THE EFFECTS OF SOY-RICH DIET ON LIPID PROFILE, LIPID PEROXIDATION AND MENOPAUSAL SYMPTOMS IN CLIMACTERIC WOMEN

KITTANA CHANDA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (NUTRITION)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004

ISBN 974-04-4809-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

Thesis
Entitled

THE EFFECTS OF SOY-RICH DIET ON LIPID PROFILE, LIPID PEROXIDATION AND MENOPAUSAL SYMPTOMS IN CLIMACTERIC WOMEN

Kittana Chanda
.....
Miss Kittana Chanda
Candidate

S. Songchitsomboon
.....
Asst. Prof. Sriwatana Songchitsomboon, D.Sc. (Nutrition)
Major-Advisor

Surat Komindr, M.D.
.....
Prof. Surat Komindr, M.D.
Co-Advisor

Jittima Manonai
.....
Assoc. Prof. Jittima Manonai, M.D.
Co-Advisor

Rassm Hoon
.....
Assoc. Prof. Rassmidara Hoonsawat, Ph.D.
Dean
Faculty of Graduate Studies

Emorn Wasantwisut
.....
Assoc. Prof. Emorn Wasantwisut, Ph.D.
Chair
Master of Science Programme in Nutrition,
Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital

Copyright by Mahidol University

Thesis
Entitled

THE EFFECTS OF SOY-RICH DIET ON LIPID PROFILE, LIPID PEROXIDATION AND MENOPAUSAL SYMPTOMS IN CLIMACTERIC WOMEN

was submitted to the Faculty of Graduate Studies, Mahidol University
for the degree of Master of Science (Nutrition)
on
May 6, 2004

Kittana Chanda
.....
Miss Kittana Chanda
Candidate

S. Songchitsomboon
.....
Asst. Prof. Sriwatana Songchitsomboon, D.Sc. (Nutrition)
Chair

.....
Prof. Surat Komindr, M.D.
Member

N. Boontaveeyuwat
.....
Assoc. Prof. Naiyana Boontaveeyuwat
Ph.D. (Biotechnology)
Member

Jittima Manonai
.....
Assoc. Prof. Jittima Manonai, M.D.
Member

.....
Assoc. Prof. Rassmidara Hoonsawat, Ph.D.
Dean
Faculty of Graduate Studies
Mahidol University

Prakit Vathesatogkit
.....
Prof. Prakit Vathesatogkit, M.D., A.B.I.M., FRCP.
Dean
Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital
Mahidol University

Copyright by Mahidol University

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and sincere appreciation to my advisor, Assistant Professor Dr. Sriwatana Songchitsomboon for her valuable advice, timeless supervisor, guidance, encouragement, and constructive criticism, which enable me to successful by complete this thesis.

Appreciation is also extended to my co-advisor, Professor Surat Komindr, M.D. and Associated Professor Jittima Manonai, M.D. for their guidance, support, and suggestions.

I am very grateful for Associated Professor Dr. Jeong Hwa Hong (School of Food Science, Inje University, Korea), all staffs at the Unifood Tech Laboratory (Kimhae, Korea), and Mr. Kyung Hwa Hong (Managing director, NutraTech. Co., Ltd., Thailand) for their excellent technical assistance in analysis of isoflavones in food and blood samples.

I sincerely thank Associated Professor Dr. Naiyana Boontaveeyuwat for her helpful comments and kindness.

I would like to thank Dr. Orawan Phukitwattananon for her advice in lipid peroxidation measurement. My sincere thanks go to all of my volunteers for their attention during the period of research.

My thanks also extended to all of my friends for their help and encouragement.

I wish to express my infinite gratitude and most appreciation to my family for their love, understanding and morale support that has kept my spirit up to accomplish this work.

This study was supported in part by a grant from the Thai Health Promotion Foundation

Kittana Chanda

Copyright by Mahidol University

THE EFFECTS OF SOY-RICH DIET ON LIPID PROFILE, LIPID PEROXIDATION AND MENOPAUSAL SYMPTOMS IN CLIMACTERIC WOMEN.

KITTANA CHANDA 4336565 RANU/M

M.Sc. (NUTRITION)

THESIS ADVISORS: SRIWATANA SONGCHITSOMBOON, D.Sc. (NUTRITION), SURAT KOMINDR, M.D., JITTIMA MANONAI, M.D.

ABSTRACT

Soybean consumption has been shown to have many health benefits, such as improving blood lipid profile and relieving menopausal symptoms. After the US FDA (the United States Food and Drug Administration) stated that 25 grams of soy protein a day, as part of a diet low in saturated fat and cholesterol, may reduce the risk of heart disease, there has been an increasing focus in the use of soy for health improvement.

The purpose of this study was to investigate the capacity of a soy-rich diet to decrease cardiovascular risk factors and menopausal symptoms in climacteric women.

Thirty-seven climacteric women (aged 40-59 years) participated in this randomized, crossover trial with two 12-wk diets and a 4-wk washout period before and between treatments. The study diets consisted of a control diet (soy-free diet) and soy-rich diet (25 g of soy protein in various forms of soy foods, containing 50 mg isoflavones daily, substituted for animal protein as a part of their habitual diet with their own recipes). Subjects were asked to fill-in a daily soy food consumption checklist and maintain a consistent level of physical activity throughout the period. During both dietary periods, they consumed self-selected diets with low fat and low cholesterol foods. Fasting blood samples, vaginal cytology examinations and blood pressure (BP) were performed before and after the 12-wks of each treatment period. Menopausal symptoms and anthropometric measurement were evaluated at all visits.

After 12 weeks of both soy-rich and control diet periods, LDL-C (low density lipoprotein cholesterol) were significantly reduced by 18 and 8% whereas HDL-C (high density lipoprotein cholesterol) were significantly increased by 20 and 21%, respectively but no significant difference between periods was observed. Significant reduction in TC (total cholesterol), 7.9%, was only observed after 12 weeks on the soy-rich diet. Although, significant reduction in plasma lipid hydroperoxides and systolic blood pressure (BP) were shown only in soy-rich diet period, percentages of change between two periods were not significantly different. No significant differences in parameters of vaginal cytology (KPI, MV, MI, and vaginal health index) between soy-rich and control diet period were observed. In addition, compared with baseline, significant reductions ($p < 0.05$) in total score of the Greene Climacteric Scale were observed after 4, 8 and 12 weeks of soy-rich diet period but no significant differences were observed during the control diet period.

In this study, the data suggest that a soy-rich diet is more helpful than a control diet in lowering serum total cholesterol and relieving menopausal symptoms but no more effective for improving LDL-C, HDL-C level and vaginal cytology.

KEY WORDS: SOY PROTEIN / ISOFLAVONE / MENOPAUSAL SYMPTOMS / CLIMACTERIC WOMEN / SERUM LIPID / LIPID PEROXIDATION / VAGINAL CYTOLOGY

120 pp. ISBN 974-04-4809-7

Copyright by Mahidol University

ผลของการกินอาหารที่มีปริมาณของถั่วเหลืองมากต่อระดับไขมันและไลปิดเปอร์อ็อกซิเดชั่นในเลือด และอาการจากภาวะหมดระดูของหญิงวัยทอง (THE EFFECTS OF SOY-RICH DIET ON LIPID PROFILE, LIPID PEROXIDATION AND MENOPAUSAL SYMPTOMS IN CLIMACTERIC WOMEN)

กิตฌา จันทร์ดา 4336565 RANU/M

วท.ม. (โภชนศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์, วท.ด. (โภชนศาสตร์), สุรัตน์ โคมินทร์, พ.บ., จิตติมา มโนนัย, พ.บ.

บทคัดย่อ

เนื่องจากถั่วเหลืองมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ในหลายๆด้าน ตัวอย่างเช่น ลดระดับไขมันในเลือดซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ และบรรเทาอาการต่างๆจากภาวะหมดระดู เป็นต้น องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาได้ให้คำแนะนำแก่ประชาชนว่า การบริโภคโปรตีนจากถั่วเหลืองอย่างน้อย 25 กรัมต่อวัน ร่วมกับการรับประทานอาหารที่มีไขมันอิ่มตัวและโคเลสเตอรอลต่ำ สามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจได้ ทำให้มีประชาชนบริโภคถั่วเหลืองเพื่อรักษาสุขภาพในจำนวนมากขึ้น การวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของอาหารที่มีปริมาณของถั่วเหลืองมากต่อระดับไขมันในเลือดซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ และอาการต่างๆจากภาวะหมดระดูของหญิงวัยทอง

อาสาสมัครเป็นผู้หญิงวัยทองทั้งหมด 37 คน (อายุ 40-59 ปี) เข้าร่วมในการวิจัยจนสิ้นสุดการทดลอง การวิจัยประกอบด้วย 2 ช่วงเวลา คือ ช่วงรับประทานอาหารที่มีถั่วเหลืองมาก และช่วงควบคุม(งดถั่วเหลือง) ช่วงละ 12 สัปดาห์ และมีช่วงพัก 4 สัปดาห์ ก่อนที่จะสลับช่วงระหว่างกลุ่ม ซึ่งอาสาสมัครทั้งหมดจะถูกแบ่งแบบสุ่มเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับอาหารจากถั่วเหลืองก่อน และกลุ่มที่จะได้รับภายหลัง ทั้งสองกลุ่มได้รับการแนะนำให้เลือกรับประทานอาหารที่มีไขมันและโคเลสเตอรอลต่ำตลอดการวิจัย และเมื่ออยู่ในช่วงที่ต้องรับประทานอาหารจากถั่วเหลือง อาสาสมัครจะได้รับอาหารจากถั่วเหลืองเพื่อทดแทนเนื้อสัตว์บางส่วนตามที่ผู้วิจัยจัดให้ (ซึ่งจะทำให้ได้รับโปรตีนจากถั่วเหลืองอย่างน้อย 25 กรัม และได้สารไอโซฟลาโวน 50 มก. ต่อวันโดยเฉลี่ย) อาสาสมัครจะได้รับการเจาะเลือด, ตรวจภายใน, วัดความดันโลหิต และ วัดสัดส่วนร่างกาย ก่อน ระหว่างและหลังสิ้นสุดแต่ละช่วงของชนิดอาหาร ผลการศึกษาพบว่าระดับแอลดีแอล-โคเลสเตอรอล ลดลง (18 และ 8%) และเอชดีแอล-โคเลสเตอรอล เพิ่มขึ้น (20 และ 21%) ในช่วงถั่วเหลืองและช่วงควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างของร้อยละของการเปลี่ยนแปลงระหว่างทั้งสองช่วงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบว่าระดับโคเลสเตอรอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (7.9%) เฉพาะช่วงถั่วเหลือง ระดับไลปิดเปอร์อ็อกไซด์และความดันโลหิตซิสโตลิคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงถั่วเหลือง แต่เมื่อดูเป็นร้อยละของการเปลี่ยนแปลงระหว่างช่วงของชนิดอาหารทั้งสองไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับผลการตรวจทางเซลล์วิทยาของช่องคลอด การศึกษานี้ไม่พบความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งระหว่างก่อนและหลังรับประทานอาหารแต่ละชนิด และระหว่างช่วงของชนิดอาหารทั้งสอง ในขณะที่อาการจากภาวะหมดระดู (คะแนนรวมจากแบบประเมิน)ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังสัปดาห์ที่ 4, 8 และ 12 ในช่วงถั่วเหลือง แต่ในช่วงควบคุมไม่พบความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการวิจัย จึงสรุปได้ว่า การบริโภคอาหารที่มีปริมาณของถั่วเหลืองมาก สามารถช่วยลดระดับโคเลสเตอรอล และอาการจากภาวะหมดระดูได้ดีกว่า แต่ไม่ช่วยให้ระดับแอลดีแอล-โคเลสเตอรอล, เอชดีแอล-โคเลสเตอรอล และผลทางเซลล์วิทยาของช่องคลอด ดีขึ้นมากกว่าเมื่อเทียบกับอาหารปกติที่ไม่มีส่วนประกอบของถั่วเหลือง

120 หน้า. ISBN 974-04-4809-7

Copyright by Mahidol University

CONTENTS

Page

ACKNOWLEDGEMENTS..... **iii**

ABSTRACT (ENGLISH)..... **iv**

ABSTRACT (THAI)..... **v**

LIST OF TABLES..... **ix**

LIST OF FIGURES..... **xi**

LIST OF ABBREVIATIONS..... **xii**

CHAPTER

1 INTRODUCTION..... 1

Objectives of the study..... 3

2 LITERATURE REVIEW..... 4

2.1 Cardiovascular disease risk factor..... 4

2.2 Soy and isoflavones (IF)..... 5

2.3 Soy and cardiovascular disease..... 9

2.4 Soy and menopause..... 11

2.5 Soy and cancer..... 13

3 MATERIALS AND METHODS..... 14

3.1 Experimental design..... 14

3.2 Sample size..... 14

3.3 Subjects recruitment..... 15

3.4 Intervention..... 16

3.5 Measurements..... 20

3.5.1 Dietary assessment..... 21

3.5.2 Anthropometric assessment..... 21

Copyright by Mahidol University

CONTENTS (cont.)

Page

3 MATERIALS AND METHODS (cont.)

3.5.3 Biochemistry assessment..... 22

3.5.3.1 Serum analysis..... 22

3.5.3.2 Plasma lipid peroxidation..... 23

3.5.3.3 Conjugated dienes..... 23

3.5.4 Vaginal cytology assessment..... 23

3.5.5 Menopausal symptoms assessment..... 23

3.6 Statistical analysis..... 24

4 RESULTS..... 25

4.1 General characteristics of the subjects..... 25

4.2 Compliance..... 30

4.3 Biochemical and blood pressure measurements..... 34

4.4 Anthropometric assessments..... 37

4.5 Vaginal cytology and menopausal symptoms assessments..... 39

5 DISCUSSION..... 42

6 CONCLUSION..... 47

REFERENCES..... 49

APPENDIX..... 57

APPENDIX A The health history and general data questionnaire..... 58

APPENDIX B The soy-food frequency questionnaire..... 62

APPENDIX C The 3-day food record form..... 68

APPENDIX D The menopausal symptoms questionnaire (MSQ)..... 71

APPENDIX E Menopausal hand-book..... 72

Copyright by Mahidol University

CONTENTS (cont.)

Page

APPENDIX (cont.)

APPENDIX F Determination of glucose……... 88

APPENDIX G Determination of total cholesterol…….. 91

APPENDIX H Determination of triglycerides……... 94

APPENDIX I Determination of HDL cholesterol and calculation of LDL cholesterol…... 97

APPENDIX J Determination of uric acid……. 101

APPENDIX K Determination of plasma lipid peroxidation (plasma lipid hydroperoxides)…….. 104

APPENDIX L Determination of plasma conjugated dienes…….. 106

BIOGRAPHY……... 107

Copyright by Mahidol University

LIST OF TABLES

Page

Table 2.1 Risk classification of hypercholesterolemia in patients without …….. 5 coronary heart disease

Table 3.1 Items and amounts of soyfoods offered to subjects for 7 days……19

Table 3.2 The study schedule…….20

Table 4.1 General characteristics of the climacteric women at the …….. 26 preparation period

Table 4.2 Numbers and percentages of the climacteric women reported …….... 27 the menopausal symptoms rating on the Greene Climacteric Scale at the preparation period (n = 37)

Table 4.3 The Greene Climacteric Scale (n = 37) at the preparation period…….28 (mean ± SEM)

Table 4.4 Calculated dietary intake from 24-hr recalled (n = 37) at the……... 28 preparation period (mean ± SEM)

Table 4.5 Blood lipid, lipid hydroperoxides, conjugated dienes, glucose…….29 and uric acid at the beginning of dietary program (mean± SEM)

Table 4.6 Daily consumption of soy foods in the soy-rich diet period……. 31 (mean ± SEM)

Table 4.7 Average soy foods intake (servings/ 7 days) classified by types ..…... 32 of soy-food during soy-rich diet period (mean ± SEM)

Table 4.8 Average energy and macronutrients intakes (n = 37) during ……..… 33 control diet and soy-rich diet (mean ± SEM)

Copyright by Mahidol University

LIST OF TABLES (cont.)

Page

Table 4.9 Percentages of change of energy and macronutrients intake…… 33
after treatment diet (mean ± SEM) (n = 37)

Table 4.10 Comparison of biochemical parameters and blood pressure ……... 35
(n = 37) during control diet and soy-rich diet period
(mean ± SEM)

Table 4.11 Mean of percentages of change of blood lipid profile, lipid …… 36
hydroperoxides, conjugated dienes, glucose, uric acid and
blood pressure after treatment diet (n = 37)

Table 4.12 Anthropometric measurement (overall; n = 37) during control…… 38
diet and soy-rich diet (mean ± SEM)

Table 4.13 The changes of karyopyknotic index (KPI), maturation value……..... 40
(MV), vaginal pH and maturation index (MI) during control diet
and soy-rich diet (mean ± SEM) (n = 36)

Table 4.14 The Greene Climacteric Scale (GCS) during control diet……..... 41
(mean ± SEM) (n = 37)

Table 4.15 The changes of the Greene Climacteric Scale (GCS) which…….……41
observed during the soy-rich diet period (mean ± SEM) (n = 37)

Copyright by Mahidol University

LIST OF FIGURES

Page

Figure 2.1 Structures of the phytoestrogens……. 6

Figure 2.2 Chemical structures of the isoflavones found in soybeans…… 6

Figure 2.3 Formation of enterolactone and enterodiol by human fecal flora……. 7

Figure 2.4 Proposed metabolic pathways for the catabolism of daidzein and…… 8 genistein by human gut bacteria

Figure 3.1 Experimental design…….. 14

Copyright by Mahidol University

LIST OF ABBREVIATIONS

A	=	age
BMI	=	body mass index
CAD	=	coronary artery disease
CHD	=	coronary heart disease
C.I.	=	confidence interval of the difference
CVD	=	cardiovascular disease
CV	=	coefficient of variance
dL	=	deciliter
e.g.	=	exampli gratia; for example
ER	=	estrogen receptor
FBG	=	fasting blood glucose
FFQ	=	fod frequency questionnaire
FOX2	=	the Ferrous oxidation-xylenol orange method, version 2
g	=	gram
GCS	=	the Greene climacteric scale
gr	=	group
H	=	height
HDL-C	=	high density lipoprotein cholesterol
hr	=	hour
HRT	=	hormone replacement therapy
IF	=	ioflavones
ISP	=	isolated soy protein
kcal	=	kilocalorie
kg	=	kilogram
KPI	=	karyopycnotic index
L	=	liter
LDL-C	=	low density lipoprotein cholesterol

Copyright by Mahidol University

LIST OF ABBREVIATIONS (cont.)

mg	=	milligram
MI	=	vaginal cell maturation index
mm-Hg	=	millimeter-mercury
mmol	=	millimole
MSQ	=	menopausal symptoms questionnaire
MV	=	maturation value
n	=	number of samples
NCEP	=	the National cholesterol education program
PE	=	phytoestrogens
Ref	=	reference
SD	=	standard deviation
SEM	=	standard error of mean
SP	=	soy protein
SPSS	=	statistical package for the social sciences
TC	=	total cholesterol
TG	=	triglycerides
µM	=	micromole per liter
US FDA	=	the United states food and drug administration
VHI	=	vaginal health index
vs.	=	versus
W	=	weight
WHR	=	waist-over-hip circumference ratio
wk	=	week

Copyright by Mahidol University

CHAPTER 1
INTRODUCTION

At present, mankind has a longer life expectancy than the past as a result of improvement in medicine and public health evolution. The data from Institute for Population and Social Research showed that the life expectancy at birth for Thai men and women are 69.9 and 74.9 years, respectively [1]. In addition, the study from the Human Resources Planning Division, Office of the National Economic and Social Development Board found that the number of Thai women aged between 40-59 years old increased every year. By the year 2002, it was estimated that there were about 7.2 million Thai women of this age and increased to 7.4 and 7.6 million in the year 2003 and 2004, respectively [2].

Golden age or menopausal period refers to a transitional phase of women's life, which ovarian function and hormonal production decline, especially estrogen, cause both physically and psychologically changes. For Thai women, average age of menopause is about 50.1 ± 4.7 (mean ± SD) years [3]. During this period, loss of ovarian follicular activities and changes of hormonal level cause many unpleasant symptoms called menopausal or climacteric symptoms as follow; hot flashes, night sweat, mood swing, headache & insomnia, depressed feeling, vaginal dryness, vaginitis, skin dryness, muscle or joint or back pain, etc. Moreover, there is an increased risk of atherosclerosis and coronary heart disease in menopausal women [4, 5]. Decrease in endogenous estrogen levels during menopause coincide with higher levels of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and triglycerides (TG) and equal or lower high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels in postmenopausal women [6-8].

Charuraks et al (1994) showed that mean concentrations of TC of female workers in Bangkok were increased as age increased [9]. Chooprapawan (2000) also reported that mortality rates of Thai women from cardiovascular diseases were

Copyright by Mahidol University

increased as age increased (106.5, 520.9 and 2017.0 per 100,000 for group aged between 45-59, 60-74 and >75 years old, respectively) [10].

Many studies showed that the prevalence of climacteric symptoms in Thai menopausal women tended to increase every year: 51, 72, 71 and 98 % in 1988, 1992, 1996 and 1997, respectively [11-14]. Cheewaroungroj et al (2000) found that Thai menopausal women (aged between 40-59 years old, n=272) had one or more climacteric symptoms [15]. The prevalence rates of vasomotor, psychological, skin-musculoskeletal, and urogenital symptoms were 79, 75, 93 and 74 %, respectively.

Since the year 2000, 'Menopausal clinics' were established in the hospitals regulated by Ministry of Public Health. One of their treatments was 'Hormone Replacement Therapy' (HRT). It has been shown that HRT can reduce climacteric symptoms in menopausal women [16, 17]. Unfortunately, numerous studies also have shown that HRT increases the risk of breast cancer, endometrial cancer, and has side effects such as weight gain, bloating, irritability and nausea[18, 19]. In addition, recently study showed that HRT cannot be recommended for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease approach[20]. At present, it is still unclear about benefits and hazards of long-term HRT supplement.

Soybeans and soyfoods are the most significant dietary sources of isoflavones, one of phytoestrogens. Phytoestrogens are estrogenic compounds found in plants that show effects suggestive of estrogenicity, such as binding to the estrogen receptor (ER), induction of specific estrogen-responsive gene products, although weakly in comparison to estradiol [21]. Furthermore, several studies suggested a protective effect of soy or soybean isoflavones against several types of cancers, such as breast, colon, and prostate cancer [22-24].

In 1995, Anderson et al conducted a meta-analysis of 38 clinical trials showed that consumption of soy protein, rather than animal protein significantly decreased serum concentrations of TC (9.3%), LDL-C (12.9%), and TG (10.5%). In summary, they suggested that soy estrogens (phytoestrogens) may be responsible for most of the hypocholesterolemic effects of soy protein [25].

In 1999, the United States Food and Drug Administration (US FDA) stated that " Including 25 grams of soy protein a day, as part of a diet low in saturated fat and cholesterol, may reduce the risk of heart disease " [26].

Copyright by Mahidol University

Lipid peroxidation appears to be a highly significant consequence of oxidative stress in injured human arterial walls, contributing to the development of atherosclerotic lesions [27]. Detection of end products of lipid peroxidation is the evidence most frequently quoted for a role of free radicals in human disease or tissue injury by toxins. There were some studies showed that soy isoflavones can act as antioxidants directly or indirectly through the enhancement of antioxidant enzyme activities [21]. In addition, Albertazzi et al (1998) showed that 60 g of isolated soy protein (ISP) added daily to the diet was significantly superior to placebo (casein) in reducing the mean number of hot flashes/ day after 4, 8, and 12 weeks of treatment ($p<0.01$) in postmenopausal women [28].

Nevertheless, no dietary modification with corporate soyfoods in habitual diet has been conducted in Thai climacteric women before. The aim of this study was to explore the effects of soy-rich diet (soy protein 25 g/ day) on lipid profiles, plasma lipid peroxidation, and menopausal symptoms in Thai climacteric women. It is hoped that the data could be helpful for adjusting dietary manipulations on the prevention of hyperlipidemia and menopausal symptoms, instead of imported lipid-lowering drugs, synthetic hormones, or expensive food supplements.

Objectives of the Study

1. To determine the effects of soy-rich diet consumption on serum lipid profiles in climacteric women.
2. To determine the effects of soy-rich diet consumption on menopausal symptoms in climacteric women.
3. To determine the effects of soy-rich diet consumption on plasma lipid peroxidation in climacteric women.
4. To compare the effects of soy-rich diet consumption with well-balanced diet (control diet) on serum lipid profiles, menopausal symptoms, and plasma lipid peroxidation in climacteric women.
5. To investigate the effects of soy-rich diet consumption on vaginal cell maturation index in climacteric women.

Copyright by Mahidol University

CHAPTER 2
LITERATURE REVIEW

2.1 Cardiovascular disease risk factor

A large number of epidemiologic, angiographic and postmortem studies have documented a causal relationship between the elevated serum total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) and triglyceride levels and the genesis of coronary heart disease (CHD) or cardiovascular disease (CVD).

Each 1% increase in serum cholesterol has been estimated to give a 2-3 % increase in CVD risk. The National Cholesterol Education Program (NCEP) has developed upper and lower limits for risk profiling shown in Table 2.1 [29]. Elevated plasma triglyceride levels (>200 mg/dL or 2.26 mmol/L) are associated with increased CHD risk [30] and strongly correlated with several potentially atherogenic metabolic aberrations, including reduced levels of high-density lipoprotein (HDL); increased levels of denser (more atherogenic) LDL species; insulin resistance; and prothrombotic changes including increased concentrations of platelet activator inhibitor-1. Because these factors are linked, it is difficult to determine which are the most direct causes of atherogenesis. It is generally assumed that they all contribute to the increased CHD risk where triglyceride levels are high. In contrast, HDL-cholesterol (HDL-C) levels are inversely related to CHD risk. In general, individuals with low HDL-C levels are at a higher risk regardless of their total cholesterol concentrations [31].

Copyright by Mahidol University

Table2.1 Risk classification of hypercholesterolemia in patients without coronary heart disease.

Classification	Total cholesterol level	LDL-C level	HDL-C level
▪ **Desirable**	< 200 mg/dL (<5.15 mmol/L)	<130 mg/dL (<3.35 mmol/L)	≥ 60 mg/dL (≥ 1.55 mmol/L)
▪ **Borderline high risk**	200 -239 mg/dL (5.15 - 6.20 mmol/L)	130- 159 mg/dL (3.35- 4.10 mmol/L)	35 -59 mg/dL (0.90–1.55 mmol/L)
▪ **High risk**	≥ 240 mg/dL (≥ 6.20 mmol/L)	≥ 160 mg/dL (≥ 4.15 mmol/L)	< 35 mg/dL (< 0.90 mmol/L)

LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol;
HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol
Reprinted from *National Cholesterol Education Program. Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (adult treatment panel II).* Bethesda, MD. : National Cholesterol Education Program, National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, 1993; DHSS publication no. (NIH) 93-3095:5.

2.2 Soy and isoflavones (IF)

Phytoestrogens (PE) are estrogenic compounds found in plants, such as beans, cabbage, soybean, grains and hops that show effects suggestion of estrogenicity, such as binding to the estrogen receptor (ER), induction of specific estrogen-responsive gene products [21, 32]. PE can be divided into three main classes: isoflavones, coumestans, and lignans. All are diphenolic compounds with structural similarities to natural and synthetic estrogens and antiestrogens (Figure 2.1) [21].

Isoflavone (IF) precursors are found in soy and other types of bean, clover and alfalfa (Figure 2.2). Lignan precursors are found in whole grains, seeds (especially flaxseed), fruits, vegetables, rye, millet, and legumes (Figure 2.3). The richest source of dietary phytoestrogen for human is soybeans and soy-based food products.

Copyright by Mahidol University

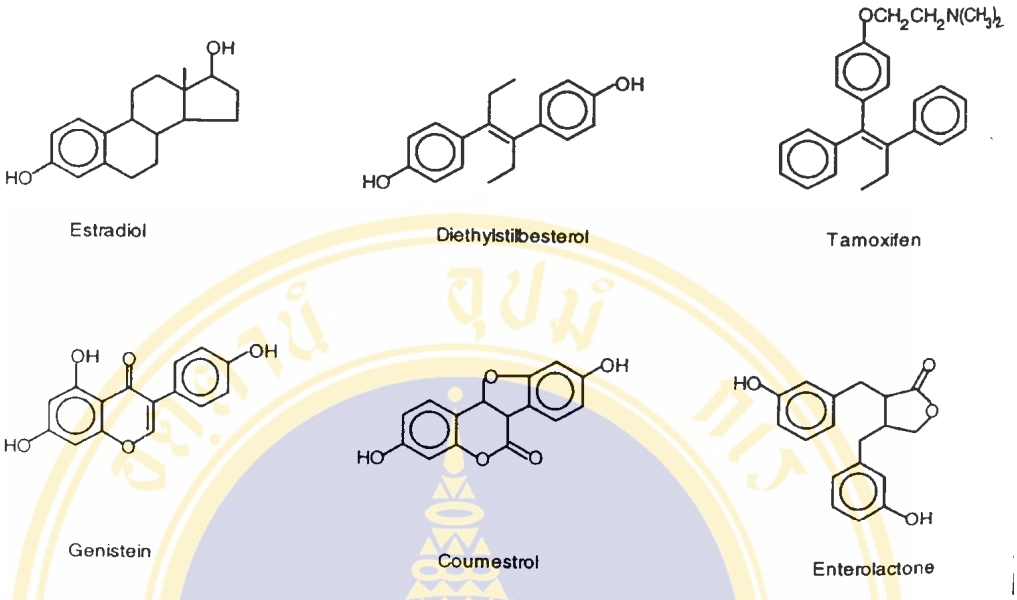
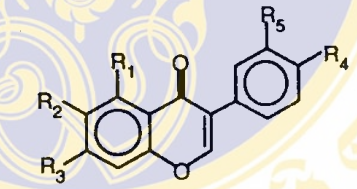


Figure 2.1 Structures of the phytoestrogens: genistein (isoflavone), coumestrol (coumestan), and enterolactone (lignan) for comparison with estradiol (natural estrogen), diethystibestrol (synthetic estrogen), and tamoxifen (synthetic antiestrogen). From Ref.[21].



Isoflavone	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Daidzein	H	H	OH	OH	H
Genistein	OH	H	OH	OH	H
Glycitein	H	OCH_3	OH	OH	H
Daidzin	H	H	O-glucoside	OH	H
Genistin	OH	H	O-glucoside	OH	H
Glycitin	H	OCH_3	O-glucoside	OH	H
Formononetin	H	H	OH	OCH_3	H
Biochanin A	OH	H	OH	OCH_3	H

Figure 2.2 Chemical structures of the isoflavones found in soybeans. Daidzein, genistein, and glycitein are also present as acetylglucosides (6”-O-acetyldaidzin, 6”-O-acetylgenistin, 6”-O-acetylglycitin) and malonylglucosides (6”-O-malonyldaidzin, 6”-O-malonylgenistin, 6”-O-malonylglycitin). From Ref.[21].

Copyright by Mahidol University

The main isoflavones of soy are genistein and daidzein, and their respective glucosidic components are genistin and daidzin. Once ingested, genistin and daidzin are hydrolyzed in the intestines by bacterial β-glucosidases and are converted to corresponding bioactive aglycones (genistein and daidzein) [33]. Daidzein is further partially metabolized to equol and O-desmethylangiolensin (O-DMA)[34], whereas genistein is metabolized to p-ethylphenol in the colon [33]. Absorbed isoflavone metabolites undergo enterohepatic circulation and may be excreted in the bile, deconjugated by intestinal flora, reabsorbed, reconjugated by the liver, and excreted in the urine (Figure 2.4). Concentrations of the different isoflavone metabolites vary widely between individuals even when a controlled quantity of an isoflavone supplement is administered [34].

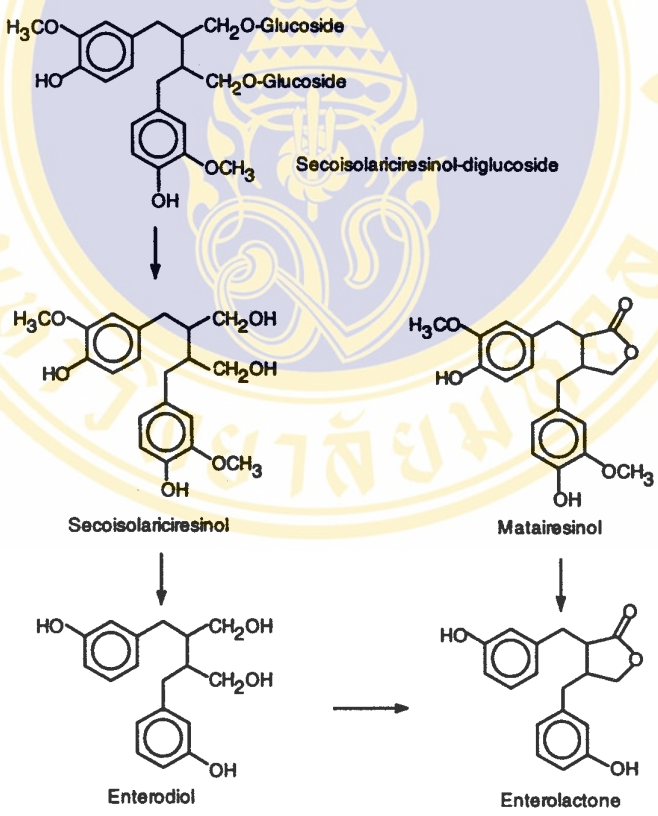


Figure 2.3 Formation of enterolactone and enterodiol by human fecal flora. The plant lignans secoisolariciresinol diglucoside is metabolized to enterodiol through hydrolysis of the sugar moiety, dehydroxylation, and demethylation. Enterodiol can then be further oxidized to enterolactone. Matairesinol is converted to enterolactone by gut bacteria through dehydroxylation and demethylation. From Ref.[21].

Copyright by Mahidol University

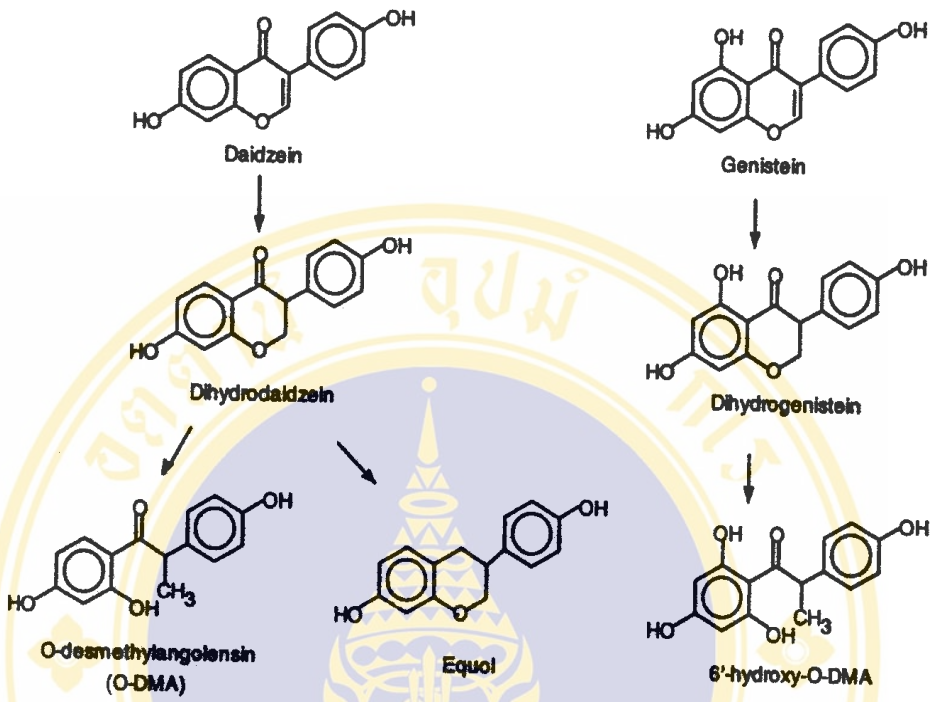


Figure 2.4 Proposed metabolic pathways for the catabolism of daidzein and genistein by human gut bacteria. The formation of O-DMA from daidzein and 6'-hydroxy-O-DMA from genistein likely involves several reduction reactions. The formation of equol from dihydrodaidzein may go through reduction, dehydration, and further reduction reactions. From Ref.[21].

Isoflavones may act as both estrogen agonists and antagonist. The estrogenic activity of IF is generally much less than that of human estrogen, ranges from 1/500 to 1/1000 of the activity of estradiol [21, 32, 35, 36]. IF at concentration 100-1000 times that of estradiol (the probable levels in human plasma after regular consumption of soy products), it has been proposed that IF may be able to compete effectively with endogenous mammalian estrogens, bind to estrogen receptor, and prevent estrogen-stimulated growth in mammals [23]. Consequently, it has been suggested that they might partly suppress or inhibit normal estrogenic activity in estrogen-responsive tissues such as breast tissue and may reduce the risk of breast cancer [32]. The effects of IF are tissue specific owing to presence of different type of estrogenic receptors (α or β) across various tissues, which may play different roles in gene regulation. Many authors have suggested that soy IF may affect plasma lipid concentrations through their estrogenic action.

Copyright by Mahidol University

2.3 Soy and cardiovascular disease

Soy can be an effective guard against diseases of heart and blood vessels (cardiovascular disease), including atherosclerosis, coronary heart disease, heart attack, stroke, and high blood pressure. A hallmark of coronary heart disease is high cholesterol level, especially increased LDL-C level [37]. Numerous research studies have shown that adequate amounts of soy protein substituted for animal protein in diet reduce blood total cholesterol and LDL-C in humans. In addition, the decrease in blood cholesterol has generally been greater in hypercholesterolemic than in normocholesterolemic subjects [38].

In 1995, a meta-analysis of 38 controlled clinical trials carried out by Anderson et al demonstrated that soy protein intake averaged 47 g/d , rather than animal protein significantly decreased serum TC (23.2 mg/dL, 9.3%), LDL-C (21.7 mg/dL, 12.9%), and triglycerides (13.3 mg/dL, 10.5%). The changes in serum cholesterol and LDL-C concentrations were related to the initial serum cholesterol concentration ($p<0.001$). The ingestion of soy protein was associated with a non-significant 2.4% increase in serum HDL-C. This study also suggested that soy estrogens may account for 60-70% of hypocholesterolemic effects of soy protein [25]. Nagata et al conducted an ecologic study in Japan evaluating the relationship between soy and IF intake (at a population level) with mortality from heart disease and cancer. There was a significant inverse correlation between heart disease mortality rate and soy protein consumption in Japanese women and modest correlation in men. A prospective cohort study conducted by Nagata et al showed a significant trend for decreased total cholesterol concentration with a higher intake of soyfoods in both Japanese men and women [39]. This study supports the notion that soy protein may be beneficial in lowering serum total cholesterol concentrations.

A randomized, double-blind, crossover study conducted by Washburn et al (1999) found significant declines in total cholesterol (6%) and LDL-C (7%) in perimenopausal women consuming 20 g of soy protein containing 34 mg of phytoestrogens for 6 weeks, compared with the carbohydrate placebo diet, $p<0.05$ [40]. In 1999, Crouse et al carried out a double-blind, randomized, paralleled trial for comparing the effect of casein with that of isolated soy protein (ISP) on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. Results showed that 25 g of ISP with 62 mg

Copyright by Mahidol University

of isoflavones daily intake for 9 weeks, lowered total cholesterol and LDL-C levels by 4% (p=0.04) and 6%(p=0.01), respectively, compared with casein [41].

Wangen et al (2001) conducted a randomized, crossover trial in 18 postmenopausal women throughout three 93 day periods (control, low- and high-isoflavones periods) of ISP consumption providing 7.1 ± 1.1 , 65 ± 11 , or 132 ± 22 mg isoflavones/day, respectively. The high-isoflavones diet caused significantly decrease in LDL-C level (6.5% lower, p<0.02), compared with the control diet. Nevertheless, isoflavone consumption did not significantly affect plasma concentrations of total cholesterol, HDL-C and triglycerides in this study [42]. Gardner et al (2001) determined the effect of soy protein (SP) and isoflavones on plasma lipid levels in postmenopausal, moderately hypercholesterolemic women. This study was a randomized, double-blind trial with 3 treatment group (gr): control gr (milk protein), Soy+ gr (SP containing 80 mg isoflavones) and Soy- gr (SP containing trace amounts of isoflavones) with 12 weeks periods for each group. Results showed that in the Soy+ gr significantly decreased total cholesterol (p=0.03) and LDL-C (p=0.005) levels than in the Soy- gr without significantly difference between control and either the Soy- or the Soy+ gr [43]. In contrast, Gooderham et al (1996) indicated that ISP beverage powder supplement (60 g/day for 28 day) did not alter plasma total cholesterol and HDL-C levels in male subjects (n=20) when compared with control (casein). However, this study did not determine plasma LDL-C level [44]. The study of Hodgson et al (1998) also showed that there were no significant differences in serum lipid concentration between placebo and isoflavonoid group (supplement with 55 g of isoflavonoid/day for 8 wks) [45].

Lipid peroxidation appears to be a highly significant consequence of oxidative stress in injured human arterial walls, contributing to the development of atherosclerotic lesions [27]. Detection of end products of lipid peroxidation is the evidence most frequently quoted for a role of free radicals in human disease or tissue injury by toxins. The initial products of lipid peroxidation are conjugated dienic hydroperoxides. These active substances decompose either into various aldehydes or, if the original fatty acid is arachidonic acid, into isoprostanes. All these products of degradation and decomposition are used in assessing oxidative stress, including malondialdehyde, conjugated dienes (CD), hydroperoxides (LOOH), F2-isoprostanes,

Copyright by Mahidol University

and breath gases, etc. There were some studies showed that soy isoflavones can act as antioxidants directly or indirectly through the enhancement of antioxidant enzyme activities [21]. Isoflavones have direct free-radical quenching ability, with genistein and daidzein being particularly effective. Record et al (1995) showed that genistein, the major isoflavone in soy beans, is an effective scavenger of hydrogen peroxide[46]. Nestel et al (1997) conducted the placebo-controlled, crossover trial in perimenopausal women to determine the effects of 80 mg daily isoflavones (45 mg of genistein) over 5- to 10- week periods. The results showed no significantly changes in LDL-oxidizability between isoflavone and placebo treatments whereas systemic arterial compliance (arterial elasticity) in isoflavone treatment improved 26% ($p<0.001$) compared with placebo[47].

2.4 Soy and menopause

Physiologic changes associated with menopause are thought to increase the risks of various chronic diseases, including CVD and osteoporosis. HRT has been used to alleviate these risks. However, accumulating evidence suggests that HRT may be associated with an increase risk of breast cancer. Soyfoods have been suggested as an alternative to HRT because they contain isoflavones, structurally resemble estradiol. Soy is particularly beneficial for women because of not only protective effect against breast and other hormonally influenced cancers and hypocholesterolemic response. Many studies indicate that soy in form of either isoflavone-rich protein or pure isoflavone supplements can increase bone density and reduce menopausal hot flashes in women [37].

Interest in the effect of IF on menopausal symptoms arose after analysis of epidemiological data. While the rate of hot flashes ranged from 70 to 80% in European women, this decreased by 18 and 14% in China and Singapore, respectively.

In 1990, the first study that showed certain dietary PE can exert mild estrogenic effects in postmenopausal women was conducted by Wilcox et al. In this study, 45 g of soy flour intake daily showed an increase in the vaginal cell maturation index (an indicator of estrogenic activity) [48]. Nevertheless, Murkies et al (1995) conducted a randomized, double-blind study in 58 postmenopausal women with at least 14 hot flashes per week. They were received 45 g of soy flour or wheat flour

Copyright by Mahidol University

(control) per day as supplement to their regular diet over 12 weeks. Results showed significantly decrease in hot flashes in both the soy and wheat flour groups (40% and 25%, respectively) with a rapid response in the soy flour group in six weeks. Menopausal symptom scores also decreased significantly in both groups whereas no significant changes in vaginal cytology were found [49]. Another study by Baird et al (1995) found that soyfoods supplying 165 mg of isoflavones daily resulted in an increase in the percentage of vaginal superficial cells in 19% of the soy group compared with 8% of controls; however, the results did not achieve statistical significance [50]. However, this study apparently used an unusual method of collecting vaginal cells that may have underestimation of vaginal maturation.[51]

Brzezinski et al (1997) conducted a 12-wk trial of a PE - rich diet compared with a PE-poor diet in 165 postmenopausal women (parallel study). The PE - rich diet consisted of soy drinks, tofu, miso, and flaxseed. There were significant reductions in hot flashes and vaginal dryness scores ($p=0.004$ and 0.005, respectively) in the PE – rich group compared with control diet (regular-omnivorous Israeli diet) [52]. Albertazzi et al (1998) showed that adding 60 g of ISP to daily diet of postmenopausal women for 12 weeks significantly reduced the frequency of hot flashes after 4, 8, and 12 wk compared with placebo. By the end of the 12 wk, soy group had a 45% reduction in their daily hot flashes versus a 30% reduction obtained with the placebo ($p<0.01$) [28]. Washburn et al (1999) carried out a randomized, double blind, crossover trial of perimenopausal women who were experiencing menopausal symptoms consuming isocaloric supplements containing 20 g of complex carbohydrates (placebo group), and 20 g of soy protein containing 34 mg of phytoestrogens (soy groups) given in a single dose (once daily group), and split into two equal doses (twice-daily group). Results showed that the severity of vasomotor symptoms and hypoestrogenic symptoms significantly reduced in the twice-daily soy group compared with the placebo group ($p<0.004$) [40].

In 2000, Scambia et al conducted a 12-week, randomized, double-blind trial in 39 postmenopausal women with at least 14 hot flashes per week. Twenty participants in the soy group were received 400 mg/ day of the standardized soy extract (50 mg of isoflavones daily) and 19 participants were received placebo. After 6 weeks of treatment, the soy group had a significant reduction ($p<0.001$) in the mean

Copyright by Mahidol University

point values 19 and 20 of the Greene climacteric scale (hot flashes and night sweats) compared with placebo group. However, the stardardized soy extract did not modify any other menopausal symptoms and there were no significant changes in vaginal cytology [53]. Upmalis et al (2000) conducted a double-blind, randomized, paralleled study in 177 postmenopausal women. The results showed relief in the incidence and severity of hot flashes both in the soy group (received soy isoflavone extract; total of 50 mg genistin and daidzin per day) and placebo group but no changes in vaginal cytology in either group were observed [54].

In the contrary, Nagata et al (2001) studied the association between soy product intake and the occurrence of hot flashes in Japanese women. The result showed that hot flashes were significantly inversely associated with consumption of soy products in terms of both total amount and isoflavones intake[55].

Because of unconclusive results of the benefits of soy-based diet and phytoestrogens, more research is required to monitor the effect of phytoestrogens on menopausal symptoms for using phytoestrogens as a viable alternative to HRT in the future.

2.5 Soy and cancer

A number of epidemiologic studies have examined the relationship between soy food consumption and cancer risk. Japanese men who consumed tofu more than five times a week had half the risk of prostate cancer [56]. Chinese women who consume soyfoods less than once a week have been shown to have twice the risk of breast cancer compared with women who consumed daily [57]. A review study by Messina et al (1994) suggest a protective effect of soy and isoflavones consumption against several types of cancer such as breast, colon, and prostate cancers [22].

Copyright by Mahidol University

CHAPTER 3
MATERIALS AND METHODS

3.1 Experimental design

The study was a randomized, crossover clinical trial. Subjects were randomly assigned as SC group which consumed soy-rich diet at the first period and CS group which consumed control diet (soy-free) at the first period (Figure 3.1). The protocol consisted of two 12-week diet periods separated by 4 weeks washout period for each group (SC and CS group).

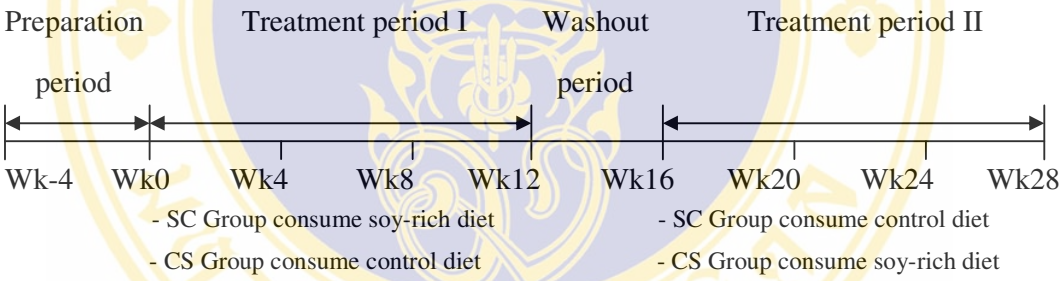


Figure 3.1 Experimental design

3.2 Sample size

Sample size of participants was calculated from the following formula [58]:

$$n = \frac{(Z_\alpha + Z_\beta)^2 S_d^2}{(d)^2}$$

α = 0.05, 2-tailed, Z_α = 1.96

β = 0.05, 95% confidence interval, Z_β = 1.64

d = mean difference between 2 groups

$S_d^2 = S_1^2 + S_2^2 - 2rS_1S_2 = (8.485)^2 + (8.2462)^2 - 2(0.5)(8.485)(8.2462) = 70.026$

(based on the study conducted by Wangen et al [42])

$$n = \frac{(1.96 + 1.64)^2 70.026}{(6)^2} = 25.2$$

Copyright by Mahidol University

The number of subjects calculated from the above formula is 26. Because of participants' compliance, the sample size of the study at the beginning is 42.

3.3 Subjects recruitment

Recruitment started in September 2002, by advertising in Faculty of Medicine, Ramathibodi hospital, Mahidol university and newspaper including personal persuasion. Those women who were interested, visited the research unit (Division of Nutrition and Biochemical Medicine, Research Center, Ramathibodi hospital) and were interview by researcher to explain further details and answer questions. Their eligibility was determined by a health history questionnaire. The inclusion criteria to the study were:

- Presence of climacteric symptoms.
- History of menstrual irregularity or have a long period of amenorrhea beginning from 3 months without pregnancy by natural or surgical removal of both ovaries (with or without hysterectomy).
- Not currently using hormone replacement therapy or using contraceptive drugs in the past 3 months.
- Non-smoker and had no history of drug or alcohol abuse.
- Not intake lipid-lowering drugs or medication known to interfere with the study in the past 3 months.
- Had no history of heart diseases, breast cancer, uterine cancer, endometrial or ovary cancer, and diabetes in the past 10 years.
- Had no history of liver and kidney disorder, and thyroid gland dysfunction.
- Not regularly consume vegetarian diet.
- Had good attitude about this study.

Of a total of 236 women contacted, 42 healthy climacteric women aged 40-59 years were recruited and randomized into two dietary intervention groups (SC and CS), 37 women completed the study. Five women withdrew from the study during the study because of their inability to comply with the study, unrelated to soy-product consumption. Of those, 27 women lived in Bangkok and surrounding districts and 10 lived in Ratchaburi province. The Ethics Committee on Human Rights Related to

Copyright by Mahidol University

Research Involving Human Subjects, Faculty of Medicine, Ramathibodi hospital, Mahidol University approved the study protocol and all participants gave written informed consent.

3.4 Intervention

At wk -4; Preparation period

At the beginning, wk –4, all subjects were interviewed about health history, habitual diet for dietary assessment (24-hr food recalled), frequency of consuming soy and soy products by the questionnaire (FFQ).

They were advised to consume weight-maintaining diets based on estimated caloric requirements which have proportion of carbohydrate: protein: fat equals to 50-55:15-20:30 and also low in saturated fat and cholesterol throughout the study. They were also asked to avoid intake of soybean, soy products and legumes for 4 weeks (preparation period) before the beginning of the dietary program. In addition, the subjects were instructed how to record their food items for 3-day food record before starting the program.

Wk 0 (Baseline; the beginning of the dietary program)

After 4 weeks of the preparation period, all of the subjects were collected their fasting blood for determining baseline of blood glucose (FBG), serum total cholesterol (TC), serum high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), serum triglyceride (TG), serum low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), serum uric acid, plasma lipid hydroperoxides and conjugated diene levels. They also had a baseline vaginal cell maturation index (MI), the karyopycnotic index (KPI), the maturation value (MV) and the vaginal health index (VHI) by vaginal cytology examination, baseline menopausal symptoms by the questionnaire(MSQ), baseline blood pressure, waist-hip ratio, skin-fold thickness, %body fat, body weight and height measurements and body mass index (BMI).

In addition, all of subjects were advised how to eat in the proportional serving sizes by using the food exchange lists model which described in the menopausal hand book from the researcher. For example, in the control diet period,

Copyright by Mahidol University

1,000 kcal of energy requirement daily, they should have dietary pattern in a day as shown below:

Food group 1: Rice, bread, pasta or wheat products	5	servings
Food group 2: Meat, poultries or fishes (lean meat)	3	servings
Food group 3: Fat and Oils	3	servings
Food group 4: Root-Vegetables	1	servings
Food group 5: Fruits	2	servings
Food group 6: Milk (skim milk)	1	serving

For the same energy requirement (1,000 kcal/ day) in the soy-rich diet period, they had to replace 2 servings of food group 2 (animal meat) with assigned soy food (as shown in Table 3.1) and consumed soy milk instead of cow milk.

Regimens for each dietary intervention group were as described below.

SC Group: *Consumed soy-rich diet (S) and then followed by control diet (C)*

After the baseline examinations (at wk0), SC group started the 12-week soy-rich diet period and received soy food which the researcher assigned for them (as shown in Table 3.1) and they were asked to record all of soy food and soy products which they consumed during the soy-rich diet period. They were allowed to consume their regular diet menus with the designated amounts of soy food at home. The researcher prepared a 4-week supply of soy food for each subject and they came to meet the researcher every 4 week to receive their new pack of soy food and being measured their anthropometry assessments. In addition, they were asked for their completed MSQ, 3-day food record and soy-food consumption check-list when they came to meet the researcher every visit.

CS Group: *Consumed control diet (C) and then followed by soy-rich diet (S)*

In the contrast of SC group, CS group consumed control diet as they consumed during preparation period. They were advised to maintain their regular diets by avoiding intake of soybean, soy products and legumes for the entire duration of the first 12-week period. They also came to meet the researcher every 4 weeks for their anthropometry assessments and their completed MSQ and 3-day food record.

Copyright by Mahidol University

Wk 12; End of the Treatment period I

At the end of the first 12-week period (Treatment period I), fasting blood were collected their and had a vaginal cytology examination for the second time. They also had the blood pressure and anthropometric measurements, and completed their MSQ and 3-day food record.

Both groups were advised to maintain their diets that give appropriate energy for maintaining their body weights but avoiding ingestion of soybean, soy products and legumes for the next 4-week washout period and maintained level of physical activity throughout the period.

Wk 16; End of the washout period

At the 16th week of the program, the end of the washout period, SC and CS groups swapped over to the other treatment. All of them came to the research unit for their fasting blood collection, vaginal cytology examination, blood pressure and anthropometric measurements, and their MSQ and 3-day food record.

After the washout period, SC group continued control diet consumption as they consumed during the washout period. They were advised for maintain their regular diets by avoiding intake of soybean, soy products and legumes for the entire duration of the next 12 weeks.

On the contrary, CS group started the 12-week soy-rich diet period and received soy foods which the researcher assigned for them (as shown in Table 3.1), the same way as SC group did on the first 12 weeks of the dietary program.

Both groups still came to meet the researcher every 4 weeks for being measured their anthropometry assessments, completed their MSQ and 3-day food record during the Treatment period II.

Wk 28; End of the Treatment period II: End of the program

At the 28th week, the end of the program, all of the subjects came to the research unit for complete their fasting blood collection, vaginal cytology examination, MSQ, blood pressure, and anthropometric measurements.

The experimental schedule was shown in Table 3.2.

Copyright by Mahidol University

Both SC and CS groups were advised to maintain their diets that give appropriate energy for the individual calculated from their ideal weights and maintained level of physical activity throughout the study.

Assessment of compliance included reminding-telephone every month and monitoring during the study by review of 3-day food record and soy-food consumption check-list, recorded by the subjects, which they gave to the researcher every visits

Table 3.1 Items and amounts of soyfoods offered to subjects for 7 days

Day	Breakfast or Lunch	Dinner	Total Soy protein (g)
1	UHT soy-milk (230 ml)	White soft tofu, 250 g	22.3
2	UHT soy-milk (230 ml)	White hard tofu, 150 g	32.5
3	UHT soy-milk (230 ml)	Vegetarian sausage, 100 g	24.9
4	UHT soy-milk (230 ml)	Texture soy protein, 30 g	21.8
5	UHT soy-milk (230 ml)	Vegetarian sausage, 100 g	24.9
6	UHT soy-milk (230 ml)	Texture soy protein, 30 g	21.8
7	UHT soy-milk (230 ml)	Vegetarian chicken, 60 g	18.8

Copyright by Mahidol University

Table 3.2 The study schedule

Wk	0	4	8	12	16	20	24	28
- Determine fasting blood glucose	X	-	-	X	X	-	-	X
- Determine serum total cholesterol	X	-	-	X	X	-	-	X
- Determine serum LDL-C	X	-	-	X	X	-	-	X
- Determine serum HDL-C	X	-	-	X	X	-	-	X
- Determine serum TG	X	-	-	X	X	-	-	X
- Determine serum uric acid	X	-	-	X	X	-	-	X
- Determine lipid hydroperoxides	X	-	-	X	X	-	-	X
- Determine conjugated dienes	X	-	-	X	X	-	-	X
- Determine vaginal cell maturation index	X	-	-	X	X	-	-	X
- Determine karyopycnotic index	X	-	-	X	X	-	-	X
- Determine maturation value	X	-	-	X	X	-	-	X
- Determine vaginal health index	X	-	-	X	X	-	-	X
- Blood pressure measurement	X	-	-	X	X	-	-	X
- Skin-fold thickness	X	-	-	X	X	-	-	X
- Body weight measurement	X	X	X	X	X	X	X	X
- Height measurement	X	X	X	X	X	X	X	X
- Report menopausal symptoms (MSQ)	X	X	X	X	X	X	X	X
- 3-day food intake records	X	X	X	X	X	X	X	X
- Soy-food consumption check-list	X	X	X	X	X	X	X	X
- Reminding-telephone	X	X	X	X	X	X	X	X
- Meeting at Ramathibodi hospital for follow up and consult	X	X	X	X	X	X	X	X

3.5 Measurements

An overview of visits and measurements is shown in Table 3.2. In total, women visited the research unit 8 times and at the outpatient clinic of Obstetrics and Gynecology 4 times. Endpoints were assessed at baseline (wk0), wk12, wk16 and wk28. Subjects were evaluated at certain on the following aspects:

Copyright by Mahidol University

- *Dietary assessment:* energy, nutrient intake and soy food intake
- *Anthropometry assessment:* weight, height, body mass index, body fat and waist-hip circumference ratio
- *Blood pressure measurement*
- *Biochemistry assessment:* serum lipid profile consisting of total cholesterol, triglycerides, HDL-C and LDL-C, fasting blood glucose, serum uric acid and plasma lipid hydroperoxides and conjugated diene levels
- *Vaginal cytology assessment:* Vaginal cell maturation index (MI), the karyopycnotic index (KI), the maturation value (MV) and vaginal health index
- *Menopausal symptoms assessment:* Menopausal symptoms questionnaire (MSQ) by the Greene Climacteric Scale (GCS)

3.5.1 Dietary assessment

At the beginning, all subjects were instructed by researcher how to record their food intake including the varieties and the amount of food consumption per day for 3-day food record. They also recorded their daily soy-food intake in the soy-food consumption check-list (Appendix B). Both record and check-list were reinterviewed by the same researcher at every visit.

Food intake data were calculated for energy and nutrient intakes using the software INMUCAL version 4.0 and the food exchange lists formula. The soy-food intake data were calculated for soy protein and macronutrients intake based on food composition analysis. The samples of soyfoods in this study were shipped on dry ice and assayed for isoflavones at the Unifood Tech Laboratory (Kimhae, Korea) using high performance liquid chromatography (HPLC).

3.5.2 Anthropometric assessment

- Body weight was measured to the nearest of 0.1 kg by the same digital scale throughout the study.
- Body mass index (BMI) was derived from body weight in kilogram divided by the square of height in meters (kg/m^2).
- %Body fat composition was measured by using bioelectrical impedance, (Tanita digital scale) [59] and calculated from the Durnin and Womersley's

Copyright by Mahidol University

formula using the sum of skinfold thickness at four-points which measured by the Harpenden's caliper [60].

- Waist over hip circumference ratio (WHR) was computed from the waist circumference divided by the hip circumference [61].

3.5.3 Biochemistry assessment

Fasting (>12 hr) blood samples were collected at wk0, wk12, wk16 and wk28. A NaF blood sample was collected for determining fasting blood glucose. A clotted blood sample was collected for determining serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and uric acid. Heparinzed blood was collected for determining plasma lipid hydroperoxides and conjugated diene. All of blood samples were immediately kept in ice-box and centrifuged at 1000X g for 10 minutes within 3 hr. Serum and plasma were stored at -70 °C until assay. Plasma lipid hydroperoxides determination was performed in the next day.

3.5.3.1 Serum analysis

Concentrations of fasting blood glucose (FBG), total cholesterol, HDL-C, triglyceride and uric acid were measured by the VITROS Slides (VITROS 250 Automated Chemistry System, Johnson & Johnson, USA). FBG was determined according to the glucose oxidase-peroxidase method of Trinder [62] and Curme et al [63]. Serum total cholesterol and triglyceride were analyzed by the enzymatic method as described by Allain et al [64] and Spayd et al [65], respectively. Before analyzing HDL-C, serum was precipitated by the VITROS Magnetic HDL-Cholesterol Reagent, according to the dextran sulfate-magnesium precipitation [66, 67]. Concentration of LDL-C was calculated from the Friedewald's equation [68]: LDL-C (mg/dL) = TC (mg/dL) – HDL-C (mg/dL) - (TG/5) (mg/dL). Uric acid concentration was measured by the enzymatic method described by Kageyama [69]and Trivedi et al [70].

A quality control material (Johnson & Johnson, level I and II) was analyzed with each set of determinations. The intra-assay coefficients of variation of control materials level I and II were 1.4-6.2, 3.6-8.5, 4.4-7.5, 6.2-9.0, and 5.1-6.1% for the determination of FBG, TC, TG, HDL-C, and uric acid, respectively.

Copyright by Mahidol University

3.5.3.2 Plasma lipid peroxidation

Plasma lipid peroxidation levels were measured in the form of plasma lipid hydroperoxides according to the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange, version 2 (FOX2) assay as described by Nourooz-Zadeh et al [71-74].

3.5.3.3 Conjugated dienes

Conjugated dienes level in plasma was measured by the spectrophotometric method as described by Hunter and Mohamed [75].

3.5.4 Vaginal cytology assessment

General gynecologic examination including pelvic examination and vaginal pH test, using pH indicator strips were performed by the same obstetrics-gynecologist. The vaginal health index was evaluates according to the methods proposed by Nachtigall [76]. This method indicates vaginal health by scoring vaginal moisture, vaginal fluid volume, vaginal elasticity, and vaginal mucosa on a scale of 1 (poorest) to 5 (best). Vaginal smear from the lateral vaginal wall was stained according to the Papanicolaou technique. The maturation index (MI) based on the classification of the vaginal epithelial cells as the percentage of parabasal, intermediate and superficial cells was scored under light microscope by a single cytopathologist who was blinded with regard to onset, type and duration of treatment and randomization number. The karyopycnotic index (KPI) (the percentage of superficial cells with pycnotic nucleus found in the total population of the squamous cells examined) and the maturation value (MV) (0 x %parabasal cells + 0.5 x %intermediate cells + 1.0 x %superficial cells) were also determined. These assessments were performed at wk 0, wk12, wk16 and wk 28 of the study.

3.5.5 Menopausal symptoms assessment

Menopausal symptoms (climacteric symptoms) of the subjects were assessed by using the menopausal symptoms questionnaire (MSQ), according to the Greene Climacteric Scale [77]. The Greene Climacteric Scale (GCS) measures a total of 21 symptoms. Each symptom is rated by the subject according to its severity using a four-point rating scale: not-at-all (0); a little (1); quite a bit (2); extremely (3).

Copyright by Mahidol University

Symptoms 1-11 address psychological symptoms divided in a measure of anxiety (a sum of symptoms 1-6) and of depression (a sum of symptoms 7-11). Somatic aspects are addressed in symptoms 12-18 and vasomotor symptoms in symptom 19 and 20. Symptom 21 is a probe for sexual dysfunction. The total Greene Climacteric Score is the sum of all 21 scores. The Greene Climacteric Scale is shown in the appendix D.

3.6 Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed with the use of the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for WINDOWS software, version 10.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Paired t-test was used when the data were normal distribution and Wilcoxon signed-rank test were used when the data were not normal distribution. The differences of percentages of change scores [(final -initial)*100/initial] between the soy-rich diet and control diet periods were tested by Paired t-test. Differences were considered significant if $p\text{-value} < 0.05$.

Copyright by Mahidol University

CHAPTER 4
RESULTS

4.1 General characteristics of the subjects

Of a total of 236 women contacted, 42 healthy climacteric women aged 40-59 years were recruited and randomized into two dietary intervention groups (SC and CS), 37 women completed the study. Five women withdrew from the study during the study because of their inability to comply with the study, unrelated to soy-product consumption. Of those, 27 women lived in Bangkok and surrounding districts and 10 lived in Ratchaburi province. The general characteristics of the climacteric women participating in the study are shown in Table 4.1. No statistically significant differences in age, weight, height and body mass index (BMI) were observed between the SC and CS groups.

At the beginning of the study, all subjects were interviewed about health history, habitual diet for dietary assessment (24-hr food recalled), frequency of consuming soy and soy products by the Greene Climacteric Scale (GCS). Evaluated initial ratings on the GCS were shown in Table 4.2. Most of them (more than 60%) rated their severities of each menopausal symptom as score 0-2 (not-at-all, a little and quite a bit). Less than 40% rated their severities as score 3 (extremely). When we considered at the sum of each menopausal symptoms cluster and total score of GCS, data showed that mean of their GCS score was not severe (less than 40% of capable maximum score). There were no significant differences of mean of the GCS score between SC and CS group at the preparation period (Table 4.3). Table 4.4 shows calculated dietary intake from 24-hr recalled at the preparation period interviewed face to face by the same researcher. No difference was found between two groups for the percentage of energy derived from total fat, protein, or carbohydrate although significant differences between SC and CS groups in protein and carbohydrate intake (g/ day) were observed. At the beginning of dietary program, biochemical parameters of the 37 women completed the study (Table 4.5) were comparable between SC and CS groups. There were no significant differences in any parameters between groups.

Copyright by Mahidol University

Table 4.1 General characteristics of the climacteric women at the preparation period

Parameter	Group		Overall (n = 37)
	SC (n = 20)	**CS** (n = 17)	
Age, years (mean ± SEM) *	53.4 ± 1.1	50.9 ± 1.3	52.2 ± 0.9
40 – 49 years (n, %)	6 (30)	6 (35.3)	12 (32.4)
50 – 59 years (n, %)	14 (70)	11 (64.7)	25 (67.6)
Weight, kg (mean ± SEM)*	57.9 ± 1.9	57.2 ± 2.0	57.6 ± 1.4
Height, m (mean ± SEM)*	1.545 ± 0.012	1.522 ± 0.010	1.535 ± 0.008
BMI, kg/m^2 (mean ± SEM)*	24.2 ± 0.6	24.7 ± 0.8	24.4 ± 0.5
18.5 – 22.9 kg/m^2 (n, %)	7 (35)	7 (41.2)	14 (37.8)
23.0 – 24.9 kg/m^2 (n, %)	5 (25)	3 (17.6)	8 (21.6)
25.0 - 29.9 kg/m^2 (n, %)	8 (40)	5 (29.4)	13 (35.1)
≥ 30 kg/m^2 (n, %)	0 (0)	2 (11.8)	2 (5.4)
Education (n, %)			
Primary school	6 (30)	4 (23.5)	10 (27.0)
Secondary school	1 (5)	0 (0)	1 (2.7)
High school	2 (10)	3 (17.6)	5 (13.5)
Diploma	2 (10)	3 (17.6)	5 (13.5)
Bachelor degree and higher	9 (45)	7 (41.2)	16 (43.2)
Marital status (n, %)			
Single	4 (20)	3 (17.6)	7 (18.9)
Married	13 (65)	9 (52.9)	22 (59.5)
Separated/ widowed	3 (15)	5 (29.4)	8 (21.6)
Occupation (n, %)			
No occupation/ house wife	8 (40)	7 (41.2)	15 (40.5)
Agriculturist	2 (10)	0 (0)	2 (5.4)
General worker	1 (5)	3 (17.6)	4 (10.8)
Private business/ merchant	6 (30)	3 (17.6)	9 (24.3)
Government/ State employee	3 (15)	4 (23.5)	7 (18.9)
Menopause (n, %)			
Irregular menstrual cycle	3 (15)	5 (29.4)	8 (21.6)
Natural amenorrhea ≥ 3 months	12 (60)	6 (35.3)	18 (48.6)
Surgical removal of both ovaries	5 (25)	6 (35.3)	11 (29.7)

* No significant differences between SC and CS groups; $p > 0.05$, Unpaired t-test

Copyright by Mahidol University

Table 4.2 Numbers and percentages of the climacteric women reported the menopausal symptoms rating on the Greene Climacteric Scale at the preparation period (n = 37)

Symptoms	Not at all (0)	A little (1)	Quite a bit (2)	Extremely (3)
1. Heart beating quickly or strongly	12 (32)	22 (60)	3 (8)	0 (0)
2. Feeling tense or nervous	9 (24)	20 (54)	8 (22)	0 (0)
3. Difficulty in sleeping	9 (24)	20 (54)	4 (11)	4 (11)
4. Excitable	14 (38)	17 (46)	4 (11)	2 (5)
5. Attacks of panic	13 (35)	16 (43)	8 (22)	0 (0)
6. Difficulty in concentrating	19 (51)	14 (38)	4 (11)	0 (0)
7. Feeling tired or lacking in energy	9 (24)	17 (46)	8 (22)	3 (8)
8. Loss of interest in most things	17 (46)	15 (41)	5 (14)	0 (0)
9. Feeling unhappy or depressed	16 (43)	19 (51)	2 (5)	0 (0)
10. Crying spells	13 (35)	20 (54)	4 (11)	0 (0)
11. Irritability	8 (22)	17 (46)	10 (27)	2 (5)
12. Feeling dizzy or faint	11 (30)	19 (51)	3 (8)	4 (11)
13. Pressure or tightness in head or body	14 (38)	14 (38)	7 (19)	2 (5)
14. Parts of body feel numb or tingling	5 (14)	20 (54)	10 (27)	2 (5)
15. Headaches	12 (32)	17 (46)	5 (14)	3 (8)
16. Muscle and joint pains	2 (5)	15 (41)	9 (24)	11 (30)
17. Loss of feeling in hands or feet	20 (54)	13 (35)	3 (8)	1 (3)
18. Breathing difficulties	21 (57)	12 (32)	3 (8)	1 (3)
19. Hot flashes	11 (30)	11 (30)	11 (30)	4 (11)
20. Sweating at night	15 (41)	10 (27)	6 (16)	6 (16)
21. Loss of interest in sex	14 (38)	8 (22)	6 (16)	9 (24)

Psychological symptoms = sum of symptoms 1-11; Anxiety symptoms = sum of symptoms 1-6; Depression symptoms = sum of symptoms 7-11; Somatic symptoms = sum of symptoms 12-18; Vasomotor symptoms = sum of symptoms 19-20 and Sexual interest is symptom 21.

Copyright by Mahidol University

Table 4.3 The Greene Climacteric Scale (n = 37) at the preparation period (mean ± SEM)

GCS *	Group		Overall (n = 37)
	SC group (n = 20)	CS group (n = 17)	
Psychological	9.8 ± 1.3	9.1 ± 1.2	9.5 ± 0.9
- Anxiety	5.5 ± 0.7	4.7 ± 0.6	5.1 ± 0.5
- Depression	4.3 ± 0.6	4.4 ± 0.6	4.4 ± 0.4
Somatic	7.4 ± 0.9	6.7 ± 1.0	7.1 ± 0.7
Vasomotor	2.3± 0.4	2.3 ± 0.5	2.3 ± 0.3
Sexual interest	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2
Total score of GCS	21.7 ± 2.3	20.2 ± 2.2	20.2± 2.2

* No significant differences between groups; $p > 0.05$, Unpaired t-test

Table 4.4 Calculated dietary intake from 24-hr recalled (n = 37) at the preparation period (mean ± SEM)

Parameter	Group		Overall (n = 37)
	SC group (n = 20)	CS group (n = 17)	
Energy, kcal / day	1,235 ± 84	1,068 ± 76	1,158 ± 58
Protein			
▪ g / day	43.1 ± 3.5*	32.2 ± 2.8*	38.1 ± 2.4
▪ % of total calorie intake	14.2 ± 0.9	12.1 ± 0.7	13.2 ± 0.6
Carbohydrate			
▪ g / day	188.6 ± 14.1*	145.6 ± 13.5*	168.8 ± 10.3
▪ % of total calorie intake	60.8 ± 1.7	59.3 ± 2.3	60.1 ± 1.4
Fat			
▪ g / day	34.3 ± 3.2	33.4 ± 4.3	33.8 ± 2.6
▪ % of total calorie intake	25.0 ± 1.5	27.7 ± 2.4	26.2 ± 1.4

* Significant differences between SC and CS groups; $p < 0.05$, Unpaired t-test

Copyright by Mahidol University

Table 4.5 Blood lipid, lipid hydroperoxides, conjugated dienes, glucose and uric acid at the beginning of dietary program (mean± SEM)

Parameter *	Group		Overall (n = 37)
	SC group (n = 20)	CS group (n = 17)	
Serum total cholesterol, mg/dL	242.1 ± 7.9	239.1 ± 9.4	240.7± 6.0
Serum LDL-C, mg/dL	166.7 ± 7.8	166.5 ± 9.0	166.6± 5.8
Serum HDL-C, mg/dL	52.7 ± 2.4	52.5 ± 3.2	52.6 ± 1.9
Serum triglycerides, mg/dL	113.6 ± 9.7	100.7 ± 9.9	107.7± 6.9
Plasma lipid hydroperoxides,µM	10.46 ± 0.60	9.18 ± 0.44	9.87 ± 0.39
Plasma conjugated dienes, OD/mL	0.87 ± 0.04	0.88 ± 0.04	0.87 ± 0.03
Fasting blood glucose, mg/dL	87.0 ± 1.9	89.2 ± 2.6	88.0 ± 1.6
Serum uric acid, mg/dL	5.1 ± 0.2	4.7 ± 0.2	4.9 ± 0.2

* No significant differences between groups; $p > 0.05$, Unpaired t-test

Copyright by Mahidol University

4.2 Compliance

Compliance was good. At every visit, to ensure that subjects maintained their dietary intervention, the food exchange lists formula was used to calculate approximated energy and macronutrients intakes to give individual's food advice. Because of limitation of soyfoods database in INMUCAL, soy protein intake during the soy-rich diet period was calculated based on food composition analysis of soy products consumed by participants. Average intakes of daily soy protein and isoflavones calculated from soy-food consumption check-list in soy-rich diet period were equally 25.6 ± 0.7 g and 51.7 ± 1.2 mg (mean ± SEM), respectively (Table 4.6). It reached our goal as attempt to give soy-protein for our subjects not less than 25 g/d. Table 4.7 shows average soy food intake classified by types during soy-rich diet period (serving size/ 7 days). There were significantly differences in macronutrients of both periods. When compared percentage of change of energy and macronutrients after both treatments, significant differences in energy, protein and cholesterol intakes were found (Table 4.9).

Copyright by Mahidol University

Table 4.6 Daily consumption of soy foods in the soy-rich diet period (mean ± SEM)

Type of soy foods	Average intake *		
	Weight (g/ day)	Soy Protein (g/day)	Isoflavones (mg/day)
UHT soy-milk			
SC group (n =20)	302.41 ± 15.46	11.19 ± 0.57	28.67 ± 1.47
CS group (n =17)	342.58 ± 18.79	12.68 ± 0.70	32.48 ± 1.78
Overall (n =37)	320.87 ± 12.30	11.87 ± 0.46	30.42 ± 1.17
White soft tofu			
SC group (n =20)	38.62 ± 3.48	2.12 ± 0.86	8.65 ± 0.78
CS group (n =17)	42.58 ± 2.43	2.34 ± 0.55	9.54 ± 0.55
Overall (n =37)	40.44 ± 2.18	2.22 ± 0.12	9.06 ± 0.49
White hard tofu			
SC group (n =20)	29.71 ± 2.52	4.75 ± 0.40	6.15 ± 0.52
CS group (n =17)	34.95 ± 4.42	5.59 ± 0.71	7.23 ± 0.92
Overall (n =37)	32.12 ± 2.45	5.14 ± 0.40	6.65 ± 0.51
Vegetarian sausage			
SC group (n =20)	15.31 ± 2.03	2.50 ± 0.33	1.68 ± 0.22
CS group (n =17)	14.38 ± 2.25	2.34 ± 0.37	1.58 ± 0.25
Overall (n =37)	14.88 ± 1.49	2.42 ± 0.24	1.64 ± 0.17
Vegetarian chicken			
SC group (n =20)	4.56 ± 0.79	0.78 ± 0.14	0.58 ± 0.10
CS group (n =17)	4.85 ± 0.76	0.83 ± 0.13	0.62 ± 0.10
Overall (n =37)	4.69 ± 0.54	0.81 ± 0.09	0.60 ± 0.07
Texture soy protein			
SC group (n =20)	3.98 ± 0.66	1.77 ± 0.29	2.94 ± 0.49
CS group (n =17)	5.21 ± 0.59	2.32 ± 0.26	3.85 ± 0.44
Overall (n =37)	4.55 ± 0.45	2.02 ± 0.20	3.36 ± 0.33
Total			
SC group (n =20)		24.80 ± 0.90	48.67 ± 1.35 †
CS group (n =17)		26.62 ± 0.93	55.29 ± 1.72 †
Overall (n =37)		25.63 ± 0.66	51.71 ± 1.19

* Calculated from the soy-food consumption check-list, based on food composition analysis data; † Significant differences between groups; $p < 0.05$, Unpaired t-test

Copyright by Mahidol University

Table 4.7 Average soy foods intake (servings/ 7 days) classified by types of soy-food during soy-rich diet period (mean ± SEM) *

Type of soy foods (quantity/ serving)	Servings/ 7 days			
	0-4 week	5-8 week	9-12 week	Average for 12 weeks †
UHT soy-milk (230 ml)				
SC group (n =20)	7.78 ± 0.64	9.07 ± 0.64	10.75 ± 0.69	9.20 ± 0.47
CS group (n =17)	9.32 ± 0.63	11.05 ± 0.65	10.91 ± 0.77	10.43 ± 0.57
Overall (n =37)	8.51 ± 0.46	9.98 ± 0.48	10.82 ± 0.51	9.77 ± 0.37
White soft tofu (250 g)				
SC group (n =20)	1.26 ± 0.14	0.99 ± 0.11	1.01 ± 0.18	1.08 ± 0.10
CS group (n =17)	0.93 ± 0.08	1.06 ± 0.10	1.59 ± 0.18	1.19 ± 0.07
Overall (n =37)	1.10 ± 0.09	1.02 ± 0.07	1.28 ± 0.13	1.13 ± 0.06
White hard tofu (150 g)				
SC group (n =20)	1.55 ± 0.16	1.29 ± 0.14	1.34 ± 0.17	1.39 ± 0.12
CS group (n =17)	1.40 ± 0.21	1.46 ± 0.19	2.03 ± 0.28	1.63 ± 0.21
Overall (n =37)	1.48 ± 0.13	1.37 ± 0.11	1.66 ± 0.17	1.50 ± 0.11
Vegetarian sausage (50 g)				
SC group (n =20)	1.98 ± 0.31	2.05 ± 0.28	2.34 ± 0.46	2.14 ± 0.28
CS group (n =17)	2.14 ± 0.33	2.03 ± 0.32	1.87 ± 0.44	2.01 ± 0.31
Overall (n =37)	2.06 ± 0.22	2.04 ± 0.21	2.12 ± 0.32	2.08 ± 0.21
Vegetarian chicken (10 g)				
SC group (n =20)	3.30 ± 0.63	3.70 ± 0.78	2.28 ± 0.51	3.19 ± 0.55
CS group (n =17)	3.95 ± 0.69	3.35 ± 0.83	2.89 ± 0.89	3.40 ± 0.53
Overall (n =37)	3.60 ± 0.46	3.54 ± 0.56	2.56 ± 0.49	3.28 ± 0.38
Texture soy protein (30 g)				
SC group (n =20)	0.38 ± 0.06	0.43 ± 0.09	0.43 ± 0.09	0.41 ± 0.07
CS group (n =17)	0.47 ± 0.09	0.80 ± 0.13	0.36 ± 0.07	0.54 ± 0.06
Overall (n =37)	0.42 ± 0.05	0.60 ± 0.08	0.40 ± 0.06	0.47 ± 0.05

* Calculated from the soy-food consumption check-list, based on food composition analysis data

† No significant differences between groups in the average servings/ 7 days; $p > 0.05$, Unpaired t-test

Copyright by Mahidol University

Table 4.8 Average energy and macronutrients intakes (n = 37) during control diet and soy-rich diet (mean ± SEM)

Parameter	Control diet		p-value*	Soy-rich diet		p-value*
	Baseline	After 12 weeks		Baseline	After 12 weeks	
Energy, kcal / day	1,261 ± 53	1,274 ± 63	0.821	1,206 ± 56	1,409 ± 45	0.001
Protein, g / day	40.8 ± 1.9	45.4 ± 2.3	0.022	42.8 ± 2.3	58.2 ± 2.5	0.000
Fat, g / day	38.0 ± 2.5	40.1 ± 2.5	0.489	37.8 ± 2.6	47.9 ± 2.3	0.001
Carbohydrate, g / day	190.1 ± 8.6	184.3 ± 9.9	0.513	174.6 ± 9.2	187.9 ± 7.1	0.078
Cholesterol, mg / day	126.4 ± 12.8	160.9 ± 13.4	0.023	160.0 ± 13.8	119.5 ± 10.1	0.012

* Statistical analysis by Paired t-test

Table 4.9 Percentages of change of energy and macronutrients intake after treatment diet (mean ± SEM) (n = 37)

Parameter	% change from baseline		95% C.I.		p-value *
	Control diet	Soy-rich diet	lower	upper	
Energy, kcal / day	4.35 ± 4.80	22.52 ± 5.10	-33.88	-2.47	0.025
Protein, g / day	14.61 ± 5.29	45.54 ± 7.79	12.07	49.78	0.002
Fat, g / day	15.95 ± 7.50	40.44 ± 8.75	-1.07	50.05	0.060
Carbohydrate, g / day	-0.16 ± 4.58	12.61 ± 4.28	-1.66	27.19	0.081
Cholesterol, mg / day	64.17 ± 20.43	-5.28 ± 11.27	28.02	110.88	0.002

* Statistical analysis by Paired t-test

Copyright by Mahidol University

4.3 Biochemical and blood pressure measurements

Levels of blood lipid profile, lipid hydroperoxides, conjugated dienes, fasting blood glucose, uric acid and blood pressure are shown in Table 4.10. After 12 weeks of control diet, there were significantly decrease in serum LDL-C, fasting blood glucose, and diastolic blood pressure and significantly increase in serum HDL-C whereas after soy-rich diet period, there were significantly decrease in serum total cholesterol, LDL-C, fasting blood glucose, plasma lipid hydroperoxides, systolic blood pressure and diastolic blood pressure and significantly increase in HDL-C. However, when compared percentage of change of those parameters after both treatment, there was significantly treatment effect on serum total cholesterol (Table 4.11). Percentage of reduction in serum total cholesterol in soy-rich diet was 2.3 times higher than control period (7.9 vs. 2.7 %).

Copyright by Mahidol University

Table 4.10 Comparison of biochemical parameters and blood pressure (n = 37) during control diet and soy-rich diet period (mean ± SEM)

Parameter	Control diet		p-value *	Soy-rich diet		p-value *
	Baseline	After 12 weeks		Baseline	After 12 weeks	
Serum total cholesterol, mg/dL	238.1 ± 5.6	229.9 ± 5.1	0.084	239.3 ± 5.5	219.3 ± 5.2	0.000
Serum LDL cholesterol, mg/dL	159.4 ± 5.5	143.0 ± 6.1	0.019	165.3 ± 5.1	134.2 ± 5.3	0.000
Serum HDL cholesterol, mg/dL	54.6 ± 2.1	63.0 ± 2.9	0.028	51.6 ± 1.8	60.6 ± 3.2	0.006
Serum triglycerides, mg/dL	120.1 ± 11.1	119.6 ± 7.6	0.965	111.7 ± 7.2	122.1 ± 10.3	0.161
Plasma lipid hydroperoxides, µM	8.55 ± 0.34	8.24 ± 0.37	0.532	9.84 ± 0.43	8.06 ± 0.35	0.001
Plasma conjugated dienes, OD/mL	0.91 ± 0.03	0.89 ± 0.03	0.480	0.87 ± 0.04	0.89 ± 0.02	0.640
Fasting blood glucose, mg/dL	87.1 ± 1.5	70.0 ± 1.8	0.000	88.9 ± 2.2	74.6 ± 1.8	0.000
Serum uric acid, mg/dL	4.9 ± 0.2	5.0 ± 0.2	0.730	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.2	0.926
Systolic blood pressure, mm-Hg	111 ± 2	110 ± 2	0.786	115 ± 2	109 ± 2	0.007
Diastolic blood pressure, mm-Hg	71 ± 2	67 ± 2	0.010	72 ± 2	68 ± 2	0.001

* Statistical analysis by Paired t-test

Copyright by Mahidol University

Table 4.11 **Mean of percentages of change of blood lipid profile, lipid hydroperoxides, conjugated dienes, glucose, uric acid and blood pressure after treatment diet (n = 37)**

Parameter	% change from baseline		95% C.I.		p-value *
	Control diet	Soy-rich diet	lower	upper	
Serum total cholesterol	-2.71	-7.94	0.25	10.21	0.040
Serum LDL cholesterol	-8.08	-18.46	-1.01	21.77	0.073
Serum HDL cholesterol	21.27	19.50	-15.85	19.39	0.840
Serum triglycerides	12.71	10.78	-20.53	24.39	0.863
Plasma lipid hydroperoxides	1.93	-12.68	-1.42	30.63	0.073
Plasma conjugated dienes	-0.28	6.15	-15.90	3.04	0.177
Fasting blood glucose	-19.21	-14.48	-12.81	3.35	0.243
Serum uric acid	2.68	1.75	-8.78	10.65	0.846
Systolic blood pressure	-0.20	-4.81	-10.07	0.86	0.096
Diastolic blood pressure	-5.74	-6.40	-5.51	6.84	0.829

* Statistical analysis by Paired t-test

Copyright by Mahidol University

4.4 Anthropometric assessments

Anthropometric assessments including height, weight, body mass index (BMI), body fat composition, waist-hip circumference ratio, and upper arm circumference were measured during the study. Body fat composition (%) was both measured by using bioelectrical impedance (Tanita digital scale) and also calculated from the Durnin and Womersley's formula using the sum of skinfold thickness at four-points which measured by the Harpenden's caliper. The anthropometric data were shown in Table 4.12. There were no significant changes in height, weight, BMI, %body fat composition (Durnin & Womersley), waist and hip circumferences, waist/hip ratio and upper arm circumference after control diet and soy-rich diet period. There was significant decrease only in %body fat composition (Tanita scale) and hip circumference in control diet period.

Copyright by Mahidol University

Table 4.12 Anthropometric measurement (overall; n = 37) during control diet and soy-rich diet (mean ± SEM)

Parameter	Control diet		p-value*	Soy-rich diet		p-value*
	Baseline	After 12 weeks		Baseline	After 12 weeks	
Weight, kg	58.2 ± 1.4	57.4 ± 1.4	0.413	57.6 ± 1.3	57.6 ± 1.3	0.735
BMI, kg/m^2	24.4 ± 0.5	24.4 ± 0.5	0.384	24.4 ± 0.5	24.4 ± 0.5	0.597
% body fat (Tanita scale), %	34.5 ± 1.0	33.6 ± 1.0	0.006	34.5 ± 1.0	34.1 ± 1.0	0.190
% body fat (Durnin&Womersley)†,%	40.9 ± 0.7	40.7 ± 0.6	0.333	40.7 ± 0.7	40.7 ± 0.6	0.898
Waist circumference, cm	77.3 ± 1.2	76.5 ± 1.2	0.147	76.5 ± 1.1	76.5 ± 1.1	0.969
Hip circumferences, cm	96.5 ± 1.1	95.6 ± 1.0	0.007	96.1 ± 1.0	95.6 ± 1.0	0.051
Waist/ hip ratio	0.80 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.843	0.80 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.181
Upper arm circumference, cm	28.6 ± 0.5	28.6 ± 0.5	0.781	28.6 ± 0.5	28.6 ± 0.5	0.923

***** Statistical analysis by Paired t-test

† Calculated from total skin-fold thickness and formula of Durnin and Womersley, 1974 [60]

Copyright by Mahidol University

4.5 Vaginal cytology and menopausal symptoms assessments

Vaginal cytology assessments were observed as vaginal cell maturation index (MI), karyopyknotic index (KPI), maturation value (MV), and vaginal pH. One woman of total 37 subjects did not complete the four times of vaginal cytology assessments because of her individual reason, unrelated to soy-product consumption. Thus, her vaginal cytology data was excluded. Only significant increase in vaginal pH was observed in control diet period. There were no significant differences in other vaginal cytological parameters in both control and soy-rich diet periods (Table 4.13).

Menopausal symptoms assessments were measured by the Greene Climacteric Scale (GCS). All subjects (n=37) completed this assessment. Menopausal symptoms results, including psychological symptoms (anxiety and depression sub-clusters); somatic symptoms; vasomotor symptoms; and sexual interest during the study were shown in Table 4.14 and 4.15. Compared with baseline, significant reductions in total score of the Greene climacteric scale were observed at week 4, week 8 and week12 after treatment in the period of soy-rich diet but no significant differences were observed during the period of control diet. Significant reductions in somatic symptoms were also observed at week 4, week 8 and week 12 after soy-rich diet treatment but were observed only at week 4 and week 8 in the period of control diet. There were significantly decrease in psychological symptoms expressed as anxiety subcluster at week 4 and week 8 after soy-rich diet period compared with baseline but there were no significant differences during the control diet period. However, there were no significant differences in depression subcluster, vasomotor symptoms and sexual interest in both treatment periods.

Copyright by Mahidol University

Table 4.13 The changes of karyopyknotic index (KPI), maturation value (MV) , vaginal pH and maturation index (MI) during control diet and soy-rich diet (mean ± SEM) (n = 36)

Parameter	Control diet		p-value*	Soy-rich diet		p-value*
	Baseline	After 12 weeks		Baseline	After 12 weeks	
KPI †	15.97 ± 4.67	10.28 ± 3.25	0.073	20.69 ± 4.96	13.61 ± 4.40	0.057
MV ‡	32.85 ± 5.32	29.58 ± 4.69	0.107	38.68 ± 5.44	30.83 ± 5.07	0.058
Vaginal health index	12.28 ± 0.63	11.72 ± 0.57	0.345	12.81 ± 0.71	12.64 ± 0.70	0.733
Vaginal pH	7.2 ± 0.1	7.4 ± 0.1	0.047	7.1 ± 0.1	7.1 ± 0.2	0.687
Maturation index						
- Parabasal cells (%)	50.4 ± 7.2	50.8 ± 7.2	0.598	43.3 ± 7.0	51.9 ± 6.9	0.239
- Intermediate cells (%)	33.8 ± 6.0	38.6 ± 5.9	0.403	36.0 ± 5.4	34.4 ± 5.5	0.871
- Superficial cells (%)	16.0 ± 4.7	10.3 ± 3.3	0.073	20.7 ± 5.0	13.6 ± 4.4	0.057

* Statistical analysis by Wilcoxon Signed Ranks Test, except vaginal health index (Paired t-test)

† KPI = the percentage of superficial cells with pycnotic nucleus found in the total population of the squamous cells examined

‡ MV = (0 x %parabasal cells) + (0.5 x %intermediate cells) + (1.0 x %superficial cells)

Copyright by Mahidol University

Table 4.14 The Greene Climacteric Scale (GCS) during control diet (mean ± SEM) (n = 37)

Parameter	Control diet			
	Baseline	After 4 weeks	After 8 weeks	After 12 weeks
Psychological	9.49 ± 0.80	9.76 ± 0.98	9.34 ± 0.91	10.00 ± 1.02
- Anxiety	5.14 ± 0.44	5.12 ± 0.55	4.94 ± 0.50	5.24 ± 0.56
- Depression	4.35 ± 0.45	4.65 ± 0.47	4.40 ± 0.46	4.59 ± 0.50
Somatic	7.62 ± 0.62	6.82 ± 0.72 *	6.46 ± 0.55*	7.35 ± 0.69
Vasomotor	2.11 ± 0.34	2.29 ± 0.35	2.03 ± 0.33	2.22 ± 0.32
Sexual interest	1.86 ± 0.19	1.94 ± 0.19	1.97 ± 0.18	1.97 ± 0.18
Total score of GCS	21.08 ± 1.54	20.82 ± 1.75	19.80 ± 1.59	21.54 ± 1.85

* Paired t-test, p-value < 0.05, compared with baseline (0 week)

Table 4.15 The changes of the Greene Climacteric Scale (GCS) which observed during the soy-rich diet period (mean ± SEM) (n = 37)

Parameter	Soy -rich diet			
	Baseline	After 4 weeks	After 8 weeks	After 12 weeks
Psychological	10.95 ± 0.95	9.16 ± 0.92 *	9.30 ± 0.85 *	9.97 ± 0.85
- Anxiety	6.22 ± 0.57	4.95 ± 0.48 *	4.86 ± 0.49 *	5.51 ± 0.50
- Depression	4.73 ± 0.46	4.22 ± 0.47	4.46 ± 0.41	4.46 ± 0.39
Somatic	7.41 ± 0.58	6.03 ± 0.56 *	6.24 ± 0.63 *	6.59 ± 0.54 *
Vasomotor	2.14 ± 0.32	2.08 ± 0.30	1.84 ± 0.30	2.08 ± 0.33
Sexual interest	1.95 ± 0.18	1.89 ± 0.19	1.78 ± 0.20	1.70 ± 0.18
Total score of GCS	22.43 ± 1.68	19.16 ± 1.58 *	19.16 ± 1.61*	20.35 ± 1.54 *

* Paired t-test, p-value < 0.05, compared with baseline (0 week)

Copyright by Mahidol University

CHAPTER 5
DISCUSSION

For years, HRT has been used to alleviate menopausal symptoms and osteoporosis and also reduce cardiovascular risk factor. However, fear of increased risk of cancer has kept many Thai women away from HRT. In addition, recent study indicated that HRT cannot be recommended for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease approach[20]. Alternative treatments that retain the beneficial effects on health, without the negative consequences of HRT for menopausal women are most desirable.

The study of Jenkins et al (2002) showed that substitution of soyfoods for animal products, regardless of isoflavones concentration, reduce the CAD risk because of both modest reductions in blood lipids and reductions in oxidized LDL, homocysteine and blood pressure[78]. Therefore, the purpose of this study was to investigate the capacity of a soy-rich diet to reduce cardiovascular risk factors and menopausal symptoms in climacteric Thai women. Soy product consumption was substituted for animal protein as a part of their habitual diet with their own recipes. Climacteric women in this study were mostly unaware at screening that their blood cholesterol (TC) levels were elevated. Of 37 women, 43 and 46 % of them had serum TC in range 200 - 239 and ≥ 240 mg/dL whereas 40 and 49 % had LDL-C in range 130 - 159 and ≥ 160 mg/dL, respectively. No women had serum HDL-C less than 35 mg/dL. Seventy and 30% of them had HDL-C in range 35 - 59 and ≥ 60 mg/dL, respectively. These women had good attitude to soy food consumption. Adherence to the dietary treatments in this study was good, according to self-reported food records and soy food consumption check-list. Average soy protein was equally 25 g/d. Although subjects consumed vegetarian sausage, vegetarian chicken and texture soy protein less than the instruction, they were advised to replace with UHT soy-milk, white soft tofu and white hard tofu. In addition, no significant changes in weight after both treatment periods were observed.

Copyright by Mahidol University

After 12 weeks on both soy-rich and control diet (soy free diet), LDL-C were significantly reduced by 18 and 8 % whereas HDL-C were significantly increased by 20 and 21 %, respectively. Significant reduction in TC was only observed after 12 weeks on soy-rich diet period. Compared with control diet, soy-rich diet significantly reduced TC by 7.9 %, 2.3 times higher than control diet (2.3%) (Table 4.11). In addition, serum LDL-C was reduced more in soy-rich diet period than control diet (18% vs. 8%, $p > 0.05$, respectively). Data from 3-d food record at wk 12 of both periods showed that the trend of dietary cholesterol intake in soy-rich diet was reduced from baseline whereas in control diet, it was higher from baseline. It was the weak point of this study that average dietary cholesterol intakes from 3-d food record were not constant during both periods. Ideally, food intakes should be recorded everyday by the subjects but this request would make high dropout from the study. However, there were no significant bivariated correlations between the levels of dietary cholesterol intake and concentrations of serum TC at baseline and after 12 weeks of both treatment periods. Besides, when the subjects were divided into 2 subgroups by the increased or decreased of cholesterol intake from baseline (BL), there were still significant reductions of serum TC levels in both subgroups after 12 weeks of soy-rich diet. The mean (SEM) of serum TC concentration on soy-rich diet period were 223.9 ± 6.9 (BL) vs. 205.4 ± 6.2 mg/dL(wk 12), $p < 0.010$ in the increased subgroup (n=15) and 249.9 ± 7.4 vs. 228.7 ± 7.1 mg/dL, $p < 0.010$ in the decreased subgroup (n=22). On the contrary, there were no significant changes in serum TC levels of both subgroups after 12 weeks of control diet [243.1 ± 7.4 (BL) vs. 232.4 ± 6.7 mg/dL(wk 12), $p > 0.05$ in the increased subgroup (n=25) and 227.7 ± 7.3 vs. 224.9 ± 7.9 mg/dL, $p > 0.05$ in the decreased subgroup (n=12)]. The results from this study suggested that regular consumption of soy foods such as soy-milk, white soft tofu, white hard tofu, vegetarian sausage, vegetarian chicken, and texture soy protein had beneficial effects on serum TC, lipid hydroperoxides and systolic BP compared with control diet.

This finding correlated with many studies which reported similar hypocholesterolemic effects of soy protein in human as reviewed by Anderson et al (1995)[25] but this study differs from previous studies in two ways. It was a wide range of soyfoods used to substitute for the sources of animal protein normally eaten in the diet and the treatment diet was self-prepared diet under supervision of the same

Copyright by Mahidol University

researcher. Recently, Chiechi et al (2002) randomized 187 healthy asymptomatic postmenopausal women, aged 39 – 60 years into three groups: a soy rich diet group, a HRT group, and a control group. Lipid profile, BMI, blood pressure, endometrial thickness, uterine artery resistance index (RI), were evaluated in all participants at the baseline, after 6 months, and at the end of the study. After a 6-month intervention period, the lipid profile in the soy rich diet group showed a favorable outcome, similar to that observed in the HRT group, but compliance to the diet was low[79].

Until now, the effects of soy protein on blood cholesterol concentrations in humans have been variable, and the explanations for this remain elusive. Variations in the age and genetics of human study subjects (normocholesterolemic, familial hypercholesterolemic), study design (free-living, metabolic ward), fatty acid profile and cholesterol content of the soy protein-based diet, non-protein constituents in the diet (e.g., fiber or plant sterols), length of study period, amount of soy protein consumed (in absolute terms and relative to animal protein) and type of soy preparation likely all contribute to the range of responses reported [80].

Possible mechanisms that have been studied in animals and humans include enhancement of bile acid excretion, reduced cholesterol metabolism, increased thyroid hormones, and reduced insulin-to-glucagon ratios [81]. However, the hypocholesterolemic mechanisms of soyfoods are inconclusive and the constituents of soy responsible for these serum lipid effects are under investigation. Small peptide components, individual amino acid ratios, non-protein components such as isoflavones, or a combination of factors may alter lipoprotein metabolism. Studies in animals have shown that soy protein consumption increases activities of HMG CoA reductase and cholesterol 7 α-hydroxylase. In addition, soy isoflavones, structurally similar to estrogens, interact with estrogen receptors and may decrease serum cholesterol concentrations by similar mechanisms [81]. Two proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of isoflavones are the up-regulation of the LDL receptors and/or the inhibition of the endogenous cholesterol synthesis. Isoflavones in soy protein may stimulate the clearance of cholesterol, probably by up-regulating LDL receptors, and thereby increasing LDL receptor activity [82]. Lipoprotein (a) [Lp(a)] is a cholesterol-carrying particle in the apoprotein (a) [apo(a)] moiety. The only

Copyright by Mahidol University

compounds found to alter circulating Lp(a) are estrogens and other sex steroids, which may decrease Lp(a) concentrations by 35%[83]. Isoflavones, having a structural similarity with endogenous estrogens and estrogen receptor-binding capabilities, may suggest a potential means of lowering Lp(a), warranting further studies to test this hypothesis. Beneficial effects on lipid profiles could not be attributed with certainty to soy isoflavones. There are currently not enough data to recommend the consumption of isoflavones supplements to lower plasma cholesterol levels [84].

Vaginal atrophy in menopause is commonly known as due to estrogen deficiency. In clinical practice, the estrogen deficiency diagnosis is often made by evaluation of patient's symptoms and inspection of the vaginal epithelium. The most commonly used method has been vaginal cytology, which is considered the method of choice. The analysis is based on the classification of the vaginal epithelial cells as parabasal, intermediate or superficial. Several different quota such as KPI (karyopycnotic index), MV (maturation value) and MI (maturation index) can be calculated to express the degree of vaginal atrophy as a numeric value[85]. The MI is read from left to right and refers to the percentage of parabasal, intermediate, and superficial squamous cell on a smear, with the total of all three values equaling 100%. Estrogen stimulates the development of superficial squamous cells. The MI qualitatively measures estrogen response rather than quantitatively measuring estrogen level. Hormonal cytology presents only two diagnostic patterns. The first pattern demonstrates predominantly superficial cell with few intermediate cells, indicating estrogen stimulation. The second pattern is atrophic presentation of predominantly parabasal cells, indicating a lack of estrogen. Vaginal pH also has been related to estrogen levels by its association with glycogen content of vaginal cells, growth of lactobacilli, and production of lactic acid. In normally estrogenized vaginas, pH is generally 4.5 or less. With hypoestrogenism, glycogen content, lactobacilli, and lactic acid levels decrease and vaginal pH increases [86]. MI shift to the left is associated with a vaginal pH of 6.2 or greater, while a shift to the right is associated with a mean vaginal pH of 4.5. In addition, vaginal health index (VHI) was proportional relative with estrogenic status, lower VHI demonstrates as the greater of the vaginal atrophy.

It was highlighted by Adlercreutz et al who showed that the urinary excretion of isoflavones was 10-100 times higher in Japanese women than in their

Copyright by Mahidol University

American and Finnish counterparts. This led him to hypothesize that this high intake of estrogen-like compounds may act similarly to HRT and be responsible for the low incidence of such menopausal symptoms such as hot flashes in Asian communities [87].

Chiechi et al (2003) analyzed the effects of a 6-month soy-rich diet (approximately 47 mg/day of isoflavones) on vaginal epithelium of asymptomatic postmenopausal women in a randomized clinical trial. 187 women were divided into three groups: a soy rich diet group, a HRT group, and a control group. The KPI increased significantly in the soy rich diet and HRT groups but not in the control group. The MI had an identical trend to the KPI [88].

In the present study, the ability of a soy-rich diet, contain 50 mg isoflavones/day to affect vaginal epithelium and menopausal symptoms in Thai women was assessed. No significant differences in parameters of vaginal cytology (KPI, MV, MI, and vaginal health index) between soy-rich and control diet period were observed. The MI reflected that hypoestrogenic status of these climacteric women were not changed during both dietary interventions. Vaginal pH after 12 weeks of control diet was significantly higher than baseline whereas no significant change was observed in soy-rich diet period. In addition, compared with baseline, significant reductions in total score of the Greene Climacteric Scale were observed after 4, 8 and 12 weeks of soy-rich diet period but no significant differences were observed during the control diet period. Significant reductions in somatic and psychological symptoms were more observed in soy-rich diet period than control diet period. The weak estrogenic effects on vaginal cytology and menopausal symptoms which observed in this study may resulted from short time of dietary intervention and the subjects had less severity of baseline menopausal symptoms.

It is possible that women, whether peri- or postmenopausal, would response more to phytoestrogens if they had more symptoms to start with. In addition, menopausal symptoms are quite subjective judgement of individual person, so subject may not able to distinguish their symptoms especially vasomotor symptoms like hot flashes and night sweats in tropical climate area such as Thailand. The more significant effects observed are seen in the studies with the greater number of study participants.

Copyright by Mahidol University

CHAPTER 6
CONCLUSION

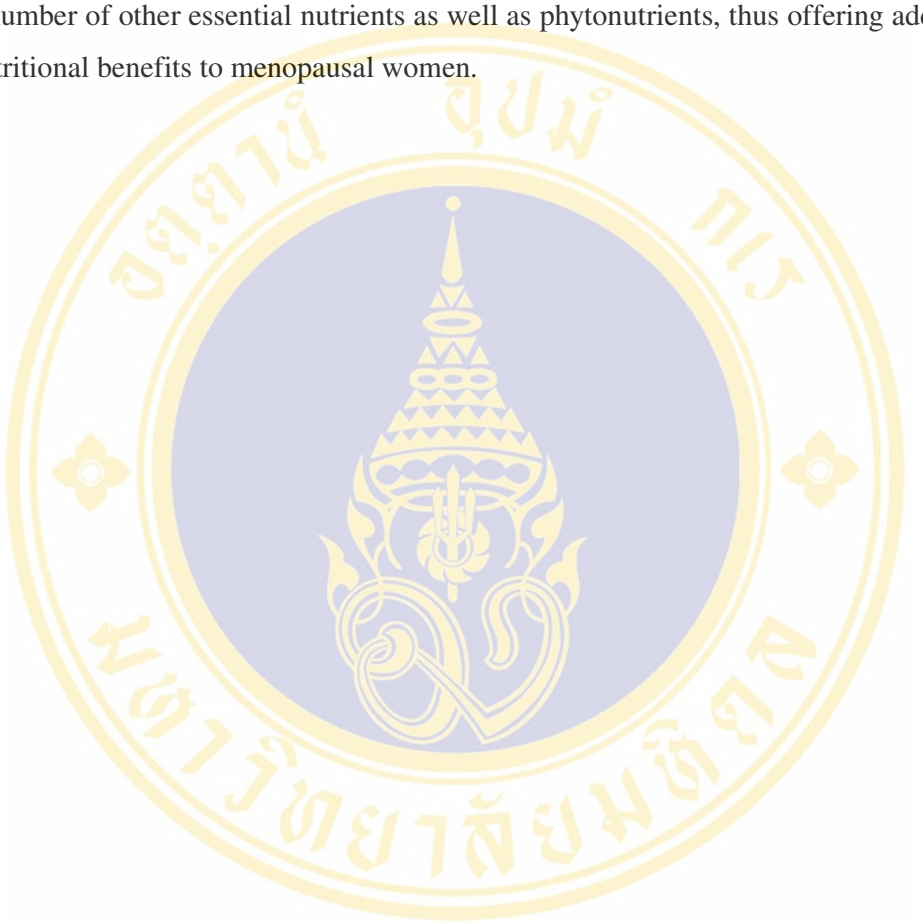
In this randomized crossover study, the data suggested that a soy-rich diet (25 g of soy protein/day, contain approximately 50 mg isoflavones) was more helpful than a control (soy-free) diet in lowering serum total cholesterol and relieving menopausal symptoms but no more effective for improving LDL-C, HDL-C level and vaginal cytology. From this study, regular consumption of soy foods such as soy-milk, white soft tofu, white hard tofu, vegetarian sausage, vegetarian chicken, and texture soy protein had beneficial effects on serum total cholesterol, lipid hydroperoxides and systolic blood pressure, compared with control diet in climacteric Thai women. It seems that whole soy foods with isoflavones in a "heart healthy" diet may be appropriate recommendation for cardiovascular health. Substituting soy protein for animal protein especially red meat will decrease saturated fat and cholesterol intake, which should reduce CHD risk and would also decrease the intake of potentially carcinogenic heterocyclic amines. When substituted soy protein for animal protein, it reduced urinary calcium excretion. In addition, soy protein may have a favorable effect on renal function relative to animal proteins.

Recent studies and this study appear that soy does not have any serious safety issues. The main adverse events described were mildly gastro-intestinal complaints [89]. Although it was a study showed that phytic acid in soy-protein isolates could inhibit iron absorption [90], there was no significant effect on iron status after 24 -wk dietary intervention with soy protein isolate as a meal replacement [91].

Nevertheless, nutritional education for Thai middle-aged women for dietary modification and self-monitoring seems to have beneficial effects on health because significant improvement of lipid profile in control diet period was also shown in this study.

Copyright by Mahidol University

The results from this study also indicate that the beneficial effect of soy-rich diet can be achieved with a modest amount of soy foods that are both acceptable to Thai women and readily available in supermarkets and health food stores. Additionally, many of the traditional soy foods are often low in fat and contain a number of other essential nutrients as well as phytonutrients, thus offering additional nutritional benefits to menopausal women.



Copyright by Mahidol University

REFERENCES

1. สถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล. สารประชากรมหาวิทยาลัยมหิดล 2543;9(2):1.
2. กองวางแผนทรัพยากรมนุษย์ สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. การคาดประมาณประชากรของประเทศไทย 2533-2563. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ; 2538.
3. Punyahotra S, Dennerstein L, Lehert P. Menopausal experiences of Thai women. Part1: Symptoms and their correlates. Maturitas 1997;26:1-7.
4. ธีระ ทองสง. วัยหมดระดู: Menopause. ใน : นรีเวชวิทยา(ฉบับสอบบอร์ด): Gyne special. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่; 2536. หน้า 465-475.
5. ประมวล วีรุตมเสน. วัยหมดระดู. ใน : สรีรวิทยาการเจริญพันธุ์. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2532. หน้า 381-403.
6. Miller VT. Lipids, lipoproteins, women and cardiovascular disease. Atherosclerosis 1994;108(suppl):73s-82s.
7. Stevenson JC, Crook D, Godsland IF. Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. Atherosclerosis 1993;98:83-90.
8. Ossewaarde ME, Bots ML, Bak AAA, et al. Effect of hormone replacement therapy on lipids in perimenopausal and early postmenopausal women. Maturitas 2001;39:209-216.
9. Charuraks N, Krailadsiri P, Pingsuthiwong S. Reference range values for blood lipids and CHD guidelines for risk classification in middle-aged subjects. Chula Med J 1994 Aug;38(8):461-470.

Copyright by Mahidol University

10. จันทร์เพ็ญ ชูประภาวรรณ. สุขภาพคนไทยปี พ.ศ.2543: สถานะสุขภาพคนไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน; 2543.

11. Chompootaweep S, Tankeyoon M, Yamarat K, Poomsuwan P, Dusitsin N. The menopause age and climacteric complaints in Thai women in Bangkok. Maturitas 1993;17:63-71.

12. Kochanam S. Age at menopause and associated factors among menopausal women in Suratthani province[M.S.Thesis in Human Reproduction and Population Planning]. Bangkok: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University; 1992 (In Thai).

13. Department of Health, Ministry of Public Health. The national study of health behaviors of pre and postmenopausal Thai women. Bangkok: Ministry of Public Health; 1996 (In Thai).

14. Kamolchum W. Age at menopause and health problems of menopausal women in Ratchaburi province [M.S.Thesis in Human Reproduction and Population Planning]. Bangkok: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University; 1997 (in Thai).

15. Cheewaroungroj B. Factors associated with menopausal symptoms: A study at health clinic, health promotion center region1 [M.S.Thesis in Human Reproduction and Population Planning]. Bangkok: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.; 2000.

16. Christiansen C. Hormone replacement therapy for the postmenopausal women. Maturitas 2001;38 (suppl.1):s1-s5.

17. Taechakraichana N, Limpaphayom K, Jaisamrarn U, Chompootaweep S, Panyakhamlerd K, Chaikittisilpa S. Menopausal complaints. Chula Med J 1995 Jun;39(6):451-468.

18. Ettinger B, Quesenberry C, Schroeder DA, Friedman G. Long-term postmenopausal estrogen therapy may be associated with increased risk of breast cancer: A cohort study. Menopause 1997;4(3):125-129.

19. Stoppard M. Menopause. London: Doring Kindersley Limited; 1994.

Copyright by Mahidol University

20. Neves-e-Castro M, Samsioe G, Doren M, Skouby SO. Results from WHI and HERS II- implications for women and the prescriber of HRT. Maturitas 2002;42:255-258.
21. Kurzer MS, Xu X. Dietary phytoestrogens. Annu Rev Nutr 1997;17:353-381.
22. Messina MJ, Pershy V, Setchell KDR, Barnes S. Soy intake and cancer risk: a review of the In vitro and In vivo data. Nutr Cancer 1994;21:113-131.
23. Adlercreutz H, Goldin BR, Gorbach SL, Hockerstedt KAV, Watanabe S, et al. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. J Nutr 1995;125:757s-770s.
24. Barnes S. Effect of genistein on In vitro and In vivo models of cancer. J Nutr 1995;125:777s-783s.
25. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. N Engl J Med 1995;333:276-282.
26. Food and Drug Administration US, Department of Health and Human Services. FDA Talk Paper: FDA Approves New Health Claim For Soy Protein and Coronary Heart Disease. October 20, 1999(T99-48).
27. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 1993;57 (suppl):715s-725s.
28. Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G, Zanotti L, Forini E, De Aloysio D. The effect of soy supplementation on hot flushes. Obstet Gynecol 1998;91:6-11.
29. Pekkanen J, Linn S, Heiss G, et al. Ten year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. N Engl J Med 1990;322:1700-1707.
30. Stemler J, Wentworth Eaton JD. Association of increasing plasma cholesterol and coronary risk. JAMA 1986;256:2823.
31. Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, et al. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. Am J Clin Nutr 2001;73:61-67.
32. Institute of Food Science & Technology. Phytoestrogens. In: http://www.ifst.org/hottop34.htm; 4/4/2002.

Copyright by Mahidol University

33. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. Am J Clin Nutr 2002;76:1191-1201.

34. Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Clinical review 92: Phytoestrogens. J Clin Endocrinol Metab 1998;83(2):297-303.

35. Markiewicz L, Garey J, Adlercreutz H, Gurpide E. In vitro bioassays of nonsteroidal phytoestrogens. J Steroid Biochem Molec Biol 1993 May;45(5):399-405.

36. Anderson JJB, Garner SC. Phytoestrogen and bone. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1998;12:543-557.

37. Albrecht F. Soy foods: Continuing education module. In: Food-Based NUTRITION TRACK: New Hope Natural Media; Oct,1999.

38. Carroll KK. Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. J Am Diet Assoc 1991;91:820-827.

39. Nagata C, Takatsuka N, Kurisu Y, Shimizu H. Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and women. J Nutr 1998;128:209-213.

40. Washburn S, Burke GL, Morgan T, Anthony M. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. Menopause 1999;6:7-13.

41. Crouse JR, Morgan T, Terry JG, Ellis J, Vitolins M, Burke GL. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. Arch Intern Med 1999;159:2070-2076.

42. Wangen KE, Duncan AM, Xu X, Kurzer MS. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. Am J Clin Nutr 2001;73:225-231.

43. Gardner C, Newell KA, Cherin R, Haskell WL. The effect of soy protein with or without isoflavones relative to milk protein on plasma lipids in hypercholesterolemic postmenopausal women. Am J Clin Nutr 2001;73:728-735.

44. Gooderham MJ, Adlercreutz H, Ojala ST, Wahala K, Holub BJ. A soy protein isolate rich in genistein and daidzein and its effects on plasma

Copyright by Mahidol University

isoflavone concentrations, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men. J Nutr 1996;126:2000-2006.

45. Hodgson JM, Puddey IB, Beilin LJ, Mori TA, Croft KD. Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. J Nutr 1998;128:728-732.
46. Record IR, Dreosti IE, McInerney JK. The antioxidant activity of genistein in vitro. J Nutr Biochem 1995;6:481-485.
47. Nestel PJ, Yamashita T, Sasahara T, et al. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17(12):3392-3398.
48. Wilcox G, Wahlqvist ML, Burger H, Medley G. Oestrogenic effects of plant foods of post-menopausal women. BMJ 1990;301:905-906.
49. Murkies AL, Lombard C, Strauss BJG. Dietary flour supplementation decreases postmenopausal hot flushes: effect of soy and wheat. Maturitas 1995;21(189-195).
50. Baird DD, Umbach DM, Lansdell L, et al. Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 1995;80:685-690.
51. Knight DC, Eden JA. A review of the clinical effects of phytoestrogens. Obstet Gynecol 1996;87:897-904.
52. Brzezinski A, Adlercreutz H, Shaoul R, et al. Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. Menopause 1997;4(2):89-94.
53. Scambia G, Mango D, Signorile PG, et al. Clinical effects of a standardized soy extract in postmenopausal women: a pilot study. Menopause 2000;7:105-111.
54. Upmalis DH, Lobo RA, Bradley L, Warren M, Cone F, Lamia C. Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tablets in postmenopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. Menopause 2000;4:236-242.

Copyright by Mahidol University

55. Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H. Soy product intake and hot flashes in Japanese women results from a community-based prospective study. Am J Epidemiol 2001;153:790-793.

56. Severson RK, Nomura AMY, Grove JS, Stemmermann GN. A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. Cancer Res 1989;49:1857-1860.

57. Lee HP, Gourley L, Duffy SW, et al. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. Lancet 1991;337:1197-1200.

58. สังวาลย์ รักษ์เผ่า. ระเบียบวิธีวิจัยและสถิติในการวิจัยทางคลินิก: Methodology and Statistics in Clinical Research. เชียงใหม่: โครงการตำรา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2539.

59. Lukaski HC. Comparison of proximal and distal placements of electrodes to assess human body composition by bioelectrical impedance. Basic Life Sci 1993;60:39-43.

60. Durnin JVGA, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness : measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. Br J Nutr 1974;32:77-97.

61. Lean MEJ, Han TS, Seidell JC. Impairment of health and quality of life in people with large waist circumference. Lancet 1998;351:853-856.

62. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. Ann Clin Biochem 1969;6:24.

63. Curme HG, et al. Multilayer film elements for clinical analysis. Clin Chem 1978;24:1335-1342.

64. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem 1974;20:470-475.

65. Spayd R, et al. Multilayer film elements for clinical analysis. Clin Chem 1978;24:1348-1350.

66. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg^{2+} precipitation for quantitation of high-density lipoprotein cholesterol. Clin Chem 1982;28:1379-1388.

Copyright by Mahidol University

67. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ, editors. Dextran sulfate-Mg^{2+} precipitation procedure for quantitation of high-density lipoprotein cholesterol. Washington, D C: American Association for Clinical Chemistry; 1983.

68. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972;18:499-502.

69. Kageyama N. A direct colorometric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalysts system. Clin Chem Acta 1971;31:421.

70. Trivedi RC, Rabar L, Berta EN, et al. New enzymatic method for serum uric acid at 500 nm. Clin Chem 1978;24:1908-1911.

71. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. Anal Biochem 1994;220:403-409.

72. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. Diabetes 1995;44:1054-1058.

73. Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, et al. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. Diabetologia 1997;40:647-653.

74. Nourooz-Zadeh J. Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. Methods Enzymol 1999;300:58-62.

75. Hunter MIS, Mohamed JB. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in Duchenne muscular distrophy. Clin Chim Acta 1986;155:123-132.

76. Nachtigall LE. Comparative study: Replens versus local estrogen in menopausal women. Fertil Steril 1994;61:178-180.

77. Greene JG. Constructing a standard climacteric scale. Maturitas 1998;29:25-31.

78. Jenkins DJA, Kendall CWC, Jackson C-JC, et al. Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. Am J Clin Nutr 2002;76:365-372.

Copyright by Mahidol University

79. Chiechi LM, Secreto G, Vimercati A, et al. The effects of a soy rich diet on serum lipids: the Menfis randomized trial. Maturitas 2002;41:97-104.

80. Lichtenstein AH. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. J Nutr 1998;128:1589-1592.

81. Anderson JW, Smith BM, Washnock CS. Cardiovascular and renal nenefits of dry bean and soybean intake. Am J Clin Nutr 1999;70 (Suppl):464s-474s.

82. Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Monetti M, Pazzuconi F, Gatti E. Soy and cholesterol reduction: clinical experience. J Nutr 1995;125:598s-605s.

83. Shewmon DA, Stock JL, Rosen CJ, et al. Tamoxifen and estrogen lower circulation lipoprotein (a) levels and lipids in healthy postmenopausal women. Arterioscler Thromb 1994;14:1586-1593.

84. Demonty I, Lamarche B, Jones PJH. Role of isoflavones in the hypocholesterolemic effect of soy. Nutr Rev 2003;61(6):189-203.

85. Nilsson K, Risberg B, Heimer G. The vaginal epithelium in the postmenopause-cytology, histology and pH as methods of assessment. Maturitas 1995;21:51-56.

86. Brizzolara S, Killeen J, Severino R. Vaginal pH and parabasal cells in postmenopausal women. Obstet Gynecol 1999;94:700-703.

87. Adlercreutz H, Hamalainen B, Gorbach SL, Goldin BR. Dietary phytoestrogens and the menopause in Japan. Lancet 1992;339:1233 (letter).

88. Chiechi LM, Putignano G, Guerra V, Schiavelli MP, Cisternino AM, Carriero C. The effect of a soy rich diet on the vaginal epithelium in postmenopause: a randomized double blind trial. Maturitas 2003;45:241-246.

89. McMann MC. Soyprotein: what you need to know. New york: Avery; 2000.

90. Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko SA, Cook JD. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. Am J Clin Nutr 1992;56(3):573-578.

91. Swain JH, Alekel DL, Dent SB, Peterson CT, Reddy MB. Iron indexes and total antioxidant status in response to soy protein intake in perimenopausal women. Am J Clin Nutr 2002;76:165-171.

Copyright by Mahidol University

APPENDIX

Copyright by Mahidol University

APPENDIX A

The health history and general data questionnaire

ID ……..

แบบบันทึกข้อมูลทั่วไปของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

เรื่อง : ผลของการกินอาหารที่มีสัดส่วนของถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นต่อระดับไขมันและไลปิดเปอร์อ็อก-ซิเดชั่นในเลือด และอาการจากภาวะหมดระดูของหญิงวัยทอง

H.N. _____ ชื่อ-นามสกุล _____

โทร. _____วันเดือนปีที่สัมภาษณ์ _____

ช่วงเวลาที่สามารถติดต่อได้สะดวก _____

ส่วนที่ 1. ข้อมูลด้านประชากรและสังคม

1. อายุ _____ ปี (เต็ม)

2. ระดับการศึกษา
( ) 0. ไม่ได้เรียนหนังสือ
( ) 1. ประถมศึกษา
( ) 2. มัธยมศึกษาตอนต้น
( ) 3. มัธยมศึกษาตอนปลาย หรือเทียบเท่า
( ) 4. อนุปริญญา ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง หรือเทียบเท่า
( ) 5. ปริญญาตรี และสูงกว่าปริญญาตรี

3. อาชีพ
( ) 1. ไม่ได้ประกอบอาชีพ / แม่บ้าน
( ) 2. เกษตรกร (ทำไร่ ทำนา ทำสวน เลี้ยงสัตว์)
( ) 3. รับจ้างแรงงาน / รับจ้างทั่วไป
( ) 4. ประกอบอาชีพส่วนตัว / ค้าขาย
( ) 5. รับราชการ / รัฐวิสาหกิจ
( ) 6. อื่นๆ

4. สถานภาพสมรส
( ) 1. โสด
( ) 2. คู่
( ) 3. หม้าย หย่า แยกกันอยู่

Copyright by Mahidol University

ส่วนที่ 2. ข้อมูลด้านสุขภาพ

1. ข้อมูลเกี่ยวกับระดู (ประจำเดือน) ในช่วง 1 ปีที่ผ่านมา
   ( ) 1. ระดูมาไม่สม่ำเสมอ (ขาดระดูติดต่อกันมาแล้วอย่างน้อย _____ เดือน)
   ( ) 2. หมดระดูตามธรรมชาติ (ขาดระดูมาแล้วอย่างน้อย 3 เดือนขึ้นไป)
   ( ) 3. หมดระดูจากการผ่าตัดมดลูก และรังไข่ทั้งสองข้าง
2. ในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา ท่านได้รับประทานยาคุมกำเนิด หรือ รับการรักษาด้วยวิธี Hormone replacement therapy (ใช้ฮอร์โมนทดแทน) หรือไม่
   ( ) 0. ไม่ใช้ ( ) 1. ใช้
3. ท่านสูบบุหรี่หรือไม่
   ( ) 0. ไม่สูบ
   ( ) 1. เคยสูบ แต่เลิกแล้ว
   ( ) 2. สูบเป็นบางครั้ง นานๆครั้ง
   ( ) 3. สูบบ่อยๆ
   ( ) 4. สูบทุกวัน
   ถ้าสูบบุหรี่ จำนวนบุหรี่ที่สูบ _____ มวน/วัน
4. ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ท่านมีประวัติการเป็นโรคต่อไปนี้หรือไม่ (0 = ไม่มี, 1= มีประวัติ)
   ( ) โรคหัวใจ ( ) โรคเบาหวาน
   ( ) โรคมะเร็งมดลูก ( ) โรคมะเร็งรังไข่
   ( ) โรคมะเร็งเต้านม ( ) โรคตับ
   ( ) โรคไต ( ) ภาวะ hyperthyroidism
5. โรคประจำตัว
   ( ) 0. ไม่มี
   ( ) 1. มี, ระบุ _____
6. ท่านรับประทานอาหารมังสวิรัติเป็นประจำหรือไม่
   ( ) 0. ไม่ ( ) 1. ใช่
7. ท่านมียาที่ต้องรับประทานเป็นประจำหรือไม่ (เช่น ยาลดไขมัน, แอสไพริน, วิตามินซี, วิตามินอี, วิตามินรวม เป็นต้น)
   ( ) 0. ไม่มี
   ( ) 1. มี, ระบุ _____
   ความถี่ที่รับประทาน _____

Copyright by Mahidol University

8. ท่านรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่างๆ เป็นประจำหรือไม่ (เช่น น้ำมันปลา โอเมกา-3, โปรตีนสกัด, สารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ, สารสกัดจากเมล็ดองุ่น ฯลฯ)

( ) 0. ไม่

( ) 1. มี, ระบุ _____

ความถี่ที่รับประทาน _____

9. ความดันโลหิต _____ มิลลิเมตร-ปรอท
10. น้ำหนักตัว _____ กิโลกรัม
11. ส่วนสูง _____ เซนติเมตร
12. Body fat, % BW _____

ส่วนที่ 3. ข้อมูลอาการที่เกี่ยวข้องกับภาวะหมดระดูในช่วง 2 เดือนที่ผ่านมา

กรุณาทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องที่ตรงกับลักษณะอาการของท่านที่ประสบอยู่ในขณะนี้

ลำดับ	อาการ	ไม่เคย	บางครั้ง	บ่อยครั้ง	บ่อยมาก	score 0-3
1	ใจสั่น หัวใจเต้นเร็ว หรือใจเต้นแรง					
2	รู้สึกกระวนกระวาย เครียด หงุดหงิด					
3	นอนไม่หลับ หรือ นอนหลับยาก					
4	ตื่นเต้นตกใจง่าย					
5	กลัว วิตกกังวลใจ					
6	จิตใจไม่อยู่กับเนื้อกับตัว ไม่มีสมาธิ					
7	รู้สึกเหนื่อยอ่อนเพลีย ไม่ค่อยมีแรง					
8	ความสนใจในสิ่งต่างๆรอบตัวลดลง					
9	รู้สึกไม่มีความสุข ซึมเศร้า หดหู่ใจ					
10	รู้สึกน้อยใจ โศกเศร้าเสียใจง่าย					
11	โกรธง่าย ฉุนเฉียว อดทนอดกลั้นน้อยลง					
12	รู้สึกวิงเวียนศีรษะ หน้ามืดตาลาย คล้ายจะเป็นลม					
13	ร่างกายรู้สึกอึดอัด ศีรษะตื้อ มึนทึบ					
14	เหน็บชาตามส่วนต่างๆของร่างกาย					
15	ปวดศีรษะ					

Copyright by Mahidol University

ส่วนที่ 3. ข้อมูลอาการที่เกี่ยวข้องกับภาวะหมดระดูในช่วง 2 เดือนที่ผ่านมา (ต่อ)

ลำดับ	อาการ	ไม่เคย	บางครั้ง	บ่อยครั้ง	บ่อยมาก	score 0-3
16	ปวดข้อ ปวดเมื่อยตามตัว					
17	การรับรู้ความรู้สึกที่มือ เท้า ลดลง					
18	หายใจขัด หายใจลำบาก					
19	ร้อนวูบวาบตามตัว					
20	เหงื่อออกตอนกลางคืน					
21	ความสนใจเรื่องเพศลดลง					

P (1-11) = _____ **A** (1-6) = _____ **D** (7-11) = _____

S (12-18) = _____ **V** (19-20) = _____ **Sx** (21) = _____

Copyright by Mahidol University

APPENDIX B

The soy-food frequency questionnaire

ID ……..

แบบประเมินการกินอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากถั่วเหลือง

H.N. _____ชื่อ-นามสกุล _____

โทร. _____ วันเดือนปีที่สัมภาษณ์ _____

ช่วงเวลาที่สามารถติดต่อได้สะดวก_____

กรุณา นึกทบทวนว่าในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา ท่านได้รับประทานอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากถั่วเหลืองชนิดใดบ้าง บ่อยเพียงใด จากนั้นทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องที่ตรงกับความถี่โดยประมาณที่ท่านกินอาหารและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองตามหัวข้อต่างๆ และเขียนปริมาณของอาหารแต่ละชนิดที่ท่านรับประทานตามปกติ

<u>หมายเหตุ</u> กรุณาทำเครื่องหมายให้ครบทุกหัวข้อชนิดอาหาร อย่าเว้นไม่ทำในหัวข้ออาหารชนิดใดๆ เด็ดขาด

ชนิดอาหาร	ความถี่การรับประทานอาหารชนิดต่างๆ ในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา									ปริมาณปกติที่รับประทาน
	ไม่กินเลย หรือ กินน้อยกว่า 1 ครั้ง/เดือน	1 ครั้ง/ เดือน	2-3 ครั้ง / เดือน	1 ครั้ง/ สัปดาห์	2 ครั้ง/ สัปดาห์	3-4 ครั้ง/ สัปดาห์	5-6 ครั้ง/ สัปดาห์	1 ครั้ง/ วัน	2+ ครั้ง/ วัน	
เต้าหู้อ่อน										
เต้าหู้หลอดขาว										
เต้าหู้แผ่นขาว										
เต้าหู้แผ่นเหลือง										
เต้าหู้ฟองน้ำ										
เต้าหู้ทอด(เต้าหู้พอง)										
เต้าหู้ซาลาเปา										
เต้าหู้ทอดมัน										
ฟองเต้าหู้										
เต้าหู้ยี้										

Copyright by Mahidol University

ชนิดอาหาร	ความถี่การรับประทานอาหารชนิดต่างๆ ในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา (ต่อ)									ปริมาณปกติที่รับประทาน
	ไม่กินเลย หรือกินน้อยกว่า 1 ครั้ง/เดือน	1 ครั้ง/เดือน	2-3 ครั้ง / เดือน	1 ครั้ง/สัปดาห์	2 ครั้ง/สัปดาห์	3-4 ครั้ง/สัปดาห์	5-6 ครั้ง/สัปดาห์	1 ครั้ง/วัน	2+ ครั้ง/วัน	
เต้าฮวย (ร้อน, เย็น)										
วุ้นเต้าหู้										
โยเกิร์ตเต้าหู้										
เต้าหู้ไอศกรีม										
น้ำสลัดเต้าหู้										
เส้นถั่วเหลือง										
เต้าเจี้ยว										
ถั่วนัตโตะ (Nutto)										
ซุปมิโซะ(Miso soup)										
เทมเป้ (Tempeh)										
ซีอิ๊วขาว, ซอสถั่วเหลือง										
น้ำพริกเผา เจ										
น้ำเต้าหู้										
นมถั่วเหลือง ยูเอชที (ผสมนมวัวผง)										
นมถั่วเหลือง สูตรเจ										
นมถั่วเหลือง รสช็อคโกแลต										
ถั่วเหลืองฝักอ่อนต้ม (ถั่วแระ)										
ถั่วเหลือง, เมล็ด, สุก										
แป้งถั่วเหลือง										
โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง (เช่น นิวทริไลท์โปรตีน, โปรตีนดริ้งค์มิกซ์)										

Copyright by Mahidol University

ชนิดอาหาร	ความถี่การรับประทานอาหารชนิดต่างๆ ในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา (ต่อ)									ปริมาณปกติที่รับประทาน
	ไม่กินเลย หรือกินน้อยกว่า 1 ครั้ง/เดือน	1 ครั้ง/เดือน	2-3 ครั้ง / เดือน	1 ครั้ง/สัปดาห์	2 ครั้ง/สัปดาห์	3-4 ครั้ง/สัปดาห์	5-6 ครั้ง/สัปดาห์	1 ครั้ง/วัน	2+ ครั้ง/วัน	
อาหารเสริมโปรตีน (เกษตร-1)										
โปรตีนเกษตร										
เนื้อวัว เจ										
เนื้อไก่ เจ										
เนื้อหมู เจ										
เนื้อปลาอินทรีย์ เจ										
เนื้อเป็ด เจ										
เบอร์เกอร์เนื้อ เจ										
ไส้กรอก(ฮอตด็อก)เจ										
เบคอน เจ										
ปลาหมึก เจ										
ลูกชิ้นปลา เจ										
นักเก็ตไก่ เจ										

กรุณา เขียนชนิดและปริมาณของอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากถั่วเหลืองอื่นๆ นอกเหนือจากที่มีในหัวข้อต่างๆ ข้างต้น ซึ่งท่านรับประทานในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา

ชนิดอาหาร	ความถี่การรับประทานอาหารชนิดต่างๆ ในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา									ปริมาณปกติที่รับประทาน
	ไม่กินเลย หรือกินน้อยกว่า 1 ครั้ง/เดือน	1 ครั้ง/เดือน	2-3 ครั้ง / เดือน	1 ครั้ง/สัปดาห์	2 ครั้ง/สัปดาห์	3-4 ครั้ง/สัปดาห์	5-6 ครั้ง/สัปดาห์	1 ครั้ง/วัน	2+ ครั้ง/วัน	

Copyright by Mahidol University

Soy-food consumption check-list

ID_____

แบบบันทึกการกินอาหารที่ทำจากถั่วเหลือง

<u>กรุณา</u> เขียนตัวเลข ลงในช่องให้ตรงกับจำนวน และชนิดของอาหารที่ท่านรับประทานในแต่ละวัน

เดือน_____ ชื่อ-นามสกุล_____

วันที่/ รายการอาหาร															
เต้าหู้หลอดขาว (หลอด)															
เต้าหู้แผ่นขาว (แผ่น)															
เต้าหู้แผ่นเหลือง (แผ่น)															
นมถั่วเหลือง/ น้ำเต้าหู้ (กล่อง/ ถุง)															
เส้นถั่วเหลือง (ซอง)															
ไส้กรอก เจ (แท่ง)															
แฮม เจ (แผ่น)															
ปลาปรุงรส เจ (ชิ้น)															
ไก่อบปรุงรส เจ (ชิ้น)															
เต้าฮวย (ถ้วย)															
ฟองเต้าหู้ (ช้อนโต๊ะ)															
ผงโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง(ชต.)															
โปรตีนเกษตร (ซอง)															

วันที่/ รายการอาหาร															
เต้าหู้หลอดขาว (หลอด)															
เต้าหู้แผ่นขาว (แผ่น)															
เต้าหู้แผ่นเหลือง (แผ่น)															
นมถั่วเหลือง/ น้ำเต้าหู้ (กล่อง/ ถุง)															
เส้นถั่วเหลือง (ซอง)															
ไส้กรอก เจ (แท่ง)															
แฮม เจ (แผ่น)															
ปลาปรุงรส เจ (ชิ้น)															
ไก่อบปรุงรส เจ (ชิ้น)															
เต้าฮวย (ถ้วย)															
ฟองเต้าหู้ (ช้อนโต๊ะ)															
ผงโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง(ชต.)															
โปรตีนเกษตร (ซอง)															

Copyright by Mahidol University

ชื่อ-นามสกุล _____ ID_____

แบบสอบถามความพึงพอใจ และความสะดวกในการซื้อหาอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากถั่วเหลือง

กรุณาทำเครื่องหมาย ✓ ลงในช่องตัวเลขที่ตรงกับความเห็นของท่านมากที่สุด

5 = มากที่สุด 4 = มาก 3 = ปานกลาง 2 = น้อย 1 = น้อยที่สุดหรือไม่มีเลย

การประเมินความพึงพอใจ		5	4	3	2	1	
1. รสชาติของอาหารเหล่านี้							
1.1 เต้าหู้หลอด	ดี						ควรปรับปรุง
1.2 เต้าหู้แผ่นขาว	ดี						ควรปรับปรุง
1.3 ไส้กรอกหมู เจ	ดี						ควรปรับปรุง
1.4 ไส้กรอกไก่ เจ	ดี						ควรปรับปรุง
1.5 ไก่อบปรุงรส เจ	ดี						ควรปรับปรุง
1.6 โปรตีนเกษตร	ดี						ควรปรับปรุง
1.7 นมถั่วเหลืองกล่อง	ดี						ควรปรับปรุง
2. กลิ่นของอาหารเหล่านี้							
2.1 เต้าหู้หลอด	ดี						ควรปรับปรุง
2.2 เต้าหู้แผ่นขาว	ดี						ควรปรับปรุง
2.3 ไส้กรอกหมู เจ	ดี						ควรปรับปรุง
2.4 ไส้กรอกไก่ เจ	ดี						ควรปรับปรุง
2.5 ไก่อบปรุงรส เจ	ดี						ควรปรับปรุง
2.6 โปรตีนเกษตร	ดี						ควรปรับปรุง
2.7 นมถั่วเหลืองกล่อง	ดี						ควรปรับปรุง
3. รูปลักษณะภายนอกของอาหารเหล่านี้							
3.1 เต้าหู้หลอด	ดี						ควรปรับปรุง
3.2 เต้าหู้แผ่นขาว	ดี						ควรปรับปรุง
3.3 ไส้กรอกหมู เจ	ดี						ควรปรับปรุง
3.4 ไส้กรอกไก่ เจ	ดี						ควรปรับปรุง
3.5 ไก่อบปรุงรส เจ	ดี						ควรปรับปรุง
3.6 โปรตีนเกษตร	ดี						ควรปรับปรุง
3.7 นมถั่วเหลืองกล่อง	ดี						ควรปรับปรุง
4. ราคาของอาหารเหล่านี้ที่ท่านเคยพบเห็นมา	ยอมรับได้						แพงเกินไป
5. ความสะดวกในการซื้อหาอาหารเหล่านี้	ง่าย						ยาก
6. ความสะดวกในการปรุงอาหารเหล่านี้	สะดวก						ไม่สะดวก
7. การยอมรับได้ถ้าต้องบริโภคอาหารเหล่านี้เป็นเวลานาน	ยอมรับ						ไม่ยอมรับ
8. ขนาดและปริมาณของอาหารที่กำหนดให้ท่านรับประทาน	มากไป						น้อยไป
9. ความสะดวกที่จะรับประทานอาหารเหล่านี้ในชีวิตประจำวัน	สะดวก						ไม่สะดวก
10. ความเป็นไปได้ที่จะรับประทานอาหารเหล่านี้เป็นประจำ	เป็นไปได้						เป็นไปไม่ได้
11. โปรแกรมอาหารจากถั่วเหลืองที่ผู้วิจัยจัดให้	เหมาะสม						ไม่เหมาะสม

**** ข้อเสนอแนะ หรือข้อคิดเห็นเพิ่มเติม กรุณาเขียนต่อด้านหลัง**

**** ทางกลุ่มผู้วิจัย ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี ****

Copyright by Mahidol University

แบบสอบถามความพึงพอใจ และข้อคิดเห็นต่อการดำเนินการวิจัยโครงการถั่วเหลืองกับวัยทองครั้งนี้

กรุณาทำเครื่องหมาย ✓ ลงในช่องตัวเลขที่ตรงกับความเห็นของท่านมากที่สุด

5 = มากที่สุด 4 = มาก 3 = ปานกลาง 2 = น้อย 1 = น้อยที่สุดหรือไม่มีเลย

การประเมินความพึงพอใจ		5	4	3	2	1	
1. รูปแบบการจัดกิจกรรม	ดี						ควรปรับปรุง
2. การดูแลเอาใจใส่ของผู้วิจัยที่มีต่อผู้เข้าร่วมโครงการ	ดี						ควรปรับปรุง
3. ความรู้ทางโภชนาการที่ได้รับ	ดี						ควรปรับปรุง
4. โปรแกรมอาหารจากถั่วเหลืองที่ผู้วิจัยจัดให้	เหมาะสม						ควรปรับปรุง

<u>ข้อเสนอแนะ ข้อติชม หรือข้อคิดเห็นเพิ่มเติม เพื่อทางผู้วิจัยจะได้แก้ไขปรับปรุงในโครงการต่อๆไป</u>

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**** ทางกลุ่มผู้วิจัย ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี ***

Copyright by Mahidol University

APPENDIX C

The 3-day food record form

ID……

แบบบันทึกอาหารที่รับประทานใน 24 ชั่วโมง (สำหรับ 3 วัน)

(2 วันทำงาน, 1 วันหยุด)

ชื่อ-นามสกุล _____วันเดือนปี_____

อายุ _____ ปี น้ำหนัก _____ก.ก. ส่วนสูง _____ซ.ม.

การบันทึกรายการอาหารที่รับประทานใน 24 ชั่วโมง เป็นสิ่งสำคัญของการดำเนินการตามโครงการ ดังนั้นขอให้ท่านบันทึกสิ่งที่รับประทานจริง”

ข้อแนะนำในการบันทึก

1. บันทึกอาหารทุกชนิดรวมทั้งขนมและเครื่องดื่มที่ท่านรับประทานตลอดวัน ตั้งแต่ท่านตื่นนอนจนกระทั่งเข้านอน (ทั้งที่ทานในบ้าน และนอกบ้าน)
2. บันทึกอาหาร โดยระบุลักษณะ ชนิดและการปรุงอาหารนั้นๆด้วย เช่น หมูย่าง ไก่ทอด ปลาช่อนนึ่งมะนาว กล้วยเชื่อมราดน้ำกะทิ ต้มยำกุ้งแม่น้ำ (น้ำข้น) เป็นต้น
3. บันทึกส่วนประกอบและปริมาณของอาหารต่างๆที่ท่านรับประทาน โดยระบุขนาด ปริมาณและจำนวนของอาหารที่ท่านรับประทาน ให้ละเอียดที่สุดเท่าที่จะทำได้ เช่น ผัดผักรวมมิตร ให้ระบุว่า มีผักชนิดใดบ้างที่ท่านรับประทาน และท่านทานผักแต่ละชนิดปริมาณเท่าไร เครื่องปรุงที่ประกอบผัดผักมีอะไรบ้าง(เท่าที่พอทราบ)
4. การบันทึกอาหารประเภทเครื่องดื่ม ให้บันทึกเป็นปริมาตร หรือขนาด และส่วนผสม เช่น น้ำอัดลม(น้ำส้ม) หรือ น้ำอัดลม(โค้ก) 1 ขวดกลาง 280 ซี.ซี. , กาแฟ 1 ถ้วย ขนาด 120 ซี.ซี. ใส่ครีมเทียม 2 ช้อนชา และ น้ำตาลทราย 2 ช้อนชา เป็นต้น
5. บันทึกรายการอาหารที่รับประทานในรอบ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน คือ บันทึกรายการอาหารที่รับประทานใน 2 วันทำงาน และ 1 วันหยุด

Copyright by Mahidol University

ตัวอย่างการบันทึกอาหาร

ชื่อ-นามสกุล นางดุจดาว แสงเดือน วันเดือนปี 24 ก.พ. 2546

อาหารที่รับประทานวันนี้ (✓) ปกติ (วันทำงาน) ( ) วันหยุด

มื้ออาหาร (เวลา)	รายการอาหาร	ส่วนประกอบ	น้ำหนัก/ ปริมาณ	น้ำหนักอาหาร (กรัม)
เช้า 7.00 น.	กาแฟ 1 ถ้วย (ประมาณ 150 ซี.ซี.)	กาแฟผง	1 ช้อนชา	
		ครีมเทียม (คอฟฟี่เมต)	2 ช้อนชา	
		น้ำตาลทราย	1 ช้อนโต๊ะ	
8.00 น.	แซนด์วิชไก่ 2 ชิ้น (ขนาด	ขนมปังแผ่นขาว	2 แผ่น	
	ขนมปังครึ่งแผ่นประกบกัน)	แซนด์วิชสเปรด (ไก่)	3 ช้อนโต๊ะ	
		(มีมายองเนส, ไก่, แครอท,		
		แห้ว)		
กลางวัน	ข้าวราดแกง 2 อย่าง (ผัดผักรวม	ข้าวสวย	2 ทัพพี	
12.00 น.	และหมูทอดกระทียมพริกไทย)	ถั่วลันเตา	1 ช้อนโต๊ะ	
		แครอท	1 ช้อนโต๊ะ	
		เนื้อหมูในผัดผัก	2 ช้อนโต๊ะ	
		น้ำมันพืชในผัดผัก	2 ช้อนชา	
		น้ำปลา	2 ช้อนชา	
		หมูทอดขนาด 2x5 ซ.ม.	4 ชิ้น	
เย็น 18.00 น.	น้ำส้มคั้น (คั้นเอง ไม่ใส่น้ำตาล)	น้ำส้มคั้น	1 แก้วใหญ่	300 ซี.ซี.
19.30 น.	ข้าว	ข้าวสวย	2 ทัพพี	
	โปรตีนเกษตรผัดพริกขิง	โปรตีนเกษตร(สุกแล้ว)	5 ช้อนโต๊ะ	
		น้ำพริกแกง+ น้ำมัน	2 ช้อนชา	
		ถั่วฝักยาว ขนาด 1 นิ้ว	10 ชิ้น	
	แกงจืดเต้าหู้หลอดใส่หมูบะช่อ	เต้าหู้หลอด หนา 1 นิ้ว	6 ชิ้น	
			(1 หลอด)	
		หมูบะช่อ ขนาด	8 ลูก	
		เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม.		
		ผักกาดขาว	5 ช้อนโต๊ะ	

Copyright by Mahidol University

ID.....
เดือน .....

แบบบันทึกอาหารที่รับประทานใน 24 ชั่วโมง

ชื่อ-นามสกุล _____ วันเดือนปี _____

อาหารที่รับประทานวันนี้ ( ) ปกติ (วันทำงาน) ( ) วันหยุด

มื้ออาหาร (เวลา)	รายการอาหาร	ส่วนประกอบ	น้ำหนัก/ ปริมาณ	น้ำหนักอาหาร (กรัม)

Copyright by Mahidol University

APPENDIX D

The menopausal symptoms questionnaire (MSQ)

ID ……

แบบประเมินอาการที่เกี่ยวข้องกับภาวะหมดประจำเดือน

ชื่อ .....วันที่ .....

กรุณาทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องที่ตรงกับลักษณะอาการของท่านที่ประสบอยู่ในขณะนี้

ลำดับ	อาการ	ไม่เคย	บางครั้ง	บ่อยครั้ง	บ่อยมาก	score 0-3
1	ใจสั่น หัวใจเต้นเร็ว หรือใจเต้นแรง					
2	รู้สึกกระวนกระวาย เครียด หงุดหงิด					
3	นอนไม่หลับ หรือ นอนหลับยาก					
4	ตื่นเต้นตกใจง่าย					
5	กลัว วิตกกังวลใจ					
6	จิตใจไม่อยู่กับเนื้อกับตัว ไม่มีสมาธิ					
7	รู้สึกเหนื่อยอ่อนเพลีย ไม่ค่อยมีแรง					
8	ความสนใจในสิ่งต่างๆรอบตัวลดลง					
9	รู้สึกไม่มีความสุข ซึมเศร้า หดหู่ใจ					
10	รู้สึกน้อยใจ โศกเศร้าเสียใจง่าย					
11	โกรธง่าย ฉุนเฉียว อดทนอดกลั้นน้อยลง					
12	รู้สึกวิงเวียนศีรษะ หน้ามืดตาลาย คล้ายจะเป็นลม					
13	ร่างกายรู้สึกอึดอัด ศีรษะตื้อ มึนทึบ					
14	เหน็บชาตามส่วนต่างๆของร่างกาย					
15	ปวดศีรษะ					
16	ปวดข้อ ปวดเมื่อยตามตัว					
17	การรับรู้ความรู้สึกที่มือ เท้า ลดลง					
18	หายใจขัด หายใจลำบาก					
19	ร้อนวูบวาบตามตัว					
20	เหงื่อออกตอนกลางคืน					
21	ความสนใจเรื่องเพศลดลง					

P (1-11) = _____ **A** (1-6) = _____ **D** (7-11) = _____

S (12-18) = _____ **V** (19-20) = _____ **Sx** (21) = _____

Copyright by Mahidol University

APPENDIX E

Menopausal hand-book

<u>เอกสาร 1</u> : ข้อแนะนำเรื่องอาหาร ในหญิงวัยทอง

สำหรับคุณ _____

อายุ _____ **ปี ส่วนสูง** _____ **เซนติเมตร**

หลักการ

1. **น้ำหนักที่ควรจะเป็นเมื่อเทียบกับส่วนสูง เพื่อให้มีสุขภาพดี คือ** _____**กิโลกรัม**
2. **ปัจจุบัน น้ำหนัก** _____ **กก. สูง** _____ **เมตร**

ค่าดัชนีมวลกาย (BMI) = $\frac{\text{น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม}}{\text{ส่วนสูงเป็นเมตร x ส่วนสูงเป็นเมตร}}$

ดังนั้น คุณมีค่าดัชนีมวลกาย (BMI) = _____ = _____ **กก./ม.**^{2}

x

BMI อยู่ในช่วง **18.5** ถึง **22.9 : ขอแสดงความยินดีด้วย!** คุณไม่ได้มีน้ำหนักเกินหรือน้อยเกินไป

BMI อยู่ในช่วง **23** ถึง **24.9 :คุณมีน้ำหนักเกิน!** และเริ่มมีความเสี่ยงต่อสุขภาพเกิดขึ้นแล้ว ควรควบคุมน้ำหนัก

BMI อยู่ในช่วง **25** ถึง **29.9 : คุณเป็นคนอ้วน!** และมีความเสี่ยงต่อสุขภาพเพิ่มขึ้นแล้ว ต้องควบคุมน้ำหนักแล้ว

BMI ตั้งแต่ **30 ขึ้นไป : คุณเป็นคนอ้วนมาก และถือว่าเป็นโรคอ้วนแล้ว !** ความเสี่ยงต่อสุขภาพของคุณ**เพิ่มมากขึ้นแล้ว** และคุณควรจะลงมือจัดการลดน้ำหนักส่วนเกินอย่างจริงจัง

3. **จำนวนพลังงาน (กิโลแคลอรีที่ควรได้รับต่อวัน) =** _____ **กิโลแคลอรี**

คำนวณจากสูตรของ Harris-Benedict

ความต้องการพลังงานสำหรับผู้หญิง = 655 + (9.6 x W) + (1.8 x H) - (4.7 x A)

กิโลแคลอรีต่อวัน

เมื่อ W คือ น้ำหนักที่ควรจะเป็น (กิโลกรัม), H คือส่วนสูง (เซนติเมตร),และ A คือ อายุ (ปี)

Copyright by Mahidol University

4. ปริมาณสารอาหารต่างๆ ที่คุณควรได้รับใน 1 วัน <u>เมื่ออยู่ในช่วงปกติ (ไม่ได้กินถั่วเหลือง)</u>

(คาร์โบไฮเดรต 55 %, โปรตีน 15 %, ไขมัน 30 %)

<u>ในกรณีที่ไม่ดื่มนม</u>			**<u>ในกรณีที่ดื่มนม</u>**		
ข้าว	6	ส่วน	ข้าว	5	ส่วน
เนื้อสัตว์ไม่ติดมัน,ไม่ติดหนัง	3	ส่วน	เนื้อสัตว์ไม่ติดมัน,ไม่ติดหนัง	3	ส่วน
ไขมัน (น้ำมันพืช)	3	ส่วน	ไขมัน (น้ำมันพืช)	3	ส่วน
ผัก ข.	2	ส่วน	ผัก ข.	1	ส่วน
ผลไม้	2	ส่วน	ผลไม้	2	ส่วน
นมพร่องไขมัน	-	ส่วน	นมพร่องไขมัน	1	ส่วน

5. ปริมาณสารอาหารต่างๆ ที่คุณควรได้รับใน 1 วัน <u>เมื่ออยู่ในช่วง "กินถั่วเหลือง 3 เดือน</u>"

(คาร์โบไฮเดรต 55 %, โปรตีน 15 %, ไขมัน 30 %)

ข้าว	5	**ส่วน**
เนื้อสัตว์ไม่ติดมัน,ไม่ติดหนัง	1	**ส่วน**
โปรตีนจากถั่วเหลือง (เต้าหู้, โปรตีนเกษตร, ไส้กรอกเจ, เนื้อไก่เจ) **สัดส่วนตามที่กำหนดให้**		
ไขมัน (น้ำมันพืชปรุงอาหาร)	2	**ส่วน**
ผัก ข.	1	ส่วน
ผลไม้	2	ส่วน
นมถั่วเหลือง (แทนนมพร่องไขมัน)	**1**	**ส่วน**

***ปริมาณอาหารต่อส่วน อ่านจากเอกสาร 2** (รายการอาหารแลกเปลี่ยน)

*ปริมาณของโปรตีนจากถั่วเหลืองแต่ละชนิดที่กำหนดให้รับประทาน **<u>ในช่วง"กินถั่วเหลือง 3เดือน</u>"**

เต้าหู้ = เต้าหู้หลอดขาว 1 หลอด = เต้าหู้แผ่น 1 แผ่น

โปรตีนเกษตร = น้ำหนัก 30 กรัม (1 ซอง)

ไส้กรอกเจ = ไส้กรอกไก่เจ 2 แท่ง = ไส้กรอกหมูเจ 2 แท่ง

ไก่อบปรุงรสเจ = 6 ชิ้น (น้ำหนัก 60 กรัม)

** เลือกอาหารอย่างใดอย่างหนึ่งในแต่ละวัน + นมถั่วเหลือง 1 กล่อง

Copyright by Mahidol University

**** รับประทานไข่ทั้งฟอง ไม่ควรเกิน 2 ฟองต่อสัปดาห์ (ตลอดระยะเข้าโครงการ)**

**** งดหรือหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารที่มีส่วนผสมของ เครื่องในสัตว์,น้ำมันและไขมันจากสัตว์, เนื้อสัตว์ติดมัน, น้ำมันปาล์ม, กะทิ, มาการีน, เนยขาว, เนยสด, น้ำสลัดข้น, เบคอน, ครีม**

**** ใช้น้ำมันรำข้าว หรือน้ำมันถั่วเหลือง ประกอบอาหาร**

**** ผัก ก. (ผักใบ) กินได้ไม่จำกัดจำนวน**

ตารางแสดงชนิดและขนาดของอาหาร ที่กำหนดให้กินใน 1 สัปดาห์ ในช่วง "กินถั่วเหลือง 3 เดือน"

วันที่	มื้อเช้า หรือ มื้อกลางวัน	มื้อเย็น	ปริมาณรวมของโปรตีนถั่วเหลือง (กรัม)	ปริมาณพลังงานที่ได้ (kcal)
1	นมถั่วเหลือง 1 กล่อง	เต้าหู้หลอดขาว 1 หลอด (250 กรัม)	18	230
2	นมถั่วเหลือง 1 กล่อง	เต้าหู้แผ่นเหลือง(หรือขาว) 1 แผ่น (154 กรัม)	30	274
3	นมถั่วเหลือง 1 กล่อง	ไส้กรอกเจ 2 แท่ง (100 กรัม)	34	509
4	นมถั่วเหลือง 1 กล่อง	โปรตีนเกษตร (30 กรัม)	20	239
5	นมถั่วเหลือง 1 กล่อง	ไส้กรอกไก่เจ 2 แท่ง (100 กรัม)	34	509
6	นมถั่วเหลือง 1 กล่อง	โปรตีนเกษตร (30 กรัม)	20	239
7	นมถั่วเหลือง 1 กล่อง	ไก่อบปรุงรสเจ 60 กรัม	28	333

Copyright by Mahidol University

ตัวอย่างการจัดเมนูอาหาร

มื้ออาหาร	ช่วงปกติ	ช่วงกินถั่วเหลือง
เช้า	กาแฟ ขนมปังกรอบ 2 แผ่นเล็ก	นมถั่วเหลือง 1 กล่อง, ขนมปังกรอบ 2 แผ่นเล็ก
กลางวัน	ข้าวผัดหมูใส่ไข่ 1 จาน น้ำเปล่า	ข้าวผัดหมูใส่ไข่ 1 จาน น้ำเปล่า
อาหารว่าง	สับปะรด 6 ชิ้นคำ (ไม่จิ้มน้ำตาล)	สับปะรด 6 ชิ้นคำ (ไม่จิ้มน้ำตาล)
เย็น	ข้าวสวย 2 ทัพพี , น้ำพริก ผักจิ้ม ปลาทูทอด, แกงส้มมะละกอใส่ปลา, มะละกอ 6 ชิ้นคำ	ข้าวสวย 2 ทัพพี , ลาบเต้าหู้ , แกงส้มมะละกอใส่ปลา, มะละกอ 6 ชิ้นคำ
เช้า	ซาละเปา 1 ลูกกลาง	นมถั่วเหลือง 1 กล่อง , ซาละเปา 1 ลูกกลาง
กลางวัน	ก๋วยเตี๋ยวลูกชิ้น 1 ชาม	ก๋วยเตี๋ยวลูกชิ้น 1 ชาม
อาหารว่าง	ฝรั่งครึ่งลูก(ขนาดกลาง) (ไม่จิ้มน้ำตาล)	ฝรั่งครึ่งลูก(ขนาดกลาง) (ไม่จิ้มน้ำตาล)
เย็น	ข้าวสวย 2 ทัพพี, ผัดผักรวมมิตร แกงจืดตำลึงใส่หมูบะช่อ, มะม่วงมันครึ่งลูก(กลาง)	ข้าวสวย 2 ทัพพี, โปรตีนเกษตรผัดพริกขิง แกงจืดตำลึงใส่หมูบะช่อ , มะม่วงมันครึ่งลูก(กลาง)

Copyright by Mahidol University

<u>เอกสาร 2</u> : รายการอาหารแลกเปลี่ยน

รายการอาหารแลกเปลี่ยน คือ รายการอาหารที่มีการจัดเป็นหมวดๆ ซึ่งพิจารณาจากสารอาหารและชนิดของอาหาร และจัดทำโดย American Dietetic Association และ American Diabetes Association รายการนี้แบ่งอาหารออกเป็น 6 หมวด ได้แก่

1. หมวดน้ำนม
2. หมวดผัก
3. หมวดผลไม้
4. หมวดธัญพืช ข้าว แป้ง
5. หมวดเนื้อสัตว์
6. หมวดไขมัน

แต่ละหมวดของอาหารได้กำหนดปริมาณพลังงานและสารอาหารไว้ และเรียกปริมาณที่กำหนดนั้นว่า 1 ส่วนแลกเปลี่ยน ในแต่ละหมวดมีอาหารหลากหลายชนิดให้แลกเปลี่ยนกันได้ ตัวอย่างเช่น **“หมวดธัญพืช”** ถ้าไม่กินข้าว ก็สามารถเปลี่ยนเป็นขนมปัง หรือก๋วยเตี๋ยว หรือขนมจีน เป็นต้น ซึ่งให้พลังงานและสารอาหารในปริมาณใกล้เคียงกัน อาหารบางชนิด เช่น ถั่วเมล็ดแห้ง และเนยถั่ว มีโปรตีนสูง เป็นอาหารที่แลกเปลี่ยนได้จากอาหาร 2 หมวดคือหมวดธัญพืช และหมวดเนื้อสัตว์ รายละเอียดของอาหารแลกเปลี่ยนในแต่ละหมวด มีดังนี้

Copyright by Mahidol University

1. หมวดน้ำนม

นม 1 ส่วน : ให้โปรตีน 8 กรัม, ไขมัน 8 กรัม, คาร์โบไฮเดรต 12 กรัม พลังงาน 152 กิโลแคลอรี

นมสดธรรมดา.....1 ถ้วยตวง หรือ 240 มล.
นมสดพร่องมันเนย*.....1 ถ้วยตวง หรือ 240 มล.
นมสดขาดมันเนย*.....1 ถ้วยตวง หรือ 240 มล.
นมระเหย..... ½ ถ้วยตวง หรือ 120 มล.
นมผง.....1/4 ถ้วยตวง หรือ 4 ช้อนโต๊ะ

* นมพร่องมันเนย 1 ส่วน ให้โปรตีน 8 กรัม คาร์โบไฮเดรต 12 กรัม, พลังงาน 125 กิโลแคลอรี
* นมขาดมันเนย 1 ส่วน ให้โปรตีน 8 กรัม คาร์โบไฮเดรต 12 กรัม, พลังงาน 80 กิโลแคลอรี

นมที่ควรงด

นมที่เติมน้ำตาล, นมข้นหวาน, นมช็อกโกแลต,โกโก้,โอวัลติน

2. หมวดเนื้อ

เนื้อ 1 ส่วน : ให้โปรตีน 7 กรัม, ไขมัน 5 กรัม, พลังงาน 73 กิโลแคลอรี

เนื้อหมู วัว เป็ด ไก่.....30 กรัม หรือ 2 ช้อนโต๊ะ หรือ 14 ชิ้นเล็ก
เนื้อปลา.....30 กรัม หรือ 2 ช้อนโต๊ะ
เนื้อปู, หอย.....30 กรัม หรือ 2 ช้อนโต๊ะ
ไข่เป็ด, ไข่ไก่ทั้งฟอง.....1 ฟองใหญ่
ไส้กรอก.....1 - 1 ½ แท่ง
กุ้งขนาดกลาง..... 4 - 6 ตัว
ปลาทูขนาดกลาง.....1 ตัว
เต้าหู้ขาว, อ่อน .....100 กรัม หรือ ½ หลอด
เต้าหู้เหลือง, แข็ง.....65 กรัม หรือ 1/3 ชิ้น
ลูกชิ้นปลาหรือลูกชิ้นเนื้อ.....5 ลูกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 ซม.
นมถั่วเหลืองไม่หวาน ..... 1 ถ้วยตวง หรือ 240 มล.

หมายเหตุ น้ำหนักของเนื้อ คือน้ำหนักของเนื้อสุก

3. หมวดข้าว แป้ง ธัญพืช

ข้าว 1 ส่วน : ให้โปรตีน 2 กรัม, คาร์โบไฮเดรต 18 กรัม, พลังงาน 80 กิโลแคลอรี

ข้าวสาร..... 20 กรัม
ข้าวสวย..... 55 กรัม หรือ 5 ช้อนโต๊ะ
ข้าวเหนียวนึ่ง.....35 กรัม หรือ ¼ ถ้วยตวง หรือ 3 ช้อนโต๊ะ
ก๋วยเตี๋ยวลวก.....90 กรัม หรือ ½ ถ้วยตวง หรือ 8 ช้อนโต๊ะ
ขนมจีน..... 90 กรัม หรือ 1 จับใหญ่
ขนมปัง..... 25 กรัม หรือ 1 แผ่น
ขนมปังแครกเกอร์ ..... 20 กรัม หรือ 2 แผ่น
ข้าวโพดต้ม .....65 กรัม หรือ ½ ฝัก หรือ 6 ช้อนโต๊ะ
บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป, แห้ง ..... 20 กรัม หรือ 1/3 ห่อบะหมี่สุก ..... 75 กรัม หรือ 1 ก้อน
เส้นหมี่ลวก.....100 กรัม หรือ 10 ช้อนโต๊ะ
วุ้นเส้นแช่น้ำ.....45 กรัม หรือ 5 ช้อนโต๊ะ
วุ้นเส้นลวก.....100 กรัม หรือ 10 ช้อนโต๊ะ
มักกะโรนีสุก.....75 กรัม หรือ 2/3 ถ้วยตวง หรือ 8 ช้อนโต๊ะ
สปาเกตตี้ลวก .....75 กรัม หรือ 2/3 ถ้วยตวง หรือ 8 ช้อนโต๊ะ
วีทเจิร์ม .....20 กรัม หรือ 3 ช้อนโต๊ะ
แปะก๊วยต้ม..... 40 กรัม หรือ 3 ช้อนโต๊ะ
สาคูลวก..... 75 กรัม หรือ 5 ช้อนโต๊ะ
มันฝรั่งต้ม.....100 กรัมหรือ ½ ถ้วยตวง หรือ 10 ช้อนโต๊ะ
เผือก, มันเทศต้ม.....65 กรัม หรือ ½ ถ้วยตวง หรือ 6 ช้อนโต๊ะ
เกาลัดจีนคั่ว .....30 กรัม หรือ 5 เม็ดเล็ก(3 เม็ดใหญ่)
มันฝรั่งทอด (French fried)..... 8 ชิ้น
แป้งสาลี, แป้งข้าวโพด .....20 กรัม หรือ 3 ช้อนโต๊ะ

** ถั่วเมล็ดแห้ง สุก ½ ถ้วยตวง มีคุณค่าอาหารเท่ากับข้าว -แป้ง 1 ส่วน และเนื้อสัตว์ไขมันต่ำมาก 1 ส่วน

Copyright by Mahidol University

4. หมวดผลไม้

ผลไม้ 1 ส่วน : ให้คาร์โบไฮเดรต 15 กรัม, พลังงาน 60 กิโลแคลอรี

กล้วยน้ำว้า, กล้วยไข่ ..... 45 กรัม หรือ 1 ผลกลาง
กล้วยหอม ..... 50 กรัม หรือ ½ ผลกลาง
กล้วยหักมุก..... 50 กรัม หรือ ½ ผลใหญ่
แคนตาลูป.....200 กรัม หรือ ¼ ผล(6 - 8 ชิ้นคำ)
เงาะ.....85 กรัม หรือ 4 -5 ผล
ชมพู่..... 250 กรัม หรือ 2 ผล
แตงโม.....285 กรัม หรือ ¼ ผลกลาง (20 ชิ้นคำ)
มะละกอ..... 115 กรัม (6 - 8 ชิ้นคำ)
มังคุด..... 75 กรัม หรือ 4 ผล
ฝรั่ง..... 120 กรัม หรือ ½ ผลกลาง
ลางสาด..... 90 กรัม หรือ 7-8 ผล
ลิ้นจี่สด.....110 กรัม หรือ 6 ผล
ส้มเขียวหวาน .....150 กรัม หรือ 2 ผลกลาง
ส้มเช้ง.....120 กรัม หรือ 1 ผลกลาง
ส้มโอ.....130 กรัม หรือ 2 กลีบใหญ่
สับปะรด.....125 กรัม หรือ 6-8 ชิ้นคำ
แอ๊ปเปิ้ล.....100 กรัม หรือ 1 ผลเล็ก
มะม่วงดิบ.....100 กรัม หรือ ½ ผลใหญ่
มะม่วงสุก..... 80 กรัม หรือ ½ ผลกลาง
องุ่น.....100 กรัม หรือ 20 ผลกลาง
ลำไย..... 55 กรัม หรือ 6 ผล
น้อยหน่า.....60 กรัม หรือ ½ ผล
ละมุด..... 70 กรัม หรือ 1 ½ ผล
ทุเรียน.....40 กรัม หรือ 1 เม็ดเล็ก
น้ำส้มคั้น, น้ำผลไม้..... 120 มล.

ผลไม้ที่ควรงด

องุ่น, ทุเรียน, ละมุด, มะม่วงสุก, น้อยหน่า, ขนุน, ลำไย, ลูกเกด, อ้อย, ลูกพรุน, ผลไม้กระป๋อง, ผลไม้แช่อิ่ม, ผลไม้เชื่อม, ผลไม้กวน

5. หมวดผัก

แบ่งเป็น 2 ประเภท

1. ผัก ก.

ผัก ก. 1 ส่วน ให้พลังงานน้อยมาก จึงรับประทานได้ตามต้องการ ได้แก่

ผักตั้งโอ๋	ผักกาดขาว	ผักกาดสลัด	ผักกาดเขียว
ผักบุ้ง	ผักกวางตุ้ง	ผักตำลึง	ผักกาดหอม
หัวปลี	หัวไชเท้า	มะเขือต่างๆ	บวบ
ฟักเขียว	ดอกกุยช่าย	ผักปวยเล้ง	คูณ
มะเขือเทศ	สายบัว	แตงกวา	ยอดฟักทองอ่อน
ตั้งโอ๋	ดอกกะหล่ำ	คื่นช่าย	ผักชี
ขมิ้นขาว	พริกหยวก	พริกหนุ่ม	กะหล่ำปลี
น้ำเต้า	ผักแว่น		

ผัก ข. 1 ส่วน ให้โปรตีน 2 กรัม, คาร์โบไฮเดรต 5 กรัม, พลังงาน 28 กิโลแคลอรี

ปริมาณผัก ข. 1 ส่วน คือ ผักสุก 1/3 – 1/2 ถ้วยตวง หรือ 50-70 กรัม และผักดิบ ¾ - 1 ถ้วยตวง หรือ 70 กรัม (2 ทัพพีเล็ก) ได้แก่

ฟักทอง	มะรุม	สะตอ	ถั่วลันเตา
แครอท	ถั่วฝักยาว	สะเดา	รากบัว
ถั่วงอกหัวโต	ถั่วพู	ถั่วแขก	ดอกแค
บร็อคโคลี่	ผักคะน้า	ผักกะเฉด	ข้าวโพดอ่อน
ใบ-ดอกขี้เหล็ก	หอมหัวใหญ่	ยอดชะอม	ยอดกระถิน
ดอกขจร	ดอกโสน	หน่อไม้	มะละกอดิบ
มะระจีน	เห็ดเป๋าฮื้อ	เห็ดฟาง	เห็ดนางรม
หัวผักกาดแดง (บีทรูท)		ยอดมะพร้าวอ่อน	

Copyright by Mahidol University

6. หมวดไขมัน หรือน้ำมัน

ไขมัน 1 ส่วน : ให้ไขมัน 5 กรัม, พลังงาน 45 กิโลแคลอรี
แบ่งตามประเภทของกรดไขมัน ดังนี้

ประเภทที่ 1 : กลุ่มมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวตำแหน่งเดียว (MUFA)สูง ได้แก่

น้ำมันมะกอก ..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
น้ำมันรำข้าว..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
น้ำมันถั่วลิสง ..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
เนยถั่วลิสง ..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
ถั่วลิสง ..... 10 เม็ด(10 กรัม)
เม็ดอัลมอนด์ ..... 10 เม็ด(10 กรัม)
เม็ดมะม่วงหิมพานต์ ..... 6 เม็ด(10 กรัม)

ประเภทที่ 2 : กลุ่มมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (PUFA)สูง ได้แก่

น้ำมันถั่วเหลือง ..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
น้ำมันข้าวโพด..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
น้ำมันดอกคำฝอย ..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
น้ำมันดอกทานตะวัน ..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
มาของเนส. ..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
น้ำสลัด (น้ำใส) ..... 1 ช้อนโต๊ะ(15 กรัม)
เม็ดดอกทานตะวัน ..... 1 ช้อนโต๊ะ(10 กรัม)
เม็ดฟักทอง..... ..... 1 ช้อนโต๊ะ(10 กรัม)

ประเภทที่ 3 : กลุ่มมีกรดไขมันอิ่มตัว (SFA)สูง ได้แก่

น้ำมันหมู ,น้ำมันไก่ ..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
น้ำมันปาล์ม..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
มาการีน ..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
เนยขาว,เนยสด ..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
กะทิ..... 1 ช้อนโต๊ะ(15 กรัม)
น้ำสลัดข้น ..... 1 ช้อนชา (5 กรัม)
เบคอน..... 1 ชิ้นเล็ก (10 กรัม)
ครีมนมสด 40% ..... 1 ช้อนโต๊ะ (15 กรัม)

Copyright by Mahidol University

ปริมาณอาหารแลกเปลี่ยน

สำหรับอาหาร 700 กิโลแคลอรี

ในกรณีที่ไม่ดื่มนม			ในกรณีที่ดื่มนม		
ข้าว	3	ส่วน	ข้าว	3	ส่วน
เนื้อสัตว์	2	ส่วน	เนื้อสัตว์	1	ส่วน
ไขมัน	3	ส่วน	ไขมัน	3	ส่วน
ผัก ข.	1	ส่วน	ผัก ข.	1	ส่วน
ผลไม้	2	ส่วน	ผลไม้	1	ส่วน
นม	-	ส่วน	นม	1	ส่วน

สำหรับอาหาร 800 กิโลแคลอรี

ในกรณีที่ไม่ดื่มนม			ในกรณีที่ดื่มนม		
ข้าว	5	ส่วน	ข้าว	4	ส่วน
เนื้อสัตว์	3	ส่วน	เนื้อสัตว์	2	ส่วน
ไขมัน	3	ส่วน	ไขมัน	2	ส่วน
ผัก ข.	2	ส่วน	ผัก ข.	2	ส่วน
ผลไม้	1	ส่วน	ผลไม้	1	ส่วน
นม	-	ส่วน	นม	1	ส่วน

สำหรับอาหาร 1000 กิโลแคลอรี

ในกรณีที่ไม่ดื่มนม			ในกรณีที่ดื่มนม		
ข้าว	6	ส่วน	ข้าว	5	ส่วน
เนื้อสัตว์	3	ส่วน	เนื้อสัตว์	3	ส่วน
ไขมัน	3	ส่วน	ไขมัน	3	ส่วน
ผัก ข.	2	ส่วน	ผัก ข.	1	ส่วน
ผลไม้	2	ส่วน	ผลไม้	2	ส่วน
นม	-	ส่วน	นม	1	ส่วน

สำหรับอาหาร 1200 กิโลแคลอรี

ในกรณีที่ไม่ดื่มนม			ในกรณีที่ดื่มนม		
ข้าว	6.5	ส่วน	ข้าว	6.5	ส่วน
เนื้อสัตว์	4.5	ส่วน	เนื้อสัตว์	3.5	ส่วน
ไขมัน	4	ส่วน	ไขมัน	4	ส่วน
ผัก ข.	1.5	ส่วน	ผัก ข.	1.5	ส่วน
ผลไม้	2.5	ส่วน	ผลไม้	1.5	ส่วน
นม	-	ส่วน	นม	1	ส่วน

Copyright by Mahidol University

เอกสาร 3 : ตัวอย่างอาหารที่ควรหลีกเลี่ยง

ประเภทกับข้าว

แกงเขียวหวาน แกงเผ็ดต่างๆ แกงคั่ว แกงกะหรี่ แกงมัสมั่นไก่ แกงสับนก
แกงเทโพ ต้มข่า ต้มกะทิฟัก-สายบัว ต้มส้ม ต้มเค็ม ต้มจับฉ่าย
ตือฮวน ต้มเครื่องในวัว ต้มพะโล้ ไข่ลูกเขย ผัดวุ้นเส้น ผัดเผ็ด
ผัดคะน้าหมูกรอบ ผัดพริกขิง หมี่กรอบ บาร์บีคิว(หวาน) หมูหวาน เทมปุระ
ปลาทอดราดพริก ผัดเปรี้ยวหวาน หมูสะเต๊ะ ไก่ชุบแป้งทอดหมูย่าง ฉู่ฉี่

ประเภทขนม

ขนมหวานทุกชนิด ขนมอบเค้ก คุกกี้ ขนมปังหวาน เยลลี่ แยม
สับปะรดกวน ไอศกรีม ทอฟฟี่-ลูกอม ช็อคโกแลต ข้าวต้มผัด มะพร้าวแก้ว
พายหวานและเค็ม ขนมปังกรอบไส้ครีม มะขามแก้ว กล้วยตาก

ประเภทก๋วยเตี๋ยว อาหารจานเดียว

บะหมี่กรอบราดหน้า ผัดซีอิ๊ว ผัดไทย หอยทอด ราดหน้า ก๋วยจั๊บ
ก๋วยเตี๋ยวต้มยำ เย็นตาโฟ ก๋วยเตี๋ยวแขก ก๋วยเตี๋ยวหลอด ข้าวมันไก่ ข้าวหมกไก่
หมี่กะทิ สปาเก็ตตี้ ข้าวขาหมู เต้าหู้ทอด ขนมหัวผักกาด
ขนมจีนน้ำพริก ขนมกุ๋ยฉ่าย ขนมจีนซาวน้ำ ก๋วยเตี๋ยวแห้ง (ใส่น้ำมันเจียวมาก)
ข้าวผัดน้ำมันมาก แฮมเบอร์เกอร์ ไก่ทอด มันฝรั่งทอด

ประเภทเครื่องดื่ม

น้ำหวาน น้ำอัดลม น้ำผลไม้ต่างๆ เช่น น้ำลำไย น้ำส้ม นมเปรี้ยว UHT นมหวานรสต่างๆ
แนะนำ ให้ดื่มน้ำเปล่า, น้ำมะตูมต้มไม่ใส่น้ำตาล, น้ำใบเตยไม่ใส่น้ำตาล

เบ็ดเตล็ดอื่นๆ

หมูหยอง หมูแผ่น หมูตั้ง ไส้กรอก เบคอน กุนเชียง
แคบหมู ไส้กรอกอีสาน ขนมครก ปาท่องโก๋ ตับทอด ขนมปัง
สังขยา ขนมปังหน้าหมู-หน้ากุ้ง หลนต่างๆ ซาละเปาทอด
ถั่วลิสงทอด-คั่ว ข้าวเม่าทอด ขนมเปี๊ยะ กล้วยแขกมันทอด อาหารชุบแป้งทอด
เม็ดมะม่วงหิมพานต์คั่ว-ทอด อาหารทอดน้ำมันมากๆ ขนมหวานใส่กะทิ
น้ำจิ้มลูกชิ้น น้ำจิ้มสุกี้ มายองเนส น้ำสลัดข้น น้ำผึ้ง

- หลีกเลี่ยงการใช้น้ำมัน กะทิ น้ำตาล ซึ่งให้พลังงานสูง

- ปรุงอาหารที่รับประทานโดยการนึ่ง ลวก อบ ต้ม ตุ๋น ปิ้ง จะดีกว่า

Copyright by Mahidol University

<u>เอกสาร 4</u> : ตัวอย่างอาหารจากเต้าหู้และโปรตีนเกษตร

<u>เต้าหู้ผัดเห็ดนางฟ้า</u>

เครื่องปรุง

เต้าหู้เหลืองชนิดอ่อน	1 แผ่น	เห็ดนางฟ้า	200 กรัม
ต้นหอมหั่นท่อนยาว	3 ต้น	กระเทียมสับละเอียด	1 ช้อนชา
น้ำตาลทราย	1/2 ช้อนชา	ซีอิ๊วขาว	2 ช้อนโต๊ะ
น้ำซุป	2 ช้อนโต๊ะ	น้ำมันพืชสำหรับทอด	2 ช้อนโต๊ะ

วิธีทำ 1. ล้างเต้าหู้ หั่นเป็นชิ้นพอคำ ทอดให้เหลือง พักไว้

2. ล้างเห็ดนางฟ้า เฉือนโคนที่สกปรกออก ฉีกเป็นชิ้นพอคำ

3. ใส่น้ำมันสำหรับผัดลงในกะทะ ตั้งไฟ ใส่กระเทียม เจียวพอหอม ใส่เห็ดนางฟ้า เต้าหู้ทอด น้ำซุป ผัดให้ทั่ว ปรุงรสด้วยน้ำตาล ตักใส่จาน เสิร์ฟ

<u>เต้าหู้ผัดพริกขิง</u>

เครื่องปรุง

เต้าหู้เหลืองชนิดแข็ง	1 แผ่น	ถั่วฝักยาว	5 ฝัก
ใบมะกรูดซอย	1 ช้อนชา	น้ำพริกแกงเผ็ด	2 ช้อนโต๊ะ
น้ำตาลทราย	1 ช้อนโต๊ะ	ซีอิ๊วขาว	1-2 ช้อนโต๊ะ
น้ำซุป	2 ช้อนโต๊ะ	น้ำมันพืชสำหรับผัด	2 ช้อนโต๊ะ
น้ำมันพืชสำหรับทอด			

วิธีทำ 1. ล้างเต้าหู้ หั่นเป็นชิ้นหนา 1 ½ ซ.ม. ตามยาว ทอดให้เหลือง ตักขึ้นให้สะเด็ดน้ำมัน

2. ลวกถั่วผักยาวทั้งฝักพอสุก ตักขึ้นแช่น้ำเย็นจัด จากนั้นหั่นเป็นท่อนสั้นๆ

3. ใส่น้ำมันสำหรับผัดลงในกะทะ ตั้งไฟให้ร้อน ใส่น้ำพริกแกง ผัดให้หอม

4. ปรุงรสด้วยน้ำตาล ซีอิ๊วขาว ใส่น้ำซุป ถั่วฝักยาวลวกแล้ว และเต้าหู้ที่ทอดไว้ ผัดให้เข้ากัน ปิดไฟ ตักใส่จาน โรยด้วยใบมะกรูด เสิร์ฟ

<u>เต้าหู้ผัดขี้เมา</u>

เครื่องปรุง

เต้าหู้เหลืองชนิดแข็ง	1 แผ่น	กะเพราเด็ดเป็นใบ	1 ถ้วย
พริกขี้หนูสวน	10 เม็ด	หอมแดงซอย	10 หัว
กระเทียม	10 กลีบ	น้ำตาลทราย	1-2 ช้อนชา
ซีอิ๊วขาว	2-3 ช้อนโต๊ะ	น้ำมันพืชสำหรับผัด	1 ช้อนโต๊ะ
น้ำมันพืชสำหรับทอด			

วิธีทำ 1. ล้างเต้าหู้ หั่นชิ้นเล็ก ทอดพอเหลือง ตักขึ้นให้สะเด็ดน้ำมัน ทอดใบกระเพราครึ่งหนึ่งให้กรอบ พักไว้

Copyright by Mahidol University

2.โขลกพริกขี้หนู หอมแดง กระเทียมเข้าด้วยกันให้ละเอียด

3. ใส่น้ำมันสำหรับผัดลงในกะทะ ตั้งไฟกลาง พอร้อนใส่เครื่องที่โขลก ผัดพอหอม ใส่เต้าหู้ผัดพอทั่ว

4. ปรุงรสด้วยซีอิ๊วขาว น้ำตาล ใส่ใบกระเพราที่เหลือ ผัดให้เข้ากัน ตักใส่จาน โรยด้วยกะเพราทอด-กรอบ เสิร์ฟ

ผัดพริกขิงโปรตีนเกษตร

เครื่องปรุง

โปรตีนเกษตรโขลกหยาบ	1 ซอง		
น้ำพริกพริกขิง	2-3 ช้อนโต๊ะ	ถั่วฝักยาวหั่นท่อนยาวลวก	100 กรัม
พริกชี้ฟ้าแดงซอย	2 เม็ด	ใบมะกรูดซอย	1 ช้อนโต๊ะ
น้ำตาลปีบ	2 ช้อนชา	ซีอิ๊วขาว	3 ช้อนโต๊ะ
น้ำมันพืชสำหรับผัด	3 ช้อนโต๊ะ	น้ำมันพืชสำหรับทอด	

วิธีทำ 1. ใส่น้ำมันสำหรับทอดลงในกะทะ ตั้งไฟ ทอดโปรตีนเกษตรพอเหลืองกรอบ ตักขึ้นวางบนกระดาษซับน้ำมัน

2. ใส่น้ำมันสำหรับผัดลงในกะทะ ตั้งไฟให้ร้อน ใส่น้ำพริกแกงลงผัดให้หอม ใส่โปรตีนเกษตรทอดกรอบ ผัดพอทั่ว ปรุงรสด้วยซีอิ๊วขาว น้ำตาล ใส่ถั่วฝักยาว เคล้าให้เข้ากัน ปิดไฟ ตักใส่จาน โรยใบมะกรูด พริกชี้ฟ้าแดง เสิร์ฟ

ลาบเต้าหู้

เครื่องปรุง

เต้าหู้ขาวชนิดแข็ง	1 แผ่น	เห็ดหูหนู เห็ดฟางอย่างละ	200 กรัม
ต้นหอมซอย	1 ช้อนโต๊ะ	สะระแหน่เด็ดเป็นใบ	½ ถ้วย
พริกขี้หนูแห้งคั่วป่น	2 ช้อนชา	หอมแดงซอย	2 ช้อนโต๊ะ
ข้าวคั่วป่น	2 ช้อนโต๊ะ	ซีอิ๊วขาว น้ำมะนาว อย่างละ	2-3 ช้อนโต๊ะ

ผักสด เช่น ถั่วฝักยาว กะหล่ำปลี ใบโหระพา

วิธีทำ 1. ล้างเห็ดหูหนู เห็ดฟาง เฉือนโคนที่สกปรกออก ลวกเห็ดทั้ง 2 ชนิดพอสุก ตักขึ้น หั่นเป็นชิ้นเล็ก พักไว้

2. นึ่งเต้าหู้ พอร้อนนำมายีหรือบดให้ละเอียด คั่วพอแห้ง

3. เคล้าเต้าหู้ เห็ดหูหนู เห็ดฟางเข้าด้วยกัน ปรุงรสด้วยซีอิ๊วขาว น้ำมะนาว ใส่หอมแดง พริกป่น ข้าวคั่ว เคล้าให้เข้ากัน ชิมรส ใส่ต้นหอม ใบสะระแหน่ เคล้าเบาๆ จัดใส่จาน รับประทานกับผักสด

ยำไส้กรอกเจ

เครื่องปรุง

ไส้กรอกเจ	2 แท่ง	ตะไคร้	1 ต้น
คื่นฉ่าย	2 ต้น	ใบสะระแหน่	1 ถ้วย
พริกขี้หนู	5 เม็ด	ซีอิ๊วขาว ซอสปรุงรสอย่างละ	1 ช้อนโต๊ะ

Copyright by Mahidol University

เกลือป่น	1/4 ช้อนชา	น้ำตาลทราย	1 ช้อนชา
มะนาว	2 ผล		

วิธีทำ 1. นำไส้กรอกเจที่นึ่งสุกแล้ว มาหั่นเป็นชิ้นบางๆ ตะไคร้หั่นละเอียด คื่นฉ่ายสับหยาบ ๆ ใบสะระแหน่เด็ดเอาเฉพาะใบ พริกขี้หนูหั่นละเอียด

2. คลุกเคล้าไส้กรอกเจกับส่วนผสมอื่นๆ ทั้งหมด แล้วเติมเครื่องปรุงทุกอย่าง คนให้เข้ากัน ชิมรสตามชอบใจ รับประทานกับผักสดต่าง ๆ

* อาจผสมเนื้อหมูสับ หรือ เนื้อไก่ลวกสุก ลงไปด้วยก็ได้ตามชอบ

<u>เต้าหู้ทรงเครื่อง</u>

เครื่องปรุง

เต้าหู้หลอด	2 หลอด	เห็ดหอมแช่น้ำให้นิ่มหั่นชิ้นเล็ก	4 ดอก
ต้นหอมหั่นท่อนยาว	2-3 ต้น	หอมใหญ่หั่นเสี้ยว	1 หัว
เม็ดมะม่วงหิมพานต์ทอด	¼ ถ้วย	กระเทียมสับละเอียด	1 ช้อนโต๊ะ
พริกไทยป่น	½ ช้อนชา	แป้งมัน	1 ช้อนโต๊ะ
น้ำตาลทราย	1 ช้อนชา	ซีอิ๊วขาว	1 ช้อนโต๊ะ
น้ำมันหอย	2 ช้อนโต๊ะ	น้ำซุป	3 ช้อนโต๊ะ
น้ำมันพืชสำหรับทอด			

วิธีทำ 1. หั่นเต้าหู้หนาประมาณ 1 นิ้ว ทอดให้เหลือง ตักใส่จานไว้ ตักน้ำมันออกเหลือประมาณ 1 ช้อนโต๊ะ ใส่กระเทียม เจียวให้หอม ใส่เห็ดหอม หอมใหญ่ น้ำมันหอย ซีอิ๊วขาว น้ำตาล ผัดให้เข้ากัน

2.ใส่น้ำซุป แป้งมันละลายน้ำเล็กน้อย ผัดให้เข้ากัน ใส่ต้นหอม ผัดให้ทั่ว ตักราดบนเต้าหู้ทอด โรยพริกไทยและเม็ดมะม่วงหิมพานต์ เสิร์ฟร้อนๆ

<u>ยำหมูเทียม (เต้าหู้ทอดกรอบ)</u>

เครื่องปรุง

เต้าหู้ทอดกรอบ	100 กรัม	พริกขี้หนูสวนซอย	1 ช้อนโต๊ะ
หอมใหญ่หั่นเสี้ยว	½ หัว	มะเขือเทศหั่นเสี้ยว	1 ลูก
ต้มหอมหั่นท่อนยาว	2 ต้น	คื่นฉ่ายหั่นท่อนยาว	1 ต้น
น้ำตาลทราย	1 ช้อนชา	ซีอิ๊วขาว น้ำมะนาวอย่างละ	2 ช้อนโต๊ะ
น้ำมันพืชสำหรับทอด			

วิธีทำ 1. ทอดเต้าหู้ในน้ำมันร้อน พอพองเหลือง ตักขึ้นให้สะเด็ดน้ำมัน

2. ผสมพริกขี้หนู น้ำตาล ซีอิ๊วขาว น้ำมะนาว คนให้เข้ากัน

3. ผสมผักทุกอย่างในอ่างผสม ใส่น้ำยำข้อ 2 เคล้าพอทั่ว ใส่เต้าหู้ทอด เคล้าเบา ๆ ให้เข้ากัน ตักใส่จาน

Copyright by Mahidol University

หมูหมักซอส (โปรตีนเกษตร)

เครื่องปรุง

โปรตีนเกษตรชนิดเม็ดใหญ่แช่น้ำให้ฟอง	2	ถ้วย	ซีอิ๊วขาว ซอสถั่วเหลือง อย่างละ	2	ช้อนโต๊ะ
ซอสมะเขือเทศ	2	ช้อนโต๊ะ	น้ำตาลทราย	1	ช้อนโต๊ะ
เกลือ พริกไทย พริกป่นอย่างละ	1/2	ช้อนชา	น้ำเปล่า	1	ถ้วย

วิธีทำ 1. นำเครื่องปรุงทั้งหมด ผสมลงในชาม เติมด้วยน้ำเปล่า แล้วเทราดลงในโปรตีนเกษตร คนกลับไปมา ปิดฝาหมักไว้ 20 นาที

2. ตั้งน้ำมันสำหรับทอดให้ร้อนปานกลาง นำโปรตีนที่หมักไว้ลงทอด จนผิวนอกกรอบหอม ไม่ต้องทอดนานเพราะจะแข็ง

3. เวลาเสิร์ฟใช้มีดหั่นเป็นแผ่นๆ รับประทานกับข้าวต้มร้อนๆ

เต้าหู้นึ่งแป๊ะซะ

เครื่องปรุง

เห็ดฟาง	1	ถ้วย	เต้าหู้ขาวอย่างแข็ง	2	แผ่น
ผักกาดขาว	1	ต้น	หัวไชเท้าหั่นบาง ๆ	1/2	ถ้วย
แครอทหั่นบาง ๆ	1/2	ถ้วย	ขิงอ่อนหั่นฝอย	1	ช้อนโต๊ะ
คื่นฉ่าย	2	ต้น	พริกชี้ฟ้าสุก	1	เม็ด
งาคั่วบด	1	ช้อนโต๊ะ	เต้าเจี้ยว ซีอิ๊วขาวอย่างละ	1	ช้อนโต๊ะ
เกลือป่น น้ำตาลทรายอย่างละ	1	ช้อนโต๊ะ	น้ำมะนาว	2	ช้อนโต๊ะ
น้ำมันพืช					

วิธีทำ 1. หั่นเต้าหู้ขาวเป็นลิ่มหนาประมาณครึ่งเซ็นติเมตร ผักกาดขาวหั่นหยาบ ๆ เห็ดฟางผ่าเป็นแผ่น

2. เรียงผักกาดขาวลงในจาน เอาเต้าหู้วางทับข้างบน แต่งด้วยหัวไชเท้าและแครอทโดยรอบ

3. ตั้งกระทะเจียวงาคั่วกับน้ำมันพืช ใส่เห็ดฟางลงผัด เติมเครื่องปรุงทุกอย่าง เติมน้ำ 2 ถ้วย พอเดือดนำไปเทราดลงบนจานเต้าหู้ที่เตรียมไว้ (ถ้าชอบบ๊วยดองใส่ด้วยก็ได้)

4. นำไปนึ่งไฟแรงสัก 10 นาที ยกลงก่อนเสิร์ฟโรยด้วยขิงอ่อน พริกชี้ฟ้าสุกหั่นแฉลบ บีบมะนาว รับประทานร้อน ๆ (ถ้าชอบเผ็ดใส่พริกขี้หนูทุบพอแหลก)

ผัดหมี่ซั่ว

เครื่องปรุง

โปรตีนเกษตรเม็ดเล็ก	1/2	ถ้วย	เส้นหมี่ซั่ว	1/2	กิโลกรัม
เห็ดหอม	5	ดอก	ผักคะน้า	2	ต้น
พริกไทย	1	ช้อนชา	งาขาวคั่วบด	1	ช้อนโต๊ะ
น้ำมันพืช	3	ช้อนโต๊ะ	ซีอิ๊วขาว	3	ช้อนโต๊ะ

วิธีทำ 1. โปรตีนเกษตรเม็ดเล็กทอดกรอบ แล้วตักขึ้นพักไว้

Copyright by Mahidol University

2. ต้มน้ำให้เดือด ใส่เส้นหมี่ลงต้มพอนุ่มยกลง ตักขึ้นล้างด้วยน้ำเย็น เสร็จแล้วพักไว้ ถ้าทำมากให้ใส่น้ำมันพืชคลุกเคล้าเส้นไว้

3. เห็ดหอมแช่น้ำพอนุ่ม นำมาหั่นชิ้นขนาดพอดีคำ พักไว้ เก็บน้ำแช่เห็ดหอมไว้

4. หั่นผักคะน้า กะหล่ำปลีหยาบๆ ล้างสะอาดพักไว้

5. ตั้งกะทะใส้น้ำมันพอร้อน ใส่งาคั่วลงผัดพอหอม ใส่เห็ดหอม กะหล่ำปลี เติมซีอิ๊วขาว เติมน้ำเห็ดหอม 4-5 ช้อนโต๊ะ ผัดจนผักสุก แล้วจึงใส่เส้นหมี่ลงผัดสักพักใหญ่ โรยด้วยโปรตีนเกษตรทอดกรอบตักเสิร์ฟร้อนๆ

<u>แกงจืดเต้าหู้</u>

เครื่องปรุง

เต้าหู้หลอด	1 หลอด	ถั่วแขกหั่นท่อนสั้น	½ ถ้วย
ซีอิ๊วขาว	1 ช้อนโต๊ะ	น้ำซุป	1 ½ ถ้วย

วิธีทำ 1. หั่นเต้าหู้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า พักไว้

2. ใส่น้ำซุปลงในหม้อ ตั้งไฟพอเดือด ใส่ซีอิ๊วขาว เต้าหู้ ถั่วแขก พอเดือดอีกครั้งยกลง ตักใส่ชาม เสิร์ฟ

<u>ต้มข่าเจ</u>

เครื่องปรุง

เห็ดนางฟ้าหรือเห็ดฟาง	1 ถ้วย	เนื้อไก่เจ หรือเต้าหู้เหลือง	1 ก้อน
ข่าอ่อนปอกเปลือกหั่นบางๆ	1 ถ้วย	กะทิ	8 ถ้วย
พริกขี้หนูหรือพริกชี้ฟ้าสีแดง	1 ช้อนโต๊ะ	ตะไคร้หั่นเป็นท่อน	1 ต้น
ใบมะกรูด	3 ใบ	ซีอิ๊วขาว	1/4 ถ้วย
น้ำมะนาว	3 ช้อนโต๊ะ	น้ำตาล	1 ช้อนโต๊ะ
ใบผักชีหั่น	1 ช้อนชา		

วิธีทำ ต้มน้ำกะทิให้เดือด เติมเนื้อไก่เจหรือเต้าหู้เหลืองตัดชิ้นพอคำ เห็ดหั่น ใส่ข่าอ่อน ตะไคร้ และพริกปิดฝา เคี่ยวไฟอ่อนๆ ประมาณครึ่งชั่วโมง ยกลง ปรุงด้วยซีอิ๊ว น้ำมะนาว น้ำตาล เสิร์ฟโรยผักชี ถ้าชอบเผ็ดใส่พริกขี้หนูหั่น

<u>ต้มจืดวุ้นเส้น</u>

เครื่องปรุง

วุ้นเส้นแช่น้ำแล้ว	1 ถ้วย	เห็ดฟาง	1 ถ้วย
โปรตีนเกษตร	1/2 ถ้วย	คื่นฉ่าย	2 ต้น
งาคั่วบด	1 ช้อนโต๊ะ	น้ำมันพืช	2 ช้อนโต๊ะ
ซีอิ๊วขาว ซอสปรุงรสอย่างละ	1 ช้อนโต๊ะ	เกลือป่น	1/2 ช้อนชา
น้ำตาลทราย	1 ช้อนโต๊ะ		

วิธีทำ 1. เห็ดฟางผ่า 4 วุ้นเส้นตัดให้พอดี โปรตีนเกษตรสับละเอียด

2. เจียวงาคั่วกับน้ำมันพอร้อน ใส่โปรตีนเกษตรลงผัดให้หอมนำขึ้นพักไว้

Copyright by Mahidol University

3. ต้มน้ำ 4 ถ้วย ให้เดือด ใส่เห็ดฟาง วุ้นเส้นเติมเครื่องปรุงทั้งหมด โรยด้วยใบคื่นฉ่ายที่หั่นแล้ว ยกลงทันที ก่อนเสิร์ฟราดด้วยโปรตีนเกษตรที่เจียวงาไว้ เหยาะพริกไทยนิดหน่อย รับประทานร้อน ๆ

ข้าวผัดไส้กรอกเจ (หรือไก่ปรุงรสเจ)

เครื่องปรุง

ไส้กรอกเจ หรือไก่ปรุงรสเจ	มะเขือเทศ
แตงกวา	มะนาว
ซีอิ๊วขาว	ซอสพริก
ข้าวสวย	ผักคะน้า
น้ำมันพืช	ซอสปรุงรส

วิธีทำ 1. หั่นไส้กรอกเจ หรือไก่ปรุงรสเจ เป็นชิ้นเล็ก ๆ

2. ตั้งกระทะเทน้ำมัน พอเดือดนำแฮม มะเขือเทศ ผักคะน้าลงไปผัด แล้วตามด้วยข้าวสวย

3. เติมซอสปรุงรส ซอสพริก ซีอิ๊วขาว แล้วผัดให้เข้ากัน

4. ปรุงรสตามใจชอบ ตักใส่จาน และหั่นแตงกวา ตกแต่งให้ดูน่ารับประทาน

Copyright by Mahidol University

APPENDIX F

Determination of glucose

Principles of the procedure

Plasma were separated from fasting blood samples, which were preserved by the glycolysis inhibitor, sodium fluoride (NaF), mixed with the anticoagulant, calcium/potassium oxalate. The glucose level in plasma was determined using the VITROS GLU Slide.

The VITROS GLU Slide is a dry, multilayered, analytical element coated on a polyester support.

A 10µL drop of plasma sample was deposited on the slide where the spreading layer promotes the uniform distribution of the sample and permits an even penetration of solute molecules into the underlying reagent layer.

The oxidation of sample glucose was catalyzed by glucose oxidase to form hydrogen peroxide and gluconate. This reaction was followed by an oxidative coupling catalyzed by peroxidase in the presence of dye precursors to produce a dye. The intensity of the dye was measured by reflected light.

The dye system used was closely related to that first reported by Trinder [62]. The chemistry of the glucose slides has been described by Curme et al [63].

Test Type	Wavelength	Assay Time and Temperature
Colorimetric	540 ηm	Approximately 5 minutes at 37 ºC

Reaction Sequence

$$\beta\text{-D-glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{glucose oxidase}} \text{D-gluconic acid} + H_2O_2$$

$$2\ H_2O_2 + \text{4-aminoantipyrine} + \text{1,7-dihydroxynaphthalene} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{red dye}$$

Copyright by Mahidol University

Reagents

Slide ingredients

Reactive ingredients are glucose oxidase (*Aspergillus niger*, E.C.1.1.3.4); peroxidase (horseradish root, E.C.1.11.1.7); 1,7-dihydroxynaphthalene(dye precursor); and 4-aminoantipyrine hydrochloride(dye precursor).

Other ingredients include pigment, binders, pH 5.0 buffer, surfactants, stabilizers, and cross-linking agent.

Slide storage

Unopened slide cartridges:

- Store at or below 2 ° - 8 ºC (36º – 46 ºF).
- Do not store with or near hydrogen peroxide.

Cartridges in the system's slide supply:

- Leave in the slide supply for no more than two weeks, then replace with a fresh cartridge.
- Leave in the slide supply when the system is turned off for up to two hours.
- Verify performance with control materials:
  - If the system is turned off for more than two hours
  - After reloading cartridges that have been removed from the slide supply and stored for later use.

Testing procedure

- Remove slide cartridges from storage.
- The slide cartridge must reach room temperature, 18 º- 28 ºC (64º – 82 ºF), before it is unwrapped and loaded into the slide supply. Allow the cartridge to warm up at least:
  - 60 minutes after removing from the freezer **or**
  - 30 minutes after removing from the refrigerator

  Load the cartridges within 24 hours after they reach room temperature.
- Remove the inner wrapper and immediately load into the slide supply.
- Analyze sample on the VITROS 250 Automated Chemistry System, Johnson & Johnson, USA.

Copyright by Mahidol University

Sample dilution

If samples show glucose concentrations that exceed the system's reportable (dynamic) range, follow this procedure:

1. Dilute the plasma samples with the diluent, VITROS 7% BSA.
2. Reanalyze.
3. Multiply the results by the dilution factor to obtain the original sample's glucose concentration.

Reporting units and Unit conversion

Conventional units	SI units	Alternate units
mg/dL	mmol/L (mg/dL x 0.05551)	g/L (mg/dL x 0.01)

Limitations of the procedure

- Hemolysis causes a decrease in glucose results of up to 10% in the presence of 3+ hemolysis, equivalent to 250 mg/dL (0.16 mmol/L) of hemoglobin.
  This interference is caused by catalase or other cellular constituents released during lysis. However, the extent of basis is highly correlated with the degree of hemolysis seen in the sample.
- Elevated lipids may limit diffusion of oxygen to the reactants. Dilute grossly lipemic samples twofold before analysis.

Reportable range (Dynamic range) in serum or plasma samples

Conventional units (mg/dL)	SI units (mmol/L)	Alternate units (g/L)
20.0 – 625.0	1.11 – 34.69	0.20 – 6.25

Sensitivity of the procedure

The lower limit of the reportable (dynamic) range is 20.0 mg/dL (1.11 mmol/L).

Copyright by Mahidol University

APPENDIX G

Determination of total cholesterol

Principles of the procedure

Serum were separated from the clotted fasting blood samples within 3 hours of collection. The level of total cholesterol in serum was determined using the VITROS CHOL Slide.

The VITROS CHOL Slide is a dry, multilayered, analytical element coated on a polyester support. The method is based on an enzymatic-colorimetric method similar to that proposed by Allain et al [64].

A drop of serum sample was deposited on the slide and was evenly distributed by the spreading layer to the underlying layers. The Triton X-100 (TX100) surfactant in the spreading layer aids in dissociating the cholesterol and cholesterol esters from lipoprotein complexes presented in the sample. Hydrolysis of the cholesterol esters to cholesterol was catalyzed by cholesterol ester hydrolase. Free cholesterol was then oxidized in the presence of cholesterol oxidase to form cholestenone and hydrogen peroxide. Finally, hydrogen peroxide oxidized a leuco dye in the presence of peroxidase to generate a colored dye.

The density of dye formed was proportional to the cholesterol concentration presented in the sample and was measured by reflectance spectrophotometry.

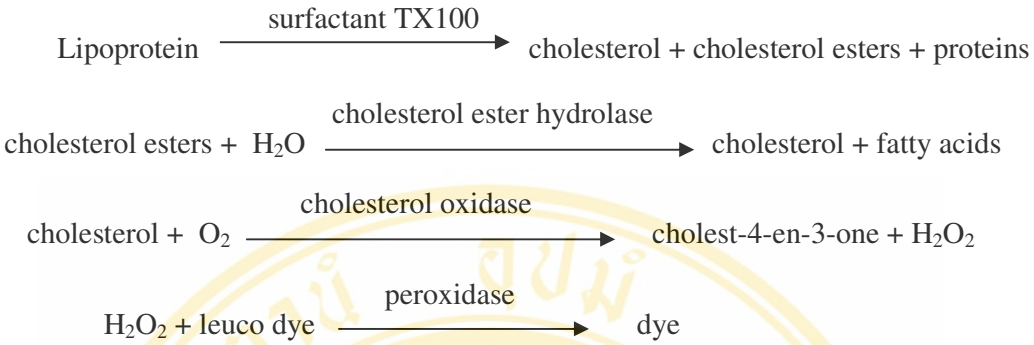
Sample drop volume

- The volume of the sample drop depends on the format of the slide. For slides with coatings labeled 3201 and above, the sample drop volume is 5.5 µL. For all other slide formats, the sample drop volume is 10 µL.

Test Type	Wavelength	Assay Time and Temperature
Colorimetric	540 ηm	Approximately 5 minutes at 37 ºC

Copyright by Mahidol University

Reaction Sequence



Reagents

Slide ingredients

Reactive ingredients are Triton X-100; cholesterol oxidase (*Nocardia sp.* or *Cellulomonas sp.*, E.C.1.1.3.6); cholesterol ester hydrolase (*Candida rugosa* or *Pseudomonas sp.*, E.C.3.1.1.13); peroxidase (horseradish root, E.C.1.11.1.7); and 2-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-4,5-bis(4-dimethylaminophenyl)imidazole (leuco dye).

Other ingredients include pigment, binders, pH 6.25 buffer, surfactants, stabilizers, and cross-linking agent.

Slide storage

Unopened slide cartridges:

- Gen 22 and below: Store at or below 2 º - 8 ºC (36º – 46 ºF).
- Gen 23 and above: Store at or below -18 ºC (0 ºF).

To reduce cartridge warm-up time or if freezer space is limited, unopened slide cartridges may be stored in the refrigerator at 2º- 8ºC (36º – 46ºF) for up to six months.

Cartridges in the system's slide supply:

- Leave in the slide supply for no more than two weeks, then replace with a fresh cartridge.
- Leave in the slide supply when the system is turned off for up to two hours.
- Verify performance with control materials:
  - If the system is turned off for more than two hours
  - After reloading cartridges that have been removed from the slide supply and stored for later use.

Copyright by Mahidol University

Testing procedure

- Remove slide cartridges from storage.
- The slide cartridge must reach room temperature, 18 °- 28 ºC (64º – 82 ºF), before it is unwrapped and loaded into the slide supply. Allow the cartridge to warm up at least:
  - 60 minutes after removing from the freezer **or**
  - 30 minutes after removing from the refrigerator

  Load the cartridges within 24 hours after they reach room temperature.
- Remove the inner wrapper and immediately load into the slide supply.
- Analyze sample on the VITROS 250 Automated Chemistry System, Johnson & Johnson, USA.

Sample dilution

If samples are lipemic or show cholesterol concentrations that exceed the system's reportable (dynamic) range, follow this procedure:

1. Dilute 1 part of sample with 1 part of the diluent, VITROS 7% BSA.
2. Reanalyze.
3. Multiply the results by 2 to obtain the original sample's cholesterol concentration.

Reporting units and Unit conversion

Conventional units	SI units	Alternate units
mg/dL	mmol/L (mg/dL x 0.02586)	g/L (mg/dL x 0.01)

Reportable range (Dynamic range)

Conventional units (mg/dL)	SI units (mmol/L)	Alternate units (g/L)
50 - 325	1.29 – 8.40	0.50 – 3.25

Sensitivity of the procedure

The lower limit of the reportable (dynamic) range is 50 mg/dL (1.29 mmol/L; 0.50g/L).

Copyright by Mahidol University

APPENDIX H

Determination of triglycerides

Principles of the procedure

Serum were separated from the clotted fasting blood samples within 4 hours of collection. The concentration of triglycerides in serum was determined using the VITROS TRIG Slide.

The VITROS TRIG Slide is a dry, multilayered, analytical element coated on a polyester support. The analysis principle is based on an enzymatic-colorimetric method as described by Spayd et al [65].

A drop of serum sample was deposited on the slide and was evenly distributed by the spreading layer to the underlying layers. The Triton X-100 (TX100) surfactant in the spreading layer aids in dissociating the triglycerides from lipoprotein complexes presented in the sample. The triglyceride molecules were then hydrolyzed by lipase to yield glycerol and fatty acids. Glycerol diffused to the reagent layer, where it was phosphorylated by glycerol kinase in the presence of adenosine triphosphate (ATP). In the presence of L-α-glycerol-phosphate oxidase, L-α-glycerophosphate was then oxidized to dihydroxyacetone phosphate and hydrogen peroxide. Finally, hydrogen peroxide oxidized a leuco dye, catalyzed by peroxidase, to produce a colored dye.

The density of dye formed was proportional to the triglycerides concentration presented in the sample and was measured by reflectance spectrophotometry.

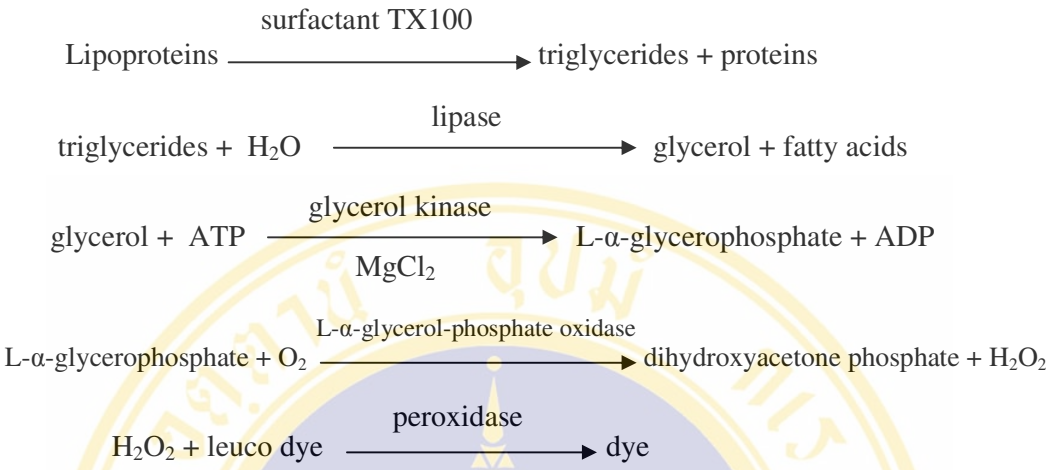
Sample drop volume

- The volume of the sample drop depends on the format of the slide. For slides with coatings labeled 3201 and above, the sample drop volume is 5.5 µL. For all other slide formats, the sample drop volume is 10 µL.

Test Type	Wavelength	Assay Time and Temperature
Colorimetric	540 ηm	Approximately 5 minutes at 37 ºC

Copyright by Mahidol University

Reaction Sequence



Reagents

Slide ingredients

Reactive ingredients are Triton X-100; lipase (*Candida rugosa*, E.C.3.1.1.3); glycerol kinase (*Cellulomonas sp.*, E.C.2.7.1.30); peroxidase (horseradish root, E.C.1.11.1.7); L-α-glycerol-phosphate oxidase (*Pediocuccos sp.*, E.C.1.1.3.21); 2-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-4,5-bis (4-dimethylaminophenyl)imidazole (leuco dye); and adenosine triphosphate.

Other ingredients include pigment, binders, pH 8.0 buffer, surfactants, stabilizers, scavenger, enzyme cofactors, dye solubilizer, and cross-linking agent.

Slide storage

Unopened slide cartridges:

- Store at or below -18 ºC (0 ºF).

Cartridges in the system's slide supply:

- Leave in the slide supply for no more than one week, then replace with a fresh cartridge.
- Leave in the slide supply when the system is turned off for up to two hours.
- Verify performance with control materials:
  - If the system is turned off for more than two hours
  - After reloading cartridges that have been removed from the slide supply and stored for later use.

Copyright by Mahidol University

Testing procedure

- Remove slide cartridges from storage.
- The slide cartridge must reach room temperature, 18 °- 28 ºC (64º – 82 ºF), before it is unwrapped and loaded into the slide supply. Allow the cartridge to warm up at least 60 minutes after removing from the freezer.
  Load the cartridges within 24 hours after they reach room temperature.
- Remove the inner wrapper and immediately load into the slide supply.
- Analyze sample on the VITROS 250 Automated Chemistry System, Johnson & Johnson, USA.

Sample dilution

If samples are grossly lipemic or show the concentrations of triglycerides that exceed the system's reportable (dynamic) range, follow this procedure:

1. Dilute sample with the diluent, VITROS 7% BSA.
2. Reanalyze.
3. Multiply the results by the dilution factor to obtain the original sample's triglycerides concentration.

Reporting units and Unit conversion

Conventional units	SI units	Alternate units
mg/dL	mmol/L (mg/dL x 0.01129)	g/L (mg/dL x 0.01)

Reportable range (Dynamic range)

Conventional units (mg/dL)	SI units (mmol/L)	Alternate units (g/L)
10.0 – 525.0	0.11 – 5.93	0.10 – 5.25

Sensitivity of the procedure

The lower limit of the reportable (dynamic) range is 10.0 mg/dL (0.11 mmol/L).

Special precautions

- Specimen collection equipment must be soap-free and glycerol-free.
- Do not use collection tubes with glycerol-lubricated stoppers.

Copyright by Mahidol University

APPENDIX I

Determination of HDL cholesterol, and Calculation of LDL cholesterol

Principles of the procedure

Serum were separated from the clotted fasting blood samples as soon as possible - preferably within 3 hours after blood collection in the closed containers to avoid contamination and evaporation. The VITROS Magnetic HDL-Cholesterol Reagent was used to prepare serum samples for analysis of HDL cholesterol (HDL-C) level in serum. Following pretreatment of the samples, HDL-C level was measured by the VITROS CHOL Slide.

HDL was separated by the precipitation of LDL and VLDL using dextran sulfate (MW 50,000) and magnesium chloride [66, 67]. The reagent also contained iron particles that were coated with a polymer that enhanced the capture of the non-HDL lipoproteins onto the particles. The supernatant containing HDL-C was prepared by removing the precipitated lipoproteins when a magnetic field was applied.

A drop of pretreated sample was deposited on the VITROS CHOL Slide and was evenly distributed by the spreading layer to the underlying layers. HDL-C underwent reactions to produce hydrogen peroxide. Finally, hydrogen peroxide reacted with a leuco dye, catalyzed by peroxidase, to produce a blue dye complex.

After measurement of the amount of light reflected from the dye after a fixed incubation period, the amount of HDL-C presented in the pretreated sample was calculated.

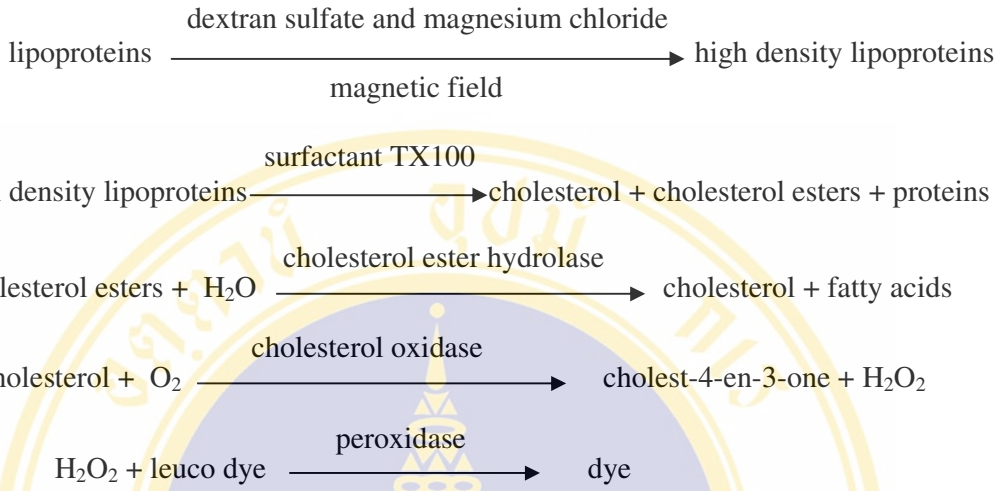
Sample drop volume

- The volume of the sample drop depends on the format of the slide. For slides with coatings labeled 3201 and above, the sample drop volume is 5.5 µL. For all other slide formats, the sample drop volume is 10 µL.

Test Type	Wavelength	Assay Time and Temperature
Colorimetric	670 ηm	Approximately 5 minutes at 37 ºC

Copyright by Mahidol University

Reaction Sequence



Reagents

VITROS Magnetic HDL-Cholesterol Reagent

For use with VITROS Chemistry Systems.

Reactive ingredients:

- Magnesium chloride
- Magnetically responsive particles

Non-reactive ingredients:

- 0.01% sodium azide
- Stabilizers

Slide ingredients of VITROS CHOL Slide

Reactive ingredients are Triton X-100; cholesterol oxidase (*Nocardia sp.* or *Cellulomonas sp.*, E.C.1.1.3.6); cholesterol ester hydrolase (*Candida rugosa* or *Pseudomonas sp.*, E.C.3.1.1.13); peroxidase (horseradish root, E.C.1.11.1.7); and 2-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-4,5-bis(4-dimethylaminophenyl)imidazole (leuco dye).

Other ingredients include pigment, binders, pH 6.25 buffer, surfactants, stabilizers, and cross-linking agent.

Copyright by Mahidol University

Slide storage

Unopened slide cartridges:

- Gen 22 and below: Store at or below 2 º - 8 ºC (36º – 46 ºF).
- Gen 23 and above: Store at or below -18 ºC (0 ºF).

To reduce cartridge warm-up time or if freezer space is limited, unopened slide cartridges may be stored in the refrigerator at 2º- 8ºC (36º – 46ºF) for up to six months.

Cartridges in the system's slide supply:

- Leave in the slide supply for no more than two weeks, then replace with a fresh cartridge.
- Leave in the slide supply when the system is turned off for up to two hours.
- Verify performance with control materials:
  - If the system is turned off for more than two hours
  - After reloading cartridges that have been removed from the slide supply and stored for later use.

Testing procedure

- Prepare VITROS Magnetic HDL-Cholesterol Reagent and make sure the reagent warm to room temperature and be mixed by gentle inversion until the particles on the bottom of the bottle are completely resuspended before using.
- Pretreat specimen using the VITROS Magnetic HDL-Cholesterol Reagent and remove the supernatant.
- Never revortex the specimen-reagent mixture after the initial vortex has been completed.
- Remove slide cartridges from storage.
- The slide cartridge must reach room temperature, 18 º- 28 ºC (64º – 82 ºF), before it is unwrapped and loaded into the slide supply. Allow the cartridge to warm up at least 60 minutes after removing from the freezer.
  Load the cartridges within 24 hours after they reach room temperature.
- Remove the inner wrapper and immediately load into the slide supply.
- Analyze the supernatant of the pretreated-specimen on the VITROS 250 Automated Chemistry System, Johnson & Johnson, USA.

Copyright by Mahidol University

Sample dilution

If samples show the HDL-C concentrations that exceed the system's reportable (dynamic) range or appear cloudy after pretreatment, follow this procedure:

1. Dilute the untreated sample with an equal volume of the VITROS 7% BSA diluent.
2. Repeat the sample pretreatment procedure.
3. Multiply the results by 2 to obtain the original sample's HDL-C concentration.
4. Additional dilutions are not recommended.

Reporting units and Unit conversion

Conventional units	SI units	Alternate units
mg/dL	mmol/L (mg/dL x 0.02586)	g/L (mg/dL x 0.01)

Reportable range (Dynamic range)

Conventional units (mg/dL)	SI units (mmol/L)	Alternate units (g/L)
3.0 – 100.0	0.08 – 2.59	0.03 – 1.00

Sensitivity of the procedure

The lower limit of the reportable (dynamic) range is 3.0 mg/dL (0.08 mmol/L).

Calculation of LDL cholesterol (LDL-C)

LDL-C level can be calculated from the Friedewald's formula[68] as follow:

Conventional units (mg/dL):

LDL-C = total cholesterol – HDL-C – (triglycerides/5)

SI units (mmol/L):

LDL-C = total cholesterol – HDL-C – (triglycerides/2.2)

Calculation of LDL-C is not appropriate for samples with the concentration of triglycerides greater than 400 mg/dL (4.52 mmol/L).

Copyright by Mahidol University

APPENDIX J

Determination of uric acid

Principles of the procedure

Serum were separated from the clotted fasting blood samples within 4 hours of collection. The concentration of uric acid in serum was determined using the VITROS URIC Slide.

The VITROS URIC Slide is a dry, multilayered, analytical element coated on a polyester support. The analytical method is similar to those described by Kageyama [69] and Trivedi et al [70]. The assays differ in the choice of dye and, consequently, in the wavelength used to measure the density of the resulting product.

A 10µL drop of serum sample was deposited on the slide and was evenly distributed by the spreading layer to the underlying layers. Uric acid from the sample migrated to the reagent layer, where it was oxidized in the presence of uricase to form allantoin and hydrogen peroxide. Finally, hydrogen peroxide reacted with a leuco dye, catalyzed by peroxidase, to produce a colored compound that was measured by reflectance spectrophotometry.

Test Type	Wavelength	Assay Time and Temperature
Colorimetric	670 ηm	Approximately 5 minutes at 37 ºC

Reaction Sequence

$$2\ H_2O + \text{uric acid} \xrightarrow{\text{uricase}} \text{allantoin} + H_2O_2 + CO_2$$

$$H_2O_2 + \text{leuco dye} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{dye}$$

Copyright by Mahidol University

Reagents

Slide ingredients

Reactive ingredients are uricase (*Candida utilis*, E.C.1.7.3.3); peroxidase (horseradish root, E.C.1.11.1.7); and 2-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-4,5-bis(4-dimethylaminophenyl)imidazole (leuco dye).

Other ingredients include pigment, binders, pH 8.7 buffer, surfactants, stabilizers, scavenger, dye solubilizer, and cross-linking agent.

Slide storage

Unopened slide cartridges:

- Store at or below 2 º - 8 ºC (36º – 46 ºF).

Cartridges in the system's slide supply:

- Leave in the slide supply for no more than two weeks, then replace with a fresh cartridge.
- Leave in the slide supply when the system is turned off for up to two hours.
- Verify performance with control materials:
  - If the system is turned off for more than two hours
  - After reloading cartridges that have been removed from the slide supply and stored for later use.

Testing procedure

- Remove slide cartridges from storage.
- The slide cartridge must reach room temperature, 18 º- 28 ºC (64º – 82 ºF), before it is unwrapped and loaded into the slide supply. Allow the cartridge to warm up at least:
  - 60 minutes after removing from the freezer **or**
  - 30 minutes after removing from the refrigerator

  Load the cartridges within 24 hours after they reach room temperature.
- Remove the inner wrapper and immediately load into the slide supply.
- Analyze sample on the VITROS 250 Automated Chemistry System, Johnson & Johnson, USA.

Copyright by Mahidol University

Sample dilution

If samples show the uric acid concentrations outside the system's reportable (dynamic) range, follow this procedure:

1. Dilute 1 part of sample with 1 part of the diluent, VITROS 7% BSA.
2. Reanalyze.
3. Multiply the results by 2 to obtain the original sample's uric acid concentration.

Reporting units and Unit conversion

Conventional units	SI units	Alternate units
mg/dL	µmol/L (mg/dL x 59.48)	mg/L (mg/dL x 10)

Reportable range (Dynamic range)

Conventional units (mg/dL)	SI units (µmol/L)	Alternate units (mg/L)
0.50-17.00	29.7 – 1011.2	5.0 -170.0

Sensitivity of the procedure

The lower limit of the reportable (dynamic) range is 0.50 mg/dL (29.7 µmol/L).

Copyright by Mahidol University

APPENDIX K

Determination of plasma lipid peroxidation (plasma lipid hydroperoxides)

Principles of the procedure

Heparinized blood was collected from the subject and kept in ice-box until centrifugation occurred. Plasma was separated usually within 3 hours. Plasma lipid hydroperoxides (ROOHs) level was determined using the Ferrous Oxidation in Xylenol Orange version 2 (FOX2) assay, modified from the FOX2 method as described by Nourooz-Zadeh et al [72].

This technique relies on the rapid hydroperoxides-mediated oxidation of Fe^{2+} under acidic conditions. Fe^{3+} forms a chromofore with xylenol orange, which absorbs strongly at 560 nm. FOX2 reagent was prepared by dissolving xylenol orange and ammonium ferrous sulfate in 250 mM H_2SO_4 to final concentrations of 1 and 2.5 mM, respectively. One volume of this concentrated reagent was added to 9 volume of HPLC-grade methanol containing 4.4 mM BHT(butylated hydroxytoluene) to make the working reagent, which comprised 250 µM ammonium ferrous sulfate, 100 µM xylenol orange, 25 mM H_2SO_4, and 4 mM BHT in 90% (vol/vol) methanol.

Plasma samples (90 µL) were transferred into 6 microcentrifuge vials (1.5 mL). Then, 10 µL of 10 mM TPP (1,1,3,3-tetraethoxypropane) in HPLC-grade methanol was added to three of the vials to reduce ROOHs, thereby generating a triplicate of blanks. HPLC-grade methanol (10 µL) was added to the remaining three vials to produce a triplicate of test samples. All vials were immediately vortexed and incubated in the controlled temperature water bath (25 ± 1 ºC) for 30 minutes prior to the addition of 900 µL of FOX2 reagent. After mixing, the samples were incubated in the water bath (25 ± 1 ºC) for another 30 minutes. The vials were centrifuged at 1,500X g for 10 minutes. Absorbance of the supernatant was measured at 560 nm by spectrophotometer. The concentration of plasma hydroperoxides was calculated from the mean absorbance difference between triplicates of test samples and blank samples,

Copyright by Mahidol University

and the apparent molar extinction coefficient of 4.31 x 10^4 $M^{-1}cm^{-1}$ for hydroperoxides- Fe^{3+}-xylenol orange complex, using equation:

$$[\text{ ROOHs}] = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / \varepsilon] * \delta$$

[ROOHs] = Concentration of lipid hydroperoxides in plasma (μM)

A_{sample} = Mean absorbance of test samples at 560 nm

A_{blank} = Mean absorbance of blank samples at 560 nm

ε = 0.0431 μ $M^{-1}cm^{-1}$

δ = Dilution factor = 11.1 (1000 μL/ 90 μL)

Copyright by Mahidol University

APPENDIX L

Determination of plasma conjugated dienes

Determination procedure

Conjugated dienes level in plasma was measured by the spectrophotometric method as described by Hunter and Mohamed [75].

Plasma (0.2 mL) were mixed with distilled water (0.3 mL) and then extracted by mixing with 1 mL of methanol and 2 mL of chloroform, followed by 1 minute high-speed vortex. Then 3 mL of 0.05 M KCL was added into the mixture and vortexed with low-speed for 15 seconds. After centrifugation at 1000X g for 10 minutes, the chloroform phase was separated and 1 mL of supernatant was dried under a flow of nitrogen gas. The residue was resuspended in 1.5 mL of cyclohexane.

Absorbance of the mixture was measured at 233 nm using the UV-spectrophotometer. The concentration of plasma conjugated dienes was expressed as ratio of absorbance $_{233\ nm}$ / mL plasma.

Copyright by Mahidol University

BIOGRAPHY

NAME Miss Kittana Chanda

DATE OF BIRTH September 17, 1979

PLACE OF BIRTH Ratchaburi, Thailand

INSTITUTION ATTENED Faculty of Medical Technology
Mahidol University, 1996-2000:
Bachelor of Science (Medical Technology)
Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital
Mahidol University, 2000-2004:
Master of Science (Nutrition)

HOME-ADDRESS 1/3 M.2 Bankong subdistrict
Photharam district, Ratchaburi province
Thailand 70120
Tel. 66-3235-6401, 66-1875-2066
E-mail: kitty_joy17@yahoo.com

Copyright by Mahidol University