รหัสโครงการSUT3-305-57-24-05

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ทางชีวภาพ ชีวปริมาณออกฤทธิ์ และการเข้าถึงชีวภาพของสารสกัดกระบองเพชร
(Bioactivity Bioavailability and Bioaccesibility of *Echinocactus grusonii*extracts)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการSUT3-305-57-24-05

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ทางชีวภาพ ชีวปริมาณออกฤทธิ์ และการเข้าถึงชีวภาพของสารสกัดกระบองเพชร
(Bioactivity Bioavailability and Bioaccesibility of *Echinocactus grusonii* extracts)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการSUT3-305-57-24-05

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ทางชีวภาพ ชีวปริมาณออกฤทธิ์ และการเข้าถึงชีวภาพของสารสกัดกระบองเพชร

(Bioactivity Bioavailability and Bioaccesibility of *Echinocactus grusonii*extracts)

คณะผู้วิจัย
หัวหน้าโครงการ
ผศ.ดร.รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีปีงบประมาณ2555
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 13 9และ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ฝ่ายห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการเกษตรคุณวิชชุนีย์ พิทักษ์สมบูรณ์, คุณทรงสุดา ชาติศรินทร์ คุณแก้วมณี นาชินคุณวันชัย จอกกระโทก และคุณวรินทร สลักคำฝ่ายวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือคุณจรรจิรา รุจิรวรรธน์ คุณสุชาดา อุดมพร และนักศึกษาปริญญาเอก สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องเซลล์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์หนังสือบรรณสารที่เป็นแหล่งการหาข้อมูล และ ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้ข้อมูลอ้างอิงในการค้นคว้ารายละเอียดของเนื้อหาการทำโครงการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีงบประมาณ 2557

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบสารพฤกษเคมี คุณสมบัติทางด้านพฤษเคมีของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี จากการตรวจสอบสารพฤกษเคมีของสารสกัดกระบองเพชรทั้งสองช่วงอายุ พบว่าสารสกัดกระบองเพชรมีสารพฤกษเคมีคือ ลูทีน คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี ฟีโอไฟตินเอ ฟีโอไฟตินบี และฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณลูทีนที่พบในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี เท่ากับ 36.14 µg/g RM and 30.44 µg/g RMตามลำดับ ในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเท่ากับ 526.29 และ366.37 µg/g RM ตามลำดับ ในส่วนของคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี ฟีโอไฟติน เอ และฟีโอไฟติน บี เท่ากับ 179.41, 97.26, 243.46, 6.16 และ 115.15, 91.28, 154.08, 5.87 µg/g RMในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ตามลำดับจากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ด้วยวิธี Folin-Ciocalteuในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี มีปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดเท่ากับ 3545.35 และ2557.96 mg gallic acid equivalent / 100 g of RM ตามลำดับปริมาณของลูทีน คลอโรฟิลล์ทั้งหมด ฟีนอลิกทั้งหมด และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี มีค่าสูงกว่าอายุ 6 ปี

ส่วนการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดกระบองเพชรก่อนและหลังผ่านแบบจำลองการย่อยอาหารพบว่ามีค่า LC_{50} มากกว่า 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ชี้ให้เห็นว่าไม่มีความเป็นพิษในเซลล์ไลน์ Caco-2 และ HepG2 และจากการทดสอบความคงตัวต่อการย่อยของ ลูทีน คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี พบว่ามีความคงตัวต่อการย่อย เท่ากับ 69.03%, 37.64% และ 60.52% ในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 6 ปี เท่ากับ 58.33%, 33.34% และ 56.89% บ่งชี้ว่า ลูทีน คลอโรฟิลล์ทั้งหมด ฟีนอลิกทั้งหมดไม่เสถียรเมื่อผ่านระบบจำลองการย่อยอาหารที่กระเพาะและลำไส้เล็ก จากนั้นทำการศึกษาการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ไลน์ Caco-2 ของ ลูทีน คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า ลูทีน คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี ถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์ไลน์ Caco-2 ที่ระดับร้อยละ 30.63, 36.88 และ 28.27 ตามลำดับ ในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 6 ปี ที่ระดับร้อยละ 26.31, 28.10 และ 25.11 ตามลำดับ ในลำดับสุดท้าย การศึกษาการขนส่งผ่านเซลล์ พบว่า ลูทีน และฟีนอลิกทั้งหมดถูกขนส่งผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2 ที่ระดับร้อยละ 8.05, 9.18 และ 7.67, 6.95 สำหรับสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ตามลำดับ แต่ไม่สามารถตรวจพบการขนส่งผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2 ของคลอโรฟิลล์ทั้งหมด สารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี ซึ่งมีปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าอายุ 6 ปี ชี้ให้เห็นความสำคัญของอายุพืช และพบว่า ลูทีน ฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรสามารถถูกดูดซึมและขนส่งผ่านเซลล์ Caco-2 ได้ แต่ไม่สามารถตรวจพบการขนส่งคลอโรฟิลล์ผ่านเซลล์ลำไส้เล็ก

Abstract

The objectives of this study were to investigate the phytochemical properties of 3-year-old golden barrel cactus extracts were compared with 6-year-old cactus extracts. Phytochemical analyses of both cactus extracts revealed the presence of lutein, chlorophyll *a*, chlorophyll *b,* pheophytin *a,* pheophytin *b* and phenolic compounds. Lutein content was 36.14 µg/g RM and 30.44 µg/g RM for 3- and 6-year-old golden barrel cactus extracts, respectively. Total chlorophyll contents was 526.29 and 366.37 µg/g raw material (RM) for 3- and 6-year-old golden barrel cactus extracts, respectively. Chlorophyll a, chlorophyll b, pheophytin a, and pheophytin b were 179.41, 97.26, 243.46, 6.16 and 115.15, 91.28, 154.08, 5.87 µg/g RM for 3- and 6-year-old golden barrel cactus extracts, respectively.Total phenolic contents of 3- and 6-year-old golden barrel cactus extracts were tested by Folin-Ciocalteu method.The 3- and 6-year-old golden barrel cactus extracts showed a total phenolic content of 3545.35 and 2557.96 mg gallic acid equivalent / 100 g of RM, respectively.Lutein, total chlorophylls, total phenolic and antioxidant activity of the 3-year-old golden barrel cactus extracts were higher than that of 6-year-old extracts.

Cytotoxicity of golden barrel cactus extracts before and after in vitro digestion exhibited extremely high value of LC50 (>200 µg RM/ml) against Caco-2 and HepG2 cells indicating the non-toxic activity to the cells. The digestive stability of lutein, chlorophylls and phenolic compounds of 3- and 6-year-old golden barrel cactus extracts was 69.03%, 37.64%, 60.52% and 58.33%, 33.34%, 56.89%, respectively. This indicated that the lutein, chlorophylls and phenolics were not stable during simulated gastric and small intestinal digestion. Additionally, the lutein, chlorophylls and phenolics from 3- and 6-year-old golden barrel cactus extracts were uptaked by Caco-2 cells at the level of 30.63%, 36.88%, 28.27% and 26.31%, 28.10%, 25.11%, respectively. Finally, the investigations of cellular lutein and phenolics transport in Caco-2 cells were 8.05%, 9.18% and 7.67%, 6.95% for 3- and 6-year-old golden barrel cactus extracts, respectively. The chlorophylls transported through Caco-2 cells could not be detected. Phytochemical content and bioactivities of 3-year-old golden barrel cactus extracts being higher than that of 6-year-old cactus extracts indicated the importance of plant maturity. In addition, lutein and total phenolic compounds from golden barrel cactus extracts could be absorbed and transported through Caco-2 cells, but chlorophylls could not be detected in the transport process.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... จ
สารบัญภาพ ..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
ขอบเขตของการวิจัย 2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 3
แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 15
การเตรียมวัตถุดิบ 15
การเตรียมสารสกัดกระบองเพชร 15
การศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดกระบองเพชรโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography 15
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 16
การศึกษาชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดกระบองเพชร 17
สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล 20
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 21
การศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดกระบองเพชร 21
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดกระบองเพชร 24
ชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดกระบองเพชร 25
บทที่ 5 บทสรุป 39
บรรณานุกรม 40
ประวัติคณะผู้วิจัย 45

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างและกิจกรรมของสารพฤษเคมีต่างๆจากพืช.....9
ตารางที่ 3.1 สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์และลูทีน.....16
ตารางที่ 4.1 ปริมาณอนุพันธ์คลอโรฟิลล์และลูทีนในสารสกัดกระบองเพชร.....22
ตารางที่ 4.2 ความเป็นพิษของสารสกัดรางจืดต่อเซลล์ไลน์ Caco-2 และ HepG2 หลังผ่าน.....24
การย่อยด้วยแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง
ตารางที่ 4.3 ปริมาณลูทีน อนุพันธ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลิกทั้งหมด ในสารสกัดกระบองเพชร.....27
ก่อนและหลังผ่านกระบวนการย่อยในระบบทางเดินอาหาร
ตารางที่ 4.4 ความคงตัวต่อการย่อยของลูทีน อนุพันธ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลิกทั้งหมดใน.....28
สารสกัดกระบองเพชรที่ผ่านระบบจำลองการย่อย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 แสดงขั้นตอนในการการศึกษาโดยใช้ *in vitro* simulated digestion models..... 11
รูปที่ 2.2 แสดงการดูดซึมสารอาหารกลุ่มคาโรทีนอยด์.....14
รูปที่ 4.1 โครมาโตแกรม HPLC ของอนุพันธ์คลอโรฟิลล์และลูทีน 21
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี..... 23
รูปที่ 4.3 ชีวภาพพร้อมใช้ (Bioaccessibility) ของอนุพันธุ์คลอโรฟิลล์, ลูทีน และฟีนอล..... 29
ทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี
รูปที่ 4.4 ปริมาณการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีน, อนุพันธุ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลทั้งหมดของ..... 31
สารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี ที่ระยะเวลาในการบ่ม 2, 4 และ 6 ชั่วโมง
รูปที่ 4.5 ปริมาณการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีน, อนุพันธุ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลทั้งหมด.....32
ของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 6 ปี ที่ระยะเวลาในการบ่ม 2, 4 และ 6 ชั่วโมง
รูปที่ 4.6 ร้อยละการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีน, อนุพันธุ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลทั้งหมดของ.....33
สารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ที่ระยะเวลาการบ่ม 6 ชั่วโมง
รูปที่ 4.7 ร้อยละการขนส่งสารสกัดกระบองเพชรผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2 ลงสู่ basolateral 35
Chamber

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่1
บทนำ

1.1ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ต่างประเทศได้มีการศึกษาสารสกัดจากกระบองเพชรเพื่อตรวจสอบหาสารพฤษเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นประโยชน์ต่อร่างกายแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ รวมไปถึงการใช้งานในด้านการแพทย์และอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ(Shetty, Rana และ Preetham, 2012)ยกตัวอย่างเช่น Heerden (2008)ได้ศึกษากระบองเพชรสายพันธ์ *Hoodia gordonii* ที่พบในแถบร้อนชื้นของทะเลทราย Kalahari ในประเทศแอฟริกาใต้, นามิเบียและบอตสวานา กล่าวกันว่าในอดีตชนเผ่า San Bushman นำมาใช้เป็นพืชที่ใช้ในการเดินทางไกลไปในทะเลทรายหรือการล่าสัตว์เพื่อช่วยยับยั้งความหิวและความกระหายน้ำโดยการยับยั้งความอยากนี้เป็นผลมาจากสารประกอบสเตอรอยด์ไกลโคไซด์ *Hoodia gordonii* จึงกลายเป็นที่สนใจและมีการนำมาใช้ทางคลินิกในการพัฒนายาลดความอ้วนซึ่งมีการศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งความอยากอาหาร และการลดน้ำหนักในหนูโดย Heerden และคณะ (2007) ได้ทดสอบคุณสมบัติยับยั้งความอยากของสารประกอบ P57 ซึ่งทำการทดสอบในหนู Wistar โดยให้สารประกอบ P57 ซึ่งแยกได้จากกระบองเพชรพันธุ์ *Hoodia gordonii*เข้าทางปาก (oral gavage) ที่ความเข้มข้น 6.25–50 mg/kg body weight ผลการศึกษาพบว่าที่ทุกความเข้มข้นของสารประกอบ P57 มีผลทำให้ปริมาณการบริโภคอาหารลดลงภายในช่วงระยะ 8 วันและน้ำหนักหนูลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม และในการศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม Fenfluramine , สารประกอบ P57 ให้ผลในการลดการบริโภคอาหารในช่วงการศึกษา รวมทั้งมีการลดลงโดยรวมไปด้วยกันของน้ำหนักหนูนอกจากนี้ De Leo, De Abreu, Pawlowska, Cioni และ Braca (2010)ได้ศึกษา *Opuntia ficus indica* ซึ่งเป็นกระบองเพชรที่อยู่ในแฟมิลี่ *Cactaceae* เป็นพืชพื้นเมืองของเม็กซิโก และเป็นที่แพร่หลายไปทั่วอเมริกากลางและอเมริกาใต้, ออสเตรเลีย, แอฟริกาใต้ เจริญเติบโตในทุกประเทศแห้งแล้งและสำหรับผลของมันสามารถกินได้มีรสหวานและฉ่ำและอุดมไปด้วยสารประกอบทางโภชนาการเช่น กรดวิตามินซีและโพลีฟีนอล ผลของกระบองเพชรนี้แสดงคุณสมบัติในการบรรเทาอาการอักเสบได้ (Galati และคณะ, 2003) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Galati และคณะ, 2003; Kuti, 2004; Tesoriere, Butera, Pintaudi, Allegra และ Livrea, 2004)ต้านมะเร็ง(Zou และคณะ, 2005)ป้องกันโรคทางระบบประสาท, ป้องกันโรคตับ (Galati และคณะ, 2007)นอกจากนี้อาจจะใช้สำหรับการรักษาโรคกระเพาะ, ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง, เส้นเลือดอุดตัน, เบาหวาน,และต่อมลูกหมากเจริญเติบโตมากเกินไป (Agozzino, Avellone, Caraulo, Ferrugia และ Filizzola, 2005)นอกจากนี้ในการศึกษาของ Galati และคณะ (2007)พบว่า เจลที่ได้จากสารสกัดของกระบองเพชร *Opuntia ficus indica* สามารถเคลือบกระเพาะอาหารและป้องกันแผลในกระเพาะอาหารจากการเหนี่ยวนำด้วยแอลกอฮอล์ในสัตว์ทดลองได้ เนื่องจากคุณสมบัติของสารสกัดกระบองเพชรในต่างประเทศที่ได้กล่าวข้างต้นเป็นสิ่งที่น่าสนใจว่ากระบองเพชรในประเทศไทยจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกันกับ

กระบองเพชรต่างประเทศหรือไม่ จึงได้ทำการศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดกระบองเพชรสายพันธ์ *Echinocactus grusonii* หรือ ถังทอง ซึ่งเป็นกระบองเพชรที่นิยมปลูกในประเทศไทย เพื่อตรวจสอบ ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสารสกัดกระบองเพชร และศึกษาความเสถียรของสารออกฤทธิ์เมื่อผ่านระบบการย่อยในโมเดลระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ การเข้าถึงชีวภาพของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุแตกต่างกันสองช่วงอายุ รวมทั้งศึกษาสารสกัดกระบองเพชรสายพันธุ์ถังทองมีคุณสมบัติลดความอยากอาหารเพื่อควบคุมน้ำหนักเช่นเดียวกับ*Hoodia gordonii*ได้หรือไม่ โดยทำการทดสอบในหนู รวมทั้งมีการประเมินความปลอดภัยของ สารสกัดกระบองเพชรสายพันธุ์ *Echinocactus grusonii* โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ และความเป็นพิษเฉียบพลันในหนู เพื่อจะได้นำสารสกัดกระบอกเพชรที่พบในประเทศไทยมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีคุณสมบัติในการควบคุมน้ำหนักตัวซึ่งเป็นผลดีในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ความดันโลหิตและไขมันในเลือดสูงได้ต่อไปเพื่อจะได้นำสารสกัดกระบอกเพชรที่พบในประเทศไทยมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสามารถ หรือป้องกันการเกิดโรคได้ รวมทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่สินค้าทางการเกษตรของประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1เพื่อศึกษาข้อมูลสารพฤษเคมีในสารสกัดกระบองเพชรโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1.2.2 เพื่อศึกษาความคงตัวต่อการย่อย (digestive stability) ของสารสกัดกระบองเพชรที่เตรียมได้เมื่อผ่านแบบจำลองของระบบย่อยอาหาร

1.2.3 ประเมินชีวภาพความพร้อมของการนำไปใช้ (bioaccessibility) ชีวภาพความพร้อมของการดูดซึม (bioavailability) และการขนส่งผ่านCaco-2 human intestinal cellsของสารสกัดกระบองเพชร

1.2.4ประเมินความปลอดภัยของ สารสกัดกระบองเพชรสายพันธุ์ *Echinocactus grusonii* โดยความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์Caco-2, HepG2

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 ศึกษาข้อมูลสารพฤษเคมีในสารสกัดกระบองเพชร

1.3.2 ศึกษาความคงตัวต่อการย่อย (digestive stability) ของสารสกัดกระบองเพชร

1.3.3 ประเมินชีวภาพความพร้อมของการนำไปใช้ (bioaccessibility) ชีวภาพความพร้อมของการดูดซึม (bioavailability) และการขนส่งผ่านCaco-2 human intestinal cellsของสารสกัดกระบองเพชร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.4.1 การเผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติหรือวารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ

1.4.2 การจดสิทธิบัตรกระบวนการเตรียมสารสกัดจากกระบองเพชร

1.5 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

การเผยแพร่องค์ความรู้เกี่ยวกับการประโยชน์ของกระบองเพชรในด้านการเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อควบคุมน้ำหนักของร่างกาย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระบองเพชรหรือแคคตัส

กระบองเพชรหรือแคคตัสที่เรารู้จักทั่วไปเป็นต้นไม้ยืนต้นที่น่าสนใจ เพราะเด่นสะดุดตาเนื่องจากมีหนามหรือตุ่มหนามปกคลุมทั่วต้น ลำต้นมีรูปร่างอวบสั้น เพราะมีน้ำหล่อเลี้ยงอยู่ภายใน ดอกไม่มีก้านดอก แต่มีสีสันสดสวย และกลีบดอกบอบบาง ต้นกระบองเพชรที่ปลูกตามบ้านอาจมีรูปร่างแตกต่างกันมากมาย เช่น เป็นรูปทรงกลมหรือทรงกระบอก บ้างชอบขึ้นเดี่ยว บ้างก็ขึ้นเป็นกลุ่ม กระบองเพชรบางพันธุ์มีขนาดต้นเล็กกะทัดรัด แต่บางพันธุ์ก็สูงใหญ่ถึง 24 เมตรกระบองเพชรมีวิวัฒนาการมาจากพืชปกติทั่ว ๆ ไป เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศที่มีความแห้งแล้งมากขึ้น พืชบางชนิดก็มีการปรับตัวเพื่อการดำรงชีวิต มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง เช่นลดรูปของใบไปเป็นหนาม เพื่อลดการคายน้ำ เป็นต้น ซึ่งกระบองเพชรเป็นพืชที่ส่วนใหญ่พบเจริญเติบโตในทะเลทรายที่มีสภาพภูมิอากาศแห้งแล้งและหนาวเย็นกระบองเพชรมีวิธีการในการพัฒนาตนเองเพื่อให้ดำรงชีวิตให้อยู่ได้ในสภาพที่โหดร้ายนั้นคือ การพัฒนาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพื่อให้เหมาะสมกับการอยู่รอดโดย

2.1.1ลดรูปของใบเปลี่ยนเป็นหนาม เพื่อลดการคายน้ำหนามยังสามารถที่จะช่วยในการพรางแสง ลดความร้อนให้กับกระบองเพชรและยังช่วยป้องกันการถูกทำลายโดยการกัดแทะจากสัตว์

2.1.2 สร้างส่วนที่มีลักษณะคล้ายไข (Wax) ปกคลุมส่วนผิวของลำต้นมีจำนวนปากใบ (Stoma) บนลำต้นจำนวนน้อย และมีลำต้นเป็นรูปทรงกลมซึ่งมีพื้นที่ผิวน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับปริมาตร ทำให้มีการสูญเสียน้ำน้อยลง

2.1.3 พัฒนาเนื้อเยื่อพิเศษในลำต้น มีลักษณะคล้ายฟองน้ำทำหน้าที่ในการเก็บรักษาน้ำ

2.1.4 มีระบบรากฝอยอยู่ตื้นๆ ใกล้กับผิวดิน ในเวลากลางคืนอากาศเย็นลงไอหมอกจะลอยตัวต่ำลงและควบแน่นกลายเป็นหยดน้ำที่ผิวดิน ทำให้รากฝอยสามารถดูดซับความชุ่มชื้นจากอากาศและผิวดินไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว

2.1.5 กระบองเพชรบางชนิดมีการพัฒนาระบบรากให้มีขนาดใหญ่ เพื่อใช้เก็บสะสมน้ำและอาหาร กระบองเพชรบางชนิดที่มีความพิเศษ สามารถหดตัวดึงเอาลำต้นให้มุดลงไปใต้ก้อนกรวดหรือใต้ผิวดิน ช่วยลดความร้อนและช่วยลดการคายน้ำโดยเฉพาะในหน้าร้อน

2.1.6 กระบองเพชรบางชนิดเจริญเติบโตบนเทือกเขาสูง ซึ่งมีอากาศหนาวเย็น ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงของหนามบางส่วนให้กลายเป็นขน (Bristle) หรือมีหนามปกคลุมลำต้นหนาแน่นป้องกันความหนาวเย็นบางชนิดเปลี่ยนแปลงลำต้นให้เล็กลง เจริญเติบโตตามซอกหินหลีกหนีจากความหนาวเย็น

2.1.7 ในทะเลทรายที่แห้งแล้ง อาหารมีความจำเป็นมากในการดำรงชีวิต กระบองเพชรบางชนิดยังมีการสร้างสารเคมีที่มีพิษต่อสัตว์นอกเหนือจากหนามที่ใช้ป้องกันตนเอง คนส่วนใหญ่จะเชื่อว่ากระบองเพชร เป็นพืชที่พบได้เฉพาะทะเลทรายเท่านั้น แต่จริง ๆแล้วเราสามารถพบกระบองเพชรได้ในทุก

สภาพภูมิอากาศ ในเขตป่าร้อนชื้น (Tropical) และเขตป่ากึ่งร้อนชื้น (Subtropical) กระบองเพชรส่วนใหญ่จะเป็นพืชเกาะอาศัย (Epiphyte) โดยจะเกาะอาศัยอยู่ตามคาคบไม้ในที่สูง รับแสงได้อย่างเต็มที่มีรากทำหน้าที่ในการยึดเกาะอยู่ปะปนกับพืชในตระกูล กล้วยไม้ และเฟิร์น มีการพัฒนาให้สามารถอยู่ได้ในสภาวะที่มีความชุ่มชื้นสูงลำต้นมีการเปลี่ยนรูปให้มีลักษณะแบนบางหรือเป็นรูปสามเหลี่ยมเพิ่มพื้นที่ผิวในการสังเคราะห์แสงส่วนหนามที่ไม่มีความจำเป็นก็มีขนาดเล็กลงหรือหายไป (สุทัศน์.,2555)

นักพฤกษศาสตร์จัดกระบองเพชรเป็นพืชอวบน้ำอยู่ในวงศ์ *Cactaceae*ประโยชน์ที่สำคัญของกระบองเพชรคือลำต้นใช้เป็นเสาในการปลูกกระท่อมหรือเป็นรั้ว กิ่งแห้งของกระบองเพชรใช้ในการเลี้ยงสัตว์ ลำต้นกระบองเพชรเวลาเอาหนามออกแล้ว ใช้ทอดรับประทานแทนผักได้ ซึ่งลำต้นที่มีการเจริญจะอุดมไปด้วยคลอโรฟิลล์ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติมโตของกระบองเพชร ส่วนผลนั้นใช้ทำแยมหรือเยลลี่ อย่างไรก็ตาม ประโยชน์ที่ยิ่งใหญ่ที่สุดสำหรับคนหลายคนที่ชอบกระบองเพชรคือ มันเป็นพืชที่ใช้ตกแต่งประดับที่สามารถให้ความเพลิดเพลินได้ ในปัจจุบันนี้มีผู้ปลูกกระบองเพชรกันอย่างกว้างขวางมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้คงเนื่องมาจากลักษณะทรงต้นของกระบองเพชรที่แตกต่างไปจากพืชอื่นๆคือ มีหนามขึ้นโดยรอบต้น การเรียงตัวของหนามที่เป็นระเบียบ เป็นพืชที่มีดอกสวยงาม รวมทั้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้านดังกล่าวข้างต้น(Shetty และคณะ, 2012)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบองเพชร

Echinocactus grusonii หรือถังทอง อยู่ในแฟมิลี่ *Cactaceae* มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตอนกลางและทางเหนือของประเทศเม็กซิโกกลาง และทางตะวันตกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในฐานะ Golden Barrel Cactus, Golden Ball และมักจะถูกเรียกทั่วไปว่า Barrel cacti เป็นหนึ่งสายพันธุ์ที่มีความนิยมเพาะปลูกมากที่สุดในประเทศไทย ลักษณะทั่วไป โดยปกติเจริญเป็นต้นเดี่ยวๆ บางครั้งแตกหน่อ ลำต้นเป็นทรงกลมขนาดใหญ่ แล้วค่อยเรียวขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น เมื่ออายุยังน้อยจะมีสันน้อยและเนินหนามนูนเด่นชัด เมื่ออายุมากขึ้นจำนวนสันจะเพิ่มขึ้น มี 30-40 สัน สันลึก ตุ่มหนามบริเวณปลายยอดมีขนสั้นๆ สีขาวถึงสีเหลืองปกคลุม หนามข้าง 8-10 อัน สีเหลืองทอง หรือสีเหลืองอ่อน หนามกลาง 4 อัน 3-5 เซนติเมตร ลักษณะคล้ายหนามข้าง เมื่ออายุประมาณ 15-20 ปี จะมีดอกเกิดบริเวณใกล้ปลายยอด ออกดอกเป็นวงคล้ายมงกุฎ ดอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 เซนติเมตร กลีบรวมแคบ ปลายเรียวแหลม สีเหลือง ปลายกลีบเป็นสีน้ำตาลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร เมล็ดสีแดงเข้มเป็นมัน สามารถขยายพันธุ์โดย วิธีเพาะเมล็ด หรือวิธีคว้านหัวให้แตกหน่อ (วชิรพงศ์.,2537)

ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ต่างประเทศได้มีการศึกษาสารสกัดจากกระบองเพชรเพื่อตรวจสอบหาสารพฤษเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นประโยชน์ต่อร่างกายแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ รวมไปถึงการใช้งานในด้านการแพทย์และอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ (Shetty และคณะ, 2012)ยกตัวอย่างเช่นDe Leo และคณะ (2010)ได้ศึกษา *Opuntia ficus indica* ซึ่งเป็นกระบองเพชรที่อยู่ในแฟมิลี่ *Cactaceae* เป็นพืชพื้นเมืองของเม็กซิโก และเป็นที่แพร่หลายไปทั่วอเมริกากลางและอเมริกาใต้, ออสเตรเลีย, แอฟริกาใต้ เจริญเติบโตในทุกประเทศแห้งแล้งและสำหรับผลของมันสามารถกินได้มีรสหวานและฉ่ำและอุดมไปด้วย

สารประกอบทางโภชนาการเช่น กรดวิตามินซีและโพลีฟีนอล ผลของกระบองเพชรนี้แสดงคุณสมบัติในการบรรเทาอาการอักเสบได้ (Galati และคณะ, 2003) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Galati และคณะ, 2003; Kuti, 2004; Tesoriere และคณะ, 2004)ต้านมะเร็ง(Zou และคณะ, 2005)ป้องกันโรคทางระบบประสาท, ป้องกันโรคตับ (Galati และคณะ, 2007)นอกจากนี้อาจจะใช้สำหรับการรักษาโรคกระเพาะ, ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง, เส้นเลือดอุดตัน, เบาหวาน,และต่อมลูกหมากเจริญเติบโตมากเกินไป (Agozzino และคณะ, 2005) และจากการศึกษาของ Galati และคณะ (2007)พบว่า เจลที่ได้จากสารสกัดของกระบองเพชร *Opuntia ficus indica* สามารถเคลือบกระเพาะอาหารและป้องกันแผลในกระเพาะอาหารจากการเหนี่ยวนำด้วยแอลกอฮอล์ในสัตว์ทดลองได้ และนอกจากนี้Hernández-Urbiola และคณะ (2010)ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี แร่ธาตุและกรดอะมิโนของกระบองเพชรสายพันธ์ *Opuntia ficus-indica* ที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละช่วงอายุการปลูก พบว่า กระบองเพชรที่อายุการปลูกมากจะมีปริมาณใยอาหารหยาบและ แร่ธาตุจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบองเพชรที่อายุมาเป็นแหล่งที่สำคัญของแคลเซียมและใยอาหาร

Oonsivilai , Chaijareonudomroung, Huantanom และ Oonsivilai (2010)ได้มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด *Echinocactus grusonii* ได้ทำการศึกษาออกแบบการทดลองด้วย central composite design โดยมีสามตัวแปรอิสระประกอบด้วย อุณหภูมิอบแห้งวัตถุดิบ,เวลาที่ใช้สกัด, และอุณหภูมิการสกัด และตัวแปรตามประกอบด้วย %yield ของสารสกัดหยาบและการหา total phenolic เทียบกับ gallic acid equivalent ในสารสกัดหยาบ ผลที่ได้พบว่า %yield ของสารสกัดหยาบสูงสุด ได้จากสภาวะอุณหภูมิอบแห้งวัตถุดิบที่ 60°C,เวลาที่ใช้สกัด 25 นาที, และอุณหภูมิการสกัด 15°C ส่วนของ total phenolic สูงสุด ได้จากสภาวะอุณหภูมิอบแห้งวัตถุดิบที่ 60°C,เวลาที่ใช้สกัด 35 นาที, และอุณหภูมิการสกัด 25°Cนอกจากนี้ยังมีการศึกษากระบองเพชรสายพันธุ์ *Hoodia gordonii*ซึ่งได้ชื่อว่าเป็นพืชลดน้ำหนัก โดยประชากรหลักในประเทศแถบตะวันตกใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ยับยั้งความอยากอาหาร และเมื่อทำการวิเคราะห์และแยกสารสำคัญในส่วนของพืชนี้โดยใช้คลอโรฟอร์มในการสกัดและละลายด้วยเมทานอลในน้ำผสมด้วยเฮกเซนแล้วนำมาแยกด้วยVLC บนซิลิกาเจลจะประกอบด้วยไกลโคไซด์ 7 ชนิด (Shukla และคณะ, 2009) และการศึกษาของ Janssen และคณะ (2008)ได้ใช้วิธี HPLV-UV และHPLC-MS ในการพัฒนาวิเคราะห์ปริมาณสเตอ รอยด์ไกลโคไซด์ของ *Hoodia gordonii*กับคุณสมบัติการยับยั้งความอยากอาหารในวัตถุดิบแห้ง สารสกัดบริสุทธิ์และในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการเติมสารสกัด *Hoodia gordonii*สำหรับวัสดุที่เป็นของแข็งได้แก่ พืชแห้งและอาหารปราศจากไขมันจะทำการสกัดสเตอรอยด์ไกลโคไซด์โดยใช้เมทานอล เนื่องจากสเตอ รอยด์ไกลโคไซด์จะแสดงออกในส่วนที่เป็นน้ำมัน จึงฉีดน้ำมันเข้าไปหลังจากเจือจางในเตตระไฮโดรฟูแรน แล้วนำไปแยกด้วย HPLC โดยใช้ octyl-modified reversed-phase column วัดด้วยรังสี UV ความยาวคลื่น 220 nm

Vermaak, Hamman และ Viljoen (2010)ได้ศึกษาสารสำคัญใน *Hoodia gordonii*โดยใช้ HPTLC พบว่าสารสำคัญที่เป็นตัวออกฤทธิ์คือ P57 ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์ลดน้ำหนักซึ่งสามารถยับยั้งความอยากอาหารได้สูง สำหรับวิธีที่ใช้ในการศึกษาเพื่อยืนยันที่รวดเร็วและง่าย คือ HPTLC โดย *Hoodia*

*gordonii*ที่เก็บตัวอย่างจากสถานที่แตกต่างกันจะให้ผลในการลดน้ำหนักเช่นเดียวกัน โดยในการวิเคราะห์จะใช้แผ่นซิลิกาเจลโดยมีเฟสเคลื่อนที่คือ โทลูอีน:คลอโรฟอร์ม:เอทานอล ในอัตราส่วน 40:40:12.5 แล้วนำไปส่องภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 365 nm โดยจะแยกส่วนประกอบทั้งหมดรวมทั้ง P57 ซึ่งสามารถยืนยันได้ด้วยการทำ LC-MS หลังจากทำ TLC เรียบร้อยแล้ว*Hoodia* speciesสามารถยับยั้งความหิวและความกระหายน้ำมาตั้งแต่อดีตและใช้อย่างแพร่หลายในชนเผ่า Khoi-San โดยการยับยั้งความอยากนี้เป็นผลมาจากสารประกอบ P57 Hoodia จึงกลายเป็นที่สนใจและมีการนำมาใช้ทางคลินิกในการพัฒนายาลดความอ้วนแต่อย่างไรก็ตามกำลังจะมีการนำมาพัฒนาเพื่อการค้าขนาดใหญ่ (Van Wyk, 2008)

Scott, Orsi, Ward และ Bradford (2012)ประเมินความปลอดภัยของสารสกัด *Hoodia gordonii* โดยทำการประเมินความเป็นพิษทางพันธุกรรม (Genotoxicity) ในสองวิธีทดสอบคือในหลอดทดลอง (*in vitro*) ประกอบด้วย การทดสอบการกลายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย และการทดสอบการกลายพันธุ์ของยีนโดยใช้เซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองของหนู อีกวิธีคือ วิธีทดสอบคือในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) เป็นการประเมินในกิจกรรมที่ก่อกลายพันธุ์ในไขกระดูกวิธีไมโครนิวเคลียสในหนู โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด *Hoodia gordonii* 400 มก./กก. วิธีประเมินทั้งหมดมีการดำเนินการปฏิบัติตามระเบียบปฏิบัติการที่ดี (Good Laboratory Practice Regulations) และสอดคล้องกับแนวทางมาตรฐาน (standard guidelines) สำหรับการทดสอบ genotoxicity ผลการประเมินพบว่า สารสกัด *Hoodiagordonii*แสดงให้เห็นว่าไม่มีความเป็นพิษทางพันธุกรรมทั้ง 3 วิธีตรวจสอบ (ทดสอบการกลายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย, การทดสอบการกลายพันธุ์ของยีนโดยใช้เซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองเมาส์และไขกระดูกไมโครนิวเคลียสในหนู)

MacLean และ Luo (2004)ได้พบว่าเมื่อฉีดสารประกอบไกลโคไซด์ P57 ซึ่งแยกได้จากกระบองเพชรพันธุ์ *Hoodia gordonii*ไปที่ระบบประสาทส่วนกลาง P57 จะไปจับกับ receptors หรือโปรตีนเป้าหมายรวมทั้ง Na/K-ATPase ทำให้เพิ่มปริมาณ ATP ในเซลล์ประสาทของสมองส่วน hypothalamus ได้ 50-150% นอกจากนี้การฉีดสาร P57 เข้าไปในโพรงสมองที่ 3 (third ventricle) ซึ่งเป็นช่องเดียวที่อยู่กึ่งกลางระหว่างสมองส่วน hypothalamus สามารถลดการบริโภคอาหารภายใน 24 ชั่วโมงโดยลดลงประมาณ 40-60% และจากการตรวจสอบปริมาณ ATP จากชิ้นสมองส่วน hypothalamic slice หลังจากที่ฉีดสาร P57 เข้าโพรงสมอง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ปริมาณ ATP เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ Heerden และคณะ (2007) ได้ทดสอบคุณสมบัติยับยั้งความอยากของสารประกอบ P57 ซึ่งทำการทดสอบในหนู Wistar โดยให้สารประกอบ P57 เข้าทางปาก (oral gavage) ที่ความเข้มข้น 6.25–50 mg/kgbody weight ผลการศึกษาพบว่าที่ทุกความเข้มข้นของสารประกอบ P57 มีผลทำให้ปริมาณการบริโภคอาหารลดลงภายในช่วงระยะ 8 วันและน้ำหนักหนูลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม และในการศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม fenfluramine, สารประกอบ P57 ให้ผลในการลดการบริโภคอาหารในช่วงการศึกษา รวมทั้งมีการลดลงโดยรวมไปด้วยกันของน้ำหนักหนู

ทั้งนี้ในปัจจุบันพบว่าต่างประเทศได้ทำการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้เทคโนโลยีแบบใหม่ หรือ novel food product ภายใต้เครื่องหมายการค้าNeOpuntia® ซึ่งมีส่วนประกอบของทั้งใยอาหารที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำจากกระบองเพชร *Opuntia ficus-indica* ที่พบว่ามีคุณสมบัติในการลดระดับ

ไขมันในเลือด ด้วยเหตุนี้จึงมีประโยชน์สำหรับผู้ป่วยที่มีความผิดปกติการเผาผลาญไขมัน นอกจากนี้ยังพบว่าลำต้นของกระบองเพชร *Selenicereus grandiflorus* ประกอบไปด้วยไกลโคไซด์ ซึ่งสารสกัดกระบองเพชรนี้มีคุณสมบัติในการขับปัสสาวะและมีคุณสมบัติช่วยรักษาโรคเลือดเลือดหัวใจ (Shetty และคณะ, 2012)

2.3สารพฤกษเคมี (Phytochemicals)

การใช้พืชเป็นแหล่งของการรักษาโรคสามารถสืบย้อนกลับไปสมัยก่อนประวัติศาสตร์มีการเติบโตอย่างมากในด้านการแพทย์สมุนไพรเนื่องจากมีที่มาเป็นวัตถุดิบธรรมชาติและมีผลข้างเคียงน้อยความหลากหลายของชิ้นส่วนพืชสมุนไพรเช่นราก, ลำต้น, ดอก, ผล, กิ่ง และใบพืชได้ถูกนำมาใช้ในการสกัดวัตถุดิบทางยา สารเคมีเหล่านี้จะเรียกว่าเป็น Phytochemicals

Phytochemicals หรือสารพฤกษเคมี จะเกิดขึ้นตามธรรมชาติสารเคมีที่ใช้งานทางชีวภาพในพืช คำว่า "Phyto" มาจากคำกรีกซึ่งหมายถึง พืชสารพฤกษเคมีในพืชจะทำหน้าที่เป็นระบบป้องกันตามธรรมชาติสำหรับพืช รวมทั้งให้สีกลิ่นและรสมีมากกว่า 4000 ของสารพฤกษเคมี เหล่านี้ ที่มีการค้นพบจนถึงปัจจุบันและคาดว่านักวิทยาศาสตร์จะค้นพบเพิ่มขึ้นอีกมากมาย สารพฤกษเคมีเหล่านี้หลายชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านหรือป้องกันโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับโรคมะเร็งและโรคหัวใจ โดยจะทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของออกซิเจนอิสระหรืออนุมูลอิสระในร่างกายของเราซึ่งอนุมูลอิสระสามารถทำลายเซลล์ของร่างกายเรา(Sood, Kaur และ Gupta, 2012)

ประชากรทั่วโลกส่วนใหญ่ยังคงอาศัยพืชสมุนไพรท้องถิ่นดั้งเดิมสำหรับการดูแลสุขภาพในชีวิตประจำวันนอกจากนี้ยังเป็นความจริงที่ว่าหนึ่งในสี่ของยาทางการแพทย์ทั้งหมดอยู่บนพื้นฐานของสารที่ได้จากพืชหรือสังเคราะห์ที่ได้จากพืช และเป็นไปตาม World Health Organization: WHO(Nyiredy, 2004)

ผู้ที่ใช้การรักษาโรคแบบดั้งเดิมหรือใช้ยาแผนโบราณอาจจะไม่เข้าใจเหตุผลทางวิทยาศาสตร์ที่อยู่เบื้องหลังยาของพวกเขาแต่พวกเขารู้จากประสบการณ์ส่วนตัวพืชสมุนไพรบางชนิดจะมีประสิทธิภาพมากหากนำมาใช้เป็นยารักษาโรค พืชสมุนไพรมักจะมีส่วนผสมของสารเคมีที่แตกต่างกันซึ่งอาจหน้าที่ที่ละอย่าง, เสริมหรือทำงานร่วมกันเพื่อเสริมฤทธิ์กันในการพัฒนาสุขภาพให้ดีขึ้น ในพืชชนิดเดียวอาจประกอบไปด้วยสารที่มีรสขมทำหน้าที่กระตุ้นการย่อยอาหาร,สารประกอบต้านการอักเสบที่ลดการบวม และความเจ็บปวด, สารประกอบฟีนอลที่สามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูล, แทนนินช่วยป้องกันแบคทีเรียและป้องกันเชื้อราที่ทำหน้าที่เป็นยาปฏิชีวนะธรรมชาติ, สารประกอบที่ช่วยขับปัสสาวะเพิ่มการกำจัดของเสียและสารพิษและอัลคาลอยด์ที่ช่วยระงับอาการปวด ทั้งนี้ยาแผนโบราณมักจะมีจุดมุ่งหมายเพื่อฟื้นฟูความสมดุลโดยใช้พืชที่มีความซับซ้อนทางเคมีหรือโดยการผสมกันของพืชหลายชนิดที่มีความแตกต่างกันเพื่อการทำหน้าที่เสริมฤทธิ์กันอย่างสูงสุดหรือเพื่อปรับปรุงความเป็นไปได้ของการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลเป้าหมายที่เกี่ยวข้อง(Nyiredy, 2004).

ตารางที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างและกิจกรรมของสารพฤษเคมีต่างๆจากพืช

สารพฤษเคมี	ลักษณะโครงสร้าง	ตัวอย่าง	กิจกรรม
ฟีนอลและโพลีฟีนอล	C_3side chain, - OH groups, phenol ring	Catechol, Epicatechin, Cinnamic acid	ต้านจุลชีพ ,ทำลายหรือขับพยาธิ, ยาแก้ท้องร่วง
ควิโนน	Aromatic rings, two ketone substitutions	Hypericin	ต้านจุลชีพ
ฟลาโวนอยด์	Phenolic structure, one carbonyl group Hydroxylated phenols, C_6-C_3 unit linked to an aromatic ring Flavones + 3-hydroxyl group	Chrysin, Quercetin, Rutin	ต้านจุลชีพ , ยาแก้ท้องร่วง
แทนนิน	Polymeric phenols (Mol. Wt. 500-3000)	Ellagitannin	ต้านจุลชีพ ,ทำลายหรือขับพยาธิ, ยาแก้ท้องร่วง
คูมารินส์	Phenols made of fused benzene and α-pyrone rings	Warfarin	ต้านจุลชีพ
เทอร์พีนอยด์และ essential oils	Acetate units + fatty acids, extensive branching and cyclized	Capsaicin	ต้านจุลชีพ , ยาแก้ท้องร่วง
อัลคาลอยด์	Heterocyclic nitrogen compounds	Berberine, Piperine, Palmatine, Tetrahydropalmatine	ต้านจุลชีพ ,ทำลายหรือขับพยาธิ, ยาแก้ท้องร่วง
เลคตินและโพลีเปปไทด์	Proteins	Mannose-specific agglutinin, Fabatin	ต้านจุลชีพ
ไกลโคไซด์	Sugar + non carbohydrate moiety	Amygdalin	ยาแก้ท้องร่วง

ที่มา : ดัดแปลงจาก Tiwari, Kumar, Kaur, Kaur และ Kaur (2011)

2.4 ชีวภาพความพร้อมของการนำไปใช้ และอัตราสารเข้าระบบชีวภาพ

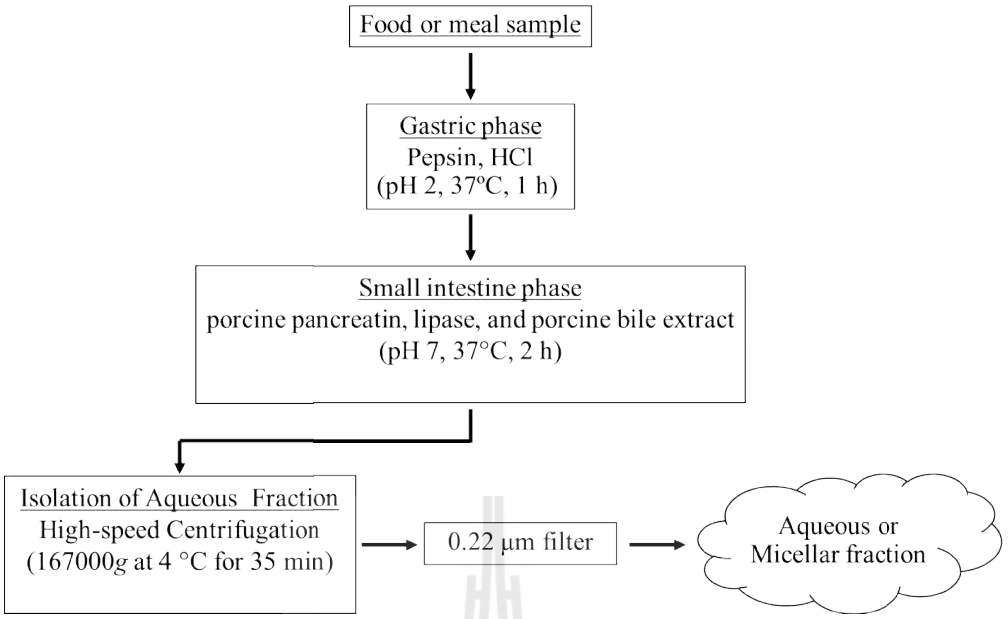
ชีวภาพความพร้อมของการนำไปใช้ (bioaccessibility) หมายถึงปริมาณของส่วนประกอบของอาหารที่มีอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการปลดปล่อยออกมาจาก food matrix และอาจจะถูกดูดซึมผ่านทาง intestinal barrier (Fernández-García, Carvajal-Lérida และ Pérez-Gálvez, 2009)

อัตราสารเข้าระบบชีวภาพ หรือ สภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพ (bioavailability) หมายถึงส่วนของสารประกอบที่ถูกย่อยและพร้อมที่จะถูกนำไปใช้ เผาผลาญ และเก็บสะสมโดยสิ่งมีชีวิต (Ferruzzi และ Blakeslee, 2007)

2.4.1 แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง

การหาปริมาณของชีวภาพความพร้อมของการนำไปใช้ (bioaccessibility) เป็นการศึกษาถึงความสามารถในการปลดปล่อยของสารออกฤทธิ์ (bioactive) นิยมใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (*in vitro* simulated digestion models) ที่เป็นการประยุกต์และเลียนแบบระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ จึงถูกนำมาใช้โดยจะให้ความสำคัญต่อระบบทางเดินอาหารที่เกี่ยวข้องกับการย่อย และการดูดซึมสารอาหาร อวัยวะที่ถูกเลียนแบบในแบบจำลองนี้คือ ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก โดยจะเลียนแบบทั้งที่เป็นส่วนของเหลวต่างๆ ที่อยู่ในแต่ละอวัยวะ เช่น น้ำลาย น้ำย่อย ค่าความเป็นกรด – ด่าง และระยะเวลาที่อาหารอยู่ในแต่ละอวัยวะ ซึ่งแบบจำลองนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่างๆ เช่น โปรตีน แร่ธาตุ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นต้น เพื่อที่จะพิจารณาถึงความเสถียรของสารเมื่อผ่านการระบบย่อยอาหาร(digestion stability) การขนส่งสารไปยังลำไส้ (transport) และกระบวนการเผาผลาญที่เกิดขึ้น ของสารออกฤทธิ์ (bioactive) ต่างๆ (Bhagavan, Chopra, Craft, Chitchumroonchokchai และ Failla, 2007)

แต่อย่างไรก็ตาม *in vitro* simulated digestion models จัดเป็นสภาวะที่คงที่ (static) ซึ่งในสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในกระบวนการย่อยอาหารในมนุษย์นั้นเป็นระบบที่มีการเคลื่อนที่ (dynamic) ซึ่งไม่สามารถที่จะแสดงให้เห็นถึงผลของปัจจัยอื่นๆ ดังเช่น ในการศึกษาด้วย *in vivo*ได้ เช่น การบีบรัดของลำไส้ การผสม เป็นต้นในการศึกษาโดยใช้*in vitro* simulated digestion models จะเลือกใช้ปัจจัยทางด้านสรีระวิทยาที่สามารถกระทำได้ในระหว่างการย่อยของกระเพาะอาหารและลำไส้ ซึ่งสารที่ได้จากการย่อยโดยการใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง เรียกว่า digesta และเมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของ aqueous fraction (รูปที่ 2.1) แล้วนำไปกรองจะได้ส่วนที่เป็น aqueous fraction ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบต่อไป (Failla และ Chitchumronchokchai, 2005; Ferruzzi, Failla และ Schwartz, 2001)



รูปที่ 2.1แสดงขั้นตอนในการการศึกษาโดยใช้ *in vitro* simulated digestion models
ที่มา : Ferruzzi และคณะ (2001)

2.4.2 Caco-2 human intestinal cells

Caco-2 เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ที่มีการแสดงออกและลักษณะคล้ายคลึงกับเซลล์ epithelial ปกติ ซึ่งลักษณะต่างๆ ของ Caco-2 คือ ได้จากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่, ลักษณะการแสดงออกคล้ายคลึงกับเซลล์ epithelial ปกติ แต่มีลักษณะที่แตกต่างได้แก่ Tight junction ระหว่าง cells, Basolateral Na^+, K^+ -ATPase, การเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ drug detoxification , บริเวณ apical brush border surface เต็มไปด้วย hydrolytic enzyme ,สามารถสังเคราะห์และทำให้เกิดการหลั่งของ chylomicrons ได้โดยเซลล์เหล่านี้จะมีความแตกต่างเมื่อ monolayer มาบรรจบกัน ซึ่งวิธีการดูแลเซลล์เหล่านี้จะใช้สภาวะแบบเดียวกันกับการเลี้ยงเซลล์ทั่วไปในระหว่างช่วง phase แรกของเซลล์จะปล่อย colonocyte และ enterocyte-specific protein การ expression ของ colonocyte ทำให้ลักษณะทางชีวเคมีของ enterocyte เปลี่ยนแปลงไปซึ่งลักษณะของ monolayer จะมีลักษณะของเซลล์ที่เกิดการจัดเรียงกันโดยมี tight junction และบริเวณยึดขึงของเซลล์ ซึ่งจะแยกระหว่าง apical microvillar และ basolateral membraneนอกจากนี้ส่วนของ apical membrane ประกอบด้วยกลุ่มเอนไซม์ประเภท hydrolases เช่น sucrase-isomaltase, lactase และ dipeptidylpeptidase IV ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่พบใน intestinal enterocytes แต่ไม่พบใน colonocyte ลักษณะทางชีวเคมีของ Caco-2 cell ที่คล้ายคลึงกับเซลล์ intestinal enterocytes ได้แก่ การแสดงออกของ apical sodium-dependent glucose, amino acid transporter และ di-and tripeptide transporter (PepT1) การสังเคราะห์และการหลั่งของ chylomicrons และ lipoprotein อีกทั้งสามารถที่จะเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ detoxification ของ phase I, phase II และ เอนไซม์ ในกลุ่ม ATP-dependent

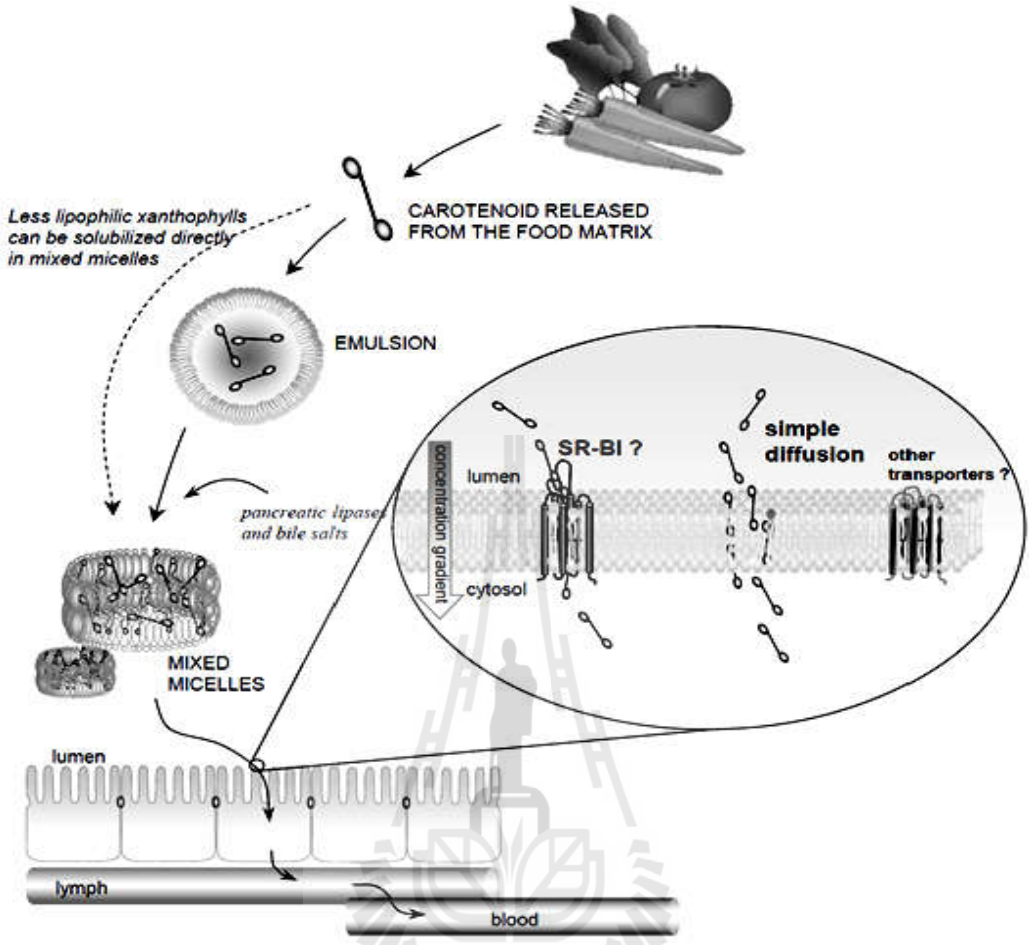
ของ phase III อีกด้วย ซึ่งความสามารถในการดูดซึมและการขนส่งสารของ Caco-2 monolayer ในมนุษย์นี้ทำให้มีการนำ Caco-2 cell ไปใช้เป็นแบบจำลองในการดูดซึมและการเผาผลาญของยาหรือสารออกฤทธิ์ bioactive ชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวาง ส่วนลักษณะของ Caco-2 cell ที่แตกต่างจาก intestinal enterocytes ปกติ คือ ประการแรก Caco-2 cell ได้จากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ซึ่งไม่ใช่เซลล์ปกติ ประการที่สอง cell line นี้เป็นเซลล์ที่มีลักษณะทางพันธุ์กรรมและการแสดงออกแตกต่างกัน ประการที่สาม transepithelial จะมีความทนทานเนื่องจาก tight junction ใน Caco-2 cell มีลักษณะที่พิเศษแตกต่างจากเซลล์ปกติ และประการสุดท้าย Caco-2 cell จะใช้ glycerol 3-phosphate pathway ในการสังเคราะห์ triacylglycerols ขณะที่เซลล์ปกติจะใช้ monoaclyglycerol pathway การดูดซึมของ intestinal epithelium จะใช้แรงที่เกิดขึ้นจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันระหว่างภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ที่เรียกว่า การแพร่(passive diffusion) หรือผ่านกระบวนการ active transport โดยจะเกิดขึ้นผ่าน transcellular(ผ่านผนังเซลล์ของ enterocyte) หรือ paracellular (ผ่าน tight junction) (Failla และ Chitchumronchokchai, 2005)

2.4.3 การใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองร่วมกับ Caco-2 model (Coupling in vitro digestion with the Caco-2 model)

Garrett, Failla และ Sarama (1999) ได้พัฒนาการใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองร่วมกับ Caco-2 modelเพื่อใช้ในการตรวจสอบอัตราสารเข้าระบบชีวภาพ ของแคโรทีนอยด์ จากอาหารที่ผ่านกระบวนการย่อย ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และในอาหาร และมีการศึกษาอย่างมากมายเกี่ยวกับความเสถียรในการย่อย, ชีวภาพความพร้อมของการนำไปใช้ (bioaccessibility) และ cell uptakeโดยการใช้ coupled *in vitro* digestion/Caco-2 cell uptake model ซึ่งแบบจำลองที่ดีนั้นจะต้องสามารถที่จะหาอัตราสารเข้าระบบชีวภาพ bioavailability ของสารพฤกษเคมีต่างๆ ในอาหารได้โดยใช้วิธีการที่สามารถกระทำได้ง่ายและสะท้อนให้เห็นถึงปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อการดูดซึมของสารพฤกษเคมีต่างๆ เช่น food matrix, food processing, digestion, และปฏิสัมพันธ์ของสารกับสารชนิดอื่นๆ ในอาหาร ซึ่งหากใช้การทดลองในมนุษย์หรือในสัตว์ทดลองนั้นเป็นรูปแบบที่กระทำได้ค่อนข้างยาก และใช้งบประมาณมาก ดังนั้นทางเลือกที่เหมาะสม คือการทดลองใน หลอดทดลอง ซึ่งจะช่วยประหยัดเวลาและงบประมาณได้ค่อนข้างมาก โดยมีงานวิจัยที่ผ่านมาของ Chitchumroonchokchai, Schwartz และ Failla (2004)ได้ทำการศึกษาความคงตัวต่อการย่อยและ bioavailability ของลูทีน ที่ได้จากผักโขมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทางการค้า ผลการศึกษาพบว่า ลูทีน และ แคโรทีนอยด์ในผักโขมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทางการค้าค่อนข้างจะคงตัวต่อการย่อยในแบบจำลองทางเดินอาหาร และมีการดูดซึมเข้าสู่เซลล์เพิ่มมากขึ้นตลอดระยะเวลาการบ่ม 8 ชั่วโมง รวมทั้งเกิดการกระตุ้นการสังเคราะห์และหลั่งของ chylomicron ในส่วนของ apicalcompartmentทำให้เกิดการขนส่งลูทีนไปสู่ส่วนของ basolateral compartmentซึ่งอาจบอกได้ว่าลูทีนถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าสู่ระบบเลือด โดยกระบวนหรือกลไกการดูดซึมสารในกลุ่มคาโรทีนอยด์เข้าสู่ผนังเซลล์ลำไส้เล็กและผ่านเข้ากระแสเลือดหรือระบบน้ำเหลือง Yonekura และ Nagao

(2007)ได้ทำการศึกษาและรายงานกลไกในการดูดซึมคาโรทีนอยด์โดยเซลล์ลำไส้เล็ก แสดงในรูปที่ 2.2 โดยเริ่มจากคาโรทีนอยด์ในอาหารจะถูกปลดปล่อยออกมาจาก food matrix ด้วยความร้อน กลไกการย่อยอาหารเชิงกลที่เกิดขึ้นในร่างกาย และการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร รวมถึงเอนไซม์ในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก จากนั้นคาโรทีนอยด์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะรวมเข้ากับส่วนของไขมัน เกิดเป็นกลุ่มอิมัลชั่นขนาดเล็กภายในกระเพาะอาหารและคาโรทีนอยด์รวมกับน้ำดีในกระเพาะอาหารเกิดเป็นไมเซลล์ ในขณะที่คาโรทีนอยด์กลุ่มที่ less lipophilic หรือชอบไขมันน้อย ได้แก่ แซนโทฟิลล์ จะสามารถละลายได้โดยตรงในไมเซลล์ จากนั้นไมเซลล์จะเคลื่อนไปที่ผนังลำไส้เล็กส่วนของ brush border ซึ่งเป็นที่ที่คาโรทีนอยด์ถูกดูดซึมเข้าสู่ลำไส้เล็กแล้วรวมตัวกันเป็นไคโรไมครอนแล้วหลั่งเข้าสู่ระบบน้ำเหลือง กลไกในการดูดซึมคาโรทีนอยด์เข้าสู่ลำไส้เล็กเป็นแบบ simple diffusion (การแพร่แบบง่าย) โดยอาศัยความความเข้มข้นที่แตกต่างกันระหว่างเยื้อหุ้มเซลล์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 2.2แสดงการดูดซึมสารอาหารกลุ่มคาโรทีนอยด์

Source: Yonekura และ Nagao (2007)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำกระบองเพชรสายพันธ์ *Echinocactus grusonii* ที่ซื้อมาจากสวนกระบองเพชรกระท่อมลุง-จรณ์ อ.สามโคก จ.ปทุมธานี มาตัดหนามและรากออกแล้วนำไปล้างดินออกให้สะอาด และหั่นเป็นแผ่นบางๆ ทำแห้งในด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง แล้วบดด้วยเครื่อง Ultra Centrifugal Mill Model ZM-1000 (Retsch, Haan, Germany)ผ่านตะแกรงขนาด 1.0 และ 0.2 มิลลิเมตรตามลำดับเพื่อให้ได้ผงกระบองเพชรที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 0.2 มิลลิเมตร และบรรจุแบบสุญญากาศ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลอง

3.2 การเตรียมสารสกัดกระบองเพชร

ชั่งผงกระบองเพชร 500 มิลลิกรัม ลงในหลอดสกัด แล้วเติมตัวทำละลาย Acetonitrile 15 ml นำไปสกัดใน ultrasonic bath (Elma Ultrasonic, Germany) ที่100% power อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20นาทีแล้ว ปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองเก็บเอาส่วนใสไว้แล้วนำส่วนตะกอนมาสกัดอีก 2 ครั้ง แล้วนำมากรองเก็บส่วนใสที่ได้ใสขวดวัดปริมาตรแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml. แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วย Vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R-114, USA)ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนสารสกัดแห้ง จากนั้นปิดฝาให้แน่นและซีลด้วยพาราฟิล์ม เก็บในภาชนะทึบแสงและจัดเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ต่อไป (Vermaak และคณะ, 2010)

3.3 การศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดกระบองเพชรโดยวิธี High PerformanceLiquid Chromatography (HPLC) (ตามวิธีของOonsivilai, Cheng, Bomser, Ferruzzi และ Ningsanond (2007))

เตรียมสารละลาย คือ อะซีโตน อะซีโตไนไตรล์ เอทิลอะซีเตต และเมทานอล เกรด HPLC เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซีเตต 1.0 Mนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 2 เท่า และปรับ pH 4.6 โดยใช้ glacial acetic acid โดยมีสารละลายมาตรฐาน คือ chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, lutein ส่วน Pheophytin *a*และ *b*เตรียมสารมาตรฐานจาก chlorophyll *a* และ chlorophyll *b* โดย chlorophyll *a*หรือ chlorophyll *b* 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซีโตน 10 มิลลิลิตร เติมไฮโดรคลอริก 1.0 N ปริมาตร 500ไมโครลิตร

3.3.1 การวิเคราะห์ คลอโรฟิลล์ และ ลูทีน

Column คือ Grace-Vydac 201TP54 reverse-phase (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มม. ยาว 250 มม.) Polymeric C 18 ใน guard column เหมือนกับ stationary phase ตอนเริ่มต้นอัตราการไหลจะเป็น 100% หลังจากนั้น 10 นาที จะมีอัตราส่วน 50/50 A/B นาน 10 นาที 5 นาที ถัดไปจะกลับเป็น A 100% และกลับสู่สภาวะเดิมอีก 5 นาที รวมเป็น 30 นาทีในแต่ละตัวอย่าง

ตารางที่ 3.1สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์และลูทีน

สภาวะ	รายละเอียด
เฟสเคลื่อนที่	reservoir A: เมทานอลต่อน้ำต่อแอมโมเนียมอะซีเตต (73: 25: 2 v/v/v) reservoir B: เอทิลอะซีเตต
อัตราการไหล	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ตัวตรวจวัดสัญญาณ	Diode Array Detector(DAD) ที่ความยาวคลื่น 250 และ 600 นาโนเมตร
ปริมาณที่ฉีด	25ไมโครลิตร

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชร(ตามวิธีของ (Oonsivilai และคณะ, 2007))

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรโดยการนำทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายอะซีโตไนไตรล์ แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำ 1.58 มิลลิลิตรเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ทิ้งไว้ 5 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (20% w/v)300 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วจึงเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น765 นาโนเมตร และหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้ gallic acid เป็นมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นของ gallic acid ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานคือ 0 , 50 , 100 , 150 และ 200 ppm ใน 95% เอทานอล ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปสมมูลของมิลลิกรัมกรดแกลลิก/100 กรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง(mg GAE/g)

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

เลี้ยงเซลล์ไลน์ Caco-2 และ HepG2 ใน 96-well plate โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $5x10^3$ เซลล์/ช่อง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของอากาศและคาร์บอนไดออกไซด์ เท่ากับ 95 : 5 นำสารสกัดกระบองเพชรที่เตรียมได้เจือจางด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์และละลายสารสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ ซึ่งอยู่ในช่วง 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ถึง 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์1.0% และ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาลีน(PBS) 1.0% เป็นตัวอย่างควบคุม ทำการเติมสารสกัดที่เตรียมได้ลงใน 96-well plate ทำการบ่มสารสกัดในเซลล์

ไลน์ Caco-2 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าว ปิเปตสารสกัดออกจากเซลล์ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใหม่ บ่มต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบด้วย MTT โดยเติมสารละลายMTT ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10ไมโครลิตรทำการบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเอาอาหารเลี้ยงเซลล์และ MTT ออก แล้วล้างด้วย PBS 100 ไมโครลิตร แล้วเติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละช่อง เพื่อละลายผลึกของ Formazan product นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio-Rad Benmark Plus , UK) นำค่าดูดกลืนแสงไปพล็อตกราฟ dose-response โดยพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจำนวน 6 ระดับ ใช้ค่าเฉลี่ยของแต่ละความระดับเข้มข้น จาก 96-well plate จำนวน 5 ช่อง แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถทำลายเซลล์ได้ 50% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด (LC_{50})(Okonogi, Duangrat, Anuchpreeda, Tachakittirungrod และ Chowwanapoonpohn, 2007)

3.5 การศึกษาชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดกระบองเพชร

3.5.1 แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (In *vitro* simulated digestion models)

แบบจำลองการย่อยสารสกัดกระบองเพชรตามระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองดัดแปลงตามวิธีการของ (Ferruzzi และคณะ, 2001; Garrett และคณะ, 1999)

3.5.1.1แบบจำลองการย่อยในกระเพาะอาหาร (Gastric phase)

นำสารสกัดกระบองเพชร ซึ่งสกัดได้จากผงกระบองเพชรเท่ากับ 2 กรัม โดยทำการเติมโซเดียมคลอไรด์(NaCl)120 มิลลิโมลาร์ (Tween80 5%)ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใน polypropylene tube ขนาด 50 มิลลิลิตรแล้วนำ homogenized แล้วปรับ pH เป็น 2.0± 0.1 ด้วย HCl1 โมลาร์แล้วเติม pepsin ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 40 มิลลิลิตรด้วย NaCl 120 มิลลิโมลาร์ จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดฝาให้แน่นและพันบริเวณฝาหลอดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) ที่95 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

3.5.1.2แบบจำลองการย่อยในลำไส้เล็ก (Small intestinal phase)

โดยใช้ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยในกระเพาะอาหาร ทำการปรับ pH 6.0 ± 0.1 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) เติม crude bile extract ปริมาตร 3 มิลลิลิตรและ pancreatin ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ต้องการทำปฏิกิริยา จากนั้นทำการปรับ pH ของตัวอย่างให้เป็น 6.5± 0.1 ด้วย 1 โมลาร์โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝาให้แน่น ปิดผนึกฝาหลอดด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) ที่95 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

หลังจากผ่าน small intestinal phase แล้ว ส่วนที่ได้เรียกว่า digesta ปิเปต digesta10 มิลลิลิตร ใส่ใน polypropylene tube ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วปิดฝาให้แน่น พันบริเวณฝาหลอดด้วยพาราฟิล์ม และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะ

นำมาวิเคราะห์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ลูทีน ด้วย HPLC และฟีนอลิกทั้งหมดด้วย Folin-Ciocalteau แล้วคำนวณความตัวต่อการย่อยตามสมการ

$$\text{ความคงตัวในกระบวนการย่อย(\%)} \frac{\text{ปริมาณสารหลังการย่อย(digesta)}}{\text{ปริมาณของสารก่อนการย่อย}} = \times 100$$

3.5.1.3 การแยกส่วนของ aqueous fraction

การแยกส่วนของ aqueous fraction จาก digesta โดยนำส่วนของ digesta ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 8,000 (Thermo electron LED GmbH D-37520, Germany) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เพื่อที่จะแยกตะกอนออก แล้วใช้เข็มขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายส่วนใส หลังจากนั้น กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมครอน สารละลายที่ได้นำไปไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดผนึกฝาให้แน่น ปิดผนึกบริเวณฝาหลอดด้วยพาราฟิล์ม และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ลูทีน ด้วย HPLC และฟีนอลิกทั้งหมดด้วย Folin-Ciocalteau แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ Bioaccessibilityหรือชีวภาพพร้อมใช้ตามสมการ

$$\text{Bioaccessibility (\%)} = \frac{\text{ปริมาณสารใน aqueous fraction}}{\text{ปริมาณของสารใน}\boldsymbol{digesta}} \times 100$$

3.5.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 cells (ATCC Cat. No. HTB-37, ATCC, USA)ใช้ passage ที่ 22-32 ทำการเลี้ยงเซลล์ใน T-75 flask โดยมี seeding density เท่ากับ 4×10^5 cells/cm^2 โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ คือ complete medium ที่มีกลูโคสในปริมาณสูง Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) ผสมกับ heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) 10.0%, กรดอะมิโนไม่จำเป็น(non-essential amino acid) 1%, แอล-กลูตามีน (L-glutamine), เพนนิซิลิน- สเตรปโตไมซิน 1% ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน อัตราส่วนของอากาศและคาร์บอนไดออกไซด์ เท่ากับ 95 : 5

3.5.3 การทดสอบการดูดซึมของสารสกัดกระบองเพชรด้วยเซลล์ไลน์ Caco-2

การทดสอบการดูดซึมของสารสกัดกระบองเพชรด้วยเซลล์ไลน์ Caco-2 ตามวิธีของ Ferruzzi และคณะ (2001) โดยหลังจากที่ทำการเลี้ยงเซลล์ passage ที่ 22เป็นระยะเวลาประมาณ 21วัน ทำการล้างเซลล์ด้วย DMEM จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเจือจาง aqueos fraction ที่ได้จากข้อ 3.5.1.3 ด้วย basal DMEM ในอัตราส่วน 1 : 3 ใส่ในภาชนะที่มีเซลล์อยู่ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา2,4และ6ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ทำการปิเปตส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แล้วล้างเซลล์ monolayer ด้วย cold PBS จำนวน 2 ครั้ง ทำการเก็บเซลล์ด้วย cell scraper

เก็บไว้ใน 1 มิลลิลิตรของ cold PBS ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปวิเคราะห์วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ลูทีน ด้วย HPLC และฟีนอลิกทั้งหมดด้วย Folin-Ciocalteau รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในเซลล์โดยใช้Bradford assay(Bradford, 1976)

$$(\%)\text{การดูดซึม} = \frac{\text{ปริมาณสารหลังจากการบ่มในเซลล์เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง}}{\text{ปริมาณของสารที่มีอยู่ในอาหารที่ทำการทดสอบ(test medium)}} \times 100$$

3.5.4 การทดสอบการขนส่งสารสกัดกระบองเพชรผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2

การทดสอบการขนส่งสารสกัดกระบองเพชรผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2 ดัดแปลงตามวิธีของ Chitchumroonchokchai และคณะ (2004)ทำการเลี้ยงเซลล์ไลน์ Caco-2 ใน Transwell inserts (6-well dishes, pore size 0.4 mm, diameter 24 mm, apical volume 1.5 ml, basolateral volume 2.5 ml) โดย seeding density เท่ากับ 3 x 10^5cells/wellอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ คือ complete medium ที่มีกลูโคสในปริมาณสูง Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) ผสมกับ heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) 10.0%, กรดอะมิโนไม่จำเป็น(non-essential amino acid) 1%, แอล-กลูตามีน (L-glutamine), เพนนิซิลิน- สเตรปโตไมซิน 1% ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน อัตราส่วนของอากาศและคาร์บอนไดออกไซด์ เท่ากับ 95 : 5 และหลังจากที่ทำการเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลาประมาณ 21วัน ทำการล้างเซลล์ด้วย DMEM จำนวน 2 ครั้ง แล้วเติม aqueos fraction ที่ได้จากข้อ 3.5.1.3 ที่เจือจางด้วย basal DMEM ในอัตราส่วน 1 : 3 ลงในส่วน apical chamber ปริมาตร1.5 มิลลิลิตร และเติม complete medium ลงในส่วน basolateral chamber ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดทำการปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ในส่วน apical chamber เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แล้วล้างเซลล์ monolayer ด้วย cold PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ taurocholate (0.5 mM), oleic acid (1.6 mM) and glycerol (45 mM) ลงในส่วน apical chamber ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการหลั่งของไคโรไมครอน (O'Sullivan, Ryan และ O'Brien, 2007)หลังจากครบเวลาที่กำหนดแล้วปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งในส่วน apical chamber และ basolateral chamberเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แล้วล้างเซลล์ monolayer ด้วย cold PBS จำนวน 2 ครั้งทำการเก็บเซลล์ด้วย cell scraper เก็บไว้ใน 1 มิลลิลิตรของ cold PBS ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปวิเคราะห์วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ลูทีน ด้วย HPLC และฟีนอลิกทั้งหมดด้วย Folin-Cicalteau รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนในเซลล์โดยใช้ Bradford assay(Bradford, 1976)

$$\text{การขนส่งผ่านเซลล์\%} = \frac{\text{ปริมาณสารในส่วน basolateral chamber} \times 100}{}$$

ปริมาณสารมีอยู่ในอาหารที่ทำการทดสอบ

3.5.4 การสกัดสารจากอาหารเลี้ยงเซลล์และเซลล์ไลน์ Caco-2

การสกัดสารจากอาหารเลี้ยงเซลล์และเซลล์ไลน์ Caco-2 ดัดแปลงจากวิธีของ Ferruzzi และคณะ (2001)โดยนำส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งในส่วน apical chamber และ basolateral chamber มาทำละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม acetone/petroleum ether (50:50) (0.1% BHT) ลงไปปริมาตร4 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 2000xg (Thermo electron LED GmbH D-37520, Germany) เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัด 3 ครั้ง และเก็บส่วนด้านบนที่เป็นชั้นของ petroleum etherของแต่ละครั้งมารวมกัน แล้วนำไปทำแห้งโดยใช้ แก๊สไนโตรเจนและละลายกลับคืนด้วย อะซิโตน แล้วนำไปวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ ลูทีน ด้วย HPLC และฟีนอลิกทั้งหมดด้วย Folin-Cicalteau ในส่วนของเซลล์ นำเซลล์มาทำละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการเติม sodium dodecyl sulfate (34.6 mmol/L) ที่ละลายด้วยเอทานอล (0.1% BHT) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 1 นาที และนำไป sonicated 30 นาที ในน้ำแข็งเพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นทำการสกัดสารโดยเติม acetone/petroleum ether (1:2) แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 2000xg (Thermo electron LED GmbH D-37520, Germany) เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัด 3 ครั้ง และเก็บส่วนด้านบนที่เป็นชั้นของ petroleum etherของแต่ละครั้งมารวมกัน แล้วนำไปทำแห้งโดยใช้ แก๊สไนโตรเจนและละลายกลับคืนด้วย อะซิโตน แล้วนำไปวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ ลูทีน ด้วย HPLC และฟีนอลิกทั้งหมดด้วย Folin-Cicalteau

3.5.5 การหาปริมาณโปรตีน

การตรวจสอบหาความเข้มข้นของโปรตีนทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford assay (Bradford, 1976)โดยทำการเจือจางBradford reagent 5 เท่า ด้วยน้ำ DI r (1Bradford: 4 DI)แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นทำการหาปริมาณโปรตีนโดย ปิเปตตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง แล้วเติม Bradford reagent เจือจางลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น595 นาโนเมตรโดยใช้ bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐานช่วงความเข้มข้นของ bovine serum albumin ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานคือ 0.125-2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.8สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้ซอฟท์แวร์สถิติโปรแกรม SPSS 16.0 (version 16.0, SPSS Inc., USA) คำนวณผลแสดงเป็นค่า mean ±standard deviation (X±S.D.) สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดลองระหว่างกลุ่มใช้ independent-samples t-testที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดกระบองเพชร

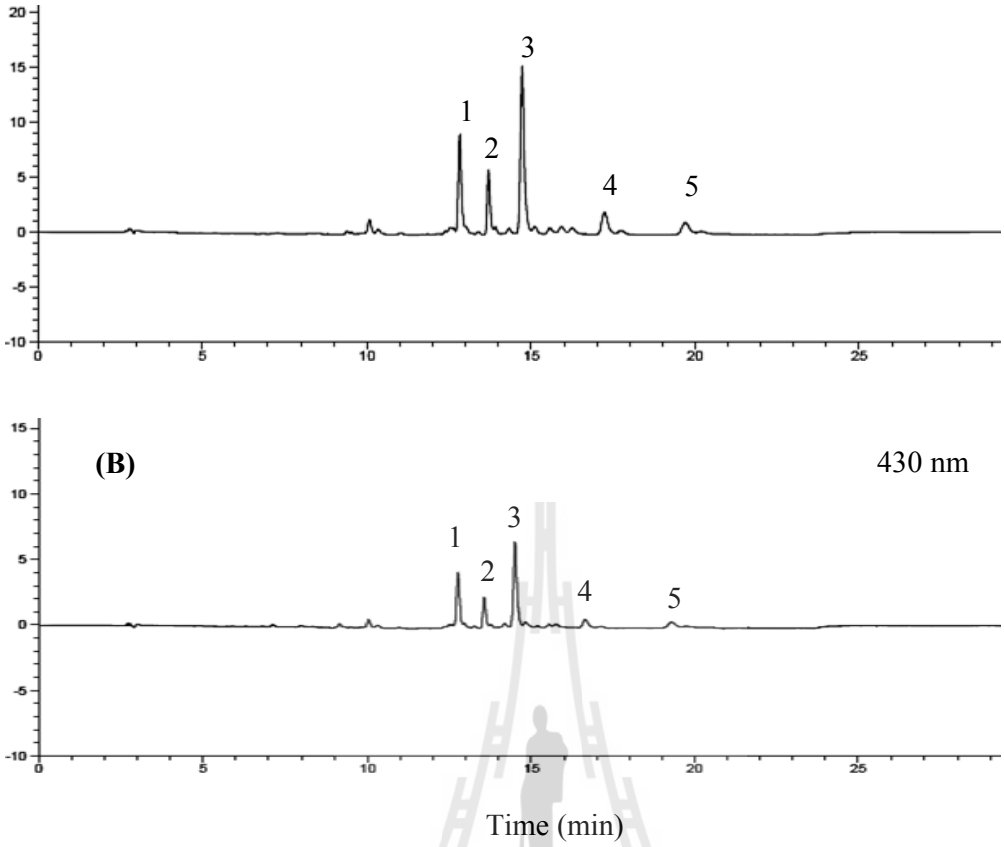
4.1.1 การวิเคราะห์ คลอโรฟิลล์ และ ลูทีนโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography

จากการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีในสารสกัดกระบองเพชร แสดงให้เห็นในโครมาโตแกรม HPLC ดังรูปที่ 4.1 ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าพีคต่างๆ ที่พบเป็นพีคของลูทีน และ อนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ สี่อนุพันธ์ ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์ บี ฟีโอไฟติน เอ และฟีโอไฟติน บี และจากการคำนวณปริมาณลูทีนและคลอกโรฟิลล์ที่พบในสารสกัดกระบองเพชรทั้งสองช่วงอายุ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมากกว่าสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 6 ปี โดยกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเท่ากับ 526.29 และ366.37 µg/g RM ตามลำดับ ในส่วนของคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี ฟีโอไฟติน เอ และฟีโอไฟติน บี เท่ากับ 179.41, 97.26, 243.46, 6.16 และ 115.15, 91.28, 154.08, 5.87 µg/g RMในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

mAU

(A) 430 nm



รูปที่ 4.1โครมาโตแกรม HPLC ของอนุพันธ์คลอโรฟิลล์และลูทีน (A) สารสกัดกระบองเพชรที่อายุการปลูก 3 ปี,(B) สารสกัดกระบองเพชรที่อายุการปลุก 6 ปีโดยพีคที่แสดง: (1) lutein; (2) chlorophyll *b*; (3) chlorophyll *a*; (4) pheophytin *b*; (5) pheophytin *a*

ปริมาณลูทีนที่พบในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี เท่ากับ 36.14 µg/g RM and 30.44 µg/g RMตามลำดับ ทั้งนี้ลูทีนเป็นสารที่พบในผักและผลไม้หลากหลายชนิด รวมไปถึงพืชที่อุดมไปด้วยลูทีนและเป็นแหล่งสำคัญของลูทีน ได้แก่ ดอกดาวเรือง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณลูทีนที่พบในสารสกัดกระบองเพชรกับในสารสกัดดอกดาวเรืองที่ได้จากการศึกษาของ Piccaglia, Marotti และ Grandi (1998)พบว่าในสารสกัดกระบองเพชรยังคงมีปริมาณลูทีนน้อยกว่าในดอกดาวเรือง (180 µg/g RM)ทั้งนี้เมื่อพิจารณาปริมาณลูทีนและคลอโรฟิลล์ทั้งหมดกับช่วงอายุการปลูกกระบองเพชรที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณลูทีนและคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรจะลดลงเมื่ออายุการปลูกกระบองเพชรเพิ่มมากขึ้น และเป็นผลให้อัตราส่วนของลูทีนต่อคลอโรฟิลล์ลดลง โดยความแตกต่างของปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดกระบองเพชรอาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของกระบองเพชร รวมไปถึงกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี ส่วนสีเขียวในสัดส่วนที่มากกว่าที่อายุ 6 ปี ซึ่งส่วนสีเขียวนี้เป็นแหล่งสำคัญของคลอโรฟิลล์และลูทีน(Holasova, Dostalova, Fiedlerova และ Horacek, 2009; Shetty และคณะ, 2012) นอกจากนี้การที่ในสารสกัดกระบองเพชรมีปริมาณลูทีนและคลอโรฟิลล์ทั้งหมดต่ำ อาจเนื่องมาจาก

การประยุกต์ใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นตัวทำละลายสำหรับสกัดกระบองเพชรซึ่งเหมาะสำหรับการสกัดลูทีนและคลอโรฟิลล์เพียงเล็กน้อย สาเหตุที่เลือกใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นตัวทำละลายเพราะในช่วงต้นของการศึกษามุ่งเน้นสนใจศึกษาสาร steroidal glycoside จากกระบองเพชรแต่ผลการศึกษาไม่พบ steroidal glycoside ในสารสกัดกระบองเพชร ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณอนุพันธ์คลอโรฟิลล์และลูทีนในสารสกัดกระบองเพชร

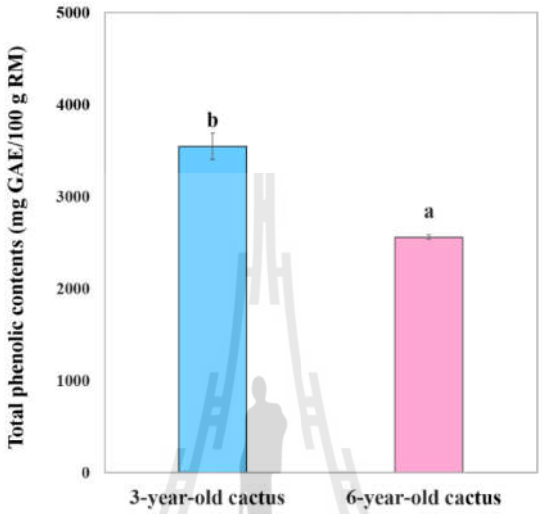
Phytochemical content	Golden barrel cactus extracts	
	3-year-old	6-year-old
Lutein (μg/g RM)	36.14±0.39[b]	30.44±0.45[a]
Chlorophyll *a* (μg/g RM)	179.41±2.89[b]	115.15±5.83[a]
Chlorophyll *b* (μg/g RM)	97.26±0.31[b]	91.28±0.80[a]
Pheophytin *a* (μg/g RM)	243.46±10.59[b]	154.08±5.23[a]
Pheophytin *b* (μg/g RM)	6.16±1.45[a]	5.87±1.48[a]
Total Chlorophylls (μg/g RM)	526.29±10.45[b]	366.37±1.22[a]

Note: Data are means ± SD; Data in the same row with different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu วิธีนี้เป็นการตรวจสอบหาปริมาณฟีนอลิกทางอ้อม โดยการใช้สารรีดิวซิ่ง molybdotungstophosphoric heteropolyanion ซึ่งมีข้อจำกัดในเรื่องของการขาดความจำเพาะของสารที่ทำปฏิกิริยา (Prior, Wu และ Schaich, 2005) โดยมีการรายงานในงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Prior และคณะ (2005)ที่พบว่าวิธี Folin-Ciocalteuจะถูกรบกวนด้วยสารต่างๆมากมายโดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามินซี น้ำตาล aromatic amines ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ สารอินทรีย์ รวมไปถึงสารประกอบอินทรีย์ที่พบตามธรรมชาติในผักผลไม้และพืช ซึ่งการแก้ไขสิ่งรบกวนจากสารเหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็น ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งพบว่าฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปีมีมากกว่ากระบองเพชรที่อายุ 6 ปี โดยในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปีมีปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดเท่ากับ 3545.35 และ2557.96 mg gallic acid equivalent / 100 g of RM ตามลำดับและพบว่าฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในสารสกัดกระบองเพชรสายพันธุ์ถังทอง (*Echinocactus*

grusonii) มีปริมาณสูงกว่าในกระบองเพชรสายพันธุ์*Opuntia* spp. ซึ่งได้จากการศึกษาของ Guevara-Figueroa และคณะ (2010)ที่พบว่าในกระบองเพชรสายพันธุ์*Opuntia* spp. มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 180-2000 mg gallic acid equivalent / 100g of RM อย่างไรก็ตาม ฟีนอลิกที่พบในพืชมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไปเป็นผลมาจากทั้งปัจจัยภายใน ได้แก่ พันธุกรรม และปัจจัยภายนอก ได้แก่ แสง UV โลหะหนักและเชื้อโรค(Achakzai, Achakzai, Masood, Kayani และ Tareen, 2009)



รูปที่ 4.2กราฟแสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี

4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดกระบองเพชร (Cytotoxicity Test)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เซลล์ไลน์ Caco-2 และ HepG2 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดกระบองเพชร ซึ่งการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Caco-2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่สามารถให้ข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาความเป็นพิษในเซลล์ลำไส้ชนิดปกติได้ (Okonogi และคณะ, 2007) และใช้คัดเลือกปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จำเป็นต้องใช้ในการศึกษาการดูดซึมเข้าสู่เซลล์และการศึกษาการขนส่งผ่านเซลล์ของสารสกัดกระบองเพชรที่ผ่านการจำลองในการย่อยอาหารในหลอดทดลอง ในส่วนของเซลล์ไลน์ HepG2 เป็นหนึ่งเซลล์ไลน์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการประเมินความเป็นพิษของสารเคมีและยาเสพติด(Knasmüller และคณะ, 2004)เพราะตับถูกออกแบบมาอย่างสมบูรณ์แบบให้เป็นอวัยวะกำจัดยาและสารพิษ ซึ่ง xenobiotics หรือสารแปลกปลอมส่วนใหญ่เข้าสู่ร่างกายโดยการดูดซึมผ่านระบบทางเดินอาหารและจากนั้นจะถ่ายเทของเหลวผ่านทางหลอดเลือดดำไปที่ตับ ควบคู่ไปกับการรวมกันของเอนไซม์drug-metabolising และขนส่งในเยื่อบุลำไส้ โดยตับที่มีประสิทธิภาพจะช่วยป้องกัน xenobiotics เข้าสู่การไหลเวียนเลือดของร่างกาย

ตารางที่ 4.2ความเป็นพิษของสารสกัดรางจืดต่อเซลล์ไลน์ Caco-2 และ HepG2 หลังผ่านการย่อยด้วยแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง

Cactus extract	LC_{50} (µg RM/ml)	
	Caco-2 cells	HepG2 cells
3-year-old cactus	>200	>200
6-year-old cactus	>200	>200
3-year-old cactus (digesta)	>200	>200
6-year-old cactus (digesta)	>200	>200

ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์Caco-2 และ HepG2ของสารสกัดกระบองเพชรจะใช้วิธี MTT assayโดยเซลล์ไลน์ Caco-2 และ HepG2จะถูกทำให้เสียหายด้วยสารสกัดกระบองเพชรส่งผลให้เกิดการการสูญเสียเซลล์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียเป็นผลให้การดูดซึม MTT ลดลง ซึ่งเมื่อทำการเติม MTT ในหลุมของแพลทที่มีการยึดเกาะของเซลล์ไลน์ Caco-2และ HepG2พบว่าเมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ จะพบผลึกรูปดาวสีม่วงเกิดขึ้นซึ่งผลึกที่เกิดขึ้นนี้ เกิดจาก mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เปลี่ยน MTT ให้กลายเป็น formazan product ซึ่งจะไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ใน 100% DMSO และสามารถวัดสีของ formazan product ที่เกิดขึ้นได้ จากค่าดูดกลืนแสงที่ระดับความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรในการศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดกระบองเพชรที่มีต่อเซลล์ไลน์ Caco-2 และ HepG2หากค่าดูดกลืนแสงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับตัวควบคุมแสดงว่าเซลล์มีการตายเกิดขึ้น ซึ่งสามารถนำไปคำนวณเป็น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเทียบกับตัวควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้เติมสารสกัด) โดยตัวควบคุมมี อัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 100% ผลการทดลองพบว่า สารสกัดรางกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ทั้งที่ไม่ผ่านและผ่านระบบจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลอง (digesta) มีค่า LC_{50} เท่ากับ >200 µg RM/mlไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าสารสกัดกระบองเพชรดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มสารที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Caco-2 และ HepG2(Okonogi และคณะ, 2007)ในการทดสอบความเป็นพิษของ digesta ต่อเซลล์ไลน์ Caco-2 นั้นเพื่อประเมินความเป็นพิษเบื้องต้น ก่อนทำการทดสอบการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ (Cellular uptake) และการขนส่งผ่านเซลล์ (Cellular transport)

4.3ชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดกระบองเพชร

4.3.1 ความคงตัวต่อกระบวนการย่อย (Digestive stability) และชีวภาพพร้อมใช้ (Bioaccessibility) ของสารพฤกษเคมีในสารสกัดกระบองเพชร

โดยทั่วไปการนำไปใช้ทางชีวภาพ (bioavailability) ของสารอาหารหรือสารพฤกษเคมีจะขึ้นอยู่กับความคงตัวต่อกระบวนการย่อยในระบบทางเดินอาหาร ชีวภาพพร้อมใช้ (bioaccessibility) สำหรับการดูดซึมผ่านพื้นผิวเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้และประสิทธิภาพของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้สำหรับการขนส่งไปยังเนื้อเยื่อส่วนปลาย(Walsh, Zhang, Vodovotz, Schwartz และ Failla, 2003)ในการวิจัยครั้งนี้ใช้แบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง (in vitro simulated digestion models) ซึ่งเป็นการประยุกต์และเลียนแบบระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ อวัยวะที่ถูกเลียนแบบในแบบจำลองนี้คือ ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก โดยจะเลียนแบบทั้งที่เป็นส่วนของเหลวต่าง ๆ ที่อยู่ในแต่ละอวัยวะ เช่น เอนไซม์ ค่าความเป็น กรด–ด่าง และระยะเวลาที่อาหารอยู่ในแต่ละอวัยวะ ซึ่งแบบจำลองนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่างๆ อย่างหลากหลาย เพื่อที่จะพิจารณาถึงความเสถียรของสารเมื่อผ่านกระบวนการย่อยอาหาร

ในการศึกษานี้ใช้แบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง โดยทดสอบการย่อยสารสกัดของปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก แต่เนื่องจากสารสกัดกระบองเพชรที่ต้องการทดสอบนี้ ไม่มีส่วนของคาร์โบไฮเดรต จึงได้ยกเว้นการทดสอบการย่อยของสารสกัดในปากและตรวจสอบความคงตัวต่อการย่อยในแบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลองและชีวภาพพร้อมใช้ (bioaccessibility) ของสารพฤกษเคมี ได้แก่ ลูทีน อนุพันธ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลิกทั้งหมด ในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี จากผลการตรวจสอบปริมาณลูทีน อนุพันธ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลิกทั้งหมดใน สารสกัดกระบองเพชรที่ไม่ผ่านระบบจำลองการย่อย (pre-digested), digesta และ aqueous or micellar fraction แสดงในตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า ลูทีน อนุพันธ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลิกทั้งหมด ในสารสกัดกระบองเพชรอายุ 3 ปี สลายตัวและมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับในกระบองเพชรอายุ 6 ปี และพบว่าในส่วนของ pre-digested มี ฟีโอไฟติน เอ ปริมาณสูงอาจเนื่องมาจากกระบวนการเตรียมตัวอย่างผงกระบองเพชรมีการนำกระบองเพชรไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมินี้โครงสร้างคลอโรฟิลล์สามารถเปลี่ยนไปเป็นฟีโอไฟตินได้ (Scheer, 1991)นอกจากนี้เมื่อผ่านกระบวนการย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กได้เป็น digesta ไม่พบปริมาณของ คลอโรฟิลล์เอ และ คลอโรฟิลล์บี หลงเหลืออยู่เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร โดยที่ระดับ pH ประมาณ 2-3 คลอโรฟิลล์ส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ ได้แก่ ฟีโอไฟตินเอ และ ฟีโอไฟตินบี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของFerruzzi และคณะ (2001) ซึ่งพบว่า คลอโรฟิลล์เอ และ คลอโรฟิลล์บี จะเปลี่ยนโครงสร้างเป็นฟีโอไฟตินเอ และ ฟีโอไฟตินบีทั้งหมดหลังจากบ่มที่ pH 2.0 เป็นระยะเวลา 30 นาที เนื่องจากความเป็นกรดในกระเพาะอาหารซึ่งมี pH เท่ากับ 2 ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ โดยโครงสร้างที่ปราศจาก Mg^{2+} ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสีของคลอโรฟิลล์จากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า ฟีโอไฟติไนเซชัน (pheophytinization)

จากการวิเคราะห์ความคงตัวต่อกระบวนการย่อยของสารสกัดกระบองเพชร ซึ่งกำหนดให้เป็นเปอร์เซ็นต์ของลูทีน อนุพันธ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ที่ยังคงเหลืออยู่ในส่วนของ digesta โดยเปอร์เซ็นต์ความคงตัวต่อการย่อยของลูทีน อนุพันธ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลิกทั้งหมดหลังผ่านระบบจำลองการย่อยแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า ลูทีนในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ3 มีความคงตัวสูงกว่าในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 6 ปี ซึ่งอาจเนื่องมาจากในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี มีองค์ประกอบอื่นๆที่สามารถป้องกันการสลายตัวของลูทีนในระหว่างกระบวนการย่อย โดยความคงตัวของลูทีนหลังผ่านระบบจำลองการย่อยของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี เท่ากับร้อยละ69.03 และ 58.33 ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าลูทีนความสูญเสียในระหว่างจำลองการ-

ตารางที่ 4.3 ปริมาณลูทีน อนุพันธ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลิกทั้งหมด ในสารสกัดกระบองเพชรก่อนและหลังผ่านกระบวนการย่อยในระบบทางเดินอาหาร

Phytochemical	3-year-old cactus extracts			6-year-old cactus extracts		
	pre-digested	digesta	aqueous micellar fraction	pre-digested	digesta	aqueous micellar fraction
Lutein (µg/g RM)*	36.14±0.39	24.95±1.19	22.35±0.08	30.44±0.45	17.75±0.17	12.12±0.22
Chlorophyll *a* (µg/g RM)*	179.41±2.89	n.d.	n.d.	115.155.83	n.d.	n.d.
Chlorophyll *b* (µg/g RM)*	97.26±0.31	n.d.	n.d.	91.28±0.80	n.d.	n.d.
Pheophytin *a* (µg/g RM)*	243.46±10.59	159.50 ±2.04	118.97±1.97	154.08±5.23	92.17±7.32	62.59±4.91
Pheophytin *b* (µg/g RM)*	6.16±1.45	38.54±1.04	26.34±1.83	5.87±1.48	29.98±1.19	16.40±0.39
Total chlorophylls (µg/g RM)	526.29±10.45	198.04±2.76	145.31±1.12	366.37±1.22	122.15±6.18	78.98±4.67
Total phenolic (mg GAE /g of RM)**	35.45±1.43	21.43±0.45	16.37±0.19	25.58±0.26	14.55±0.16	10.17±0.34

Note: Data are means ± SD;n.d. = not detected, * Determined by HPLC, ** Determined by Folin-Cicalteau colorimetric assay

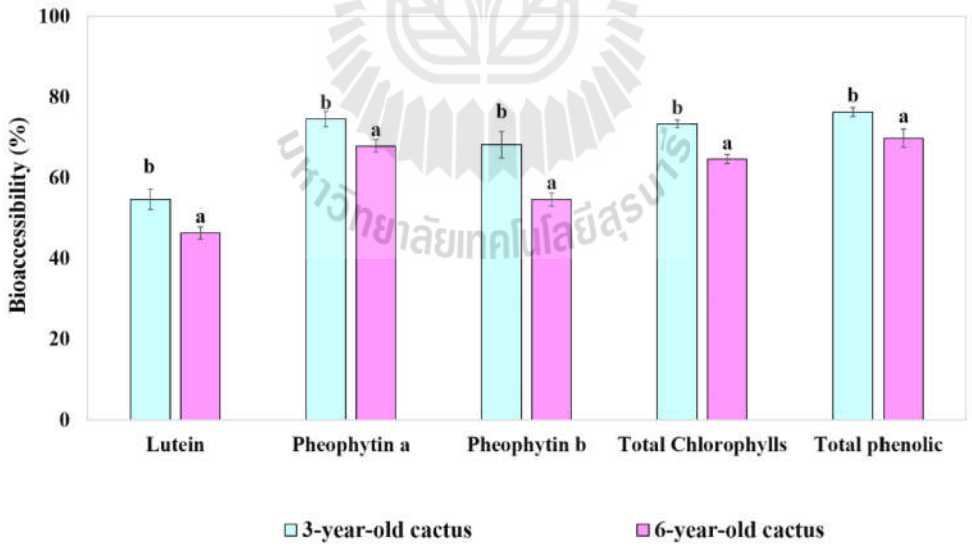
ย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก การสูญเสียลูทีนมีความสัมพันธ์กับการปรากฏตัวของ 13-cis-lutein (Chitchumroonchokchai และคณะ, 2004)ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของRe, Fraser, Long, Bramley และ Rice-Evans (2001)พบว่ามีคาโรทีนอยด์ไม่เสถียรระหว่างขั้นตอนการย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร เพราะคาโรทีนอยด์บริสุทธิ์จะไม่เสถียรในสารละลายกรดจากการศึกษาของ Chitchumroonchokchai และคณะ (2004)ซึ่งได้ทำการศึกษาการนำไปใช้ทางชีวภาพของลูทีนในผักโขมบดละเอียดและในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม พบว่า ลูทีนค่อนข้างเสถียรต่อกระบวนการย่อยในกระเพาะอาหาร และหลังผ่านกระบวนการย่อยในลำไส้เล็ก ปริมาณของลูทีน มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญสำคัญทางสถิติ ในส่วนของความคงตัวของ คลอโรฟิลล์และฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปีเท่ากับร้อยละ 37.64, 60.52 และ33.34, 56.89 ตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกถึงความไม่เสถียรของคลอโรฟิลล์และฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างการจำลองระบบการย่อย ทั้งนี้จะเห็นได้ว่า โอไฟตินเอ และ ฟีโอไฟตินบี มีความคงตัวมากกว่า 100% เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร โดยที่ระดับ pH ประมาณ 2-3 คลอโรฟิลล์ส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ ได้แก่ ฟีโอไฟติน เอ และ ฟีโอไฟติน บี นอกจากนี้ ผลความไม่คงตัวของฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างการจำลองระบบการย่อยในสารสกัดกระบองเพชรมีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Vallejo, Gil-Izquierdo, Pérez-Vicente และ García-Viguera (2004) ซึ่งพบว่าสารประกอบฟีนอลิกเกิดการสลายตัวภายใต้สภาวะของลำไส้ในปริมาณการสลายตัวที่มากกว่า 70%

ตารางที่ 4.4 ความคงตัวต่อการย่อยของลูทีน อนุพันธ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลิกทั้งหมดใน สารสกัดกระบองเพชรที่ผ่านระบบจำลองการย่อย

Phytochemical	% ความคงตัวต่อการย่อย	
	3-year-old cactus	6-year-old cactus
Lutein	69.03±2.65[b]	58.33±1.38[a]
Pheophytin *a*	65.62±3.63[a]	59.83±4.70[a]
Pheophytin *b*	655.24±187.59[a]	534.84±146.47[a]
Total chlorophylls	37.64±1.09[b]	33.34±1.73[a]
Total phenolic	60.52±2.73[a]	56.89±1.20[a]

Note: Data are means ± SD; Data in the same row with different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

Fernández-García และคณะ (2009)ให้คำจำกัดความของชีวภาพพร้อมใช้หรือ Bioaccessibility หมายถึงปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารพฤกษเคมีหลังจากผ่านการจำลองระบบการย่อยอาหารที่สมบูรณ์และพร้อมสำหรับการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นปริมาณอนุพันธุ์คลอโรฟิลล์, ลูทีนและฟีนอลทั้งหมดในส่วนaqueous fraction คือbioaccessibilityซึ่งจากผลการศึกษา bioaccessibility ของอนุพันธุ์คลอโรฟิลล์, ลูทีนและฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่า เปอร์เซ็นต์ชีวภาพพร้อมใช้ ของ ลูทีน คลอโรฟิลล์และฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปีมีค่าสูงกว่ากระบองเพชรอายุ 6 ปี เพราะจากลูทีน คลอโรฟิลล์และฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี มีค่าความคงตัวต่อการย่อยและสามารถฟอร์มไมเซลล์ ได้มากกว่ากระบองเพชรอายุ 6 ปี โดยชีวภาพพร้อมใช้ ของคลอโรฟิลลีทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี เท่ากับร้อยละ 73.38และ64.65 ตามลำดับ ซึ่งมีชีวภาพพร้อมใช้มากกว่าในผักโขมในการศึกษาของ Ferruzzi และคณะ (2001)ที่มีค่าชีวภาพพร้อมใช้เท่ากับร้อยละ37.6 ในส่วนของลูทีนในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี พบว่ามีค่าชีวภาพพร้อมใช้เท่ากับร้อยละ54.72 และ 46.39ซึ่งมีค่าสูงกว่าของแคโรทีนอยด์ในตัวอย่างอาหารผักโขม ที่ได้จากการศึกษาของChitchumroonchokchai และคณะ (2004)ซึ่งได้ทำการศึกษาชีวภาพพร้อมใช้ของลูทีนในอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยการใช้แบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลองร่วมกับเซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่า %ชีวภาพพร้อมใช้ของแคโรทีนอยด์ในตัวอย่างอาหารผักโขม หลังผ่านกระบวนการย่อยอาหาร มีค่าประมาณ ร้อยละ 25-53 ($P<0.01$)

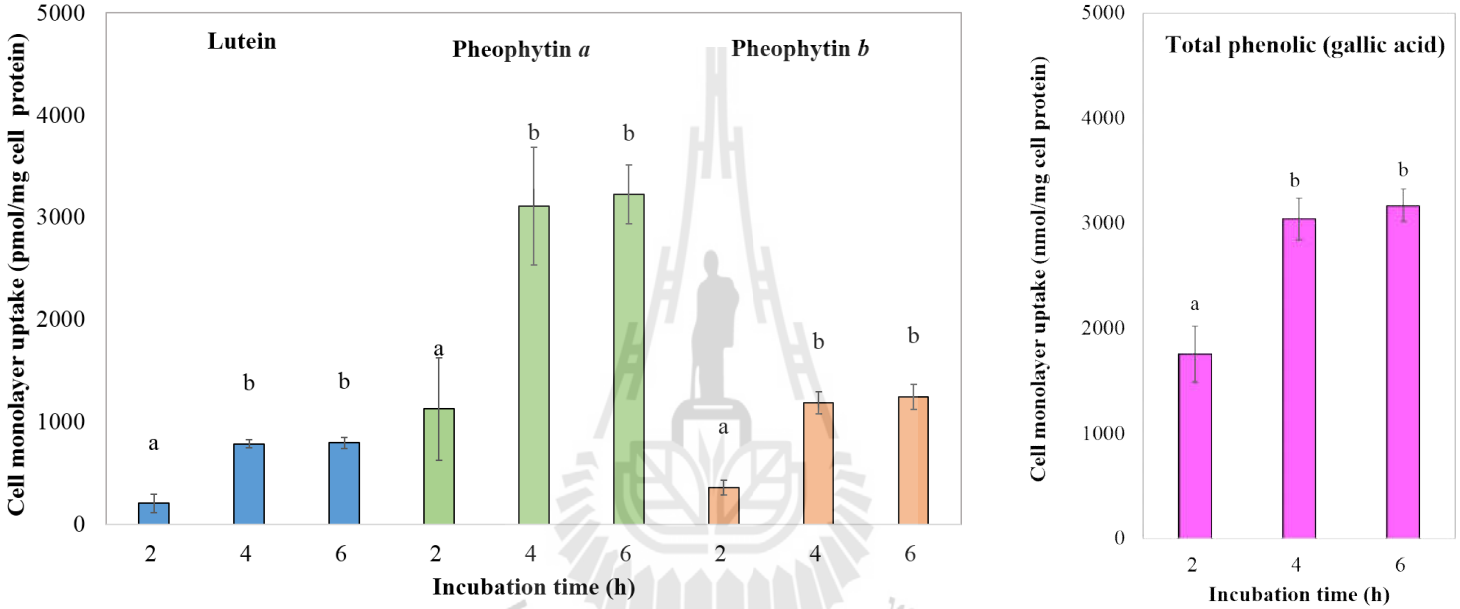


รูปที่ 4.3 ชีวภาพพร้อมใช้ (Bioaccessibility)ของอนุพันธุ์คลอโรฟิลล์, ลูทีน และฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี

4.3.2 การนำไปใช้ทางชีวภาพ หรือ การดูดซึมเข้าสู่เซลล์ (cellular uptake) ของสารสกัดกระบองเพชร

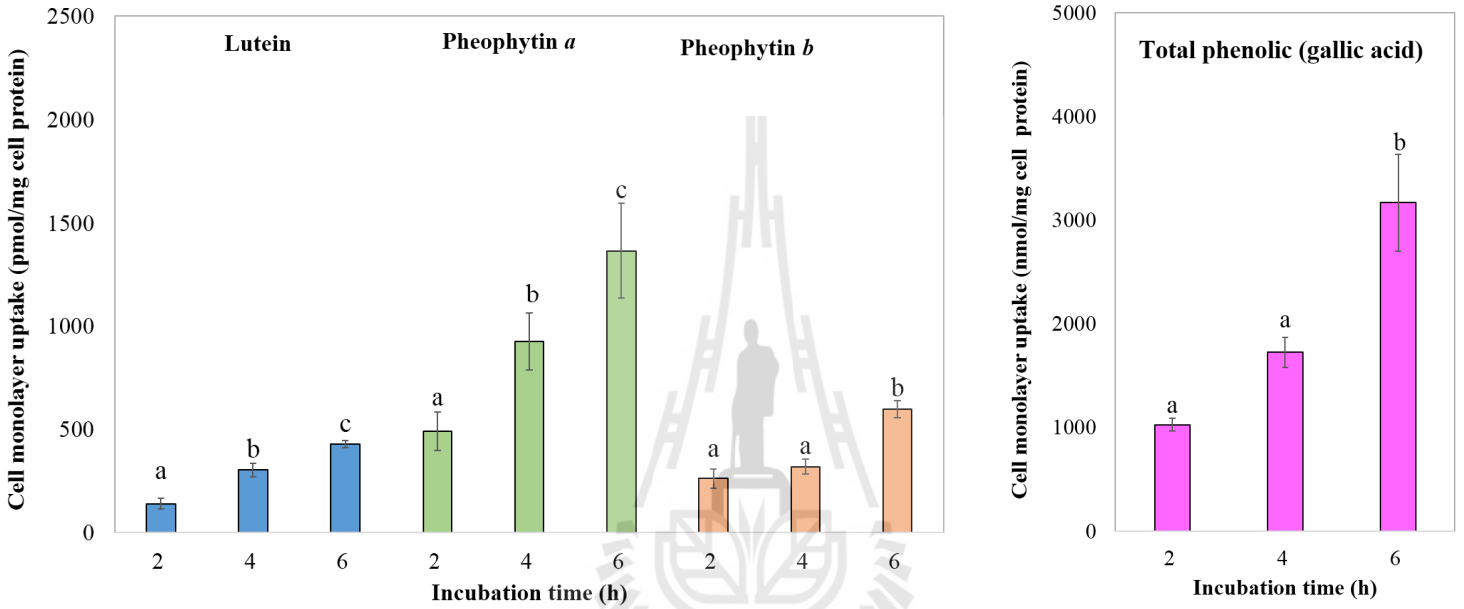
การดูดซึมเข้าสู่เซลล์ (cellular uptake) ของอนุพันธุ์คลอโรฟิลล์, ลูทีน และฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรทดสอบด้วยเซลล์ไลน์ Caco-2 โดยการเจือจางaqueous fractionของสารสกัดกระบองเพชรด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (DMEM) และบ่มกับเซลล์ เป็นระยะเวลา 2, 4และ 6ชั่วโมงเพื่อทดสอบว่าเซลล์สามารถดูดซึมอนุพันธุ์คลอโรฟิลล์, ลูทีน และฟีนอลทั้งหมดได้มากน้อยเพียงใด เซลล์ที่ใช้ อยู่ระหว่าง passage ที่ 22-35 เนื่องจากเป็นช่วงที่เซลล์สามารถ differentiate ไปเป็น enterocyte ได้ใกล้เคียงกับลำไส้เล็กของมนุษย์มากที่สุด โดยทำการเปลี่ยนน้ำยาทุก 2 วันเป็นระยะเวลา 21 วัน จากนั้นจึงสามารถนำมาใช้ทดสอบการดูดซึมได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

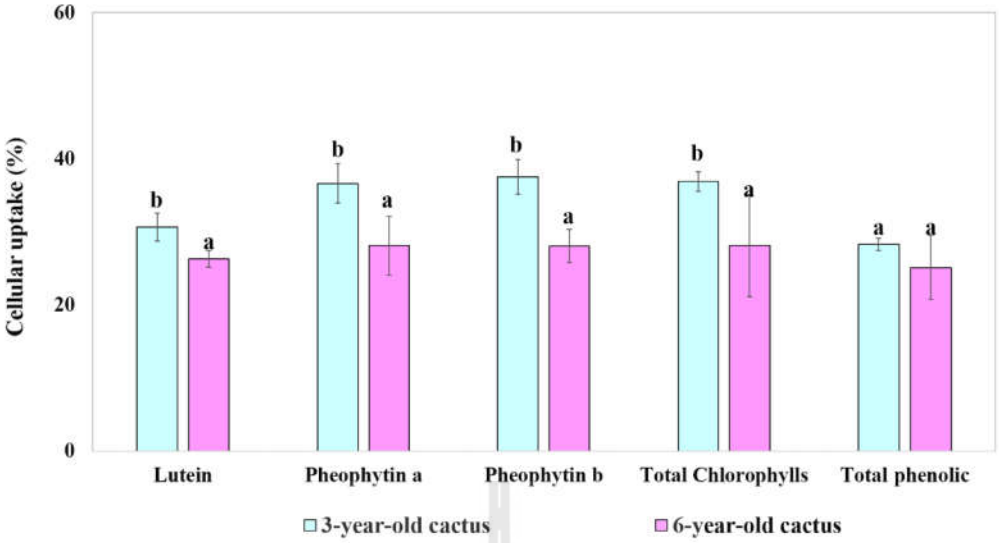


รูปที่ 4.4ปริมาณการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีน, อนุพันธุ์คลอโรฟิลล์และฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี ที่ระยะเวลาในการบ่ม 2, 4 และ 6 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.5ปริมาณการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีน, อนุพันธุ์คลอโรฟิลล์และฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 6 ปี ที่ระยะเวลาในการบ่ม 2, 4 และ 6 ชั่วโมง



รูปที่ 4.6ร้อยละการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีน, อนุพันธุ์คลอโรฟิลล์และฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3และ 6 ปี ที่ระยะเวลาการบ่ม 6 ชั่วโมง

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.4 และ 4.5 แสดงปริมาณในการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีนอนุพันธุ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ตามลำดับ เมื่อพิจารณากระบองเพชรที่อายุ 3 ปี พบว่า ปริมาณการถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีน, อนุพันธุ์คลอโรฟิลล์ และฟีนอลทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นที่ระยะเวลาการบ่ม 2 ถึง 4 ชั่วโมง จากนั้นจะคงที่ไม่แตกต่างกันที่ระยะเวลาการบ่ม และ 6 ชั่วโมง ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับการศึกษาในก่อนหน้านี้ของ Liu, Glahn และ Liu (2004) ที่พบว่าปริมาณการดูดซึมเข้าสู่เซลลของ ลูทีนซีแซนทินและเบต้า-แคโรทีน จะคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงหลังการบ่มที่ 4 ชั่วโมง ผลการทดสอบนี้ชี้ให้เห็นว่า ลูทีน, อนุพันธุ์คลอโรฟิลล์และฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี จะถูกดูดซึมจนถึงระดับอิ่มตัวที่ระยะเวลาการบ่ม 4 ชั่วโมง ในขณะที่การถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีน, อนุพันธุ์คลอโรฟิลล์และฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 6 ปี จะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการบ่ม 2 ถึง 6 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณเริ่มต้นที่ทดสอบกับเซลล์ของ ลูทีน, อนุพันธุ์คลอโรฟิลล์และฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปีมีสูงกว่ากระบองเพชรอายุ 6 ปี และการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของ ลูทีนอนุพันธุ์คลอโรฟิลล์และฟีนอลทั้งหมด เป็นแบบการแพร่ ดังนั้นสารที่มีปริมาณสูงกว่าจึงเกิดการแพร่เข้าสู่เซลล์เกิดภาวะสมดุลระหว่างภายในและนอกเซลล์ได้เร็วกว่าจึงทำให้กระบองเพชรที่อายุ 3 ปี ถูกดูดซึมจนถึงระดับอิ่มตัวที่ระยะเวลาการบ่ม 4 ชั่วโมงแต่กระบองเพชรที่อายุ 6 ปี ถูกดูดซึมจนถึงระดับอิ่มตัวที่ระยะเวลาการบ่มมากกว่า 6 ชั่วโมงปริมาณการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีนฟีโอไฟติน เอ ฟีโอไฟติน บีและฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี ที่ระยะเวลาการบ่ม 6 ชั่วโมง เท่ากับ 795.43, 3221.50, 1241.73 pmol/mg cell protein และ3169.18 nmol/mg cell proteinตามลำดับ ขณะที่การดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีนฟีโอไฟติน เอ ฟีโอไฟติน บีและฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชร

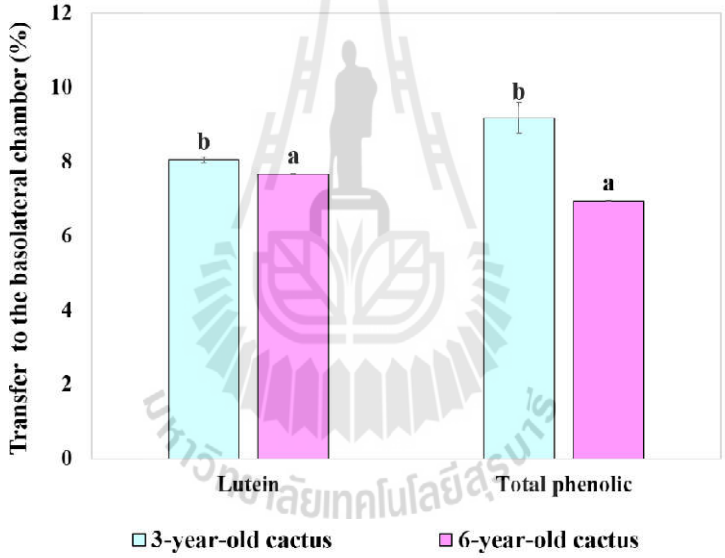
ที่อายุ 6 ปี ที่ระยะเวลาการบ่ม 6 ชั่วโมง เท่ากับ 426.28, 1365.04, 596.74 pmol/mg cell protein และ3168.91 nmol/mg cell proteinตามลำดับ เนื่องจากปริมาณเริ่มต้นที่ใช้ทดสอบของลูทีนฟีโอไฟติน เอ ฟีโอไฟติน บีและฟีนอลทั้งหมด ไม่เท่ากันระหว่างสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3กับ6 ปีจึงแสดงค่าการดูดซึมเข้าสู่เซลล์เป็นร้อยละการดูดซึมเข้าสู่เซลล์หลังบ่มที่ 6 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.6พบว่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีนฟีโอไฟติน เอ ฟีโอไฟติน บีในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี สูงกว่ากระบองเพชรอายุ 6 ปี เนื่องจากลูทีน และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในกระบองเพชรอายุ 3 ปีมีชีวภาพพร้อมใช้ (Bioaccessibility)สูงกว่ากระบองเพชรอายุ 6 ปี อาจส่งผลให้มีค่าการดูดซึมสูงกว่าด้วย ในขณะที่การดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของฟีนอลิกทั้งหมดของกระบองเพชรทั้งสองช่วงอายุไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเปอร์เซ็นต์การดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีนในสารสกัดกระบองเพชรอายุ 3 และ 6 เท่ากับ 30.63 และ 26.31 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Garrett และคณะ (1999)ซึ่งมีค่าการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลูทีนเท่ากับ 29.0% ทั้งนี้ ประสิทธิภาพการสะสมภายในเซลล์ของอนุพันธ์คลอโรฟิลล์อาจจะเป็นผลมาจากสมบัติทางเคมีกายภาพที่เฉพาะเจาะจงของคลอโรฟิลล์พารามิเตอร์ต่างๆ เช่นhydrophobicityหรือความไม่ชอบน้ำของสาร, ไอออนไนซ์และขนาดโมเลกุลที่ดูดซึมเข้าสู่ลำไส้แตกต่างกัน(Chan และ Stewart, 1996)และการดูดซึมของคลอโรฟิลล์ที่ได้จากธรรมชาติจะน้อยกว่าคลอโรฟิลล์สังเคราะห์ ได้แก่ โซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลลิน ซึ่งสามารถถูกดูดซึมได้มากถึงร้อยละ 60 โดยโครงสร้างที่ดูดซึมได้ คือ Cu-chlorin e4 (Ferruzzi และ Blakeslee, 2007)นอกจากนี้ในระหว่างขั้นตอนการจำลองระบบย่อยอาหารในหลอดทดลองอาจมีสารประกอบอื่น ๆ ในตัวอย่างอาหาร ซึ่งอาจมีผลต่อการดูดซึมของคลอโรฟิลล์และลูทีน (Gallardo-Guerrero, Gandul-Rojas และ Mínguez-Mosquera, 2008)

จากการตรวจสอบรวบรวมปัจจัยที่มีกระทบต่อ การดูดซึมเข้าสู่เซลล์ (bioavailability)ของแคโรทีนอยด์ ของ Zaripheh และ Erdman (2002) พบว่า ลูทีนซีแซนทีนและ แคนทาแซนทิน ที่มีอยู่มากในผักใบเขียวและผลไม้ แคโรนอยด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน chromoplasts หรือคลอโรพลาสของพืชและจะสร้าง non-covalently กับโปรตีนหรือเส้นใยอาหาร ที่ละลายในน้ำมันหรืออยู่ในรูปแบบผลึกทำให้การดูดซึมได้ยากบางปัจจัยสำคัญที่มีผลในการจำกัด การนำไปใช้ทางชีวภาพ (bioavailability)รวมถึงลักษณะการกระจายทางกายภาพในแหล่งอาหาร (food matrix) รวมถึงโครงสร้างของโมเลกุลแซนโทฟิลล์ และปฏิสัมพันธ์ของ xanthophylls กับสารอาหารอื่น ๆ (ส่วนใหญ่เป็นไขมันจากอาหาร) และการขาดสารอาหารนอกจากนี้ประสิทธิภาพของการกระจายตัวและการละลายส่งผลกระทบต่อการดูดซึมอย่างมีนัยสำคัญเพราะละลายเป็นสิ่งที่จำเป็นในการดูดซึมโดยเยื่อบุลำไส้เล็ก(Nagao, 2014)

4.3.3 การขนส่งสารสกัดกระบองเพชรผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2

การใช้เซลล์ไลน์ Caco-2 เป็นรูปแบบที่มีศักยภาพสูงในการใช้ประโยชน์สำหรับการศึกษาการขนส่งและการเผาผลาญอาหารของสารพฤกษเคมี (Liu และคณะ, 2004)อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ก็เป็นการจำลองระบบการเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองเลียนแบบการดูดซึมสารพฤกษเคมีเข้าสู่ลำไส้ของร่างการมนุษย์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับขั้นตอนที่สำคัญหลายประการได้แก่ การปลดปล่อยสารพฤกษเคมีออกจาก

เมทริกซ์อาหาร, การละลายของสารพฤกษเคมีเข้าไปผสมเป็น micelles ในลูเมน, การดูดซึมสารพฤกษเคมีโดยเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้เล็กและการขนส่งและการเผาผลาญของสารพฤกษเคมีเข้าสู่ระบบการไหลเวียนของน้ำเหลือง(During, Hussain, Morel และ Harrison, 2002)โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีการใช้รูปแบบ Caco-2 cell ในการเลียนแบบการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ลำไส้เล็กของสารพฤกษเคมีต่างๆ ได้แก่ การดูดซึมแคโรทีนอยด์ (Chitchumroonchokchai และคณะ, 2004; Courraud, Berger, Cristol และ Avallone, 2013; Garrett และคณะ, 1999; Liu และคณะ, 2004; Ryan, O'Connell, O'Sullivan, Aherne และ O'Brien, 2008) อนุพันธ์คลอโรฟิลล์ (Ferruzzi และคณะ, 2001; Gallardo-Guerrero และคณะ, 2008) และฟีนอลิกทั้งหมด (Rodríguez-Roque, Rojas-Graü, Elez-Martínez และ Martín-Belloso, 2013; Vallejo และคณะ, 2004)และมีบางงานวิจัยที่เกี่ยวกับการดูดซึมและการขนส่งของ carotenoids ผ่าน Caco-2 cell(Aherne, Daly, Jiwan, O'Sullivan และ O'Brien, 2010; O'Sullivan และคณะ, 2007)



รูปที่ 4.7ร้อยละการขนส่งสารสกัดกระบองเพชรผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2 ลงสู่ basolateral chamber

ปริมาณอนุพันธ์คลอโรฟิลล์ (ฟีโอไฟติน เอ ฟีโอไฟติน บี) ลูทีน และฟีนอลิกทั้งหมดที่เติมลงในส่วนของ apical chamber เท่ากับ ~1.05, ~0.42, ~1.48 μmol/L, ~5.32 mmol/L and ~0.88, ~0.32, ~1.34 μmol/L, ~3.89 mmol/L สำหรับ กระบองเพชรอายุ3 และ 6 ปี ตามลำดับค่าปริมาณร้อยละการขนส่งสารสกัดกระบองเพชรผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2 ลงสู่ basolateral chamberคือ ปริมาณคลอโรฟิลลล์ (ฟีโอไฟติน เอ ฟีโอไฟติน บี) ลูทีน และฟีนอลิกทั้งหมดที่ถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์แล้วฟอร์มตัวเป็น chylomicrons แล้วขนส่งผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2 หลั่งเข้าสู่basolateral chamberของ trans-well

plate ร้อยละการขนส่งลูทีน และฟีนอลิกทั้งหมด ผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2 ลงสู่ basolateral chamber เท่ากับ 8.05, 9.18 และ7.67, 6.95 สำหรับกระบองเพชรอายุ 3 และ 6 ปี ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.7 ร้อยละการขนส่งผ่านเซลล์ของลูทีนที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมาของChitchumroonchokchai และคณะ (2004)ซึ่งมีร้อยละการขนส่งลูทีนผ่านเซลล์เท่ากับ 7.60และO'Sullivan และคณะ (2007)มีร้อยละการขนส่งลูทีนผ่านเซลล์เท่ากับ 9.70 จากการศึกษากลไกของการขนส่งกรดแกลลิกผ่านเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กของ Konishi, Kobayashi และ Shimizu (2003)พบว่าการซึมผ่านของกรดแกลลิกไม่ขึ้นกับค่าความเป็นกรด-ด่าง และมีการซึมผ่านเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเมื่อมีความเข้มข้นของกรดแกลลิกเพิ่มขึ้นชี้ให้เห็นว่ากลไกการซึมผ่านเซลล์ของกรดแกลลิกเป็นการแพร่แบบ paracellularซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่การขนส่งฟีนอลิกของสารสกัดกระบองเพชรอายุ 3 ปีจะมากกว่า 6 ปี เนื่องจากความเข้มข้นของฟีนอลิกที่ใช้ทดสอบกับเซลล์ของสารสกัดกระบองเพชรอายุ 3 ปี มีสูงกว่าอายุ 6 ปี อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถตรวจพบการขนส่งผ่านเซลล์ของคลอโรฟิลล์ทั้งหมด อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ที่มีปริมาณต่ำกว่าความสามารถในการตรวจสอบของคลอโรฟิลโดยวิธี HPLC นอกจากนี้คลอโรฟิลล์อาจจะหายไปหรือเสียหายในระหว่างการจำลองระบบการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก รวมทั้งคลอโรฟิลล์ ยังเสียหายได้ง่ายด้วยแสงอย่างไรก็ตามจากงานวิจัยก่อนหน้าของ Ferruzzi, Failla และ Schwartz (2002)พบว่า sodium copper chlorophyllin (SCC)ซึ่งเป็นหนึ่งในอนุพันธ์คลอโรฟิลล์ที่ละลายได้ในน้ำ สามารถขนส่งผ่านเซลล์เข้าสู่ basolateral chamber ได้เพียง 2-5%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
บทสรุป

จากการตรวจสอบสารพฤกษเคมีของสารสกัดกระบองเพชรทั้งสองช่วงอายุ พบว่าสารสกัดกระบองเพชรมีสารพฤกษเคมีคือ ลูทีน คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี ฟีโอไฟตินเอ ฟีโอไฟตินบี และฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณลูทีนที่พบในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี เท่ากับ 36.14 µg/g RM and 30.44 µg/g RMตามลำดับในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมากกว่าสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 6 ปี โดยกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเท่ากับ 526.29 และ366.37 µg/g RM ตามลำดับ ในส่วนของคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี ฟีโอไฟติน เอ และฟีโอไฟติน บี เท่ากับ 179.41, 97.26, 243.46, 6.16 และ 115.15, 91.28, 154.08, 5.87 µg/g RMในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ตามลำดับจากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ด้วยวิธี Folin-Ciocalteuในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี มีปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดเท่ากับ 3545.35 และ2557.96 mg gallic acid equivalent / 100 g of RM ตามลำดับส่วนการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดกระบองเพชรก่อนและหลังผ่านแบบจำลองการย่อยอาหารพบว่ามีค่า LC_{50} มากกว่า 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ชี้ให้เห็นว่าไม่มีความเป็นพิษในเซลล์ไลน์ Caco-2 และ HepG2 และจากการทดสอบความคงตัวต่อการย่อยของ ลูทีน คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี พบว่ามีความคงตัวต่อการย่อย เท่ากับ 69.03%, 37.64% และ 60.52% ในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 6 ปี เท่ากับ 58.33%, 33.34% และ 56.89% บ่งชี้ว่า ลูทีน คลอโรฟิลล์ทั้งหมด ฟีนอลิกทั้งหมดไม่เสถียรเมื่อผ่านระบบจำลองการย่อยอาหารที่กระเพาะและลำไส้เล็ก จากนั้นทำการศึกษาการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ไลน์ Caco-2 ของ ลูทีน คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า ลูทีน คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี ถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์ไลน์ Caco-2 ที่ระดับร้อยละ 30.63, 36.88 และ 28.27 ตามลำดับ ในสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 6 ปี ที่ระดับร้อยละ 26.31, 28.10 และ 25.11 ตามลำดับ ในลำดับสุดท้ายสุดท้าย การศึกษาการขนส่งผ่านเซลล์พบว่า ลูทีน และฟีนอลิกทั้งหมดถูกขนส่งผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2 ที่ระดับร้อยละ 8.05, 9.18 และ 7.67, 6.95 สำหรับสารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 และ 6 ปี ตามลำดับ แต่ไม่สามารถตรวจพบการขนส่งผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2 ของคลอโรฟิลล์ทั้งหมด สารสกัดกระบองเพชรที่อายุ 3 ปี ซึ่งมีปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าอายุ 6 ปี ชี้ให้เห็นความสำคัญของอายุพืช และพบว่า ลูทีน ฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระบองเพชรสามารถถูกดูดซึมและขนส่งผ่านเซลล์ Caco-2 ได้ แต่ไม่สามารถตรวจพบการขนส่งคลอโรฟิลล์ผ่านเซลล์ลำไส้เล็ก

บรรณานุกรม

สุทัศน์ ยกส้าน.(2555). ตะบองเพชร [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.royin.go.th/th/knowledge/detail.php?ID=458. [23 กันยายน 2555].

วชิรพงศ์ หวลบุตตา.(2537). แคคตัส ไม้ดอกไม้ประดับ. 2000. พิมพ์ครั้งที่ 1 .ไม้ดอกไม้ประดับ ลำดับที่ 4 .กรุงเทพมหานคร: บ้านและสวน.

Achakzai, A. K. K., Achakzai, P., Masood, A., Kayani, S. A. and Tareen, R. B. (2009). Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. **Pak. J. Bot.**41(5): 2129-2135.

Agozzino, P., Avellone, G., Caraulo, L., Ferrugia, M. and Filizzola, F. (2005). Volatile profiles of Sicilian prickly pear (Opuntia ficus indica) by SPME-GC/MS analysis. **Italian journal of food science.**17(3): 341-348.

Aherne, S. A., Daly, T., Jiwan, M. A., O'Sullivan, L. and O'Brien, N. M. (2010). Bioavailability of β-carotene isomers from raw and cooked carrots using an in vitro digestion model coupled with a human intestinal Caco-2 cell model. **Food research international.**43(5): 1449-1454.

Bhagavan, H. N., Chopra, R. K., Craft, N. E., Chitchumroonchokchai, C. and Failla, M. L. (2007). Assessment of coenzyme Q10 absorption using an in vitro digestion-Caco-2 cell model. **International journal of Pharmaceutics.**333(1): 112-117.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry.**72(1): 248-254.

Chan, O. H. and Stewart, B. H. (1996). Physicochemical and drug-delivery considerations for oral drug bioavailability. **Drug Discovery Today.**1(11): 461-473.

Chitchumroonchokchai, C., Schwartz, S. J. and Failla, M. L. (2004). Assessment of lutein bioavailability from meals and a supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. **The Journal of nutrition.**134(9): 2280-2286.

Courraud, J., Berger, J., Cristol, J.-P. and Avallone, S. (2013). Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion. **Food Chemistry.**136(2): 871-877.

De Leo, M., De Abreu, M. B., Pawlowska, A., Cioni, P. and Braca, A. (2010). Profiling the chemical content of Opuntia ficus-indica flowers by HPLC–PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. **Phytochemistry Letters.**3(1): 48-52.

During, A., Hussain, M. M., Morel, D. W. and Harrison, E. H. (2002). Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells β-carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. **Journal of lipid research.**43(7): 1086-1095.

Failla, M. L. and Chitchumronchokchai, C. (2005). *In vitro models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods*: International Food Policy Research Institute.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I. and Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research.**29(11): 751-760.

Ferruzzi, M. G. and Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research.**27(1): 1-12.

Ferruzzi, M. G., Failla, M. L. and Schwartz, S. J. (2001). Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an in vitro digestion and Caco-2 human cell model. **Journal of agricultural and food chemistry.**49(4): 2082-2089.

Ferruzzi, M. G., Failla, M. L. and Schwartz, S. J. (2002). Sodium copper chlorophyllin: in vitro digestive stability and accumulation by Caco-2 human intestinal cells. **Journal of agricultural and food chemistry.**50(7): 2173-2179.

Galati, E. M., et al. (2003). Chemical characterization and biological effects of Sicilian Opuntia ficus indica (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. **Journal of agricultural and food chemistry.**51(17): 4903-4908.

Galati, E. M., et al. (2007). Opuntia ficus indica (L.) Mill. mucilages show cytoprotective effect on gastric mucosa in rat. **Phytotherapy Research.**21(4): 344-346.

Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B. and Mínguez-Mosquera, M. I. (2008). Digestive stability, micellarization, and uptake by Caco-2 human intestinal cell of chlorophyll derivatives from different preparations of pea (Pisum sativum L.). **Journal of agricultural and food chemistry.**56(18): 8379-8386.

Garrett, D. A., Failla, M. L. and Sarama, R. J. (1999). Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. **Journal of agricultural and food chemistry.**47(10): 4301-4309.

Guevara-Figueroa, T., et al. (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (Opuntia spp.). **Journal of food composition and Analysis.**23(6): 525-532.

Heerden, F. R. (2008). Hoodia gordonii: a natural appetite suppressant. **Journal of ethnopharmacology.**119(3): 434-437.

Heerden, F. R., et al. (2007). An appetite suppressant from Hoodia species. **Phytochemistry.**68(20): 2545-2553.

Hernández-Urbiola, et al. (2010). Study of nutritional composition of nopal (Opuntia ficus indica cv. Redonda) at different maturity stages. **Open Nutr J.**4: 11-16.

Holasova, M., Dostalova, R., Fiedlerova, V. and Horacek, J. (2009). Variability of lutein content in peas (Pisum sativum L.) in relation to the variety, season and chlorophyll content. **Czech J. Food Sci.**27: S188-S191.

Janssen, H.-G., et al. (2008). Quantification of appetite suppressing steroid glycosides from Hoodia gordonii in dried plant material, purified extracts and food products using HPLC-UV and HPLC–MS methods. **Analytica chimica acta.**617(1): 200-207.

Knasmüller, S., et al. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology.**198(1): 315-328.

Konishi, Y., Kobayashi, S. and Shimizu, M. (2003). Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid in Caco-2 cell monolayers. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry.**67(11): 2317-2324.

Kuti, J. O. (2004). Antioxidant compounds from four Opuntia cactus pear fruit varieties. **Food Chemistry.**85(4): 527-533.

Liu, C.-S., Glahn, R. P. and Liu, R. H. (2004). Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. **Journal of agricultural and food chemistry.**52(13): 4330-4337.

MacLean, D. B. and Luo, L.-G. (2004). Increased ATP content/production in the hypothalamus may be a signal for energy-sensing of satiety: studies of the anorectic mechanism of a plant steroidal glycoside. **Brain research.**1020(1): 1-11.

Nagao, A. (2014). Bioavailability of Dietary Carotenoids: Intestinal Absorption and Metabolism. **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ.**48(4): 385-391.

Nyiredy, S. (2004). Separation strategies of plant constituents–current status. **Journal of Chromatography B.**812(1): 35-51.

O'Sullivan, L., Ryan, L. and O'Brien, N. (2007). Comparison of the uptake and secretion of carotene and xanthophyll carotenoids by Caco-2 intestinal cells. **British journal of nutrition.**98(01): 38-44.

Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S. and Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry.**103(3): 839-846.

Oonsivilai, Cheng, C., Bomser, J., Ferruzzi, M. G. and Ningsanond, S. (2007). Phytochemical profiling and phase II enzyme-inducing properties of Thunbergia laurifolia Lindl.(RC) extracts. **Journal of ethnopharmacology.**114(3): 300-306.

Oonsivilai , R., Chaijareonudomroung, N., Huantanom, Y. and Oonsivilai , A. (2010). Extraction condition of Echinocactus grusonii. **World Academy of Science, Engineering and Technology Journal.**70: 366-369.

Piccaglia, R., Marotti, M. and Grandi, S. (1998). Lutein and lutein ester content in different types of Tagetes patula and T. erecta. **Industrial Crops and Products.**8(1): 45-51.

Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry.**53(10): 4290-4302.

Re, R., Fraser, P. D., Long, M., Bramley, P. M. and Rice-Evans, C. (2001). Isomerization of lycopene in the gastric milieu. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**281(2): 576-581.

Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P. and Martín-Belloso, O. (2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry.**136(1): 206-212.

Ryan, L., O'Connell, O., O'Sullivan, L., Aherne, S. and O'Brien, N. (2008). Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. **Plant Foods for Human Nutrition.**63(3): 127-133.

Scheer, H. (1991). *Chlorophylls*: CRC Press, Inc.

Scott, A., Orsi, A., Ward, C. and Bradford, R. (2012). Genotoxicity testing of a Hoodia gordonii extract. **Food and Chemical Toxicology.**50: S34-S40.

Shetty, A. A., Rana, M. and Preetham, S. (2012). Cactus: a medicinal food. **Journal of food science and technology.**49(5): 530-536.

Shukla, Y. J., et al. (2009). Pregnane glycosides from Hoodia gordonii. **Phytochemistry.**70(5): 675-683.

Sood, A., Kaur, P. and Gupta, R. (2012). Phytochemical screening and antimicrobial assay of various seeds extract of Cucurbitaceae family.

Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M. and Livrea, M. A. (2004). Supplementation with cactus pear (Opuntia ficus-indica) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. **The American journal of clinical nutrition.**80(2): 391-395.

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. and Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. **Internationale pharmaceutica sciencia.**1(1): 98-106.

Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Pérez-Vicente, A. and García-Viguera, C. (2004). In vitro gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. **Journal of agricultural and food chemistry.**52(1): 135-138.

Van Wyk, B.-E. (2008). A broad review of commercially important southern African medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology.**119(3): 342-355.

Vermaak, I., Hamman, J. and Viljoen, A. (2010). High performance thin layer chromatography as a method to authenticate Hoodia gordonii raw material and products. **South African Journal of Botany.**76(1): 119-124.

Walsh, K. R., Zhang, Y. C., Vodovotz, Y., Schwartz, S. J. and Failla, M. L. (2003). Stability and bioaccessibility of isoflavones from soy bread during in vitro digestion. **Journal of agricultural and food chemistry.**51(16): 4603-4609.

Yonekura, L. and Nagao, A. (2007). Intestinal absorption of dietary carotenoids. **Molecular nutrition & food research.**51(1): 107-115.

Zaripheh, S. and Erdman, J. W. (2002). Factors that influence the bioavailablity of xanthophylls. **The Journal of nutrition.**132(3): 531S-534S.

Zou, D.-m., et al. (2005). Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. **Nutrition Journal.**4(1): 25.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ(ภาษาไทย) ดร. รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์

   (ภาษาอังกฤษ) Dr. Ratchadaporn Oonsivilai

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน3 4099 00848 97 8

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

   อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหารสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์โทรสารและ E-mail

   สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหารสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา 30000

   โทรศัพท์ 0-4422 - 4232 โทรสาร 0-4422 – 4387

   Email address: roonsivi@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (พยาบาล)

สถาบัน คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปีที่สำเร็จ 2530

ปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

สถาบัน Dalhousie University, DalTech, Canada

ปีที่สำเร็จ 2543

หัวข้อวิทยานิพนธ์: “The Effect of Beta-Glucan Polymers on the Rheological and Filtration Properties of Wort”

แหล่งทุนที่ได้รับ : ทุนผู้ช่วยวิจัย NSERC Canada

ปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สถาบัน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีที่สำเร็จ 2549

หัวข้อวิทยานิพนธ์ : “Neutraceutical and Functional Properties of *Thunberga Laurifolia* Lindl (Rang Chuet) Extract”

แหล่งทุนที่ได้รับ : ทุนพัฒนาอาจารย์ทบวงมหาวิทยาลัย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัยหัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัยเป็นต้น

Jan 2007 – Present : Lecturer, Department of Food Technology Institute of

Agricultural Technology, Suranaree university of Technolgy, Nakhon Ratchasima, Thailand

Jan.2002 - Dec 2006 : Ph. D. candidate, Suranaree University of Technology

Oct 2000 - Dec.2001 : Lecturer Department of Food Technology Institute of Agricultural Technology, Suranaree university of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

Sept.1997 – Oct. 2000 : Research Assistant Department of Food Science and Technology Dalhousie University DalTech Halifax, Nova Scotia,Canada

Oct. 1993 - Aug.1997 : Register Nurse, University Infirmary Suranaree University of Technology Nakhon Ratchasima Thailand

May.1987 - Sept.1993 : Register Nurse Intensive Care Unit, Srinakarin Hospital, Khonkaen University Khonkaen, Thailand

8.งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการประยุกต์ใช้ neural network สำหรับหาค่าความเข้มข้นวิกฤตในสารละลาย beta-glucan

แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทุนวิจัยอาจารย์ใหม่ 2543: หัวหน้าโครงการ

2. โครงการ IRPUS; การเตรียมสารสกัดอุดมด้วยวิตามินซีจากหัวไชเท้า ทุนวิจัย สกว. 2550: หัวหน้าโครงการ

3. โครงการ UBI; การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเจี่ยวกู้หลาน ทุนวิจัย SUT-UBI: หัวหน้าโครงการ

4. โครงการ iTAP; การพัฒนาผลิตภัณฑ์สาหร่ายเส้นแก้ว: หัวหน้าโครงการ

5. โครงการ UBI; การยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์สาหร่ายเส้นแก้ว: หัวหน้าโครงการ

6. โครงการ iTAP;โครงการการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาล้างเครื่องซักผ้า : หัวหน้าโครงการ

7. โครงการการศึกษาการปรับแต่งกระบวนการหมักเบียร์ที่เหมาะสมโดยใช้profileของอุณหภูมิเป็นตัวกำหนด: หัวหน้าโครงการ

9. งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

1. โครงการการศึกษาพิษกึ่งระยะยาวของสารสกัดรางจืด :หัวหน้าโครงการ

2. โครงการฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดรางจืด ย่านางและ เครือหมาน้อย : หัวหน้าโครงการ

3. โครงการชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรางจืด :หัวหน้าโครงการ

4. โครงการผลิตไมโครแคปซูลสารสกัดรางจืด ย่านางและเครือหมาน้อย :ผู้ร่วมวิจัย

5. โครงการประยุกต์ใช้สารสกัดรางจืด ย่านาง เครือหมาน้อยในผลิตภัณฑ์อาหาร: ผู้ร่วมวิจัย

6. โครงการการการผลิตและการศึกษาสมบัติทางชีวภาพของสีผสมอาหารแอนโธไซยานินธรรมชาติจากเปลือกแก้วมังกร: ผู้ร่วมวิจัย

10. Publications and presentations :

1) **Oonsivilai, R.**, Speers, R.A. and Paulson, A.T. 2000. Effects of pH, maltose and ethanol on the physical properties of model beta-glucan suspensions. Presented at IOB 2000, Institute of Brewing, Asia-Pacific Section 26th Convention, Mar. 19-24, Singapore, SGP.

2) **Oonsivilai, R**. Patelakis, S.J.J., Speers, R.A., and Paulson, A.T. 1999. Rheological and filtration properties of beta-glucan polymers in the brewing process. CIFST Annual Meeting, Presentation #OR-12, June 6-9, Kelowna, BC.

3) Speers, R. A., Patelakis, S.J.J., A. T. Paulson, and **Oonsivilai, R**. 2004. Shear rate during brewing operations. MBAA TQ vol. 41, no. 3, pp. 241-247.

4) **Oonsivilai, R.**, Cheng, C., Ningsanond, S., Bomser, J.A. and Ferruzzi, M.G. 2006. Induction of quinone reductase activity in murine hepatoma cells by extracts of *Thunbergia Laurifolia* Lindl. *FASEB Journal*. Vol. 20, no. 4, Part 1: A154

5) **Oonsivilai, R.**, Cheng, C., Bomser, J.A., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Phytochemical profiling and detoxification properties of *Thunbergia Laurifolia* Lindl (Rang Chuet) extracts. Journal of Ethnopharmacology 114: 300 – 306.

6) **Oonsivilai, R.**, Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. Presented at FoSTAT 2007. BITEC, June 14-15, Bangkok, Thailand.

7) ****Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2007. Probabilistic neural network for β-glucan suspensions. Proceeding of the 7th WSEAS International Conference on Simulation, Modeling and Optimization, Beijing, China, September 15-17.

8) **Oonsivilai, R.**, Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. As. J. Food Ag-Ind. 1(02): pp 116 – 128.

9) ****Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2008. Genetic Algorithm Approach to Twin-Screw Food Extrusion Process Frequency Domain Parameter Estimation. Proceeding of the 7th WSEAS International Conference on Applied Computer & Applied Computational Science (ACACOS' 08), Hangzhou, China, April 6-8. pp: 645 – 650.

10) **Oonsivilai, A. and **Oonsivilai, R**. 2008 Parameter Estimation of Frequency Response Twin-Screw Food Extrusion Process using Genetic Algorithm. WSEAS TRANSACTIONS on SYSTEMS. Issue 7 Volume 7, July, ISSN: 1109 – 2777

11) ****Oonsivilai, R** and Oonsivilai, A. 2008. Apply a genetic algorithm to natural cheese product. Proceeding of the 8th WSEAS International conference on applied computer science (ACS'08). ISSN 1790 – 5109, pp: 269 – 274.

12) **Oonsivilai, A. and **Oonsivilai, R**. 2009. A genetic algorithm application in natural cheese products. WSEAS TRANSACTIONS on SYSTEMS. Issue 1, Vol 8, January, ISSN : 1109 – 2777, pp: 44 – 54.

13) ****Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2010. Temperature profiling during fermenting processusing differential evolution. Proceeding of the 9th WSEAS International conference on energy and environment. Febuary 23-25, Cambridge, London.

14) ****Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2010. Differential evolution application in temperature profile of fermenting. WSEAS TRANSACTION on SYSTEMS. Issue. ISSN: 1109-2777. Issue 6(9): 618-628.

** งานวิจัยที่ไม่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์

อนุสิทธิบัตร: ยื่นจดอนุสิทธิบัตรเรื่องการเตรียมสารสกัดจากหัวไชเท้า เลขที่คำขอ 0801003939

ความลับทางการค้า : กรรมวิธีการผลิตวุ้นเส้นสาหร่ายแก้ว

: สูตรวุ้นเส้นสาหร่ายแก้ว

Training Courses:

1. โครงการพัฒนาบุคลากรให้เป็นผู้เชี่ยวชาญ ระบบ HACCP. สถาบันอาหาร 22-24 กรกฎาคม 2544

2. IRCA2009/Approved Food safety and Management System (ISO 22000: 2005) Lead Auditors training course. By National Food Institute of Thailand (NFI) , Agro-Industry Academic Council Association., April 28-30, 2008. Amari Airport Hotel, Bangkok, Thailand.

3. ISO2200:2005 Food safety and Management System: Document & Implementation course. by National Food Institute of Thailand (NFI) , Agro-Industry Academic Council Association. June 9-11, 2008. Amari Airport Hotel, Bangkok, Thailand.

ผู้ร่วมวิจัย

แบบประวัติส่วนตัวและผลงานทางวิชาการ

ของ ผศ. ดร อนามัย เทศกะทึก

คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1. ประวัติส่วนตัว

1.1 วัน เดือน ปี เกิด เกิดวันที่ 12เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2507

1.2 อายุ 45ปี 6 เดือน 14 วัน

1.3 การศึกษาระดับอุดมศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ

1.3.1 PhD (Tropical Medicine) major on Environmental Toxicology	2548	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
1.3.2สาธารณสุขศาสตรบัณฑิต (อาชีวอนามัยและความปลอดภัย	2542	สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัย สุโขทัยธรรมาธิราช ประเทศไทย
1.3.3สาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต (อนามัยสิ่งแวดล้อม)	2537	คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
1.3.4วิทยาศาสตรบัณฑิต (พยาบาลและผดุงครรภ์)	2530	คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย

2. ประวัติการรับราชการ

ได้รับการแต่งตั้งเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ในสาขาวิชา อาชีวอนามัย สังกัดภาควิชาสุขศาสตร์อุตสาหกรรมและ ความปลอดภัย คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อวันที่ 4 สิงหาคม พ.ศ. 2543 จนถึงปัจจุบัน พ.ศ. 2553

3. 1 งานวิจัย

ชื่อเรื่องงานวิจัย	สถานะ	ปีงบประมาณ	ระยะเวลาดำเนินการ (ปี)
1) การประเมินความเสี่ยงของปัจจัยสิ่งคุกคามต่อสุขภาพอนามัยของผู้ปฏิบัติงานในโรงโม่หินในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย	ผู้ร่วมโครงการวิจัย	2538	1
2) ปัจจัยที่สัมพันธ์กับการสูญเสียการได้ยินของผู้ประกอบอาชีพในสถานประกอบการดิสโก้เทคในเขตจังหวัดชลบุรี	หัวหน้าโครงการวิจัย	2541	1
3) การศึกษาผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของเกษตรกรที่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช ในจังหวัดชลบุรี และจันทบุรี	ผู้ร่วมโครงการวิจัย	2541	1
ชื่อเรื่องงานวิจัย	สถานะ	ปีงบประมาณ	ระยะเวลาดำเนินการ (ปี)
4) การศึกษาระดับเอนไซม์คลอริเนสเตอเรสในเลือด โดยเครื่องมืออีคิวเอ็ม เทสต์คิต ในกลุ่มเกษตรกร ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี	หัวหน้าโครงการวิจัย	2542	1

5) การศึกษาระดับตะกั่วในเลือดของผู้ปฏิบัติงาน ในบรรยากาศของโรงพิมพ์ที่ตั้งอยู่ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี	ผู้ร่วมโครงการวิจัย	2542	1
6)ประสิทธิผลของโปรแกรมการอบรมทางด้านอันตรายจากสารเคมีและการป้องกันต่อการเปลี่ยนแปลงความรู้ ทัศนคติและพฤติกรรมในพนักงานโรงงานอุตสาหกรรมผลิตชิ้นส่วนยานยนต์ในเขตจังหวัดชลบุรี	หัวหน้าโครงการวิจัย	2549	1
7) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อสุขภาพในระบบทางเดินหายใจในกลุ่มพนักงานโรงงานอุตสาหกรรมผลิตผลผลิตจากไม้และเฟอร์นิเจอร์ในเขตภาคตะวันออก	หัวหน้าโครงการวิจัย	2550	1

3.2 งานบริการด้านวิชาการ

เป็นวิทยากร	ระหว่างวันที่
1). อันตรายจากสารเคมีและแนวทางในการป้องกัน บริษัทสยามฮิตาชิ เอลลิเวเตอร์ จำกัด	10 กุมภาพันธ์ 2549
2). อันตรายจากการทำงานในโรงพยาบาลและแนวทางในการป้องกัน โรงพยาบาลศูนย์แพทย์	9 มีนาคม 2549
3). อันตรายจากการทำงานในโรงงานอุตสาหกรรมและแนวทางในการป้องกัน ที่บริษัทซีพี	15 มีนาคม 2549
4). การจัดทำแนวทางพัฒนามาตรฐานสุขภาพและดัชนีชี้วัดสุขภาพ ห้องประชุมกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข	29 เมษายน 2551
5). โรคที่พบบ่อยจากการประกอบอาชีพและการรักษาพยาบาลเบื้องต้น คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	4 พฤษภาคม 2551
6). ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารเคมีและอันตรายต่อสุขภาพอนามัย สำหรับเจ้าหน้าที่อนามัย	26 พฤษภาคม 2551
7). การจัดการพิษจากสารเคมีแก่ครู อาจารย์ นักเรียน ในเขตโรงงานอุตสาหกรรม	1 กรกฎาคม 2551
8). การจัดการพิษจากสารเคมีแก่ครู อาจารย์ นักเรียน ในเขตเกษตรกรรม	2 กรกฎาคม 2551
9). การจัดการพิษจากสารเคมี แก่บุคลากรจากสถานอนามัยจากระยอง รุ่นที่ 1	4 กรกฎาคม 2551
10). การจัดการพิษจากสารเคมี แก่บุคลากรภาครัฐและประชาชน	13 มิถุนายน 2551

เป็นวิทยากร	ระหว่างวันที่

11). การจัดการพิษจากสารเคมี แก่บุคลากรจากสถานอนามัยจากระยอง รุ่นที่ 2	30 กรกฎาคม 2551
12). การปฏิบัติงานกับสารเคมีอันตราย บริษัทสยามฮิตาชิ เอลลิเวเตอร์	22 สิงหาคม 2551
13). อบรมเจ้าหน้าที่ความปลอดภัยในการทำงาน มหาวิทยาลัยบูรพา	25 สิงหาคม 2551
14). อบรมเจ้าหน้าที่ความปลอดภัยในการทำงาน มหาวิทยาลัยบูรพา	27สิงหาคม 2551
15). โรคสารเคมีการเกษตร คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	5 มีนาคม 2552
16). โรคสารเคมีการเกษตร คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	27 มีนาคม 2552
17). อบรมเจ้าหน้าที่ความปลอดภัยในการทำงาน สำนักบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยบูรพา	17มิถุนายน2552
18). พิษวิทยาและหลักการดูแลผู้ป่วยเบื้องต้น โรงแรมสตาร์ ระยอง	16 มิถุนายน 2552
19). โรคจากการประกอบอาชีพ บริษัทสยามเอทีอุตสาหกรรม	23 กรกฎาคม 2552
20). การจัดทำตัวชี้วัดผลกระทบต่อสุขภาพจากสิ่งแวดล้อม สำนักโรคจากการประกอบอาชีพ กระทรวงสาธารณสุข	27-29 กรกฎาคม 2552
21). อันตรายจากการทำงานกับสารเคมีและการป้องกัน บริษัทดีไอซี กราฟิก	22กรกฎาคม 2552
22). อันตรายจากการทำงานกับสารเคมีและการป้องกัน บริษัทดีไอซี กราฟิก	20 สิงหาคม 2552
23). อันตรายจากการทำงานกับสารเคมีและการป้องกัน บริษัทวอลโว่ ประเทศไทย จำกัด	16กันยายน 2552
24). พิษวิทยาและหลักการดูแลผู้ป่วยเบื้องต้น โรงแรมสตาร์ ระยอง	19 พฤศจิกายน 2552
25). พิษวิทยาและหลักการดูแลผู้ป่วยเบื้องต้น โรงแรมสตาร์ ระยอง	26 พฤศจิกายน 2552
26) ระวังพิษภัย จากสารเคมีรอบตัว ศูนย์ฝึกและพัฒนาอาชีพเกษตรกรรมวัดญาณสังวรารามวรมหาวิหาร อันเนื่องมาจากพระราชดำริ	12 กุมภาพันธ์ 2552

3.3 งานบริหาร

เลขที่ตำแหน่ง	ตำแหน่ง	ตั้งแต่	ชั่วโมงต่อสัปดาห์
1250/2542	ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายวางแผนและพัฒนาคณะ	18กันยายน 2540 - 14 กันยายน 2542	0.6
1250/2542	รองคณบดีฝ่ายบริหาร	22กันยายน 2542 - 31 ตุลาคม 2543	1
0824/2548	ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายวิเทศสัมพันธ์	2พฤษภาคม 2548 - 31 พฤษภาคม 2550	1
1261/2550	รองคณบดีฝ่ายกิจการพิเศษ	11มิถุนายน 2550 - 9	1

		มีนาคม 2551	
0621/2551	ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายวิเทศสัมพันธ์	10 มีนาคม 2551 - 31 ธันวาคม 2551	1

3.4 งานอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

3.4.1 การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

ชื่อเรื่องการนำเสนอผลงานทางวิชาการ	การประชุม	ระหว่างวันที่	ชั่วโมงต่อสัปดาห์
1) Challenge of Migrant Workers to the Thai Medical System	The Annual Council on Thai Studies Conference. The Northern Illinois University, USA	23-27 October 2009	0.2
2) Respiratory Symptoms and Rubber Trees Wood Dust Exposure among Furniture Manufacturing Factory Workers in Thailand	ICOH 2009 ,The International CongressOn Occupational Health, Cape town ,South Africa	21-27 March 2009	0.2
3) Rubber Tree Dust and Lung Function among Thai Furniture Manufacturing Workers	The 3 rd International Occupational and Environmental Health ,Vietnam	21-23 Oct 2008	0.2
4) The influence of Occupational Exposure to Chlorpyrifosand CPOase on Plasma Cholinesterase Activity among Orchard Workers in Thailand	ICOH 2009 ,The International CongressOn Occupational Health, Milan, Italy	11-16 June 2006	0.2
5) Blood Plasma Cholinesterase Level By EQM Test Kit Among Agricultural Workers in Amphur Muang Chonburi Province.	International Conference on Pesticide Exposure and Health. Natcher Center National Institutes of Health Bethesda, Maryland USA.	8- 12 July 2002	0.1

3.4.2 การศึกษาดูงาน ณ ต่างประเทศ

หลักสูตรเรื่องการอบรม/ดูงาน	**สถานที่/หน่วยงานที่จัดอบรม/ดูงาน**	**ระหว่างวันที่ (14)**
SOUTH EAST ASIA PUBLIC HEALTH EDUCATION INSTITUTIIONS NETWORK (SEAPHEIN) Moving SEAPHEIN to Influence Public Health Policy and Action	Jaipur, India	September 25-28, 2007
หลักสูตรเรื่องการอบรม/ดูงาน	**สถานที่/หน่วยงานที่จัดอบรม/ดูงาน**	**ระหว่างวันที่ (14)**
ไปเจรจาความร่วมมือทางวิชาการ	มหาวิทยาลัยแมสเซ่ ประเทศนิวซีแลนด์	ระหว่างวันที่ 10-19 พฤษภาคม 2549
ลงนามความร่วมมือทางวิชาการกับมหาวิทยาลัยนอร์ทสุมาตรา อินโดนีเซีย	มหาวิทยาลัยนอร์ทสุมาตรา อินโดนีเซีย	20 -23 พฤศจิกายน 2548
เรียนรายวิชา Occupationalepidemiology และ toxic chemicals และ Toxicology	มหาวิทยาลัยวอชิงตัน, USA	26 มี.ค. 2547- 26 มิ.ย. 2547
เรียนรายวิชา Occupational and Environmental Health	มหาวิทยาลัยวอชิงตัน, USA	2 ม.ค. 2546- 28 มี.ค. 2546
อบรมและนำเสนอผลงานทางวิชาการ เรื่อง International Conference on Pesticide Exposure and Health	Natcher center, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA	8 ก.ค. 2545- 12 ก.ค. 2545
ดูงานด้านอาชีวอนามัยและความปลอดภัย	มหาวิทยาลัยวอชิงตัน, USA.	1 ม.ค .2542 – 2 พ.ค..2542
อบรมทางวิชาการ เรื่อง “Indoor Air Quality School at School and Home	Northwest Center for Occupational Health and Safety, University of Washington”, USA.	4 ก.พ. 2542

ประชุมวิชาการด้านอาชีวอนามัยและความปลอดภัย	Research Triangle Park, North Carolina, USA.	17-22 ก.พ. 2542
ดูงานด้านอาชีวอนามัยและความปลอดภัย	มหาวิทยาลัยวอชิงตัน, USA.	5 ต.ค..2541 - พย. 2541
Primary and secondary prevention of silicosis	ณ National Institute for Occupational and Environmental Health, Hanoi, Vietnam.	5 –10 พค. 2540

บทความทางวิชาการ

ชื่อผู้แต่ง	ชื่อเรื่อง	ชื่อวารสาร	ปีที่ตีพิมพ์
1) อนามัย เทศกะทึก	ข่าวคราวความเคลื่อนไหวในด้านอาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม	วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ	ปีที่ 3, ฉบับที่ 92553 :86-93
2) อนามัย เทศกะทึก	ผลกระทบต่อทางเดินหายใจจากการรับสัมผัสฝุ่นไม้จากการทำงาน	วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ	ปีที่ 2, ฉบับที่ 82552 : 6-18
3) อนามัย เทศกะทึก	ข่าวคราวความเคลื่อนไหวในด้านอาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม	วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ. หาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช	ปีที่ 2 ฉบับที่ 5 2552: 105-108.
4) อนามัย เทศกะทึก	ข่าวคราวความเคลื่อนไหวในด้านอาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม	วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ. หาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.	ปีที่ 2 ฉบับที่ 5 สิงหาคม–ตุลาคม 2551: 96-100.
5) อนามัย เทศกะทึก	ความเสี่ยงอันตรายของการทำงานในที่อับอากาศ.	วารสารเพื่อความปลอดภัยและอนามัยในการทำงานของสังคมไทย.	29 พ.ค.-มิ.ย. 2547: 22-23.

6) อนามัย เทศกะทึก	ภัยจากเชื้อ Legionella สามารถป้องกันได้	วารสารเพื่อความปลอดภัย และอาชีวอนามัยในการทำงาน ของสังคมไทย	20 มกราคม – กุมภาพันธ์2545 :22-23.
7) อนามัย เทศกะทึก	อุบัติเหตุจากการทำงานเกิดได้อย่างไร.	วารสารคณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	ปีที่ 9ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม 2544: 48-56.
8) อนามัย ธีรวิโรจน์	อันตรายจากการประกอบอาชีพจากความเย็น	อาชีวเวชศาสตร์และสิ่งแวดล้อม ปี 2000 และต้นสหัสวรรษใหม่. ในการประชุมอาชีวเวชศาสตร์และสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 9.	2543 : 121-132.
9) อนามัย ธีรวิโรจน์	การศึกษาระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในเลือดโดยใช้เครื่องมือชนิดอีคิวเอ็มเทสต์คิต ในกลุ่มเกษตรกรในเขตอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	ปีที่ 4 ฉบับที่ 2, กรกฎาคม - ธันวาคม 2542: 11-17.

ชื่อผู้แต่ง	ชื่อเรื่อง	ชื่อวารสาร	ปีที่ตีพิมพ์
10) อนามัย ธีรวิโรจน์	ความเครียดจากการประกอบอาชีพ	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	3 ปีที่ 4ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2542 : 57-68.
11) อนามัย ธีรวิโรจน์	ปัญหาคราบน้ำมันกับแหล่งน้ำไทย.	จดหมายข่าวคณะสาธารณสุขศาสตร์	ปีที่ 2ฉบับที่ 6, มกราคม - กุมภาพันธ์ 2541.
12) อนามัย ธีรวิโรจน์	ความดันบรรยากาศที่ผิดปกติ...มีผลกระทบต่อสุขภาพอย่างไร	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	ปีที่ 3ฉบับที่ 1, มกราคม - มิถุนายน 2541: 53-56.
13) อนามัย ธีรวิโรจน์	มารู้จัก...โรคซิลิโคลีสกันเถอะ.	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	ปีที่ 3ฉบับที่ 2, กรกฎาคม - ธันวาคม

			2541: 31-36.
14) อนามัย ธีรวิโรจน์	ความสั่นสะเทือนจากการทำงาน..มีผลต่อสุขภาพอย่างไร	วารสารศูนย์การศึกษาต่อเนื่อง มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ปีที่ 1ฉบับที่ 3, กันยายน - ธันวาคม 2540.
15) อนามัย ธีรวิโรจน์	Biological control ทางเลือกหนึ่งของการควบคุมลูกน้ำยุงพาหะนำโรคในประทศไทย	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	ปีที่ 2ฉบับที่ 1, เดือนมกราคม - มิถุนายน 2540.
16) อนามัย ธีรวิโรจน์	ของแถมที่ไม่ต้องการ	จดหมายข่าวคณะสาธารณสุขศาสตร์	ฉบับที่ 5มีนาคม - เมษายน 2539.
17) อนามัย ธีรวิโรจน์	มหันตภัยจากขยะและสิ่งปฏิกูล	จดหมายข่าวคณะสาธารณสุขศาสตร์	ที่ 1ฉบับที่ 4มกราคม - กุมภาพันธ์ 2539
18) อนามัย ธีรวิโรจน์	ดิน.เกิดมลพิษได้อย่างไร	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	ที่ 1ฉบับที่ 2, มกราคม – เมษายน2539: 5-9.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4.4 บทความวิจัย

ผู้เขียน	ชื่อเรื่อง	วารสาร	ปีที่ตีพิมพ์	มีส่วนส่วนร่วมในการวิจัย
1) Anamai Thetkathuek, Tanongsak Yingratasuk, Paul A Demers,	Rubber-Tree Dust and Lung Function among Thai Furniture-Factory Workers.	The International Journal of Occupational and	Jan-March 2010 : 69-74	70

Phayong Thepaksorn , Sastri Saowakhontha, Keifer M		Environmental Health.		
2) Anamai Thetkathuek, Tanongsak Yingratasuk, Phayong Thepaksorn , Sastri Saowakhontha	Respiratory Symptoms and Rubber Trees Wood Dust Exposureamong Furniture Manufacturing Factory Workers in Thailand.	Journal of Science, Technology, and Humanities.	(Accepted July 27, 2009 : In press).	60
3) Chensheng Lu, Teresa Rodriguez, Anamai Thetkathuek , Aura Funez, Melanie Pearson.	Feasibility of using salivary biomarker to assess human exposure to chlorpyrifos.	J. Tox. Environ. Chem.	http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713653210~db=all~tab=issueslist~branches=90 - v9090, (2) 2008 : 315 - 325	20
4) Anamai Thetkathuek Tanongsak Yingratanasuk Phayong Thepaksorn	Effectiveness of Chemical Prevention Training Program for the Improvement of	Journal of Science, Technology, and Humanities.	5 (1) 2007: 29-34.	70

ผู้เขียน	ชื่อเรื่อง	วารสาร	ปีที่ตีพิมพ์	มีส่วนส่วนร่วมในการวิจัย
	Knowledge,			

	Attitudes, and Work Practice among Auto Parts Workers in Thailand.			
5) อนามัย เทศกะทึก.ปวีณามี ประดิษฐ ศาสตรี เสาวคนธ์.	การศึกษานำร่องในการดำเนินงานระบบรับรองมาตรฐานคุณภาพชีวิตการทำงานในสถานประกอบการในประเทศไทย: กลุ่มผู้ดำเนินงาน.	วารสารสาธารณสุขศาสตร์	37, (1) 2550) : 26-33. 4	45
6) Thetkathuek A, Keifer M, Fungladda V, Kaewkungwal J, Padungtod C,Wilson BW, Mankhetkorn S	Spectrophotometric determination of Plasma and red blood cell Cholinesterase activity of 53 fruit farm workers pre- and post-exposed chlorpyrifos for one fruit corps	Chem Pharm Bull	5 53 (4). 2005: 442-4.	50

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4.5 บทความวิทยุ

ชื่อผู้แต่ง	ชื่อเรื่อง	รายการวิทยุ	ปีที่ตีพิมพ์
1) อนามัย เทศกะทึก	การเกิดมะเร็งจากการทำงาน	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 1 เดือนเมษายน 2551
2) อนามัย เทศกะทึก	อันตรายจากสารเคมีในชีวิตประจำวัน	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 4 เดือนสิงหาคม 2551
3) อนามัย เทศกะทึก	ความปลอดภัยจากสารเคมีในชีวิตประจำวัน	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 1 เดือนกันยายน 2551.
4) อนามัย เทศกะทึก	สรรพคุณของกระเทียม	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 1 เดือนมีนาคม 2545
5) อนามัย เทศกะทึก	การป้องกันบ้านของคุณจากการเกิดอัคคีภัย..ทำได้ไม่ยาก	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 3 เดือนมีนาคม 2545
6) อนามัย เทศกะทึก	ทึก. สิ่งรอบตัวกับความพิการของทารก.	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 1 เดือนพฤษภาคม 2545
7) อนามัย เทศกะทึก	งานกะกับสุขภาพ	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 1 เดือนมิถุนายน 2545
8) อนามัย เทศกะทึก	คุณภาพอากาศภายในอาคารที่ควรรู้	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 3 เดือนมิถุนายน 2545
9) อนามัย เทศกะทึก	มารู้จักภัยจากเชื้อเลจิโอเนลล่ากันเถอะ.	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 3 เดือนกรกฎาคม 2545
10) อนามัย เทศกะทึก	แนวทางการป้องกันภัยจากเชื้อเลจิโอเนลล่า	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 4 เดือนกรกฎาคม 2545
11) อนามัย เทศกะทึก	ภัยจากสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 4เดือนกันยายน 2545

3.**4.6 หนังสือและตำรา**

ชื่อผู้แต่ง	ชื่อเรื่อง	สำนักพิมพ์	ปีที่ตีพิมพ์
1) อนามัย เทศกะทึก	การประเมินผลกระทบต่อสุขภาพ	พิมพ์ครั้งที่ 1 พิมพ์ที่บริษัทสำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ	2553 ได้รับการแก้ไขจากผู้เชี่ยวชาญ และอยู่ระหว่างการตีพิมพ์
2)อนามัย เทศกะทึก	พิษสารเคมีจากการทำงานรู้ทันป้องกันได้	พิมพ์ครั้งที่ 1พิมพ์ที่บริษัทสำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ	2553 ได้รับการแก้ไขจากผู้เชี่ยวชาญ และอยู่ระหว่างการตีพิมพ์
3) อนามัย เทศกะทึก	การประเมินความเสี่ยงทางสุขภาพ *	พิมพ์ครั้งที่ 1 พิมพ์ที่บริษัทสำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ	2552
4) อนามัย เทศกะทึก	อาชีวอนามัยและความปลอดภัย ฉบับปรับปรุง*	พิมพ์ ครั้งที่ 3 พิมพ์ที่บริษัทโอ เดียนสโตร์ กรุงเทพ	2551
5) อนามัย เทศกะทึก	ความเป็นพิษในระบบนิเวศและสุขภาพมนุษย์	พิมพ์ ครั้งที่ 1 พิมพ์ที่บริษัทโอ เดียนสโตร์ กรุงเทพ	2550
6) อนามัย เทศกะทึก	อาชีวอนามัยและความปลอดภัย	พิมพ์ ครั้งที่ 1 พิมพ์ที่บริษัทโอ เดียนสโตร์ กรุงเทพ	2549

หมายเหตุ* ใช้ในการประเมินตำแหน่งทางวิชาการ ระดับรองศาสตราจารย์

3.4.7 เวปไซต์

1) อนามัย เทศกะทึก. **อันตรายของก๊าซมีเทน...ภัยใกล้ตัว.**NPC Safety and Environment Service Co., Ltd.2552. www.npc-se.co.th

2) อนามัย เทศกะทึก. **รถจอดทิ้งไว้ ปล่อยเบนซีนออกมาทำอันตรายจริงหรือ.**NPC Safety and Environment Service Co., Ltd.2552 www.npc-se.co.th

3) อนามัย เทศกะทึก. **ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ภัยเงียบที่คาดไม่ถึง.**NPC Safety and Environment Service Co., Ltd.2552 www.npc-se.co.th

ขอรับรองว่าข้อความดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อ..... เจ้าของประวัติ

(.....นางอนามัย เทศกะทึก.....)

ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8