

รหัสโครงการ SH 3-305-53-12-24



รายงานการวิจัย

ชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรังจืด (Bioavailability and Bioaccessibility of Rang Chuet (*Thunbergia Laurifolia* Lindl.) Extract)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

ชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรังจืด

(Bioavailability and Bioaccessibility of Rang Chuet

(*Thunbergia Laurifolia* Lindl.) Extract)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

ชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรางจืด

(Bioavailability and Bioaccessibility of Rang Chuet

(*Thunbergia Laurifolia* Lindl.) Extract)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริไธย์

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์ที่
กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะ และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยอย่างดียิ่งตลอดมา และนักศึกษา
ปริญญาเอก สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวก
สะดวกในการใช้ห้องเซลล์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณวันชัย จอกระโทก และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 1, 3 และ 9 มหาวิทยาลัย
เทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่เสียสละเวลา ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดี
ตลอดมา ขอขอบคุณโรงพยาบาลครบุรีสำหรับ วัสดุคิบรางวัล เพื่อใช้ในการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553



บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรางจืด เพื่อเป็นองค์ความรู้ประกอบสำหรับการประยุกต์ใช้ในศึกษาปริมาณการนำไปใช้ของสารสกัดรางจืดในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่ถูกต้องและเหมาะสม โดยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของรางจืด ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic) การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเตรียมสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำ และเอทานอล จากการศึกษาพบว่าปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำมีปริมาณสูงสุด คือ 3037.07 mg GAE /100 g RM และเมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดรางจืดน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดที่ พิจารณาจากค่า IC_{50} 2.438 mg/ml, 1.198mg/ml และ 0.294 mmol Fe²⁺/g RM. ตามลำดับ

การศึกษาคูณลักษณะทางเคมีของสารสกัดรางจืดโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าในสารสกัดรางจืดน้ำมีองค์ประกอบหลักคือ caffeic acid , protocatechuic acid และ apigenin ในปริมาณเล็กน้อย ส่วนในสารสกัดรางจืดเอทานอลพบว่ามี ส่วนประกอบหลักคือ Chlorophyll a, Chlorophyll b, pheophorbide a และ b, pheophytin a และ b

จากการศึกษาความเสถียรของสาร ต่างๆในสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าการ สารสกัดอะซีโตนเป็นพืชต่อสัตว์ทดลอง ดังนั้นจึงทำการทดลองเฉพาะ สารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล พบว่า สกัดรางจืดน้ำค่อนข้างเสถียรในแบบจำลองกระบวนกรย่อยของทางเดินอาหาร โดยสารกลุ่มฟีนอลิกจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ Apigenin จะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารกลุ่ม Apigenin glucosides ส่วนสารสกัดรางจืดเอทานอล ซึ่งมีพฤษเคมีหลัก ประกอบไปด้วย chlorophyll a chlorophyll b และ pheophorbide a, pheophytin a เมื่อผ่านแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง มีการเปลี่ยนแปลง คือ คลอโรฟิลล์ส่วนใหญ่จะมีการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ ในรูปของ pheophytin, pyropheophytin a และ pheophorbides a และ b

จากการทดสอบความสามารถในการถูกดูดซึมของสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอลใน Caco-2 cells พบว่า สารสกัดรางจืดสามารถถูกดูดซึมได้ดี ประมาณ 55 %เนื่องจาก เป็นสารที่ละลายน้ำได้ ดังนั้นจึงมีความสามารถในการแพร่เข้าไป Caco-2 cells ได้ดีกว่า ส่วนสารสกัดรางจืดเอทานอล มีพฤษเคมีหลักที่เป็น สารประกอบคลอโรฟิลล์ ซึ่งเมื่อผ่านแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง จะถูกดูดซึมได้ ประมาณ 41-45% โดยคิดจากประมาณของคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

Abstract

The objectives of study are investigated bioavailability and bioaccessibility of Rang chuet for useful information could be provide a better understanding of extracts investigation and development into calculating the proper amount for human consumption by using coupling *in vitro* digestion with the Caco-2 model. Alterations in antioxidant power were monitored by DPPH, FRAP, and ABTS⁺ assay, whereas the total phenolic of the extract is determine by Folin-Ciocalteu . It was found that RC water crude extract showed the highest total phenolic content (3037.07 mg GAE /100 g RM). In addition, RC water crude extract displayed the highest antioxidant activities determined by DPPH assay, ABTS assay and FRAP assay at the IC₅₀ 2.438 mg/ml, 1.198mg/ml and 0.294 mmol Fe²⁺/g RM.

Majority of phytochemical constituents of RC extracts are phenolic compounds and chlorophyll were ascertained by HPLC-DAD. Ethanol extracts of RC were found to be good sources of chlorophyll derivatives including native chlorophylls and pheophytins. Additionally, a water-soluble derivative was tentatively identified as pheophorbide *a* in RC chlorophyll fraction. Our results indicate that polyphenolic compounds are not affected by the (simulated) digestive process. Otherwise, chlorophyll is changed to other derivative such pheophytin and pheophorbide.

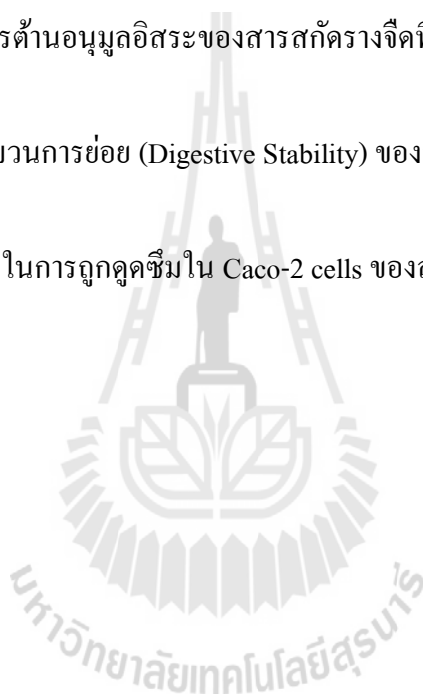
Assessment bioaccessibility of RC extracts using Caco-2 cells was determine, the intestinal absorption of those compounds can be impaired by the presence of other dietary antioxidants, such as the carotenoids. It was also found that RC extracts can be transported across the Caco-2 cell barrier

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตของการวิจัย	1
ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเตรียมสารสกัด รางจืด	13
การวิเคราะห์ปริมาณของ Total Phenolic	13
การวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	13
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	16
บทที่ 5 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	27
บรรณานุกรม	28
ประวัติคณะผู้วิจัย	31

สารบัญตาราง

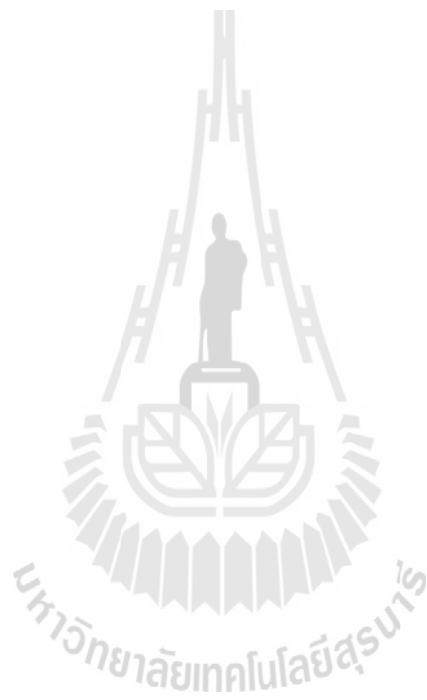
	หน้า
ตารางที่ 1 : ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดย่านาง, รังจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	4
ตารางที่ 2 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของรังจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	7
ตารางที่ 3 : ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรังจืด ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และอะซีโตน	21
ตารางที่ 4 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	22
ตารางที่ 5 : ความคงตัวต่อกระบวนการย่อย (Digestive Stability) ของสารสกัดรังจืด	24
ตารางที่ 6: ความความสามารถในการถูกดูดซึมใน Caco-2 cells ของสารสกัดรังจืด	26



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนในการการศึกษาโดยใช้ <i>in vitro</i> simulated digestion models	6
รูปที่ 2 การใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองร่วมกับ Caco-2 model ในการศึกษาการนำไปใช้ทางชีวภาพของแคโรทีนอยด์	9
รูปที่ 3 ปฏิกริยาการเสื่อมสลายและเปลี่ยนเป็นสารประกอบย่อยของคลอโรฟิลล์ระหว่าง การแปรรูปอาหาร	10
รูปที่ 4 แสดงการย่อยและการดูดซึมของคลอโรฟิลล์	13
รูปที่ 5 การวิเคราะห์ฟีนอลิกของสารสกัดรังจืดด้วยวิธี HPLC	23
รูปที่ 6 ความคงตัวต่อการย่อย(Digestive stability) ของสารออกฤทธิ์ ในสารสกัดรังจืดแอทานอล	24





บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันมีการนำพืชสมุนไพรมาใช้เพื่อรักษาโรคและเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแทนยาสังเคราะห์สารเคมีกันมากขึ้น เพราะต้องการลดความเป็นพิษของสารเคมีที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพ แต่พืชสมุนไพรหลายชนิดที่นำมาใช้ยังไม่มีข้อมูลด้านความสามารถในการดูดซึมและการนำไปใช้ ประโยชน์ทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรเมื่อผ่านกระบวนการย่อยอาหารของมนุษย์แล้ว นอกจากนี้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการย่อย การดูดซึม และเมตาโบลิซึมของคลอโรฟิลล์และสารประกอบคลอโรฟิลล์รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิก โดยมนุษย์ยังมีน้อย ดังนั้นความเข้าใจเกี่ยวกับระดับของการถูกทำลายหรือสูญเสียของคลอโรฟิลล์ และสารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติเมื่อผ่านกระบวนการย่อยอาหารของมนุษย์จึงเป็นสิ่งสำคัญในแง่ผลของพืชมงคลที่มีต่อสุขภาพมนุษย์

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบของโพลีฟีนอลในสารสกัดรางจืด
2. ความคงตัวต่อการย่อย (digestive stability) และความสามารถในการถูกดูดซึมของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดรางจืด
3. เพื่อศึกษาชีวประสิทธิผล (bioaccessibility) และความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบ โพลีฟีนอลในสารสกัดรางจืด
4. เพื่อศึกษาชีวประสิทธิผล (bioaccessibility) และความคงตัวของคลอโรฟิลล์ที่ละลายในไขมันและสารประกอบแคโรทีนอยด์ในสารสกัดรางจืด

3. สมมติฐานของการวิจัย

สารออกฤทธิ์สำคัญในสารสกัดรางจืด สามารถหลงเหลือและมีความคงตัวของเมื่อผ่าน แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง และพร้อมสำหรับการดูดซึมของ Caco-2 human intestinal cells สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทางชีวภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการกำหนดขนาดการใช้รางจืดในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประสิทธิภาพในแง่ของสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ได้

4. ขอบเขตของการวิจัย

- 4.1) การเตรียมสารสกัดรางจืด จำนวน 3 ชนิดคือ สารสกัดน้ำ อะซีโตน และเอทานอล
- 4.2) ศึกษาคุณลักษณะของส่วนประกอบออกฤทธิ์ในสารสกัดรางจืด
- 4.3) ทำการย่อยสารสกัดรางจืดโดยใช้ In vitro digestion model
- 4.4) เตรียม Caco-2 human intestinal cells หารับศึกษา cellular uptake

4.5) ศึกษาความคงตัวต่อการย่อย (digestive stability) และความสามารถในการถูกดูดซึมของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดรางจืด

4.6) ศึกษาปริมาณการนำไปใช้ได้ (Bioavailability) ของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดรางจืดเมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารแล้ว

4.7) ศึกษา cellular uptake ของสารออกฤทธิ์สำคัญในสารสกัดรางจืด โดยใช้ Caco-2 human intestinal cells

5. วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

5.1 เตรียมสารสกัดข่านาง เครือหมาน้อย และรางจืดตามวิธีของ Jittra และคณะ (2006) และรัชฎาพรและ คณะ (2007)

5.2 ศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข่านาง เครือหมาน้อย และรางจืด

5.3 ศึกษาหาปริมาณ total phenolic โดยวิธี Folin-Ciocalteu method (Prior et al, 2007)

5.4 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay, FRAP assay, แลและ ABTS (Bae and Suh, 2007)

5.5 การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีของสารสกัดรางจืดโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ตามวิธีของ Oonsivilai et al., 2007)

5.6 การศึกษาชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรางจืด(ตามวิธีของ ferruzzi et al., 2001)

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

6.1. สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพื่อประกอบการบริโภคในขนาดที่ถูกต้องในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประสิทธิภาพในแง่ของสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ได้

6.2. สามารถนำไปใช้เผยแพร่ให้กับกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ผลิตและจำหน่ายสมุนไพรรางจืดในรูปแบบแคปซูลและชาผง

7. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

7.2 นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

7.3 จัดฝึกอบรมแก่กลุ่มประชากรเป้าหมายหรือหน่วยงานในท้องถิ่นที่ผลิตและจำหน่ายรางจืด

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 รวงจืด (*Thunbergia Laurifolia* Lindl.)

รวงจืดพืชในวงศ์ Acanthaceae เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่รู้จักกันดีและใช้แพร่หลายในวงการแพทย์แผนโบราณ จากตำรายาสมุนไพร (ชะลอ 2519, เสี่ยม 2508, วุฒิ 2520)

รวงจืดเป็นไม้เถาที่พบตามชายป่าดิบ มีลักษณะของเถากลมเป็นข้อปล้อง มีสีเขียว เป็นไม้ใบเดี่ยวออกตรงข้ามกันเป็นคู่ๆ และขนาดของใบจะไล่กันขึ้นไป ตั้งแต่ขนาดใหญ่ตรงโคนก้านไปหาขนาดเล็กตรงปลายก้านใบ ใบสีเขียวผิวเกลี้ยง ลักษณะเป็นรูปหัวใจ ตรงโคนเว้า ปลายใบเป็นดิ่งแหลม กว้างประมาณ 4-5 เซนติเมตร ยาว 8-10 เซนติเมตร ออกดอกเป็นช่อ ช่อหนึ่งๆ จะมีอยู่ 3-4 ดอก ลักษณะของดอกจะมีสีม่วง เป็นกรวยสั้นๆ หลอดกรวยยาวประมาณ 1 เซนติเมตร (วิทย์, 2539 และ พนิดา, 2542)

Purima (1978) ได้ศึกษาสารเคมีในรวงจืด พบว่าส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ apigenin, cosmodin และ delphinidin-3,5-di-O-β-D-glucoside วิรุทธ (2522) ได้วิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสกัดน้ำใบรวงจืดพบว่ามี amino acid 4 ชนิด คือ methionine, serine, glycine และ unidentified amino acid และเมื่อเตรียมสารสกัดด้วย petroleum ether พบ steroids จำนวน 8 ชนิด และ carotenoid จำนวน 1 ชนิด Oonsivilai et al. (2007) ได้ศึกษาสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดรวงจืดน้ำ อะซีโตน และเอทานอลโดยวิธี High performance liquid chromatography พบว่า caffeic acid และ apigenin เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัดน้ำ ขณะที่สารประกอบ chlorophyll a chlorophyll b และ pheophorbide a, pheophytin a และ lutein เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัดอะซีโตนและสารสกัดเอทานอล

ศิริวรรณ (2522) พบว่าสารสกัดใบรวงจืดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Aerobacter aerogens* ได้ในขณะที่ Kongyingyos et al. (1990) ใช้น้ำสกัดใบรวงจืดในการยับยั้งการเจริญของไวรัส herpes simplex type 1 และ Chanawirat et al. (2000) ใช้สารสกัดจากใบรวงจืดลดพิษต่อตับของแอลกอฮอล์ในหนูขาวได้ ส่วนสุพรและคณะ (2541) ได้พัฒนาสารสกัดใบรวงจืดเป็นยาทาภายนอกสำหรับต้านการอักเสบ เพราะสามารถต้านการอักเสบในหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีการทดสอบยืนยันว่าน้ำสกัดใบรวงจืดสามารถลดอัตราการตายของหนูขาวเนื่องจากพิษของสารกำจัดแมลงได้ (พานี และ ชัษวดี, 2523 และ วิรุทธ, 2523) และยังสามารถลดอุณหภูมิในหนูขาวได้ด้วย (บุษบง, 2521)

พานีและชัษวดี (2523) กล่าวว่าใว้ว่ารวงจืดมีรสเย็นใช้ปรุงเป็นยาเขียวถอนพิษไข้ แก้เบื่อเมา แก้ร้อนใน กระหายน้ำ และใช้รักษาผู้ป่วยที่ถูกพิษต่างๆ เช่น พิษสุรา เห็นเมา พิษเนื่องจากอาการแพ้ หรือ

รับประทานสัตว์ที่มีพิษ รวมทั้งใช้รักษาผู้ที่ได้รับสารเคมีที่มีพิษร้ายแรง เช่น สารหนู สตรีกนิน และสารกำจัดแมลงชนิดต่างๆ

จากการศึกษาของ Oonsivilai et al., (2007) พบว่าสารสกัดอะซีโตน สารสกัดเอทานอล และสารสกัดน้ำของรางจืด พบว่ามีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ phase II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบ detoxification ของร่างกายและยังพบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ในการเป็นสารต่อต้านการก่อกลายพันธุ์ใน *Salmonella typhimurium* TA98 และ TA100 ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถอธิบายการใช้รางจืดในการแก้พิษ เบื่อเมา ในการใช้สมุนไพรชนิดนี้ แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการถูกทำลายหรือการสูญเสียรวมทั้งความสามารถในการถูกดูดซึมและความคงตัวของสารประกอบสำคัญซึ่งได้แก่ สารประกอบคลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์และสารประกอบ ฟีนอลิก ในรางจืดหลังจากผ่านระบบการย่อยอาหารของมนุษย์แล้ว รวมถึงความสามารถในการนำไปใช้และการดูดซึมของเซลล์ลำไส้เล็กของมนุษย์

2.2 ชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพ

ชีวภาพพร้อมใช้ (bioavailability) หมายถึง อัตราที่สารถูกปลดปล่อยออกจาก ออกจาก matrix ใดๆ ในทางเดินอาหาร และพร้อมสำหรับการดูดซึมโดยลำไส้เล็ก

การนำไปใช้ทางชีวภาพ (bioaccessibility) หมายถึง ระดับหรืออัตราที่สารถูกดูดซึม หรือพร้อมใช้ ณ ตำแหน่งออกฤทธิ์ทางสรีรวิทยา หลังจากให้สารนั้น โดยจะรวมไปถึงการดูดซึม (absorption) การเผาผลาญ (metabolism) การกระจายตัวในเนื้อเยื่อ (tissue distribution) และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivity) (Fernández-García et al., 2009)

วิธีการในการศึกษาชีวภาพพร้อมใช้ (bioavailability) ของสารอาหารและสารออกฤทธิ์ต่างๆ สามารถศึกษาได้ทั้งในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

2.2.1 แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (In vitro simulated digestion models)

การหาปริมาณของการนำไปใช้ทางชีวภาพ (bioaccessibility) เป็นการศึกษาถึงความสามารถในการปลดปล่อยของสารออกฤทธิ์ (bioactive) นิยมใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (*in vitro* simulated digestion models) ที่เป็นการประยุกต์และเลียนแบบระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ จึงถูกนำมาใช้โดยจะให้ความสำคัญต่อระบบทางเดินอาหารที่เกี่ยวข้องกับการย่อย และการดูดซึม สารอาหาร อวัยวะที่ถูกเลียนแบบในแบบจำลองนี้คือ ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก โดยจะเลียนแบบทั้งที่เป็นส่วนของเหลวต่างๆ ที่อยู่ในแต่ละอวัยวะ เช่น น้ำลาย น้ำย่อย ค่าความเป็นกรด – ด่าง และระยะเวลาที่อาหารอยู่ในแต่ละอวัยวะ ซึ่งแบบจำลองนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่างๆ เช่น โปรตีน แร่ธาตุ สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น เพื่อที่จะพิจารณาถึงความเสถียรของสารเมื่อผ่านการย่อยอาหาร (digestion stability) การขนส่งสารไปยังลำไส้ (transport) และ

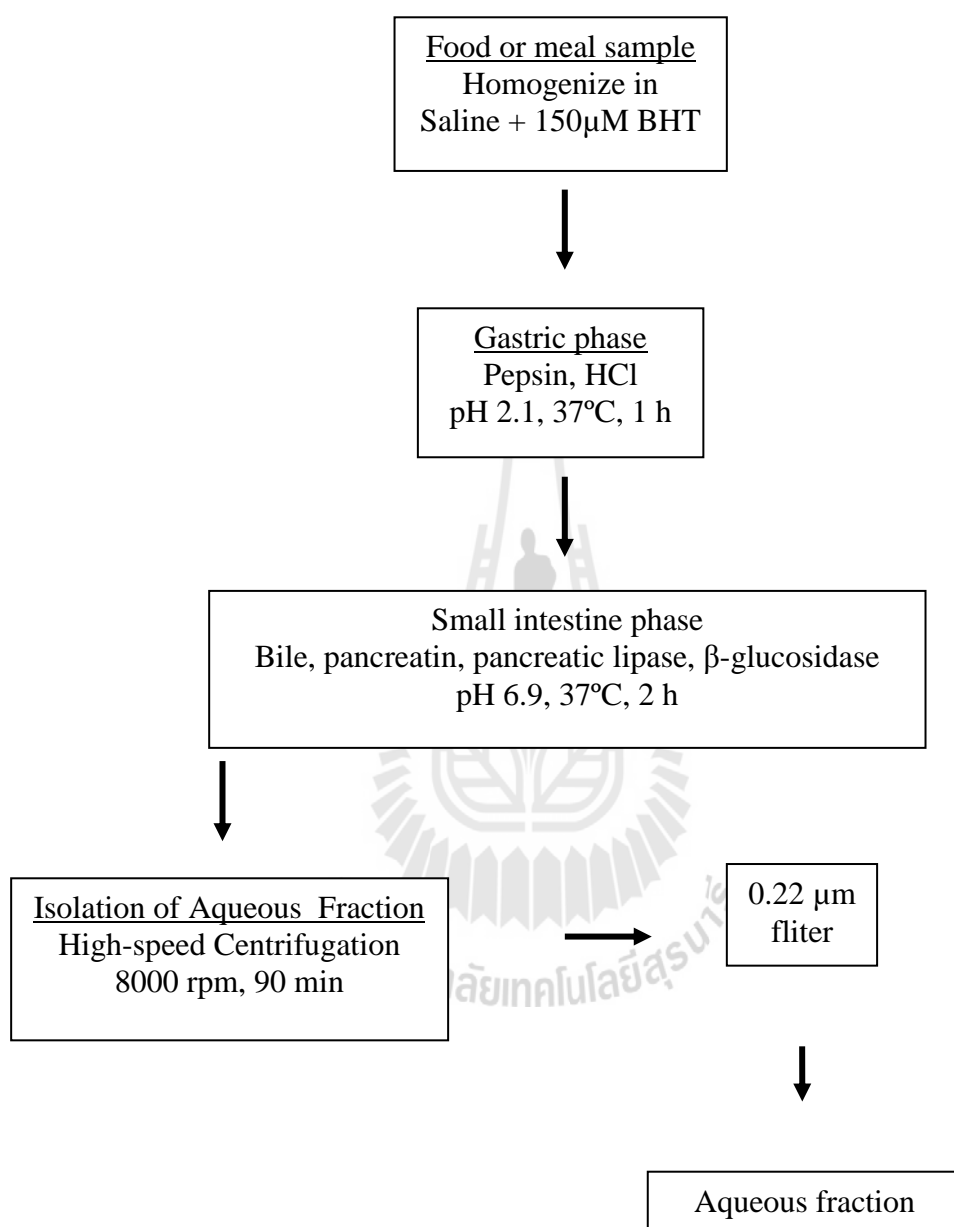
กระบวนการเผาผลาญที่เกิดขึ้น ของสารออกฤทธิ์ (bioactive) ต่างๆ แต่อย่างไรก็ตาม *in vitro* simulated digestion models จัดเป็นสถานะที่คงที่ (static) ซึ่งในสถานะที่เกิดขึ้นจริงในกระบวนการย่อยอาหารในมนุษย์นั้นเป็นระบบที่มีการเคลื่อนที่ (dynamic) ซึ่งไม่สามารถที่จะแสดงให้เห็นถึงผลของปัจจัยอื่นๆ ดังเช่น ในการศึกษาด้วย *in vivo* ได้ เช่น การบีบรัดของลำไส้ การผสม เป็นต้น ตารางที่ 1 แสดงข้อดีและข้อเสียของการตรวจวัดการนำไปใช้ทางชีวภาพ (bioaccessibility) ด้วยวิธี *in vivo* และ *in vitro* ของสารอาหารและสารออกฤทธิ์ต่างๆ

(Fernández-García et al., 2009)

ข้อดี	ข้อเสีย
<p>ในสัตว์ทดลอง (<i>in vivo</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - เป็นวิธีการที่สามารถแสดงถึงเภสัชจลนศาสตร์ของสารได้จริง - สามารถที่จะเลือกศึกษากับกลุ่มเป้าหมายได้อย่างเฉพาะเจาะจง ก่อนที่จะนำสารนั้นไปใช้จริงในมนุษย์ 	<ul style="list-style-type: none"> - ได้ผลการศึกษาช้า - มีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์ ซึ่งค่อนข้างที่จะยุ่งยากในการศึกษา - ข้อมูลอ้างอิงมาตรฐานในการเปรียบเทียบ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาและการทดลองมีค่อนข้างน้อย - ต้องมีการพิจารณาเรื่องงบประมาณและหลักทางศีลธรรม
<p>ในหลอดทดลอง (<i>in vitro</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - รวดเร็ว - ให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของกลไกในการขนส่งสารได้ - สามารถที่จะทวนสอบข้อมูลที่ได้เทียบกับอ้างอิงได้ - ราคาถูกและ เป็นวิธีที่สะดวก 	<ul style="list-style-type: none"> - การแปลผลไปสู่ <i>in vivo</i> bioavailability ค่อนข้างยากได้ - สถานะแวดล้อมภายในลำไส้เป็นกลไกที่มีการเคลื่อนที่ ซึ่งไม่สามารถที่จะศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง - ผลของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารและกลไกการเผาผลาญในระดับไม่ถูกนำมาพิจารณาด้วย

ในการศึกษาโดยใช้ *in vitro* simulated digestion models จะเลือกใช้ปัจจัยทางด้านสรีระวิทยาที่สามารถกระทำได้ในระหว่างการย่อยของกระเพาะอาหารและลำไส้ ซึ่งสารที่ได้จากการย่อยโดยใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง เรียกว่า digesta และเมื่อนำไป ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วน

ของ aqueous fraction (รูปที่ 1) แล้วนำไปกรองจะได้ส่วนที่เป็น aqueous fraction ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบต่อไป (Muangnoi, 2007)



รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนในการการศึกษาโดยใช้ *in vitro* simulated digestion models (Muangnoi, 2007)

2.2.2 Caco-2 human intestinal cells

Caco-2 เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ที่มีการแสดงออกและลักษณะคล้ายคลึงกับเซลล์ epithelial ปกติ ซึ่งลักษณะต่างๆ ของ Caco-2 แสดงในตารางที่ 2 เซลล์เหล่านี้จะมีความแตกต่างเมื่อ monolayer มาบรรจบกัน ซึ่งวิธีการดูแลเซลล์เหล่านี้จะใช้สภาวะแบบเดียวกันกับการเลี้ยงเซลล์ทั่วไป ในระหว่างช่วง phase แรกของเซลล์จะปล่อย colonocyte และ enterocyte-specific protein การ expression ของ colonocyte ทำให้ลักษณะทางชีวเคมีของ enterocyte เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งลักษณะของ monolayer จะมีลักษณะของเซลล์ที่เกิดการจัดเรียงกัน โดยมี tight junction และบริเวณขีดซึ่งของเซลล์ ซึ่งจะแยกระหว่าง apical microvillar และ basolateral membrane

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะของ Caco-2 human intestinal cells

(Muangnoi, 2007)

แสดงลักษณะของ Caco-2 human intestinal cells
1. ได้จากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่
2. ลักษณะการแสดงออกคล้ายคลึงกับเซลล์ epithelial ปกติ
3. ส่วนลักษณะที่แตกต่าง มีได้ดังนี้
3.1 Tight junction ระหว่าง cells
3.2 Basolateral Na ⁺ , K ⁺ -ATPase
3.3 การเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ drug detoxification
3.4 บริเวณ apical brush border surface เต็มไปด้วย hydrolytic enzyme
3.5 สามารถสังเคราะห์และทำให้เกิดการหลั่งของ chylomicrons ได้

นอกจากนี้ส่วนของ 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 (Sambuy et al., 2005) 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 นี้เป็นเซลล์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมและการแสดงออกแตกต่างกัน ประการที่สาม transepithelial จะมีความทนทานเนื่องจาก junction ใน Caco-2 cell มีลักษณะที่พิเศษแตกต่างจากเซลล์ปกติ และประการสุดท้าย Caco-2 cell จะใช้ glycerol 3-phosphate pathway ในการสังเคราะห์ triacylglycerols ขณะที่เซลล์ปกติจะใช้ monoacylglycerol pathway และการดูดซึมของ intestinal epithelium จะใช้แรงที่เกิดขึ้นจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันระหว่างภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ที่เรียกว่า การแพร่ (passive diffusion) หรือผ่านกระบวนการ active transport โดยจะเกิดขึ้นผ่าน transcellular (ผ่านผนังเซลล์ของ enterocyte) หรือ paracellular (ผ่าน tight junction) (Muangnoi, 2007)

2.1.3 การใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองร่วมกับ Caco-2 model

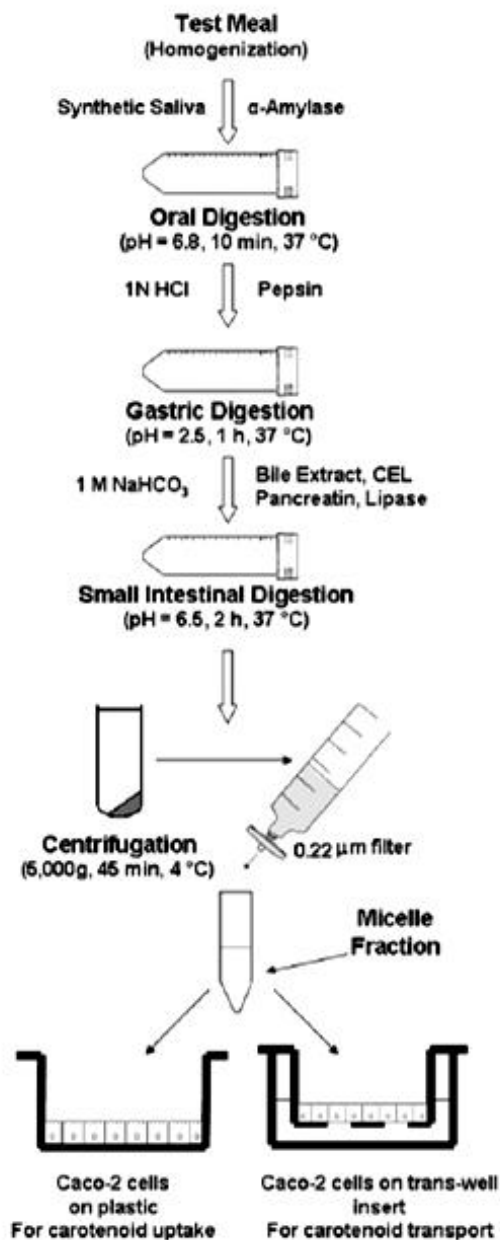
(Coupling *in vitro* digestion with the Caco-2 model)

Garrett et al. (1999) ได้พัฒนา *in vitro* และ Caco-2 human intestinal cells มาใช้ร่วมกัน เพื่อที่จะประเมินการนำไปใช้ของเซลล์ สำหรับ micellarized carotenoids และสารที่ละลายในไขมัน เมื่อผ่านกระบวนการย่อยแล้ว จะแยก micelle fraction ออกมา นำมากรองแล้วทำเจือจาง สารละลายที่ได้จะนำไปใส่ในเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้แล้ว (รูปที่ 2) เพื่อที่จะศึกษาการนำไปใช้และการเคลื่อนย้ายของ micellar carotenoids ซึ่งเมื่อให้ micelle fraction ที่เจือจางแล้ว สัมผัสกับเซลล์เป็นระยะเวลา 4-6 ชั่วโมง พบว่าจะไม่มีผลกระทบต่อโครงสร้างของเซลล์และกระบวนการเผาผลาญ

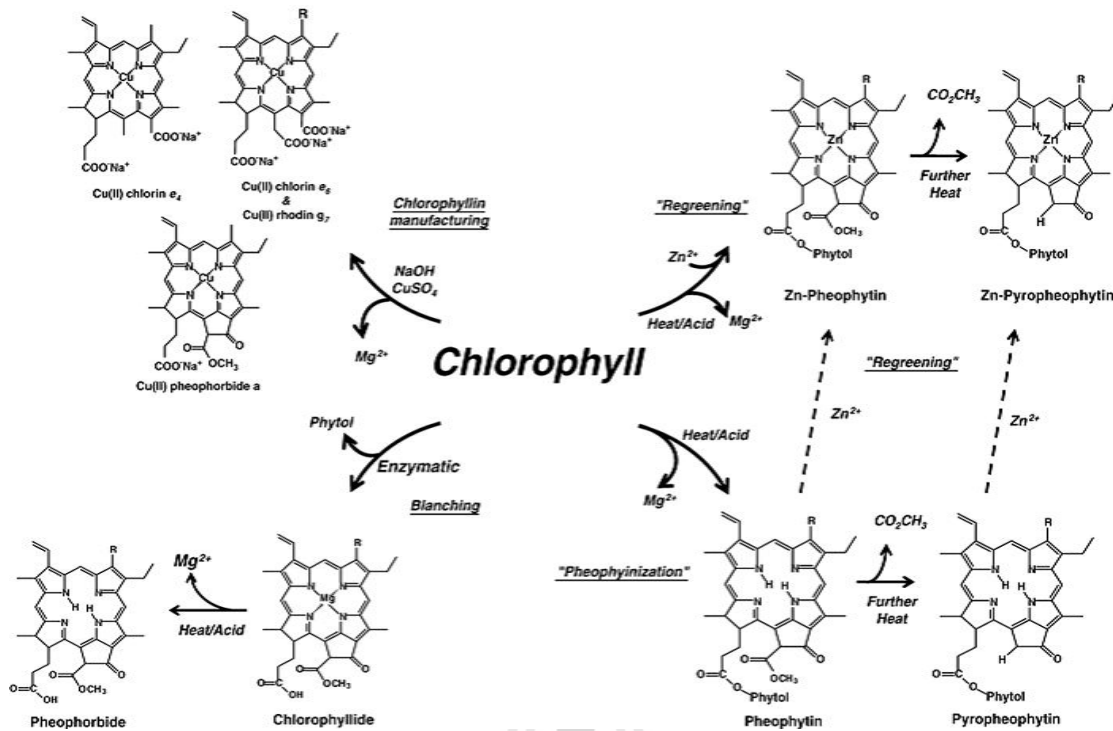
จากการศึกษาของ Chichumroonchokchai et al. (2004) ได้ทำการศึกษาชีวภาพพร้อมใช้ของ lutein ใน Spinach puree และในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม พบว่า lutein ค่อนข้างเสถียรในแบบจำลองกระบวนการย่อยของทางเดินอาหาร โดย lutein และ zeaxanthin สามารถเกิดเป็น micelle ได้ดีกว่า β -carotene และ xanthophylls และการใช้ Caco-2 เป็นเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาปัจจัยที่มีต่อการดูดซึมของ carotenoids

มีการศึกษาอย่างมากมายเกี่ยวกับความเสถียรในการย่อย , bioaccessibility และ cell up take โดยการใช้ coupled *in vitro* digestion/Caco-2 cell uptake model ซึ่งแบบจำลองที่ได้นั้นจะต้องสามารถที่จะประเมินชีวภาพพร้อมใช้ ของสารพฤกษเคมีต่างๆ ในอาหารได้โดยใช้วิธีการที่สามารถกระทำได้ง่ายและสะดวกให้เห็นถึงปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อการดูดซึมของสารพฤกษเคมีต่างๆ เช่น food matrix, food processing, digestion, และปฏิสัมพันธ์ของสารกับสารชนิดอื่นๆ ในอาหาร ซึ่งหากใช้การทดลองใน

มนุษย์หรือในสัตว์ทดลองนั้นเป็นรูปแบบที่กระทำได้ค่อนข้างยาก และใช้งบประมาณมาก ดังนั้นทางเลือกที่เหมาะสม คือการทดลองในหลอดทดลอง ซึ่งจะช่วยประหยัดเวลาและงบประมาณได้ค่อนข้างมาก ซึ่ง Caco-2 cell culture model จัดเป็นรูปแบบที่มีการศึกษาแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการทดสอบ bioavailability ของสารต้านอนุมูลอิสระในพฤษเคมีต่างๆ เช่น แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น



รูปที่ 2 การใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองร่วมกับ Caco-2 model ในการศึกษาการนำไปใช้ทางชีวภาพของแคโรทีนอยด์ (Failla et al., 2008)



รูปที่ 3 ปฏิกริยาการเสื่อมสลายและเปลี่ยนเป็นสารประกอบย่อยของคลอโรฟิลล์ระหว่างการแปรรูปอาหาร (Ferruzzi et al., 2007)

2.1.4 ชีวิตภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารประกอบคลอโรฟิลล์

คลอโรฟิลล์ในอาหารแบ่งเป็น 2 ส่วนประกอบหลักคือ ส่วนที่สามารถละลายได้ในไขมัน (lipophilic derivatives) ได้แก่ คลอโรฟิลล์และคลอโรฟิลล์บี (พบในผักสดและผลไม้สด), Metal-free pheophytins และ Pyropheophytins (พบในผักสีเขียวและผลไม้ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน), Zn-pheophytins และ Zn-pyropheophytins (พบในผักสีเขียวที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน) และอีกประเภทหนึ่งคือสารประกอบที่สามารถละลายน้ำได้ ได้แก่ chlorophyllides, pheophorbides และสารประกอบที่ใช้ทางการค้าคือ sodium copper chlorophyllin (SCC) ซึ่งปฏิกริยาการเสื่อมสลายและเปลี่ยนเป็นสารประกอบย่อยของคลอโรฟิลล์ระหว่างการแปรรูปอาหารแสดงในรูปที่ 3 (Ferruzzi et al., 2007)

ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการดูดซึมของสารประกอบคลอโรฟิลล์พบว่า มีระดับของคลอโรฟิลล์ในพลาสมาของหนูที่ได้รับ sodium copper chlorophyllin (SCC) ทางปากและพบว่ามีการกระจายอย่างรวดเร็วของ SCC ในหัวใจ ตับ ผิวหนังและปอดของหนูทดลอง และ Egner et al. (2000) ได้แสดงหลักฐานบ่งชี้ว่า สารประกอบ SCC สามารถถูกดูดซึมได้โดยร่างกายมนุษย์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในการศึกษาวิจัยผลของการป้องกันมะเร็งของสารประกอบคลอโรฟิลล์ในสาธารณรัฐประชาชนจีน เมื่อปี ค.ศ. 1997 โดยให้ผู้รับการทดลองบริโภค SCC ในปริมาณ 300 มิลลิกรัมต่อวันเป็นระยะเวลาติดต่อกันนาน 4 เดือน และทำการตรวจ

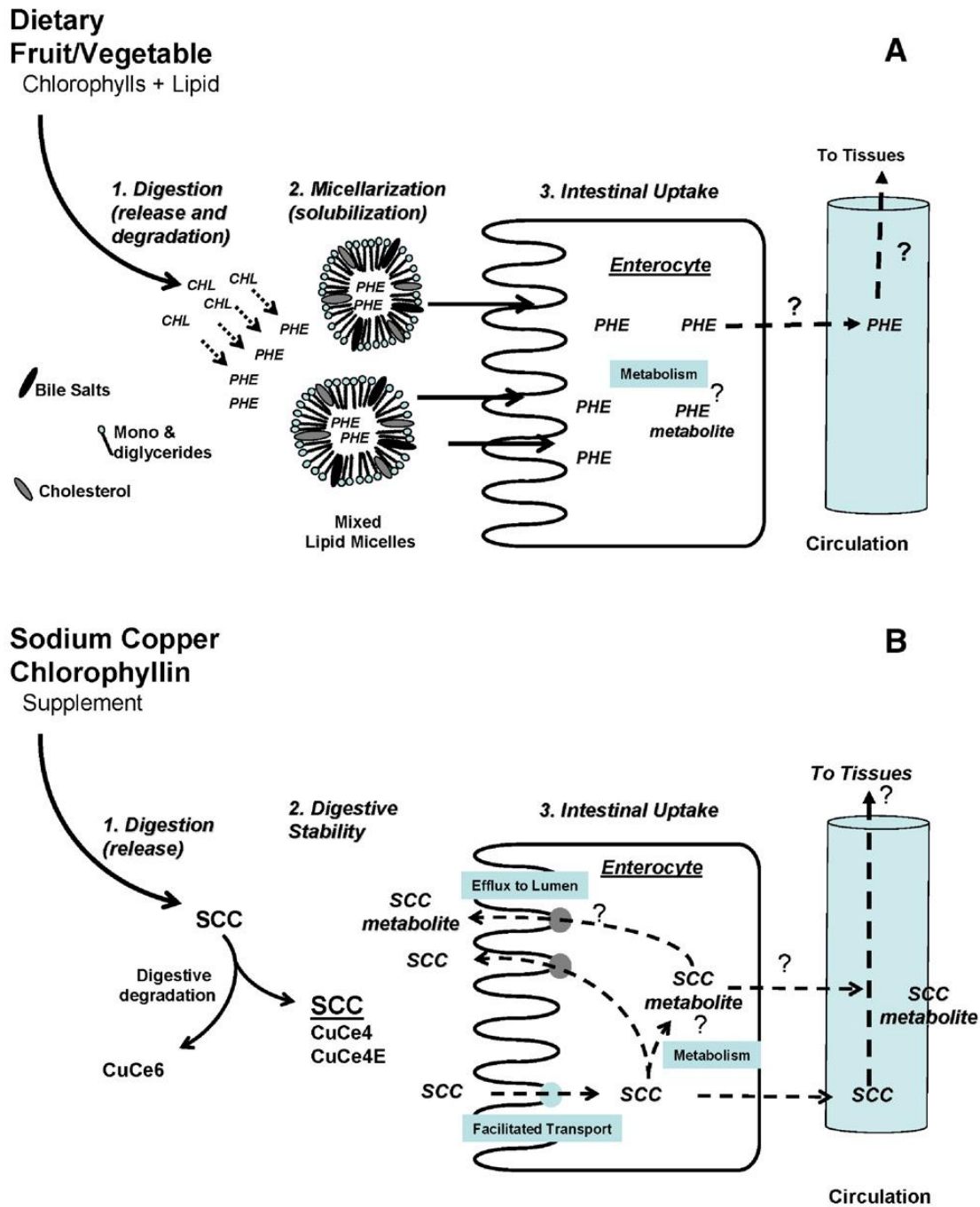
ระดับของสารประกอบคลอโรฟิลล์ในเลือด พบว่าสารประกอบคลอโรฟิลล์บางชนิดได้แก่ Cu-chlorin e₄ ethyl ester ซึ่งสรุปได้ว่าสารประกอบคลอโรฟิลล์สามารถถูกนำไปใช้ในร่างการมนุษย์เพียงบางโครงสร้าง ประโยชน์ของ SCC ที่มีการศึกษาแล้ว ได้แก่ การป้องกันมะเร็ง รวมทั้งการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านการก่อกลายพันธุ์ การจับกับสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen trapping) การ modulation ของระบบ xenobiotic metabolism ในร่างกาย และการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis จากการศึกษาความเสถียรของ SCC ต่อระบบทางเดินอาหารในมนุษย์โดย โดยใช้ in vitro digestion model และ Caco-2 cell โดยทำการศึกษาในตัวอย่าง 3 ชนิดคือ SCC ในน้ำ, SCC ในน้ำผสมกับ 10% corn oil และ SCC ในซอสแอปเปิ้ล ซึ่งตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการย่อยแล้ว ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ C₁₈HPLC และตัวตรวจวัดคือ Photodiode array โดยพบว่า SCC จะแบ่งออกเป็น 2 อนุพันธ์ คือ Cu(II) chlorine e₄ และ Cu(II) chlorine e₆ เมื่อผ่าน in vitro digestion model พบว่า Cu(II) chlorine e₄ จะมีความเสถียรมากกว่า โดยมี % recovery ได้ประมาณ 70% ในขณะที่ Cu(II) chlorine e₆ จะเกิดการเสื่อมสลายในระหว่างกระบวนการย่อย และตัวอย่าง SCC in applesauce พบว่า Cu(II) chlorine e₆ ลดลง ดังนั้นองค์ประกอบอื่นๆ จึงเป็นปัจจัยที่ต้องนำมาพิจารณาด้วย (Ferruzzi et al.,2002)

Gallardo-Guerrero et al. (2008) ได้ทำการศึกษาความคงตัว และการรวมกันเป็น micelle รวมถึงการ uptake โดย Caco-2 cell ของคลอโรฟิลล์ในถั่ว *Pisum sativum* L. ในตัวอย่างที่มีการเตรียมแตกต่างกัน ดังนี้คือ fresh pea(FP), cooked fresh pea(CFP), frozen pea(FZP), cooked frozen pea(CFZP) และ canned pea(CP) โดยพบว่า ใน frozen pea(FZP) จะมีการเพิ่มขึ้นของ pheophytin และมีปริมาณของ Chlorophyllide เกิดขึ้นในปริมาณเล็กน้อย ส่วนใน canned pea(CP) จะพบว่าในกระบวนการผลิตอาหารกระป๋องนั้น จะมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 121 องศาเซลเซียส ดังนั้นคลอโรฟิลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น pheophytin และ pyropheophytin ด้วยปฏิกิริยา pheophytinization และยังมีเกิดการออกซิเดชัน บริเวณ isocyclic ring ดังนั้นใน canned pea นี้จึงไม่พบโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ที่มี Mg อยู่ ส่วนใน cook fresh pea(CFP) และ cooked frozen pea(CFP) พบว่าคลอโรฟิลล์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ pheophytin และจะพบ pyropheophytin a และ pheophorbides a และ b ส่วนที่อยู่ในคลอโรฟิลล์ที่มี Mg พบในปริมาณเล็กน้อย เมื่อพิจารณาถึงการเกิด micellarization พบว่าในตัวอย่างที่ส่วนใน cook frozen pea (CFZP) จะสามารถที่ form เป็น micelle ได้มากที่สุดประมาณ 57% หากพิจารณาการ up take โดย Caco-2 human cell พบว่า pheophorbide a ถูกดูดซึมได้มากที่สุดในทุกตัวอย่าง หากพิจารณาจากการเตรียมจะพบว่า CFZP จะมีถูก up take ได้มากที่สุด และ Fresh pea(FP) ถูก up take ได้น้อยที่สุด ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าในกระบวนการถนอมอาหารที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น การแช่แข็งและการทำอาหารกระป๋อง การให้ความร้อน มีผลเชิงบวกต่อ bioaccessibility และ bioavailability ของคลอโรฟิลล์

ซึ่งจากงานวิจัยต่างๆ นั้นแสดงให้เห็นว่าสารประกอบคลอโรฟิลล์ สามารถนำไปใช้ได้ในร่างกายมนุษย์ในบางโครงสร้าง ซึ่งลักษณะกลไกการดูดซึมของคลอโรฟิลล์นั้นมีลักษณะที่คล้าย คลึงกับการดูดซึมของ xenobiotic compounds อื่นๆ (รูปที่ 4) ซึ่งมีผลมาจากปัจจัยดังต่อไปนี้คือ (Ferruzzi et al., 2007)

1. ประสิทธิภาพของการปลดปล่อยคลอโรฟิลล์ออกจากอาหาร
2. ความคงตัวในระบบย่อยอาหารในกระเพาะและลำไส้
3. การละลายของสารประกอบที่ละลายได้ในไขมัน
4. การถูกดูดซึมโดย Epithelial cells ของลำไส้เล็ก
5. การหลั่งออกมาสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต

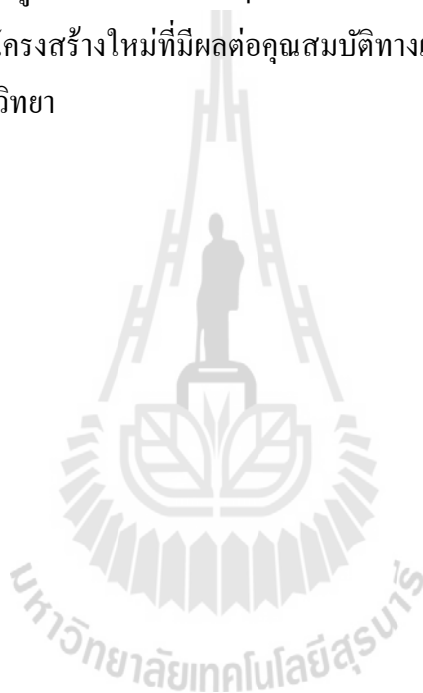




รูปที่ 4 แสดงการย่อยและการดูดซึมของคลอโรฟิลล์ (A: chlorophyll derivatives และ B: sodium copper chlorophyllin (SCC) derivatives)

(Ferruzzi et al., 2007)

นอกจากสารประกอบคลอโรฟิลล์แล้วในรางจืดยังมีสารประกอบฟีนอลิก จากการศึกษาของ Bernúdez-Soto et al. (2007) โดยทำการศึกษาความคงตัวของสารประกอบโพลีฟีนอลใน Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) เมื่อผ่านกระบวนการ in vitro gastric และ pancreatic digestion โดยตรวจวัด ปริมาณของ total recovered phenolics หลังจากผ่านกระบวนการ gastric digestion แล้วพบว่า ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ major phenolic compounds ซึ่งได้แก่ anthocyanins, flavan-3-ols, flavonols และ caffeic acid derivatives อย่างไรก็ตามส่วนประกอบเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากผ่านกระบวนการ pancreatic digestion อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะ anthocyanins ซึ่งมีการสูญเสียปริมาณ 43% ส่วน flavan-3-ols และ flavonols ลดลง 26% และ 19% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่า dietary polyphenols มีความไวสูงต่อภาวะต่างอ่อนๆ ในลำไส้เล็กและสัดส่วนของสารประกอบเหล่านี้สามารถเปลี่ยนไปเป็นรูปแบบโครงสร้างใหม่ที่มีผลต่อคุณสมบัติทางเคมี และผลต่อเนื่องต่อการนำไปใช้ได้ทางชีวภาพ และฤทธิ์ทางชีววิทยา



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การเตรียมสารสกัดรางจืด

3.1.1 การเตรียมใบรางจืดผง ใช้ใบรางจืดของโรงพยาบาลครบุรี อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา ในช่วงเดือนมิถุนายน – ตุลาคม 2553 โดยทำแห้งด้วยตู้อบ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (Mitsubishi, MX-TIPW, Thailand) เพื่อให้ได้ใบรางจืดผง และบรรจุแบบสุญญากาศ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

การเตรียมสารสกัดรางจืด เตรียมสารสกัดรางจืด 3 ชนิด คือ สารสกัดน้ำ อะซีโตน และเอทานอล ตามวิธีของ Oonsivilai (2006) คือ นำใบรางจืดผง 100 มิลลิกรัม นำไปใส่ในหลอด Centrifuge พลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำร้อน (100 องศาเซลเซียส) หรืออะซีโตน หรือเอทานอล ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (JULABO, SW22, USA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ต่อมานำไปเข้าเครื่อง Centrifuge (Hettich, universal 16R, USA) ที่ 3,000 g 3 นาที โดยแยกส่วนของเหลวกรองด้วยกระดาษกรอง และทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวทั้ง 3 ครั้งรวมกัน และกรองด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ ปรับปริมาตรใน Volumetric flask 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดใส่หลอดทดลอง (ขนาด 5 มิลลิลิตร) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เฉพาะสารสกัดน้ำนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งโดยเครื่อง Freeze drier (GEA, LYOVAC GT2-S, MD) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดอะซีโตนและเอทานอล นำไปเข้าเครื่อง Therbo vap (Caliper, LV, USA) เพื่อกำจัดตัวทำละลายอะซีโตนและเอทานอล จัดเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วปิดฝาให้แน่นและซีลด้วยพาราฟิล์ม เก็บตัวอย่างในภาชนะที่บดแสง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.2 การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีของสารสกัดรางจืดโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ตามวิธีของ Oonsivilai et al., 2007)

เตรียมสารละลาย คือ อะซีโตน อะซีโตนในไตรล์ เอทานอล เอทิลอะซีเตต และเมทานอล เกรด HPLC เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซีเตต 1.0 M นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 2 เท่า และปรับ pH 4.6 โดยใช้ glacial acetic acid โดยมีสารละลายมาตรฐาน คือ chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, lutein, phenolic acids และ apigenin ส่วน Pheophytin *a* และ *b* เตรียมสารมาตรฐานจาก chlorophyll *a* และ

chlorophyll *b* โดย chlorophyll *a* หรือ chlorophyll *b* 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซีโตน 10 มิลลิลิตร เติมไฮโดรคลอริก 0.1 N 5 มิลลิลิตร

3.2.1 การวิเคราะห์ chlorophyll และ carotenoid

Column คือ Grace-Vydac 201TP54 reversed- phase (4.6x 250 mm) Polymeric C 18 ใน guard column เหมือนกับ stationary phase binary mobile phase คือ เมทานอลต่อน้ำต่อแอมโมเนียมอะซีเตต (73: 25: 2 v/v/v) ใน reservoir A และ ethyl acetate ใน reservoir B โดย A ให้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตอนเริ่มต้นอัตราการไหลจะเป็น 100% หลังจากนั้น 10 นาที จะมีอัตราส่วน 50/50 A/B นาน 10 นาที 5 นาทีถัดไปจะกลับเป็น A 100% และกลับสู่สภาวะเดิมอีก 5 นาที รวมเป็น 30 นาที ในแต่ละตัวอย่าง จะพบ chlorophylls และ carotenoid ดูได้จากข้อมูลช่วง 250 และ 600 นาโนเมตร เทียบกับข้อมูลของสารมาตรฐาน

3.2.2 การวิเคราะห์สารประกอบ phenolic

ใช้ reverse phase column คือ Waters NovaPak C18 (3.8 mm I.d. x 150 mm) ส่วน guard column คือ Waters NovaPak C18 ให้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ 35 องศาเซลเซียส binary mobile phase เป็น น้ำต่ออะซีติก อัตราส่วน 98:2 v/v ใน reservoir A และ อะซีโตนในไตรล์ ใน reservoir B โดยช่วงเริ่มต้นมีอัตราส่วนของสารละลาย A/B คือ 99:1 v/v ถึง 70:30 v/v นาน 20 นาที ที่ 5 นาทีถัดไปจะกลับเป็นอัตราส่วนเดิม และ 5 นาทีถัดไปเข้าสู่สมดุล รวมเป็น 30 นาทีในแต่ละตัวอย่าง จะพบสารประกอบ phenolic ดูได้จากข้อมูลช่วง 200 และ 500 นาโนเมตรเทียบกับข้อมูลของสารมาตรฐาน

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณของ Total phenolic ในสารสกัดรางจืด (ตามวิธีของ Oonsivilai et al., 2007)

ปริมาณ Total phenolic ในสารสกัดรางจืด โดยการนำทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลาย น้ำ หรือ อะซีโตน หรือเอทานอล แล้ว ปิเปตสารละลายตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำ 1.58 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง Vortex ที่ 5 นาที เติม โซเดียมคาร์บอเนต (20% w/v) 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วจึงเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และหา Total Phenolic Compound โดยใช้ gallic acid เป็นมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นของ gallic acid ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานคือ 0, 50, 100, 150 และ 200 ppm ใน

95% เอทานอล ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปแบบสมมูลของมิลลิกรัม gallic acid ต่อ 100 มิลลิกรัมของ น้ำหนักแห้ง

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดรางจืด

3.3.1 วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity (Oonsivilai et al., 2007)

โดยการทำให้สารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำ อะซิโตน หรือเอทานอล แล้วเปิดสารละลาย ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DPPH 1.90 มิลลิลิตร ผสมให้ เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการวัดค่าการ ดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และคำนวณหา % inhibition จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100$$

3.3.2 วิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) (Oonsivilai et al., 2006)

โดยทำการเตรียมสารละลาย FRAP จากสารละลาย acetate buffer (pH 3.6), TPTZ 10 mM ใน HCl เข้มข้น 40 mM และสารละลาย ferrous chloride เข้มข้น 20 mM ในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v) ตามลำดับ สารละลาย FRAP จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน และนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาใช้

ในทดสอบด้วยวิธีนี้ จะใช้สารสกัดปริมาณ 50 ไมโครกรัม แล้วเติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลาเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร โดยทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย ferric sulfate ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100-2000 μM โดยทำการทดลองจำนวนสามซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

3.3.3 วิธี Scavenging activity of ABTS radical cation (Meot-Duros et al., 2009)

ทำการเตรียมสารละลาย ABTS ที่มีความเข้มข้น 7 mM โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย และเตรียม สารละลาย potassium persulfate ที่มีความเข้มข้น 140 mM ผสมสารละลาย ABTS ที่มีความ 7 mM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กับสารละลาย 140 mM ปริมาตร 35.5 μl ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 16 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้งาน จะได้ stock ABTS radical cation แล้วเจือจาง Stock ABTS radical cation ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm เท่ากับ 0.700 ± 0.02 (ต้องเตรียมใหม่ทุก ครั้งก่อนการใช้งาน)

เตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองและใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุมเติม ABTS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{734 \text{ control}} - A_{734 \text{ test sample}}) / A_{734 \text{ control}}] \times 100$$

3.4 การศึกษาชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรางจืด

3.4.1 แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (*In vitro* simulated digestion models)

3.4.1.1 Gastric phase (ตามวิธีของ ferruzzi et al., 2001)

นำสารสกัดรางจืดน้ำ แอทานอลและอะซิโตน โดยปริมาณของรางจืดสกัดเมื่อเทียบกับใบสดเท่ากับ 1 กรัม โดยทำการเติม 120 mM NaCl ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใน polypropylene tube ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำ homogenized แล้วปรับ pH 2.0 ± 0.1 ด้วย 1 M HCl แล้วเติม pepsin ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 40 มิลลิลิตร ด้วย 120 mM จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดฝาให้แน่นและซีลด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปป่มใน shaking waterbath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

3.4.1.2 Small intestinal phase (ตามวิธีของ ferruzzi et al., 2001)

ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยจาก gastric phase ทำการปรับ pH 6.0 ± 0.1 ด้วย 1 M sodium bicarbonate (NaHCO_3) เติม crude bile extract จากนั้นเติม pancreatin ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ β -glucosidase ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ต้องการทำปฏิกิริยา จากนั้นทำการปรับ pH ของตัวอย่างให้เป็น 6.5 ± 0.1 $18 \mu\text{M}$ NaHCO_3 จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วปิดฝาให้แน่นและซีลด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปป่มใน shaking waterbath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

หลังจากผ่าน small intestinal phase แล้ว ส่วนที่ได้เรียกว่า digesta ซึ่งปีเปตสาร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน polypropylene tube ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วปิดฝาให้แน่นและซีลด้วยพาราฟิล์ม นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ซึ่งต้องไม่เกิน 2 สัปดาห์

3.4.1.3 การแยกส่วนของ aqueous fraction จาก digesta (ตามวิธีของ ferruzzi et al., 2001)

นำส่วนของ digesta ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 90 นาที เพื่อที่จะแยกส่วนใสออก จากนั้นใช้เข็มขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมครอน สารละลายที่ได้นำไปไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วปิดฝาให้แน่นและซีลด้วยพาราฟิล์ม นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 Cell culture (ตามวิธีของ ferruzzi et al., 2001 และ Garret et a., 1999)

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cell) จาก Suranaree University of Technology (Nakhonratchasima, Thailand) โดยใช้ passage ที่ 29-32 ทำการเลี้ยงเซลล์ใน 75-T flask (ขนาด 75 cm^2)

โดยเซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงเริ่มต้น เท่ากับ 4×10^5 cells/cm² และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ complete medium ที่มีกลูโคสในปริมาณสูง (DMEM) ใช้ 10.0 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), กรดอะมิโนไม่จำเป็น (non-essential amino acid) 10 มิลลิกรัม/ลิตร, แอล-กลูตามีน (L-glutamine) 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร, แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร, เจนตาไมซิน (gentamicin) 50 มิลลิกรัม/ลิตร, HEPES 15 มิลลิกรัม/ลิตร และ โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) 44 มิลลิกรัม/ลิตร โดยเซลล์ที่ต้องการทดสอบจะเลี้ยงในเพลทพลาสติกแบบ 12 หลุม โดย passage ที่ใช้อยู่ระหว่าง 22-35 ในระหว่างการเลี้ยงเซลล์นี้ให้ใช้อัตราส่วนของอากาศและคาร์บอนไดออกไซด์ เป็น 95:5 หลังจากที่ทำการเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลาประมาณ 11-14 วัน จะทำการล้างเซลล์ด้วย Hank's balanced salt solution ครั้งละ 1 มิลลิกรัม จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นจึงจางสารที่ได้จากการย่อยที่ได้จากข้อ 1.3 ด้วย basal DMEM ในอัตราส่วน 1:3 ใส่ในเพลทที่มีเซลล์อยู่นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของอากาศและคาร์บอนไดออกไซด์ เป็น 95:5 เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดจะทำการเปิดส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างเซลล์ monolayer ด้วย ice-cold Hank's balanced salt solution ที่มี sodium taurocholate ความเข้มข้น 5.0 mmol/l จำนวน 2 ครั้ง ทำการเก็บเซลล์ที่ได้ใน 1 มิลลิกรัม ของ ice-cold Hank's balanced salt solution ที่มีเอทานอล 10.0% และ BHT เข้มข้น 45 μ mol แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4.3 ความคงตัวในกระบวนการย่อย (ตามวิธีของ ferruzzi et al., 2001)

นำสารสกัดวางจืดทั้งที่ผ่านการย่อยและไม่ผ่านการย่อยมาทำละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ aliquots ปริมาตร 6 มิลลิกรัม แล้วเปิดใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิกรัม และเติมเอทานอล 90% ปริมาตร 10 มิลลิกรัม นำสารละลายที่ได้ไป sonicate เป็นระยะเวลา 10 นาทีและนำไป vortex เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 3,500 rpm เป็นระยะเวลา 15 นาที โดยทำซ้ำ 3 รอบ นำส่วนใสที่ได้ทั้งหมดไประเหย (Buchi Rotavapor R-124, switzerland) ที่ 45 องศาเซลเซียส ส่วนของสารละลายที่ได้นำไปละลายด้วยเมทานอล

$$\text{ความคงตัวในกระบวนการย่อย(\%)} = \frac{\text{ปริมาณสารหลังการย่อยปริมาณของสารก่อนการย่อย}}{\text{ปริมาณสารหลังการย่อยปริมาณของสารก่อนการย่อย}} \times 100$$

3.4.4 การวิเคราะห์ aqueous fraction (ตามวิธีของ ferruzzi et al., 2001)

นำส่วนของ aqueous fraction มาทำละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิกรัม เติม 90% ethanol ปริมาตร 30 มิลลิกรัม นำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที แล้ว vortex เป็นระยะเวลา 2 นาที round bottom flask ขนาด 50 มิลลิกรัม แล้วนำไปทำแห้ง (Buchi Rotavapor R-124 switzerland) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำสารที่ผ่านการทำแห้งแล้วไปละลายด้วย absolute ethanol

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไปด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography เพื่อคำนวณหา % aqueous fraction

$$\% \text{ aqueous fraction} = \frac{\text{ปริมาณสารใน } \textit{aqueous}}{\text{ปริมาณของสารก่อนทำการย่อย}} \times 100$$

3.4.5 การวิเคราะห์ การดูดซึมสารของ Caco-2 human intestinal cells (ตามวิธีของ ferruzzi et al., 2006)

นำสารตัวอย่างที่ได้จาก Caco-2 human intestinal cells ซึ่งประกอบไปด้วย เซลล์และ ส่วนของ aqueous fraction ไปอุ่นใน shaking waterbath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเติมสารละลายโปรติเอส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) ในเอทานอล แล้ว vortex เป็นระยะเวลา 1 นาที แล้วเติมสารละลายอะซีโตนและปิโตรเลียมอีเทอร์ (อัตราส่วน 1:2) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 2000 g โดยเก็บส่วนของปิโตรเลียมอีเทอร์ ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำส่วนที่ได้ทั้งหมด ไปทำแห้งโดยใช้ไนโตรเจน แล้ววิเคราะห์ต่อ ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography เพื่อที่จะนำไปคำนวณหา % cell uptake

$$(\%) \text{ cell uptake} = \frac{\text{ปริมาณสารหลังจากการบ่มในเซลล์เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงปริมาณของสารที่มีอยู่ในอาหารที่ทำการทดสอบ}}{(\text{test medium})} \times 100$$

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดรางจืด

1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันคือ น้ำ, เอทานอล, และอะซีโตน วิเคราะห์โดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดแต่ละชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าเอทานอล และอะซีโตน โดยรางจืดที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด (3037.07 mg GAE /100 g RM) และรางจืดที่สกัดด้วยอะซีโตนมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ต่ำสุด (120.87 mg GAE / 100 g RM) โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืดมีปริมาณใกล้เคียงกับการศึกษาของรัชฎาพร และคณะ (2006)

ตารางที่ 3 : ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืด ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และอะซีโตน

Total Phenolics (mg GAE / 100 g RM)		
Water	Ethanol	Acetone
3037.07 ± 107.054 ^a	1768.42±198.54	120.87 ± 18.821

^a หมายถึง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH) , 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) และ Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH) เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH คือ อนุภาคอิสระที่ เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็น โมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ ด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติมโซเดียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

ส่วนการวิเคราะห์ด้วย Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay เป็นการวัดความสามารถ ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดซึ่งเกิดจาก การรีดิวซ์ โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก Fe^{3+} กับ TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+} กับ TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระ ใช้ BHT และ Ascorbic acid เป็นตัวควบคุมได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

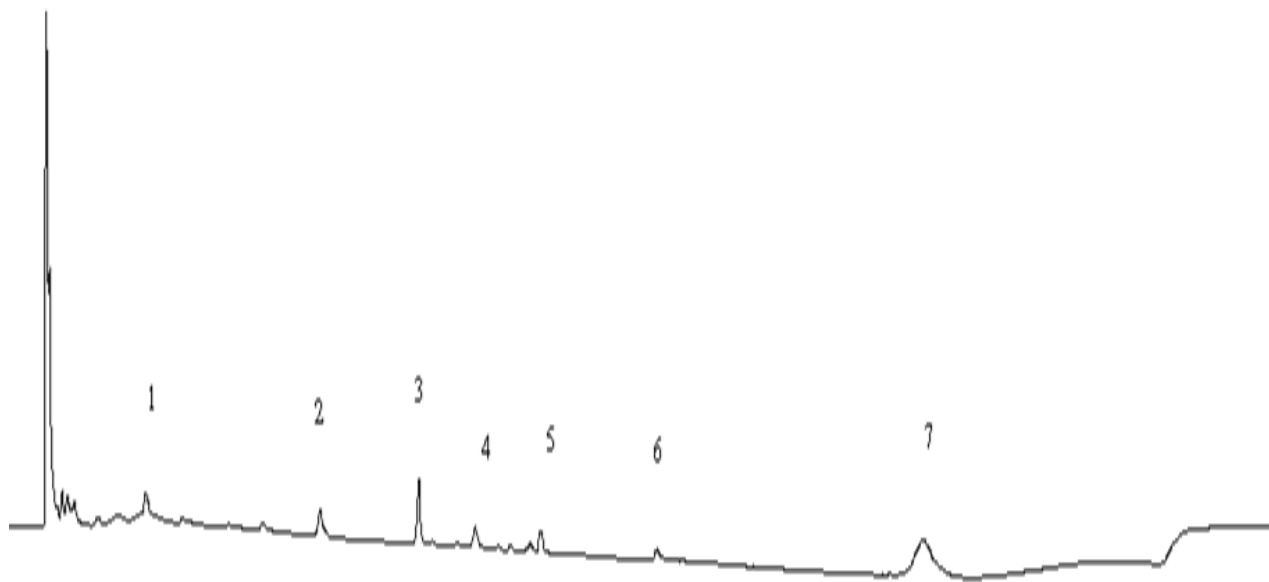
ตารางที่ 4 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

Assay	IC ₅₀ (mg / ml)				
	Water	Ethanol	Acetone	BHT	Ascorbic acid
DPPH	2.438 ± 0.182 ^a	4.695 ± 1.534	51.910 ± 8.994	0.339 ± 0.039	0.036 ± 0.00
ABTS ⁺	1.198 ± 0.211 ^a	25.477 ± 0.159	65.687 ± 0.914	0.0853 ± 0.0075	0.0478 ± 0.0088
	Total Antioxidant activity (mmol Fe ²⁺ / g RM)				
FRAP	0.294 ± 0.089 ^{8a}	0.048 ± 0.1015	0.018 ± 0.0817	2.379 ± 0.871	

^a หมายถึง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืด ด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า โดยพบว่า รางจืดที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และรางจืดที่สกัดด้วยอะซีโตนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด หากเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ BHT และ Ascorbic acid และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะสอดคล้องกับปริมาณของ Total phenolic ที่มีในตัวอย่าง หากสารสกัดใดมีปริมาณของ Total phenolic มากจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกกับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ Jacobo-Velazquez และคณะ(2009)

2. การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีของสารสกัดรางจืด โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography



รูปที่ 5 การวิเคราะห์ฟีนอลิกของสารสกัดรางจืดด้วยวิธี HPLC (1= protocatechuic acid, 2= Caffeic acid, 3- 6 = กลุ่ม Glucosides , 7= Apigenin)

จากการศึกษาได้ศึกษา Phenolic Profile ของสารสกัดรางจืดน้ำ โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าส่วนใหญ่เป็นสารประเภทฟีนอลิก ได้แก่ Protocatechuic acid, caffeic acid และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ apigenin รวมถึงกลุ่มกลูโคไซด์ ดังรูปที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ วิรุทธ (2522) และ Oonsivilai et al. (2007) ส่วนในสารสกัดรางจืดเอทานอล พบสารพฤษเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักดังนี้ คือ chlorophyll a chlorophyll b และ pheophorbide a, pheophytin a

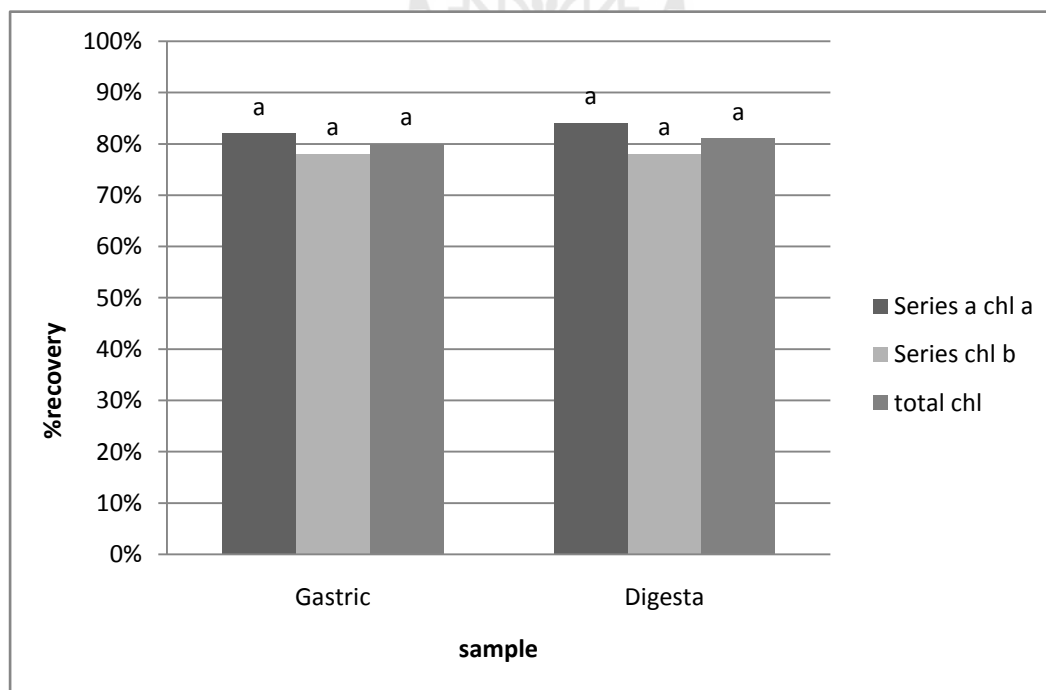
3. ศึกษาความคงตัวต่อการย่อย (Digestive stability) ของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดรางจืด

การใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (*in vitro* simulated digestion models) เป็นการประยุกต์และเลียนแบบระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ อวัยวะที่ถูกเลียนแบบในแบบจำลองนี้คือ ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก โดยจะเลียนแบบทั้งที่เป็นส่วนของเหลวต่าง ๆ ที่อยู่ในแต่ละอวัยวะ เช่น เอนไซม์ ค่าความเป็น กรด - ด่าง และระยะเวลาที่อาหารอยู่ในแต่ละอวัยวะ ซึ่งแบบจำลองนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่างๆ อย่างหลากหลาย เพื่อที่จะพิจารณาถึงความเสถียรของสารเมื่อผ่านการระบบย่อยอาหาร(digestion stability)

ตารางที่ 5 ความคงตัวต่อกระบวนการย่อย (Digestive Stability) ของสารสกัดรางจืด

ตัวอย่าง	สารสกัดน้ำ	สารสกัดเอทานอล		
	Total phenolic	% recovery of chlorophyll a	% recovery of chlorophyll b	Total chlorophyll
Gastric	87.05±4.38 ^a %	82.059±7.89%	78.09±4.65%	80.05±8.63%
Digesta	89.04±5.69%	84.07±8.96%	78.07±7.89%	81.58±5.87%

^a หมายถึง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



^a ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ(P<0.05)

รูปที่ 6 ความคงตัวต่อการย่อย (Digestive stability) ของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดรางจืดเอทานอล

จากการศึกษาความเสถียรของสารต่างๆในสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลพบว่า สกัดรางจืดน้ำ ค่อนข้างเสถียรในแบบจำลองกระบวนการย่อยของทางเดินอาหาร โดย สารกลุ่มฟีนอลิกจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ Apigenin จะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารกลุ่ม Apigenin glucosides ดังรูปที่ 8

ส่วนสารสกัดรางจืดเอทานอล ซึ่งมีพฤษเคมีหลัก ประกอบไปด้วย chlorophyll a, chlorophyll b และ pheophorbide a, pheophytin a และ lutein เมื่อผ่านแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง มีการเปลี่ยนแปลง คือ คลอโรฟิลล์ส่วนใหญ่จะ มีการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปของ pheophytin, pyropheophytin a และ pheophorbides a และ b ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ (Ferruzzi et al., 2007) เนื่องจากความเป็นกรดในระบบทางเดินอาหาร ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของคลอโรฟิลล์ โดย Mg^{2+} หลุดออกจากโครงสร้าง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีเขียว ไปเป็นสีน้ำตาล โดยเรียกกระบวนการนี้ว่า Pheophytinization แต่ปริมาณของ Total chlorophyll ไม่แตกต่างกัน



4. การนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรางจืด

ตารางที่ 6 ความสามารถในการถูกดูดซึมใน Caco-2 cells ของสารสกัดรางจืด

ตัวอย่าง	สารสกัดน้ำ	สารสกัดเอทานอล		
	Total phenolic	% recovery of chlorophyll a	% recovery of chlorophyll b	Total chlorophyll
Gastric	55.00±5.8%	42.04±7.8%	47.86±8.5%	45.00±7.4%
Digesta	56.00±5.9%	37.50±6.8%	46.52±7.6%	47.85±6.3%

จากการทดสอบความสามารถในการถูกดูดซึมของสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอลใน Caco-2 cells พบว่า สารสกัดรางจืดน้ำสามารถถูกดูดซึมได้ดีกว่า ประมาณ 55-56% เนื่องจาก เป็นสารที่ละลายน้ำได้ ดังนั้น จึงมีความสามารถในการแพร่เข้าไป Caco-2 cells ส่วนสารสกัดรางจืดเอทานอล มีพฤษเคมีหลักที่เป็น สารประกอบคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ ซึ่งเมื่อผ่าน แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง แสดงให้เห็นว่าสารประกอบคลอโรฟิลล์ สามารถนำไปใช้ได้ในร่างกายมนุษย์ในบางโครงสร้าง ซึ่งสามารถถูกดูดซึมได้ประมาณ 42-47 % ซึ่งลักษณะกลไกการดูดซึมของคลอโรฟิลล์นั้นมีลักษณะที่คล้าย คลึงกับการดูดซึมของ xenobiotic compounds อื่นๆ เช่น คโรทีนอย์ (Garrett et al, 1999)

บทที่ 5

บทสรุป

จากการศึกษาได้ศึกษา Phenolic Profile ของสารสกัดรางจืดน้ำ โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าส่วนใหญ่เป็นสารประเภทฟีนอลิก ได้แก่ Protocatechuic acid, caffeic acid และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ apigenin รวมถึงกลุ่มกลูโคไซด์

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรทั้งสามชนิดด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า โดยพบว่า รางจืดที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และรางจืดที่สกัดด้วยอะซิโตนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด หากเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ BHT และ Ascorbic acid และความสามารถในการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดจะสอดคล้องกับปริมาณของ Total phenolic ที่มีในตัวอย่าง

จากการศึกษาความเสถียรของสาร ต่างๆในสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล พบว่า สกัดรางจืดน้ำ ค่อนข้างเสถียรในแบบจำลองกระบวนการย่อยของทางเดินอาหาร โดย สารกลุ่มฟีนอลิกจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ Apigenin จะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารกลุ่ม Apigenin glucosides ส่วนสารสกัดรางจืดเอทานอล ซึ่งมีพฤษเคมีหลัก ประกอบไปด้วย chlorophyll a chlorophyll b และ pheophorbide a, pheophytin a และ lutein เมื่อผ่านแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง มีการเปลี่ยนแปลง คือ คลอโรฟิลล์ส่วนใหญ่จะ มีการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปของ pheophytin, pyropheophytin a และ pheophorbides a และ b

จากการทดสอบความสามารถในการถูกดูดซึมของสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอลใน Caco-2 cells พบว่า สารสกัดรางจืดสามารถถูกดูดซึมได้ เนื่องจาก เป็นสารที่ละลายน้ำได้ ดังนั้นจึงมีความสามารถในการแพร่เข้าไป Caco-2 cells ส่วนสารสกัดรางจืดเอทานอล มีพฤษเคมีหลักที่เป็นสารประกอบคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ ซึ่งเมื่อผ่านแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง แสดงให้เห็นว่าสารประกอบคลอโรฟิลล์ สามารถถูกดูดซึมได้ ประมาณ 41-45 % โดยความสามารถในการดูดซึมผ่าน epithelial layer จะแตกต่างกันไปตามอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ นำไปใช้ได้ในร่างกายมนุษย์ในบางโครงสร้าง

บรรณานุกรม

- ชะลอ อุทกภาชนัน. (2519). ยาสมุนไพรรักษาโรคลำไส้ในประเทศไทยและวิธีการบำบัดรักษา. กรุงเทพฯ : แพร์ พิตยา อินเตอร์เนชั่นแนล, 244-252.
- พนิดา ไชยธรรมสาร. (2542). รานจิต. จุลสารข้อมูลสมุนไพรรักษา, 16(1): 4-7
- พานิช เตชะเสน และ ชัชวดี ทองทาบ. (2523). การทดลองใช้รานจิตแก้พิษยาฆ่าแมลง. **เชียงใหม่เวชสาร** 19(2) : 105-114.
- วีรยุทธ จิตรพิวงม. (2522). การศึกษาสารประกอบรานจิต. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ .
- วีรวรรณ เรืองยุทธการณ. 2523. การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของใบรานจิต. วิทยานิพนธ์การวิจัยวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- วุฒิ วุฒิชัยธรรมราช. (2540). **สารานุกรมสมุนไพรรักษาไทย**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 390.
- ศิริวรรณ ศิลปะสุวรรณ. (2522). การศึกษาผลของสมุนไพรรานจิตต่อการเจริญของแบคทีเรียบางอย่างในตระกูล Enterobacteriaceae. วิทยานิพนธ์การวิจัยวิทยาศาสตร์ (การสอนชีววิทยา). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- สุพร จารุมณี และคณะ. (2541). รายงานการวิจัยเรื่องการพัฒนายาทาภายนอกสำหรับต้านการอักเสบจากเถารานจิต ตอนที่ 1. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 1-4
- เสถียร ปิ่นเครือ. (2535). **ไม้เทศเมืองไทย**. กรุงเทพฯ: การพิมพ์ไชยวัฒน์, 455-456.
- Bermúdez-Sota, M.-J., Tomás-Barberán, F.-A. and García-Conesa., (2007). Stability of polyphenols in Chokeberry (*Aronia melanocarpa*). **Food Chemistry**. 102: 865-874.
- Chanawirat A. The protective effect of *Thunbergia laurifolia* extract on ethanol-induced hepatotoxicity in mice. Master of Science Thesis, Mahidol University 2000.
- 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: 2280-2286
- Egner, P.A., Stansbury, K.H., Snyder, E.P., Rogers, M.E., Hinz, P.A. and Kensler, T.W. (2000). Identification and characterization of chlorine 4 ethyl ester in sera of individuals participating in the chlorophyllin chemoprevention trial. **Chem Res Toxicol**. 13: 900-906.
- Failla, M.L., Huo, T. and Thakkar, S.K. (2008) *In vitro* screening of relative bioaccessibility of carotenoids from foods. **Asia Pac J Clin Nutr**. 17 (S1): 200-203.
- Ferruzzi, M.G and Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives, *Nutr. Res. (N.Y.)*. 27, 1-12.

- Ferruzzi, M.G., Failla, M.L., and Schwartz, S.J. (2002). Sodium Copper Chlorophyllin: in Vitro digestion stability and accumulation by Caco-2 human intestinal cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50:2173-2179.
- Ferruzzi, M.G., Failla, M.L., and Schwartz, S.J. (2001). Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophylls derivatives from Spinach Puree using an in vitro digestion and Caco-2 human intestinal cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49:2082-2089.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérda, I., and Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**. 29:751-760.
- Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., and Mínguez-Mosquera, M.I. (2008). Digestive stability, micellization, and uptake by Caco-2 human intestinal cell of chlorophyll derivatives from different preparation of pea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56:8379-8386.
- Garrett, D.A., Failla, M.L., Sarama, R.J., and Craft, N. (1999). Development of in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47(10):4301-9.
- Kongyingyos B, Plentong C, Ekalaksananan T, et al. Antiviral activity of Thai medicinal herbs on herpes simplex virus. 16th Conference on Science and Technology of Thailand 25-27 October 1990.
- Meot-Duros, L. and Magne, C. (2009). Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**. 47:37-41.
- Muangnoi, C. (2007). Bioaccessibility, Cellular uptake and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor activity of triterpenoids from *Centella asiatica* (Linn.) urban. [M.Sc. thesis in Nutrition]. Bangkok. Facultative of graduate studies. Mahidol university.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Ningsanond, S., Bomser, J.A. and Ferruzzi, M.G. (2006). Induction of quinine reductase activity in murine hepatoma cells by extracts *Thunbergia laurifolia* Linn. **Presented at EB 2006. Moscone Convention center**. April 1-5. San Francisco: CA.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Bomser, J.A., Ferruzzi, M.G. and Ningsanond, S. (2007). Phytochemical profiling and detoxification properties of *Thunbergia laurifolia* Linn. (Rang Chute) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. 114: 300 – 306.
- Oonsivilai, R., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. (2007). Antioxidant activity and cytotoxicity of Rang Chute (*Thunbergia laurifolia* Linn.) extracts. **Presented at FoSTAT . BITEC**. June 14-15. Bangkok, Thailand.

Purina, GPC. (1978). Coloring matters from flowers of *Thunbergia laurifolia* Linn.
Journal of the Indian chemical society. 55(6): 622-623

Sambuy, Y. et al., (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier:
influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional
characteristics. **Cell Biology and Toxicology.**21: 1-26

