

ชีวภาพพร้อมใช้และชีวภาพการนำไปใช้ของสารสกัดรางจืด



นางสาวทัศนีวรรณ ลีสัน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2556

**BIOAVAILABILITY AND BIOACCESSIBILITY OF
RANG CHUET (*Thunbergia Laurifolia* Lindl.)
EXTRACT**

Thassaneewan Seesan



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Food Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2013**

ชีวภาพพร้อมใช้และชีวภาพการนำไปใช้ของสารสกัดรางจืด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รศ. ดร.จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริไธย)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร.เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์)

กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ทัศนวิวรรณ สีสัน : ชีวภาพพร้อมใช้และชีวภาพการนำไปใช้ของสารสกัดรางจืด
(BIOAVAILABILITY AND BIOACCESSIBILITY OF RANG CHUET
(*Thunbergia Laurifolia* Lindl.) EXTRACT) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริวิไลย์, 74 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรางจืด เพื่อประเมินการบริโภคสารสกัดรางจืด โดยใช้แบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลองร่วมกับการทดลองการดูดซึมด้วยเซลล์ไลน์ Caco-2 นอกจากนี้ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu ผลการศึกษา พบว่า ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำมีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 3037.07 มิลลิกรัมกาลีค /100 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดรางจืดเอทานอลและอะซีโตน มีปริมาณเท่ากับ 1768.42 และ 120.87 มิลลิกรัมกาลีค/100 กรัม ตามลำดับ สารสกัดรางจืดน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดรางจืดเอทานอลและอะซีโตน จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดน้ำ เอทานอล และอะซีโตน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.44 ± 0.18 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 4.695 ± 1.534 และ 51.91 ± 8.994 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบเปรียบกับตัวควบคุม คือ BHT และกรดแอสคอร์บิก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.339 ± 0.039 และ 0.036 ± 0.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร การทดสอบด้วยวิธี ABTS พบว่า ในสารสกัดน้ำ เอทานอล และอะซีโตน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.20 ± 0.21 , 25.48 ± 0.16 และ 65.68 ± 0.91 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบเปรียบกับตัวควบคุม คือ BHT และกรดแอสคอร์บิก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.09 ± 0.01 และ 0.05 ± 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้การทดสอบด้วยวิธี FRAP พบว่าในสารสกัดน้ำ เอทานอล และอะซีโตน มีค่าเท่ากับ 0.294 ± 0.089 , 0.048 ± 0.002 และ 0.018 ± 0.002 mmol Fe^{2+} /กรัม เปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ BHT ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.379 ± 0.071 mmol Fe^{2+} /กรัม

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดรางจืดโดย HPLC พบว่าในสารสกัดรางจืดมีองค์ประกอบหลัก คือ กรดคาเฟอิก, กรดโปรโตคาเทชอิก และอะพิจินิน ส่วนสารสกัดรางจืดเอทานอล มีองค์ประกอบหลักคือ คลอโรฟิลล์เอ , คลอโรฟิลล์บี, ฟิโอฟิรบายด์ เอ และ บี, ฟิโอฟิตินเอ และ ฟิโอฟิตินบี

สุดท้ายได้มีการศึกษาการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรางจืด โดยเซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่าสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลสามารถถูกดูดซึมผ่านผนังเซลล์ไลน์ Caco-2 ที่ระดับร้อยละ 56 และ 47.85 ตามลำดับ

กล่าวโดยสรุป สารสกัดรางจืดน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด องค์ประกอบทางเคมีหลักของสารสกัดรางจืด และเอทานอล คือ คอลโรฟิลล์เอ และคอลโรฟิลล์บี หลังจากผ่านแบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง พบว่า คอลโรฟิลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปอนุพันธ์ของ คอลโรฟิลล์ ที่สามารถถูกดูดซึมผ่านผนังของเซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่าสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลสามารถถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็กได้



THASSANEEWAN SESSAN : BIOAVAILABILITY AND
(BIOACCESSIBILITY OF RANG CHUET (*Thunbergia Laurifolia* Lindl.)
EXTRACT). THESIS ADVISOR : ASST. PROF. RATCHADAPORN
OONLIVILAI, Ph.D., 74 PP.

RANG CHUET EXTRACT/BIOAVAILABILITY/BIOACCESSIBILITY

The bioavailability and bioaccessibility of Rang Chuet extracts were studied to evaluate a proper amount of Rang Chuet extract consumption by *in vitro* simulated digestion model and absorption experiment with Caco-2 cells. Alterations of antioxidant capacity of Rang Chuet extracts were monitored by DPPH• and ABTS• radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power assay (FRAP). Moreover, the total phenolic content was evaluated by Folin-Ciocalteu method. The results showed that water extraction was the most efficient (3037.07 mg GAE /100 g) when compared with the ethanol and acetone extraction which had phenolic contents of 1768.42 and 120.87 mg GAE /100 g, respectively. The Rang Chuet water extract also exhibited the highest scavenging activity against DPPH• than the ethanol and acetone extracts. The IC₅₀ of Rang Chuet water extract was 2.44 ± 0.18 mg/ml whereas the IC₅₀ values of ethanol and acetone extracts were 4.70 ± 1.53 and 51.91 ± 8.99 mg/ml, respectively. The IC₅₀ values of BHT and ascorbic acid, the positive controls, were 0.34 ± 0.039 and 0.04 ± 0.00 mg/ml, respectively. In addition, the IC₅₀ of ABTS - radical scavenging capacity of Rang Chuet extracted by water, ethanol, and acetone were 1.20 ± 0.21, 25.48 ± 0.16, and 65.69 ± 0.91 mg/ml, respectively. whereas BHT and ascorbic acid showed the IC₅₀ values of 0.09 ± 0.01 and 0.05 ± 0.01 mg/ml, respectively. Furthermore, the ferric reducing antioxidant power of Rang Chuet water,

ethanol, and acetone extracts were 0.294 ± 0.089 , 0.048 ± 0.002 , and 0.018 ± 0.002 mmol Fe²⁺/g, respectively, whereas the value of the BHT standard was 2.379 ± 0.071 mmol Fe²⁺/g.

The analysis of phytochemical constituents by HPLC showed that the phenolic compounds of Rang Chuet water extract were mostly caffeic acid, protocatechuic acid, and apigenin whereas the Rang Chuet ethanol extract contained mostly chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, pheophorbide *a*, pheophytin *a*, and pheophytin *b*. The stability study indicated that the phenolic compounds in Rang Chuet water extract were only slightly affected by the (simulated) digestive process whereas chlorophyll components in Rang Chuet ethanol extract was changed to chlorophyll derivatives.

Finally, the bioaccessibility of Rang Chuet extracts using Caco-2 cells was studied, the results showed that Rang Chuet water and ethanol extracts could be absorbed through Caco-2 cell barrier at the level of 56.00% and 47.85% respectively.

In conclusion, the Rang Chuet water extract contains the highest content of phenolic compounds showing the highest antioxidant activities. The main compounds in Rang Chuet water and ethanol extracts are chlorophyll *a* and chlorophyll *b* and converted to be chlorophyll derivatives after having passed through the simulated digestion model using Caco2 cell lines which could be absorbed through Caco-2 cell barrier.

School of Food Technology

Academic Year 2013

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริไฉย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะ ให้ความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยอย่างดี ยิ่งตลอดมา รวมถึงให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์ กราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านกรุณาสละเวลา ในการให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมถึงกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวชื่อ มา ณ ที่นี้ ที่ให้ความรู้ในด้านวิชาการตลอดระยะเวลาหลายปีในรั้ว มทส.

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 1, 2, 3 และ 9 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทุกท่านที่เสียสละเวลาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เพื่อใช้ในการทดลอง

ขอบคุณเพื่อนๆ ที่ร่วมเรียนระดับปริญญาโทที่ให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำเนิด ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน และส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดี ตลอดมา

ทัศนวิวรรณ ลีสัน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 รางจืด (<i>Thunbergia Laurifolia</i> Lindl.).....	4
2.2 องค์ประกอบทางเคมีของรางจืด.....	5
2.3 สรรพคุณของรางจืด.....	5
2.3.1 รางจืดกับการแก้พิษจากยาฆ่าหญ้า.....	5
2.3.2 รางจืดกับการแก้พิษจากสัตว์ที่เป็นพิษและพืชพิษ.....	6
2.3.3 รางจืดกับการสูดดมมลภาวะ ออกฤทธิ์ต้านพิษของตะกั่วต่อสมอง.....	7
2.3.4 รางจืดช่วยในการลดเล็กลูกยาบ้า.....	7
2.3.5 รางจืดกับการต้านพิษเห็ด.....	7
2.3.6 รางจืดกับการรักษาโรคเรื้อรัง.....	8
2.3.7 รางจืดกับการต้านแก้อักเสบ.....	8

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.8	ร่างจัดกับ โรคมะเร็ง.....	8
2.4	การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดรางจืด.....	9
2.5	ชีวภาพพร้อมใช้และชีวภาพการนำไปใช้ของสารสกัดรางจืด.....	12
2.5.1	แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง.....	12
2.5.2	เซลล์ไลน์ Caco-2.....	15
2.5.3	การใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง ร่วมกับเซลล์ไลน์ Caco-2.....	16
2.5.4	ชีวภาพพร้อมใช้และชีวภาพการนำไปใช้ของสารประกอบ ประกอบคลอโรฟิลล์.....	18
2.5.5	ชีวภาพพร้อมใช้และชีวภาพการนำไปใช้ของสาร ประกอบฟีนอลิก.....	23
3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
3.1	วัสดุอุปกรณ์.....	25
3.2	สารเคมี.....	27
3.3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
3.3.1	การเตรียมสารสกัดรางจืด.....	29
3.3.2	การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีของสารสกัดรางจืดโดยวิธี HPLC.....	30
3.3.3	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดรางจืด.....	31
3.3.4	การทดสอบความเป็นพิษ.....	33
3.3.5	การศึกษาชีวภาพพร้อมใช้และชีวภาพการนำไปใช้ ของสารสกัดรางจืด.....	33
3.3.6	สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์.....	36
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	37
4.1	การเตรียมสารสกัดรางจืด.....	37
4.2	การการศึกษาคุณลักษณะทางเคมีของสารสกัดรางจืดโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.1	การวิเคราะห์สารประกอบ ฟีนอลิก	37
4.2.2	การวิเคราะห์สารประกอบคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์.....	38
4.2.3	การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	40
4.3	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืด	40
4.3.1	วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity.....	41
4.3.2	วิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP).....	41
4.3.3	วิธี Scavenging activity of ABTS radical cation.....	42
4.4	การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรางจืด (Cytotoxicity Test).....	43
4.5	ศึกษาความคงตัวต่อกระบวนการย่อย (Digestive stability) ของสารออกฤทธิ์ ในสารสกัดรางจืด.....	44
4.5.1	ความคงตัวต่อกระบวนการย่อยของสารสกัดรางจืดน้ำ.....	45
4.5.2	ความคงตัวต่อกระบวนการย่อยของสารสกัดรางจืดเอทานอล.....	46
4.6	ชีวภาพการนำไปใช้ ของสารสกัดรางจืด	48
4.6.1	ความสามารถในการถูกดูดซึม (% cell uptake) ของสารสกัดรางจืดน้ำ.....	48
4.6.2	ความสามารถในการถูกดูดซึม (% cell uptake) ของสารสกัดรางจืด เอทานอล.....	51
5	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	54
	บรรณานุกรม.....	56
	ภาคผนวก	61
ก	วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและ ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	65
ข	การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	67
ค	บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.2555 (รางจืด).....	69
	ประวัติผู้เขียน.....	74

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	แสดงข้อดีและข้อเสียของการตรวจวัดชีวภาพการนำไปใช้.....13
2.2	แสดงลักษณะของเซลล์ไลน์ Caco-2.....15
2.3	%Micellarization ของแคโรทีนอยด์จากงานวิจัยต่างๆ.....21
2.4	ความคงตัวของสารโพลีฟีนอลในอาหารชนิดต่างๆ.....24
3.1	สถานะที่ใช้การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ และ แคโรทีนอยด์.....32
3.2	สถานะที่ใช้การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก.....33
4.1	%yield ของสารสกัดรังจืดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน.....37
4.2	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรังจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ.....40
4.3	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ชนิดต่างๆ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH.....41
4.4	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ชนิดต่างๆ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี FRAP.....42
4.5	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ชนิดต่างๆ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี ABTS.....43
4.6	ความเป็นพิษของสารสกัดรังจืดต่อ Caco-2 cells หลังผ่านการย่อยด้วยแบบ จำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง.....44
4.7	ปริมาณสารประกอบทางเคมีในสารสกัดรังจืดน้ำก่อนและหลังผ่านกระบวนการย่อยใน ระบบทางเดินอาหาร.....47
4.8	ปริมาณสารประกอบทางเคมีในสารสกัดรังจืดเอทานอลก่อนและ หลังผ่านกระบวนการ การย่อยในระบบทางเดินอาหาร.....47
4.9	ความสามารถในการดูดซึม (% cell uptake) ของสารสกัดรังจืดน้ำ.....49
4.10	ความสามารถในการดูดซึมในเซลล์ไลน์ Caco-2 ของสารสกัดรังจืดเอทานอล.....52

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	รางจืด (<i>Thunbergia Laurifolia</i> Lindl.)..... 4
2.2	แสดงโครงสร้างของ MTT..... 10
2.3	แสดงลักษณะของ Haemocytometer..... 12
2.4	แสดงขั้นตอนในการการศึกษาโดยใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง..... 15
2.5	การใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองร่วมกับ Caco-2 model..... 18
2.6	ปฏิกิริยาการเสื่อมสลายและเปลี่ยนเป็นสารประกอบย่อยของคลอโรฟิลล์ระหว่างการ แปรรูปอาหาร..... 19
2.7	การย่อยและการดูดซึมของคลอโรฟิลล์..... 23
4.1	โครมาโตแกรมแสดงการแยกของฟีนอลิกจากสารสกัดรางจืดน้ำด้วยวิธี HPLC..... 38
4.2	โครมาโตแกรมแสดงการแยกคลอโรฟิลล์จากสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี HPLC..... 39
4.3	ลักษณะของเซลล์ไลน์ Caco-2 ตั้งแต่เริ่มเลี้ยง (seeded cells) จนมีอายุ 21 วัน..... 50
4.4	การเกิด Micellarization ของสารสกัดเอทานอล..... 51

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ABTS	=	2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid
ALT	=	alanine transaminase
ATP	=	adenosine triphosphate
AST	=	aspartate transaminase
BHT	=	butylated hydroxytoluene
Caco-2	=	เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่
DMEM	=	dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	=	ไดเมทิลซัลฟอกไซด์
EC ₅₀	=	half maximal "Effective Concentration"
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic Acid
FBS	=	fetal bovine serum
FRAP	=	ferric reducing antioxidant power
HPLC	=	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
IC ₅₀	=	half maximal "Inhibitory Concentration"
LC ₅₀	=	lethal Concentration 50 เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการตายของสิ่งมีชีวิตร้อยละ 50
MDA	=	malondialdehyde
MTT	=	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
Mg ²⁺	=	แมกนีเซียม
NaCl	=	โซเดียมคลอไรด์
NADH	=	nicotinamide adenine dinucleotide
SCC	=	โซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลิน
SEM	=	standard error mean

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กระแสโลกาภิวัตน์ของการพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตรแบบก้าวกระโดด ทำให้เกษตรกรต้องใช้อยาฆ่าแมลงและสารเคมีปริมาณมากในการเพาะปลูกพืชต่างๆ จากการสำรวจตัวอย่างเลือดของเกษตรกรของกระทรวงสาธารณสุข พบว่า มีสารเคมีในกระแสเลือดอยู่มากกว่าร้อยละ 51 เพราะฉะนั้นจากเกษตรกร 14.1 ล้านคนจะพบ 7 ล้านกว่าคนมีสารพิษฆ่าแมลงทั้งชนิดออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) และ คาร์บาเมต (carbamate) และอาการที่เกิดขึ้นคือ วิงเวียนศีรษะ อาเจียน ปวดเมื่อย และระบบสมองเสื่อมเร็ว รวมไปถึงการพัฒนาสู่การเป็นมะเร็ง คิ้ว ภาพการณ์เช่นนี้ กระทรวงสาธารณสุขจึงรณรงค์ให้มีการใช้สมุนไพรกำจัดลั้งพิษในกระแสเลือดให้เกษตรกร ซึ่งกำจัดเป็นสมุนไพรที่มีการศึกษาวิจัยทั้งในห้องทดลองและการศึกษาในคนมากกว่า 30 ปี (สุภาภรณ์, 2554)

รางจืด ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Thunbergia laulifolia* Lindl. ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาในตำรับยาแผนโบราณมาช้านาน นิยมบริโภคในรูปของชาชง จากการศึกษาของ Kanchanapoom et al. (2002) พบว่า รางจืดมีส่วนประกอบของ iridoid glucosides, 8-epi-grandiforic and 3'-O-β-glucopyranosyl-stibericoside ซึ่งได้จากส่วนของเถารางจืด นอกจากนี้ ยังมีประกอบไปด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เช่น อะพิจินิน (apigenin), คอสโมซิน (cosmosin), delphinidin-3-5-di-O-β-D-glucoside และกรดคลอโรจินิก (chlorogenic acid) (Thongsaard and Marsden., 2002) สารประกอบทางเคมีที่สำคัญอีกอันในรางจืด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (chlorophylls) และฟีนอลิก (phenolics) (Oonsivilai et al., 2007)

นอกจากสรรพคุณในการล้างพิษ ยังมีงานวิจัยระบุว่า รางจืดช่วยลดพิษของตะกั่ว ส่งผลให้ความจำและการเรียนรู้ของหนูดีขึ้น และทำให้เซลล์ประสาทตายน้อยลง ด้วยกลไกการต้านออกซิเดชัน โดยรางจืดช่วยรักษาระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (Thongsaard et al, 2002) ใบรางจืดยังสามารถลดไข้ได้อีกด้วย (Chamreondarassame, 2003) สารสกัดรางจืดน้ำช่วยป้องกันการตายของเซลล์ตับจากพิษของแอลกอฮอล์ ทั้งในหลอดทดลองและในหนูที่ได้รับแอลกอฮอล์ โดยทำให้ค่า AST, ALT ในพลาสมาและไตรกลีเซอไรด์ในตับลดลง และลดการเปลี่ยนแปลงสภาพทางจุลพยาธิวิทยาของตับเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับแอลกอฮอล์อย่างเดียว เนื่องจากสารสกัดด้วยรางจืดน้ำช่วย

ลดการเกิด hepatic lipid peroxidation ลดระดับแอลกอฮอล์ในเลือด และเพิ่มระดับเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH) และ aldehyde dehydrogenase (ALDH) (Chanawirat et al., 2000) นอกจากนี้ ยังมีสรรพคุณทางยาของรังจืดอีกมากมาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) (Oonsivilai et al., 2008) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) (Charumanee et al., 1998) ฤทธิ์ต้านเบาหวาน (anti-diabetic effects) (Aritajat et al., 2004) ฤทธิ์ช่วยปกป้องตับจากสารพิษ (hepatoprotective activity) เช่น แอลกอฮอล์ (Pramyothin et al., 2005) มีฤทธิ์ในการขับสารพิษ (detoxifying effect) เช่น โลหะหนัก ยาเสพติด และยาปราบศัตรูพืช ช่วยฟื้นฟูอาการสมองเสื่อมในผู้ติดยาเสพติด (Thongsaard et al., 2002; 2005)

แม้ว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับประโยชน์ของรังจืดในแง่ของผลดีต่อสุขภาพอย่างมากมาย แต่ยังไม่ มีข้อมูลด้านความคงตัวต่อกระบวนการย่อยของมนุษย์ ความสามารถในการดูดซึมและการนำไปใช้ ประโยชน์ทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์ในรังจืด ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการย่อย การดูดซึม และเมตา โบลิซึมของ คลอโรฟิลล์และสารประกอบ คลอโรฟิลล์ รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิก โดยมนุษย์ยังมี น้อย ดังนั้นข้อมูลเกี่ยวกับชีวภาพพร้อมใช้ (bioavailability) ของรังจืด รวมถึงความเข้าใจเกี่ยวกับ ระดับของการถูกทำลายหรือสูญเสียสารสำคัญในรังจืด คือ คลอโรฟิลล์และสารประกอบฟีนอลิก เมื่อผ่านกระบวนการย่อยอาหาร มนุษย์จึงเป็นสิ่งสำคัญ! ด้านชีวภาพการนำไปใช้ (bioaccessibility) ของสารสกัดรังจืด

ในการศึกษาเกี่ยวกับความคงตัวต่อกระบวนการย่อยของมนุษย์ การคงอยู่ทางชีวภาพและการ นำไปใช้ทางชีวภาพของสารต่างๆ นิยมใช้แบบจำลองการย่อยในทางเดินอาหารของมนุษย์ควบคู่ไป กับการทดสอบการดูดซึมโดยใช้เซลล์ไลน์ Caco-2 เนื่องจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นเซลล์ที่มีลักษณะ ใกล้เคียงกับเซลล์ลำไส้เล็กของมนุษย์ (Sambuy et al., 2005)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสารประกอบคลอโรฟิลล์, แคโรทีนอยด์และสารประกอบของโพลีฟีนอล ในสารสกัดรังจืด

1.2.2 ความคงตัวต่อการย่อย (digestive stability) และความสามารถในการถูกดูดซึมของ สารออกฤทธิ์ในสารสกัดรังจืด

1.2.3 เพื่อศึกษาชีวภาพพร้อมใช้ (bioavailability) ของสารประกอบ โพลีฟีนอล, คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ในสารสกัดรังจืด

1.2.4 เพื่อศึกษาชีวภาพการนำไปใช้ (bioaccessibility) ของสารประกอบ โพลีฟีนอล, คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ในสารสกัดรังจืด

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

สารออกฤทธิ์สำคัญในสารสกัดรางจืดสามารถหลงเหลือและมีความคงตัวของเมื่อผ่านแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองและพร้อมสำหรับการดูดซึมของ เซลล์ไลน์ Caco-2 สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทางชีวภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการกำหนดขนาดการใช้รางจืดในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประสิทธิภาพในแง่ของสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ได้

1.4. ขอบเขตของการวิจัย

- 1.4.1 การเตรียมสารสกัดรางจืด จำนวน 3 ชนิดคือ สารสกัดน้ำ อะซีโตน และเอทานอล
- 1.4.2 ศึกษาคุณลักษณะของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดรางจืด
- 1.4.3 ทำการย่อยสารสกัดรางจืดโดยใช้ แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง
- 1.4.4 ศึกษาความคงตัวต่อการย่อย (digestive stability)
- 1.4.5 ศึกษาการดูดซึมของสารสกัดรางจืดเมื่อเข้าสู่เซลล์ไลน์ Caco-2

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

- 1.5.1 เตรียมสารสกัดรางจืด (Oonsivilai et al., 2007)
- 1.5.2 ศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ในสารสกัดรางจืด (Oonsivilai et al., 2007)
- 1.5.3 ศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu method (Prior et al., 2007)
- 1.5.4 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, FRAP, และ ABTS (Bae et al., 2007)
- 1.5.5 การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีของสารสกัดรางจืด โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Oonsivilai et al., 2007)
- 1.5.6 ชีวภาพพร้อมใช้และชีวภาพการนำไปใช้ของสารสกัดรางจืด (ตามวิธีของ Ferruzzi et al., 2001)

1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.6.1. สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพื่อประกอบการบริโภคน้ำในขนาดที่ถูกต้องในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประสิทธิภาพในแง่ของสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ได้
- 1.6.2. สามารถนำไปใช้เผยแพร่ให้กับกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ผลิตและจำหน่ายสมุนไพรรางจืดในรูปแบบแคปซูลและชา

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 รวงจีด (*Thunbergia Laurifolia* Lindl.)

รวงจีดพืชในวงศ์ Acanthaceae เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่รู้จักกันดีและใช้แพร่หลายในวงการแพทย์แผนโบราณ (ชะลอ 2519, เส็งยม 2508, วุฒิ 2520) รวงจีดเป็นไม้เถาที่พบตามชายป่าดิบ มีลักษณะของเถากลมเป็นข้อปล้อง มีสีเขียว เป็นไม้ใบเดี่ยวออกตรงข้ามกันเป็นคู่ๆ และขนาดของใบจะไล่กันขึ้นไปตั้งแต่ขนาดใหญ่ตรงโคนก้านไปหาขนาดเล็กตรงปลายก้านใบ ใบสีเขียวผิวเกลี้ยง ลักษณะเป็นรูปหัวใจ ตรงโคนเว้า ปลายใบเป็นติ่งแหลม กว้างประมาณ 4-5 เซนติเมตร ยาว 8-10 เซนติเมตรออกดอกเป็นช่อ ช่อหนึ่ง ๆ จะมีอยู่ 3-4 ดอก ลักษณะของดอกจะมีสีม่วง เป็นกรวยสั้น ๆ หลอดกรวยยาวประมาณ 1 เซนติเมตร (พนิดา, 2542)



รูปที่ 2.1 รวงจีด (*Thunbergia Laurifolia* Lindl.)

แหล่งที่มา: สุภาภรณ์ (2554)

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของรางจืด

Purima (1978) ได้ศึกษาสารเคมีในรางจืดพบว่าส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ อะพิจินิน, cosmodin และ delphinidin-3,5-di-O- β -D-glucoside วิริยุทธ (2522) ได้วิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสกัดน้ำใบรางจืดพบว่ามี กรดอะมิโน 4 ชนิด คือ เมไทโอนีน เซอริน ไกลซีน และ กรดอะมิโนอื่น ๆ และเมื่อเตรียมสารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ พบสเตียรอยด์ จำนวน 8 ชนิด และ แคลโรทีนอยด์ จำนวน 1 ชนิด Oonsivilai et al. (2007) ได้ศึกษาสารประกอบทางเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดรางจืดน้ำ อะซีโตน และเอทานอล โดย High performance liquid chromatography พบว่า กรดคาเฟอิก และ อะพิจินิน เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัดน้ำ ขณะที่ สารประกอบคลอโรฟิลล์เอ, คลอโรฟิลล์บี, ฟิโอฟราบายด์เอ ฟิโอฟิตินเอ และลูทีน เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัดอะซีโตนและสารสกัดเอทานอล

2.3 สรรพคุณของรางจืด

โดยการศึกษาทางเภสัชวิทยาของรางจืดของพานิช (2523) พบว่ารางจืดสามารถช่วยชีวิตแมวที่ถูกวางยาพิษได้ จึงเป็นแรงบันดาลใจให้ทำการศึกษาวิจัยรางจืดในการแก้พิษสารกำจัดศัตรูพืชตั้งแต่ พ.ศ 2522 - 2523 โดยเริ่มจากสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เช่น โพลิดอล พาราไทออน ต่อมาการศึกษาพบว่ารางจืดยังสามารถลดพิษของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บอเนต เช่น เมโทรมิด เป็นต้น จากการศึกษาวิจัยการต้านฤทธิ์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชของรางจืดนั้นอาจเกิดจากหลายกลไก เช่น สารสกัดรางจืดทำให้ระดับเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสเพิ่มขึ้น หรือลดการยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้ทำหน้าที่ทำลายโคลีนที่เป็นสารสื่อประสาท ที่ทำให้เกิดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บอเนต จะไปทำลายเอนไซม์ตัวนี้ และเกิดการสะสมของโคลีนทำให้กล้ามเนื้อหดเกร็ง นำสู่อาการชัก จากการศึกษาพบว่ารางจืดไปเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ดังกล่าว (กนกวรรณ, 2543)

2.3.1 รางจืดกับการแก้พิษจากยาฆ่าหญ้า

พบว่าเมื่อป้อนสารสกัดจากใบรางจืด 1 กรัม/กิโลกรัม 2 ครั้ง/วัน ครั้งแรกให้หลังจากฉีดพาราไธออนในหนูขาว 5 นาที ครั้งที่สองให้ห่างจากครั้งแรก 8 ชั่วโมง ใน 1 วัน และ 3 วัน (กลุ่มทดลอง) พบว่าระดับพลาสมา cholinesterase เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมที่เกิดพิษจากพาราไธออน และป้อนด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (สกุลรัตน์, 2544)

ยาฆ่าหญ้าจำพวกพาราควอต นับเป็นสารเคมีที่มีพิษร้ายแรงต่อร่างกายมนุษย์มากที่สุดชนิดหนึ่งเนื่องจากในขนาดกินประมาณ 1 ช้อนโต๊ะ ก็สามารถทำให้คนตายได้ โดยสารตัวนี้จะไปทำให้เกิดการสร้างออกซิเจนที่ไม่เสถียรขึ้นอย่างมาก ออกซิเจนเหล่านี้จะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการออกซิเดชันของไขมันที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เซลล์ตาย พิษของพาราควอตจะเห็นชัดที่สุด

ในปอด เพราะปอดเป็นบริเวณที่มีออกซิเจนมากที่สุด ซึ่งพาราควอตจะทำให้เนื้อเยื่อปอดถูกทำลาย จนไม่สามารถแลกเปลี่ยนออกซิเจนได้ และเสียชีวิตในที่สุด จากรายงานผู้ป่วยของโรงพยาบาลเจ้าพระยามรราช จังหวัดสุพรรณบุรี เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 3 ปี ระหว่าง พ.ศ. 2533 - 2535 มีผู้ป่วยที่กินพาราควอตมาที่โรงพยาบาล 64 ราย พบว่ามีผู้ป่วยรอดชีวิต 33 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับย้อนหลังกับการรักษาในช่วง พ.ศ. 2531-2532 มีผู้ป่วยที่กินพาราควอต 11 รายพบว่าเสียชีวิตทุกราย ซึ่งตัวเลขของโรงพยาบาลศิริราชที่มีการรักษาพิษพาราควอตเช่นเดียวกัน มีอัตราการตายประมาณร้อยละ 80 แต่การรักษาพิษพาราควอตนั้นไม่ได้ให้แต่รางจืดอย่างเดียว แต่จะมีการทำให้ผู้ป่วยอาเจียนออกมาก่อน แล้วล้างท้องด้วยฟูลเลอร์สเอิร์ท (Fuller's earth) และทำให้ผู้ป่วยปัสสาวะออกมามาก ๆ ให้แอนติออกซิแดนซ์หรือสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการให้วิตามินซีปริมาณสูง ๆ และสตีรอยด์ รวมทั้งการรักษาแบบประคับประคองอื่น ๆ ให้ยาต้มรางจืด วิชเตรียมคือนำใบแห้งหนัก 300 กรัม ใส่ในน้ำสะอาด 1 ลิตร ต้มในหม้อดินโดยใช้ไฟกลางเคี่ยวนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ให้ผู้ป่วยดื่มหรือให้ทาง Nasogastric tube ครั้งละ 200 มิลลิลิตร ทุก 2 ชั่วโมง ตลอดเวลาที่อยู่โรงพยาบาลแม้ว่ารายงานนี้ไม่ถือเป็นงานวิจัยแต่เป็นข้อมูลที่มีประโยชน์มาก พ.ศ. 2543 (สุภาพรณ, 2554) มีรายงานการศึกษาสัตว์ทดลองเกี่ยวกับการต้านพิษพาราควอตของสารสกัดด้วยน้ำของใบรางจืด พบว่าสามารถทำให้อัตราการตายของหนูทดลองลดลง รวมทั้งพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดรางจืดมีระดับพลาสมา malondialdehyde (MDA) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าสารสกัดใบรางจืดมีฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation และฤทธิ์นี้เป็นกลไกการออกฤทธิ์ต้านพิษพาราควอตกลไกหนึ่งของรางจืด รวมทั้งรางจืดยังไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่เรียกว่า quinone oxidoreductase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารที่เราได้รับเข้าไปในร่างกาย (สกุลรัตน์, 2543)

2.3.2 รางจืดกับการแก้พิษจากสัตว์ที่เป็นพิษและพืชพิษ

ใช้แก้พิษแมงดาทะเลเป็นอีกหนึ่งรายงานของการใช้รางจืดแก้พิษ เมื่อวันที่ 4 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2522 ที่โรงพยาบาลชุมพรเขตอุดมศักดิ์ มีครอบครัวหนึ่ง 4 คนที่กินไข่แมงดาทะเล 2 ราย มีอาการรุนแรงจนหมดสติต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ ซึ่งสารพิษที่อยู่ในแมงดาทะเล คือ เทโตรโดท็อกซิน (Tetrodotoxin) สารนี้จะพบในแมงดาทะเลและปลาปักเป้า ซึ่งมีพิษทำให้ผู้ป่วยอาจถึงตายได้ ความรุนแรงของอาการพิษที่เกิดขึ้น ขึ้นอยู่กับปริมาณไข่แมงดาทะเลที่ได้รับ เริ่มแสดงอาการตั้งแต่ 40 นาที ถึง 4 ชั่วโมง ทุกรายมีอาการชารอบปาก คลื่นไส้ อาเจียน อาการชาจะลามไปยังกล้ามเนื้อต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายคือทำให้หายใจไม่ได้ อาการรุนแรง หมดสติ ต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ วิธีการรักษาปัจจุบันไม่มีวิธีเฉพาะ ไม่มีสารแก้พิษโดยเฉพาะ ต้องรักษาแบบประคับประคองจนผู้ป่วยขับเอาสารนี้ออกจากร่างกายให้หมดแพทย์ผู้รักษาใช้รางจืดจากการร้องขอของญาติ เมื่อกรอกใส่สายยางลงไป 40 นาที อาการดีขึ้น ซึ่งแพทย์ผู้รักษารู้สึกประทับใจกับรางจืดมากและบอกว่าจังหวัดที่

ชายทะเลปีหนึ่งจะมีคนตายจากพิษแมงดาทะเลหรือปลาปักเป้าทุกปี ถ้าทุกโรงพยาบาลสามารถปลูกต้นรางจืดและใช้กับผู้ป่วยของตัวเองจะช่วยให้ไม่มีผู้ป่วยเสียชีวิตเพิ่มขึ้น(สุภาภรณ์, 2554)

2.3.3 รางจืดกับการสู้กับมลภาวะ ออกฤทธิ์ด้านพิษของตะกั่วต่อสมอง

ตะกั่วเป็นมลพิษที่เกิดจากการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ คนที่อาศัยอยู่ในเมืองใหญ่ ๆ ที่มีรถติด มีโอกาสได้รับสารตะกั่วสูงกว่าคนทั่วไป พิษตะกั่วต่อร่างกายมีอยู่หลายระบบ ที่สำคัญคือสมอง เนื่องจากตะกั่วจะไปสะสมอยู่ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ มีงานวิจัยว่ารางจืดแม้จะไม่ได้ช่วยลดระดับตะกั่วในเลือดของหนูที่เราให้ตะกั่วเข้าไป แต่ไปช่วยลดพิษของตะกั่วต่อความจำและการเรียนรู้ของหนู และทำให้เซลล์ประสาทตายน้อยลง 6 กลไกการต้านออกซิเดชัน โดยรางจืดช่วยรักษาระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (Ruangyuttikarn, 2013)

2.3.4 รางจืดช่วยในการลดเลิกยาบ้า

(Thongsaard et al., 2002) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดรางจืดต่อเซลล์สมอง พบว่ารางจืดมีฤทธิ์ต่อระบบประสาทคล้ายกับสารเสพติดแอมเฟตามีน และโคเคน โดยทั่วไปเพิ่มการหลั่ง

โดพามีน ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่หลั่งมากในขณะที่ผู้ป่วยได้รับสารแอมเฟตามีน รวมทั้งไปเพิ่ม activity ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน nucleus accumbens, globus pallidus, amygdala, frontal cortex , caudate putamen และ hippocampus ที่เกี่ยวข้องกับ reward และ locomotor behaviour ทำให้คาดว่าในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดรางจืดอาจเกิดความพึง เช่นเดียวกับการรับยาเสพติด หากนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยจะทำให้ผู้ป่วยไม่ต้องทรมานทรมานมาก จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีการรักษาด้วยสารสกัดสมุนไพรได้ผล

2.3.5 รางจืดกับการต้านพิษเหล้า

(Pramyothin et al., 2005) ได้ศึกษาวิจัยฤทธิ์ของรางจืดในการต้านพิษแอลกอฮอล์ต่อตับ พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของรางจืดช่วย ป้องกันการตายของเซลล์ตับจากพิษของแอลกอฮอล์ ทั้งในหลอดทดลองและในหนูแรทที่ได้รับแอลกอฮอล์ โดยทำให้ค่า AST,ALT ในพลาสมาและไตรกลีเซอไรด์ในระดับลดลง และลดการเปลี่ยนแปลงสภาพทางจุลพยาธิวิทยาของตับเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับแอลกอฮอล์อย่างเดียวน เนื่องจากสารสกัดด้วยน้ำของรางจืดช่วยลดการเกิด hepatic lipid peroxidation ลดระดับแอลกอฮอล์ในเลือด และเพิ่มระดับเอนไซม์ alcohol dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase

Chanawirat, Toshulkao, Temcharoen, และ Glinsukon. (2000) ได้ศึกษาฤทธิ์ของรางจืดในการป้องกันการทำลายตับจากผลแอลกอฮอล์ในหนูถีบจักร พบว่าส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากสารสกัดรางจืดน้ำช่วยลดการเกิด hepatic lipid peroxidation ลดระดับแอลกอฮอล์ในเลือด และเพิ่มระดับเอนไซม์ alcohol dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase

สกุรัตน์ (2548) ได้ศึกษาฤทธิ์ของรังสีต่ออาการขาดเหงื่อ พบว่าสารสกัดรังสีให้ผลลดภาวะซึมเศร้าและทำให้พฤติกรรมที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหวของหนูเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น แต่ไม่มีผลลดความวิตกกังวล โดยสารสกัดรังสีช่วยลดการถูกทำลายเซลล์ประสาทของหนูเนื่องจากขาดเหงื่อในสมองส่วน mesolimbic dopaminergic system โดยเฉพาะที่บริเวณ nucleus accumbens และ ventral tegmental area

2.3.6 รังสีกับการรักษาโรคเรื้อรัง

การที่มีหมอยาพื้นบ้านจำนวนหนึ่งใช้รังสีในการคุมเบาหวานและความดัน ซึ่งมีการทดลองที่สนับสนุนการใช้ดังกล่าวคือ ในหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำต้มใบรังสีทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนน้ำคั้นใบรังสีสดในขนาด 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.ที่ให้หนูเบาหวานดื่มแทนน้ำนาน 12 วัน ไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด นอกจากนี้ ยังมีการทดลองพบว่า การให้สารสกัดด้วยน้ำของใบรังสีมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด และทำให้เบต้าเซลล์ของตับอ่อนฟื้นฟูขึ้นบ้างแม้จะไม่สมบูรณ์ (Aritajat et al., 2004) ในเรื่องของฤทธิ์ลดความดันนั้นพบว่าสกัดด้วยน้ำของใบรังสีแห้งมีผลทำให้ความดันโลหิตของหนูแรทลดลง โดยกลไกการออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งอาจผ่าน Cholinergic receptor และทำให้หลอดเลือดแดงคลายตัว

2.3.7 รังสีกับการต้านแก้อักเสบ

รังสีสามารถรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น ผด ผื่นคัน แมลงกัดต่อย เริม งูสวัด มีการศึกษาว่ารังสีมีฤทธิ์ต้านการอักเสบสูงกว่ามังคุดประมาณ 2 เท่า (ทดสอบด้วยวิธี Carrageenan induced paw edema) ในหนูถีบจักรและยังมีความปลอดภัยสูงกว่าอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดรังสีในรูปแบบของครีมสามารถลดการอักเสบได้ดีเท่ากับสเตียรอยด์ครีม (Charumanee et al., 1998)

สุพรและคณะ (2541) ได้พัฒนาสารสกัดใบรังสีเป็นยาทาภายนอกสำหรับต้านการอักเสบ เพราะสามารถต้านการอักเสบในหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.3.8 รังสีกับโรคมะเร็ง

รังสียังมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดยมีการศึกษาฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ กล่าวคือ สารใด ๆ มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์มีศักยภาพสูงสามารถก่อมะเร็งได้ แต่รังสีมีฤทธิ์ด้านไม่ให้สารนั้นออกฤทธิ์ มีการศึกษาโดยให้หนูกินสารสกัดของกวาวเครือซึ่งกวาวเครือจะไปมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวและการสร้างนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง กล่าวคือ นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงจะเป็นก้อนใหญ่ขึ้นและมีการแบ่งตัว นั่นคือกวาวเครือไปทำให้เกิด micronuclei ของเม็ดเลือดแดงเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ แต่ถ้าให้สัตว์ทดลองกินรังสีร่วมด้วย พบว่าสามารถลดการเกิด micronuclei ได้ ซึ่งทั้งรังสีแบบสดและแบบแห้งสามารถใช้ได้ผลเช่นกัน นับเป็นข้อดีอีกข้อหนึ่งของรังสี โดยพบว่าสารออกฤทธิ์

อาจเป็นกรดฟีนอลิก ได้แก่ กรดคาเฟอิก อะซิติก และสารกลุ่มคลอโรฟิลล์ ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ, คลอโรฟิลล์บี, ฟีโอโพรบายด์เอ และ ฟีโอไฟดิน เอ ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมาก

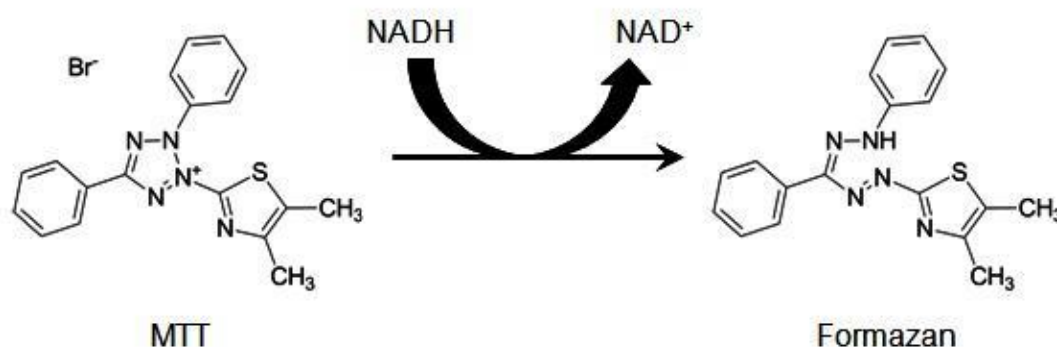
จากการศึกษาของ Oonsivilai et al. (2007) พบว่าสารสกัดอะซีโตน สารสกัดเอทานอล และ สารสกัดน้ำของรางจืด พบว่ามีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ phase II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ ระบบ detoxification ของร่างกายและยังพบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ในการเป็นสารต่อต้านการก่อ กลายพันธุ์ใน *Salmonella typhimurium* TA98 และ TA100 ซึ่งผลการศึกษา สามารถอธิบายการใช้ รางจืดในการแก้พิษ เบื่อเมา ในการใช้สมุนไพรชนิดนี้

ศิริวรรณ (2522) พบว่า สารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Aerobacteraerogens* ได้ในขณะที่ Kongyingyos et al. (1990) ใช้น้ำสกัดใบรางจืดในการยับยั้งการ เจริญของไวรัส herpes simplex type 1 และ นอกจากนี้ยังมีการทดสอบยืนยันว่าน้ำสกัดใบรางจืด สามารถลดอัตราการตายของหนูขาวเนื่องจากพิษของสารกำจัดแมลงได้ (พาณีและชัชวดี, 2523 และ วิรวรรณ, 2523) และยังสามารถลดอุณหภูมิในหนูขาวได้ด้วย (บุษบง, 2521)

พาณีและชัชวดี (2523) กล่าวว่าไว้ว่ารางจืดมีรสเย็นใช้ปรุงเป็นยาเขียวถอนพิษไข้ แก้เบื่อเมา แก้อ่อนใน กระหายน้ำ และใช้รักษาผู้ป่วยที่ถูกพิษต่าง ๆ เช่น พิษสุรา เห็ดเมา พิษเนื่องจากอาการแพ้ หรือรับประทานสัตว์ที่มีพิษ รวมทั้งใช้รักษาผู้ที่ได้รับสารเคมีที่มีพิษร้ายแรง เช่น สารหนู สตรีกนิน และสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ

2.4 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดรางจืด

การทดสอบการความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity Test) มีวิธีการตรวจนับเซลล์มีชีวิตได้ หลายวิธี เช่น การนับเซลล์ด้วย haemocytometer chamber , electronic particle counters, colony counting, radionuclide incorporation assay และ colorimetric assay (Twentyman, P.R. and Luscombe, M.,1987) colorimetric MTT assay ค้นพบโดย Mormonn ในปี ค.ศ. 1983 (Mossmann, T. 1983) เป็นวิธีการตรวจสอบการมีชีวิตและการเจริญของเซลล์ โดยดูผลการใช้เอนไซม์ succinate-dehydrogenase ใน cytochrome b และ c จากไมโทคอนเดรียย่อยสลายสาร tetrazolium salt MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, diphenyl tetrazolium bromide] ซึ่งเป็นสารที่ละลายในน้ำ ทำให้เกิด สาร formazan ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกสีฟ้า (De Robertis, E.D.P., Saez, F.A. and De Robertis, E.M.F. 1975) สารนี้ละลายใน organic solvent ตรวจวัดสีด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบอัตโนมัติ ซึ่งเป็นวิธีการที่สะดวก ถูกต้อง รวดเร็ว เสียค่าใช้จ่ายน้อย และหลีกเลี่ยงการใช้สารรังสี



รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของ MTT

แหล่งที่มา: Marshall et al. (1995)

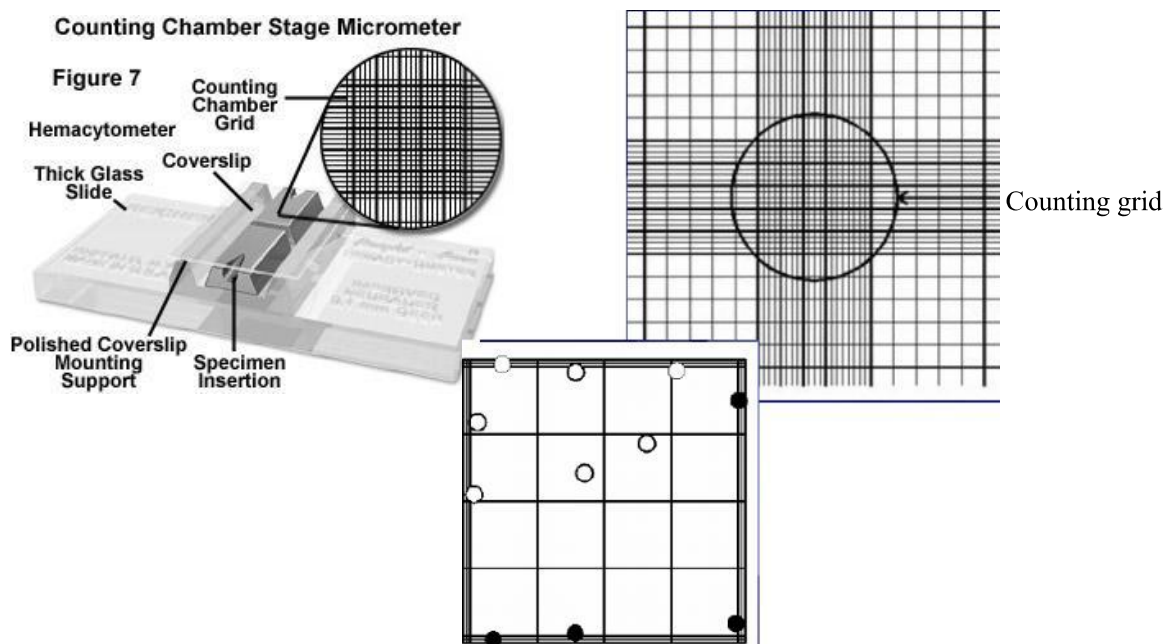
ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ MTT colorimetric assay มีมากมาย เช่น ใช้ในการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต แทนการนับเซลล์โดยใช้ haemocytometer และกล้องจุลทรรศน์ (Nomura et al., 1996)

การนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer

วิธีการที่นิยมใช้ในการนับจำนวนเซลล์นั้น มีหลายวิธี เช่น การใช้ haemocytometer หรือ counting chamber มีลักษณะดังรูปที่ 2.3 แบ่งเป็น 2 chamber บนและล่าง แต่ละ chamber มีขนาดกว้าง x ยาว = 3 มิลลิเมตร x 3 มิลลิเมตร แต่ละ chamber แบ่งเป็น 9 ช่องใหญ่ เมื่อปิดด้วย cover slip แต่ละช่องมีปริมาตรเท่ากับ ความกว้าง x ยาว x ลึก = 1 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร x 0.1 มิลลิเมตร = 0.1 ตารางมิลลิเมตร หรือ 1×10^{-4} มิลลิลิตร โดย cover glass ที่ใช้ จะถูกออกแบบเป็นพิเศษ ซึ่งจะมีลักษณะที่บางมากกว่า cover glass แบบธรรมดา

ในการรายงานความเป็นพิษ มีดัชนีบ่งชี้ความเป็นพิษจากตัวทดสอบดังต่อไปนี้ คือ IC_{50} หรือ EC_{50}

IC_{50} (half maximal "Inhibitory Concentration") หรือ คือหน่วยวัดปริมาณและความเข้มข้นของสารหรือตัวยาที่ต้องใช้ เพื่อชะลอ ปฏิกริยาทางเคมีหรือชีวเคมี ของร่างกาย เชื้อโรค หรืออนุโมลอิสระลงไปถึงเหลือ 50% ระหว่างระดับสูงสุดกับระดับที่ต่ำสุด ตัวอย่างของการหาค่า IC_{50} เช่น เริ่มต้นไม่ใช้ตัวยาใด ๆ ปฏิกริยาของอนุโมลอิสระ อยู่ที่ระดับ 100% เมื่อเริ่มใช้ตัวยา ปฏิกริยาของอนุโมลอิสระ มีการลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณหรือความเข้มข้นของสารมากขึ้นไปเรื่อย ๆ จนกระทั่ง ปฏิกริยาของอนุโมลอิสระที่วัดได้ เหลืออยู่เพียงแค่ 50% ระหว่างระดับสูงสุด 100% กับระดับต่ำสุดคือ ค่า IC_{50}



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะของ haemacytometer (A), ภาพของแต่ละ chamber เมื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์(B)

EC_{50} (half maximal "Effective Concentration") คือ ค่าความเข้มข้นที่ในการออกฤทธิ์ได้ 50% จากปริมาณและความเข้มข้นของสารหรือตัวยาที่ต้องใช้ เพื่อป้องกันหรือรักษาโรคให้ได้ผล 50% ระหว่างระดับฐานต่ำสุดคือไม่ได้ใช้ตัวยາเลย (0%) จนถึงระดับอิ่มตัวสูงสุดที่ใช้ตัวยามากที่สุดในระยะเวลายาวนาน ตามความจำเป็นที่วัดได้ ตัวอย่างของการหาค่า EC_{50} เช่น การไม่ใช้ตัวยาเลย (0%) ท่ามกลางผู้ป่วย 100 คน เมื่อเริ่มให้ยา ก็มีผลรักษาที่ดีขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งมี 50 คนที่หายโรคนั้น ความเข้มข้นและปริมาณของตัวยาที่ใช้ในกรณีนั้น คือ ค่า EC_{50}

IC_{50} และ EC_{50} มีสิ่งที่คล้ายกันคือ ทั้งสองคือค่าของความเข้มข้นของตัวยาที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ผลครึ่งทางระหว่างการไม่ได้ใช้ตัวยา และการใช้ตัวยาจนถึงจุดอิ่มตัวที่แตกต่างกันคือ IC_{50} วัดจากปฏิกิริยาระดับสูงสุด ลดลงมาเหลือ ครึ่งระดับคือ 50% ของปฏิกิริยาเดิม ส่วน EC_{50} วัดจากความสัมฤทธิ์ผลต่ำสุด ขึ้นไปเรื่อย ๆ จนได้ผล 50%

2.5 ชีวภาพพร้อมใช้และชีวภาพการนำไปใช้ของสารสกัดรางจืด

ชีวภาพการนำไปใช้ (bioaccessibility) หมายถึง อัตราที่สารถูกปลดปล่อยออกจาก matrix ใด ๆ ในทางเดินอาหาร และพร้อมสำหรับการดูดซึมโดยลำไส้เล็ก

ชีวภาพพร้อมใช้ (bioavailability) หมายถึง ระดับหรืออัตราที่สารถูกดูดซึม หรือพร้อมใช้ ณ ตำแหน่งออกฤทธิ์ทางสรีรวิทยา หลังจากให้สารนั้น โดยจะรวมไปถึงการดูดซึม การเผาผลาญ การกระจายตัวในเนื้อเยื่อ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Fernández-García et al.,2009)

วิธีการในการศึกษาชีวภาพพร้อมใช้ (bioavailability) ของสารอาหารและสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ สามารถศึกษาได้ทั้งในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

2.5.1 แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (In vitro simulated digestion models)

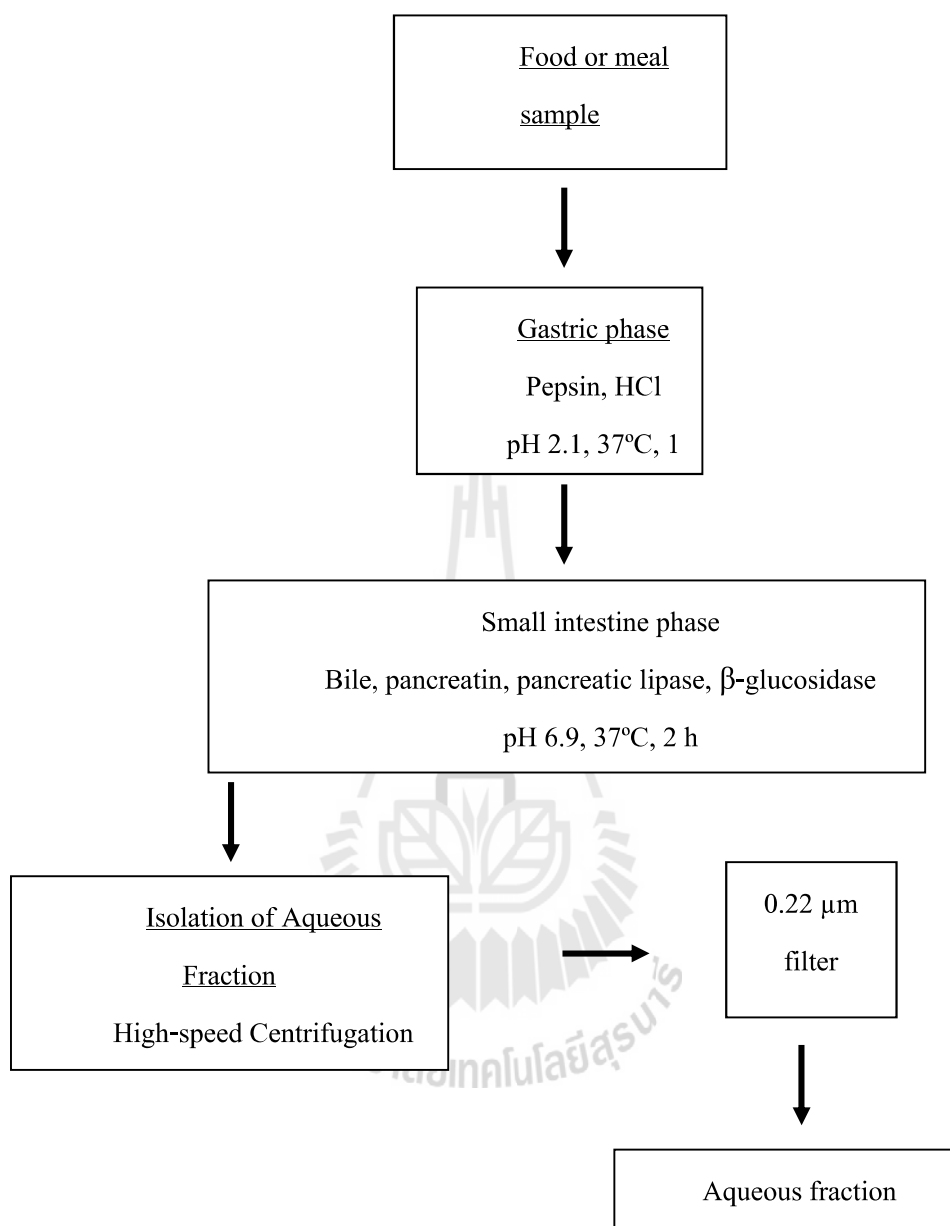
การหาปริมาณชีวภาพการนำไปใช้ (bioaccessibility) เป็นการศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยของสารออกฤทธิ์ (bioactive) นิยมใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (*in vitro* simulated digestion models) ที่เป็นการประยุกต์และเลียนแบบระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ จึงถูกนำมาใช้โดยจะให้ความสำคัญต่อระบบทางเดินอาหารที่เกี่ยวข้องกับการย่อย และการดูดซึมสารอาหาร อวัยวะที่ถูกเลียนแบบในแบบจำลองนี้คือ ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก โดยจะเลียนแบบทั้งที่เป็นส่วนของเหลวต่าง ๆ ที่อยู่ในแต่ละอวัยวะ เช่น น้ำลาย น้ำย่อย ค่าความเป็นกรด – ด่าง และระยะเวลาที่อาหารอยู่ในแต่ละอวัยวะ ซึ่งแบบจำลองนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่าง ๆ เช่น โพรตีน แร่ธาตุ สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น เพื่อที่จะพิจารณาถึงความเสถียรของสารเมื่อผ่านกระเพาะย่อยอาหาร การขนส่งสารไปยังลำไส้ และกระบวนการเผาผลาญที่เกิดขึ้นของสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตาม แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองจัดเป็นสภาวะที่คงที่ ซึ่งในสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในกระบวนการย่อยอาหารในมนุษย์นั้นเป็นระบบที่มีการเคลื่อนที่ ซึ่งไม่สามารถที่จะแสดงให้เห็นถึงผลของปัจจัยอื่น ๆ ดังเช่น ในการศึกษาด้วย *in vivo* ได้ เช่น การบีบรัดของลำไส้ การผสม เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 แสดงข้อดีและข้อเสียของการตรวจวัดชีวภาพการนำไปใช้ (bioaccessibility) ด้วยวิธี *in vivo* และ *in vitro* ของสารอาหารและสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ

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 - ข้อมูลอ้างอิงมาตรฐานในการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการศึกษาและการทดลองมีค่อนข้างน้อย - ต้องมีการพิจารณาเรื่องงบประมาณและหลักทางศีลธรรม
<p>ในหลอดทดลอง (<i>in vitro</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - รวดเร็ว - ให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของกลไกในการขนส่งสารได้ - สามารถที่จะทดสอบข้อมูลที่ได้เทียบกับอ้างอิงได้ - ราคาถูกและเป็นวิธีที่สะดวก 	<ul style="list-style-type: none"> - การแปลผลไปสู่ <i>in vivo</i> ความคงอยู่ทางชีวภาพ ค่อนข้างยากได้ - สภาวะแวดล้อมภายในลำไส้เป็นกลไกที่มีการเคลื่อนที่ ซึ่งไม่สามารถที่จะศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง - ผลของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารและกลไกการเผาผลาญในตับไม่ถูกนำมาพิจารณาด้วย

แหล่งที่มา: Fernández-García et al. (2009)

ในการศึกษาโดยใช้แบบจำลองในหลอดทดลอง จะเลือกใช้ปัจจัยทางด้านสรีระวิทยาที่สามารถกระทำได้ในระหว่างการย่อยของกระเพาะอาหารและลำไส้ ซึ่งสารที่ได้จากการย่อยโดยใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง เรียกว่า digesta และเมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของ aqueous fraction (รูปที่ 2.4) แล้วนำไปกรอง จะได้ส่วนที่เป็น aqueous fraction ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์หองค์ประกอบต่อไป (Garrett et al., 1999)



รูปที่ 2.4 แสดงขั้นตอนในการการศึกษาโดยใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง
แหล่งที่มา: Garrett et al. (1999)

2.5.2 เซลล์ไลน์ Caco-2

เซลล์ไลน์ Caco-2 เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ที่มีการแสดงออกและลักษณะคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อผิวปกติ ซึ่งลักษณะต่าง ๆ ของเซลล์ไลน์ Caco-2 แสดงในตารางที่ 2.2 เซลล์เหล่านี้จะมีความแตกต่างเมื่อ monolayer มาบรรจบกัน ซึ่งวิธีการดูแลเซลล์เหล่านี้จะใช้สภาวะแบบเดียวกันกับการเลี้ยงเซลล์ทั่วไปในระหว่างช่วง phase แรกของเซลล์จะปล่อย colonocyte และ enterocyte-specific protein การ expression ของ colonocyte ทำให้ลักษณะทางชีวเคมีของ enterocyte เปลี่ยนแปลงไปซึ่งลักษณะของ monolayer จะมีลักษณะของเซลล์ที่เกิดการจัดเรียงกัน โดยมี tight junction และบริเวณขีดยิงของเซลล์ ซึ่งจะแยกระหว่าง apical microvillar และ basolateral membrane

ตารางที่ 2.2 แสดงลักษณะของเซลล์ไลน์ Caco-2

ลักษณะของเซลล์ไลน์ Caco-2

1. ได้จากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่
2. ลักษณะการแสดงออกคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อผิวปกติ
3. ส่วนลักษณะที่แตกต่าง มีได้ดังนี้
 - 3.1 Tight junction ระหว่างเซลล์
 - 3.2 Basolateral Na^+ , K^+ -ATPase
 - 3.3 การเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ drug toxification
 - 3.4 บริเวณ apical brush border surface เต็มไปด้วย hydrolytic enzyme
 - 3.5 สามารถสังเคราะห์และทำให้เกิดการหลั่งของ chylomicrons ได้

แหล่งที่มา: Muangnoi (2007)

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 อีกทั้งสามารถที่จะเหนี่ยวนำ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ detoxification ของ phase I, phase II และ เอนไซม์ ในกลุ่ม ATP-dependent ของ phase III อีกด้วย (Sambuy et al., 2005)

ซึ่งความสามารถในการดูดซึมและการขนส่งสารของ Caco-2 monolayer ในมนุษย์นี้ทำให้มีการนำ เซลล์ไลน์ Caco-2 ไปใช้เป็นแบบจำลองในการดูดซึมและการเผาผลาญของยาหรือสารออกฤทธิ์ (bioactive) ชนิดต่าง ๆ อย่างกว้างขวางส่วนลักษณะของเซลล์ไลน์ Caco-2 ที่แตกต่างจากเซลล์ลำไส้เล็กปกติ คือ ประการแรก เซลล์ไลน์ Caco-2 ได้จากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ซึ่งไม่ใช่เซลล์ปกติ ประการที่สอง เซลล์ไลน์ Caco-2 เป็นเซลล์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมและการแสดงออกแตกต่างกัน ประการที่สาม trans-epithelial จะมีความทนทานเนื่องจาก tight junction ใน เซลล์ไลน์ Caco-2 มีลักษณะที่พิเศษแตกต่างจากเซลล์ปกติ และประการสุดท้าย เซลล์ไลน์ Caco-2 จะใช้ glycerol 3-phosphate pathway ในการสังเคราะห์ triacylglycerols ขณะที่เซลล์ปกติจะใช้ monoacylglycerol pathway และการดูดซึมของ intestinal epithelium จะใช้แรงที่เกิดขึ้นจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันระหว่างภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ที่เรียกว่า การแพร่ (passive diffusion) หรือผ่านกระบวนการแอกทีฟทรานสปอร์ต (active transport) โดยจะเกิดขึ้นผ่าน transcellular (ผ่านผนังเซลล์ของ enterocyte) หรือ paracellular (ผ่าน tight junction) (Muangnoi, 2007)

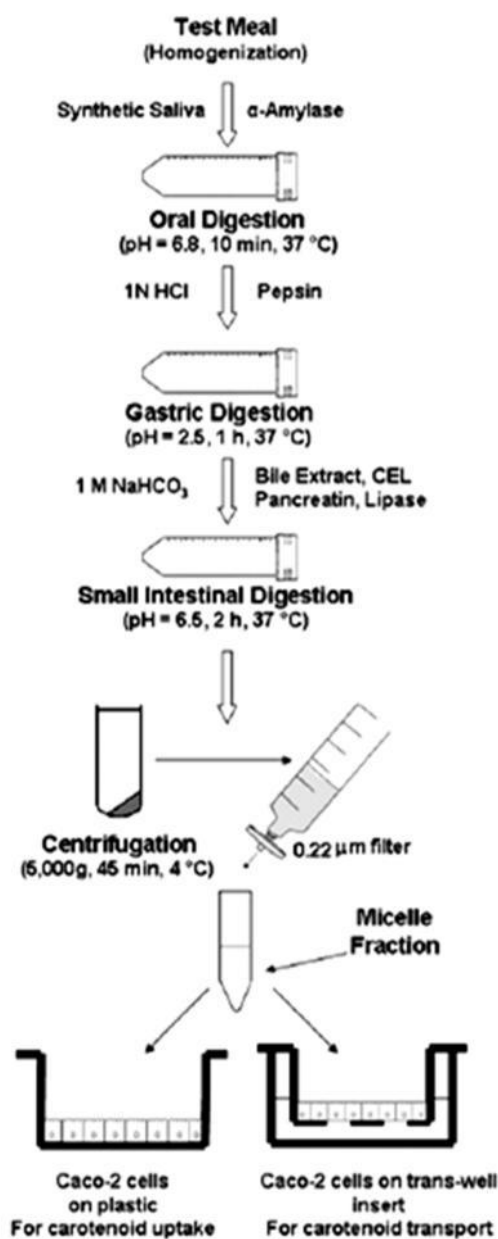
2.5.3 การใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองร่วมกับเซลล์ไลน์ Caco-2

Garrett et al. (1999) ได้พัฒนาแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง และเซลล์ไลน์ Caco-2 มาใช้ร่วมกัน เพื่อที่จะประเมินการนำไปใช้ของเซลล์ สำหรับ micellarized carotenoids และสารที่ละลายในไขมัน เมื่อผ่านกระบวนการย่อยแล้ว จะแยกส่วนของไมเซลล์ออกมา นำมากรองแล้วเจือจาง สารละลายที่ได้จะนำไปทดสอบกับเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ (รูปที่ 2.5) เพื่อที่จะศึกษาการนำไปใช้และการเคลื่อนย้ายของ micellar carotenoids ซึ่งเมื่อให้ micelle fraction ที่เจือจางแล้ว สัมผัสกับเซลล์เป็นระยะเวลา 4-6 ชั่วโมง พบว่าจะไม่มีผลกระทบต่อโครงสร้างและกระบวนการเผาผลาญของเซลล์

จากการศึกษาของ Chichumroonchokchai et al. (2004) ได้ทำการศึกษาคงอยู่ทางชีวภาพของลูทีน ในผักโขมบดละเอียด และในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม พบว่า ลูทีน ค่อนข้างเสถียรในแบบจำลองกระบวนการย่อยของทางเดินอาหาร โดย ลูทีน และ ซีแซนทีน สามารถเกิดเป็นไมเซลล์ได้ดีกว่า เบต้าแคโรทีน และ แซนโทฟิลล์ และ การใช้เซลล์ไลน์ Caco-2 เป็นเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาปัจจัยที่มีต่อการดูดซึมของแคโรทีนอยด์

มีการศึกษาอย่างมากเกี่ยวกับความเสถียรต่อการย่อยของระบบทางเดินอาหาร และ การดูดซึม โดยใช้เซลล์ไลน์ Caco-2 ซึ่งแบบจำลองที่ดีนั้น จะต้องสามารถประเมินการคงอยู่ทางชีวภาพของสารประกอบทางเคมีต่าง ๆ ในอาหารได้ และเป็นวิธีการที่สามารถกระทำได้ง่ายและสะดวกให้เห็นถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อการดูดซึมของสารประกอบทางเคมีต่าง ๆ เช่น โครงสร้างของอาหาร, กระบวนการแปรรูปอาหาร, กระบวนการย่อย และปฏิสัมพันธ์ของสารที่ต้องการทดสอบกับสารชนิดอื่น ๆ ในอาหาร การทดลองในมนุษย์หรือในสัตว์ทดลองนั้นเป็นรูปแบบที่กระทำ

ค่อนข้างยาก และใช้งบประมาณมาก ดังนั้นทางเลือกที่เหมาะสม คือการทดลองในหลอดทดลอง ซึ่งจะช่วยประหยัดเวลาและงบประมาณได้ค่อนข้างมาก ซึ่งเซลล์ไลน์ Caco-2 จัดเป็นเซลล์ที่มีการศึกษาแล้วว่ามีความมีประสิทธิภาพในการทดสอบชีวภาพพร้อมใช้ของสารต้านอนุมูลอิสระในประกอบทางเคมีต่าง ๆ เช่น แคโรทีนอยด์, คลอโรฟิลล์, ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น



รูปที่ 2.5 การใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองร่วมกับเซลล์ไลน์ Caco-2 ในการศึกษาชีวภาพพร้อมใช้ของแคโรทีนอยด์

แหล่งที่มา: Failla et al. (2008)

ได้แสดงหลักฐานบ่งชี้ว่า โซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลิน สามารถดูดซึมได้ในร่างกายมนุษย์ โดยเป็นส่วนหนึ่งในการศึกษาวิจัยผลของการป้องกันมะเร็งของสารประกอบ คลอโรฟิลล์ ในสาธารณรัฐประชาชนจีน เมื่อ ปี ค.ศ. 1997 โดยให้ผู้รับการทดลองบริโภคโซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลิน ในปริมาณ 300 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นระยะเวลาติดต่อกันนาน 4 เดือน จากนั้นทำการตรวจวัดระดับของสารประกอบคลอโรฟิลล์ ในเลือด พบว่าสารประกอบคลอโรฟิลล์บางชนิดเท่านั้น คือ Cu-chlorin e₄ ethyl ester จึงสรุปได้ว่าสารประกอบ คลอโรฟิลล์ สามารถถูกนำไปใช้ในร่างกายมนุษย์เพียงบางโครงสร้าง

ประโยชน์ของโซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลิน ที่มีการศึกษาแล้ว ได้แก่ การป้องกันมะเร็ง รวมทั้งการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านการก่อกลายพันธุ์ การจับกับสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen trapping) การมอดูเลต (modulation) ของการกำจัดสิ่งแปลกปลอม (xenobiotic metabolism) ในร่างกาย และการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส (apoptosis) จากการศึกษาความเสถียรของโซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลินต่อระบบทางเดินอาหารในมนุษย์ โดยใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง และเซลล์ไลน์ Caco-2 โดยทำการศึกษาในตัวอย่าง 3 ชนิดคือ โซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลินในน้ำ, โซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลินผสมน้ำและน้ำมันข้าวโพด 10% และ โซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลินในซอสแอปเปิ้ล จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการย่อย โดยใช้ C₁₈HPLC และตัวตรวจวัดปริมาณ คือ photodiode array (DAD) โดยพบว่าโซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลิน มี 2 อนุพันธ์ คือ Cu (II) chlorine e₄ และ Cu (II) chlorine e₆ เมื่อผ่านแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง พบว่า Cu (II) chlorine e₄ จะมีความเสถียรมากกว่าโดยมี %recovery เท่ากับ 70% ในขณะที่ Cu (II) chlorine e₆ จะเกิดการเสื่อมสลายในระหว่างกระบวนการย่อย ส่วนตัวอย่างโซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลินในซอสแอปเปิ้ล พบว่า Cu (II)chlorine e₆ ลดลง ดังนั้นองค์ประกอบอื่น ๆ ที่อยู่ในอาหาร ถือเป็นปัจจัยที่ต้องนำมาพิจารณาด้วย (Ferruzzi et al., 2002)

Gallardo-Guerrero et al. (2008) ได้ทำการศึกษาความคงตัว และการรวมกันเป็น ไมเซลล์ รวมถึงการดูดซึมโดย เซลล์ไลน์ Caco-2 ของ คลอโรฟิลล์ ในถั่วชนิดหนึ่ง (Pisumsativum L.) โดยการตัวอย่างที่แตกต่างกัน ได้แก่ ถั่วสด (fresh pea), ถั่วสุก (cooked fresh pea), ถั่วแช่แข็ง (frozen pea), ถั่วสุกแช่แข็ง (cooked frozen pea) และ ถั่วกระป๋อง (canned pea) โดยพบว่า ใน ถั่วแช่แข็ง (frozen pea) จะมีการเพิ่มขึ้นของ ฟิโอฟิตินและคลอโรฟิลล์ลายด์ในปริมาณเล็กน้อย ส่วนในถั่วกระป๋อง (canned pea) พบว่าในกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 121 องศาเซลเซียส ทำให้คลอโรฟิลล์มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็นฟิโอฟิติน และไฟโรฟิโอฟิติน ด้วยปฏิกิริยาฟิโอฟิตินในเซชัน และยังมีเกิดการเกิดออกซิเดชันบริเวณ isocyclic ring ดังนั้นใน ถั่วกระป๋อง (canned pea) นี้ จึงไม่พบโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ ที่มี Mg²⁺ อยู่ ส่วนในถั่วสุก (cooked fresh pea) และ ถั่วสุกแช่แข็ง (cooked frozen pea) พบว่า คลอโรฟิลล์ ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ ฟิโอฟิตินและจะ

พบไฟโรไฟโอไฟดินเอ และ ฟิโอโพบายด์บี ส่วนคลอโรฟิลล์ที่มี Mg^{2+} พบในปริมาณเล็กน้อย เมื่อพิจารณาถึงการเกิด micellarization พบว่าในตัวอย่างถั่วสุกแช่แข็ง (cooked frozen pea) สามารถเกิดเป็นไมเซลล์ได้มากถึง 57% หากพิจารณาการดูดซึมโดย เซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่า ฟิโอฟอร์บายด์เอ ถูกดูดซึมได้มากที่สุดในทุกตัวอย่าง หากพิจารณาจากการเตรียมจะพบว่า ถั่วสุกแช่แข็ง (cooked frozen pea) จะถูกดูดซึมได้มากที่สุด และ ถั่วสด (Fresh pea) ถูกดูดซึมได้น้อยที่สุด ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าในกระบวนการถนอมอาหารที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น การแช่แข็งและกรทำอาหารกระป๋อง การให้ความร้อน มีผลเชิงบวกต่อชีวภาพพร้อมใช้ และ ชีวภาพการนำไปใช้ของคลอโรฟิลล์ ซึ่งจากงานวิจัยต่าง ๆ นั้น แสดงให้เห็นว่าสารประกอบคลอโรฟิลล์ สามารถนำไปใช้ได้ ในร่างกายมนุษย์ในบางโครงสร้าง ซึ่งลักษณะกลไกการดูดซึมของคลอโรฟิลล์ นั้นมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับการดูดซึมของสารอื่น ๆ (รูปที่ 2.7) ซึ่งมีผลมาจากปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ (Ferruzzi et al., 2007)

1. ประสิทธิภาพของการปลดปล่อย คลอโรฟิลล์ ออกจากอาหาร
2. ความคงตัวในระบบย่อยอาหารในกระเพาะและลำไส้
3. การละลายของสารประกอบที่ละลายได้ในไขมัน
4. การถูกดูดซึมโดย Epithelial cells ของลำไส้เล็ก
5. การหลั่งออกมาสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต

นอกจากนี้ในสารสกัดรังจืดเอทานอล ยังพบสารแคโรทีนอยด์ คือ ลูทีน (Oonsivilai et al., 2007) มีการศึกษาเกี่ยวกับการคงอยู่ทางชีวภาพของแคโรทีนอยด์อย่างมากมาย โดยนิยมใช้แบบจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลอง จากข้อมูลใน ตารางที่ 2.3 แสดง %micellarization ของแคโรทีนอยด์จากงานวิจัยต่าง ๆ ถึงแม้จะเป็นอาหารประเภทเดียวกัน แต่กลับพบว่าปริมาณของแคโรทีนอยด์นั้นแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ขนาดของอาหาร การเตรียมตัวอย่าง และเทคนิคที่ใช้ในการสกัดแคโรทีนอยด์จากตัวอย่างและ ไมเซลล์ยังมีผลต่อการวิเคราะห์อย่างมาก

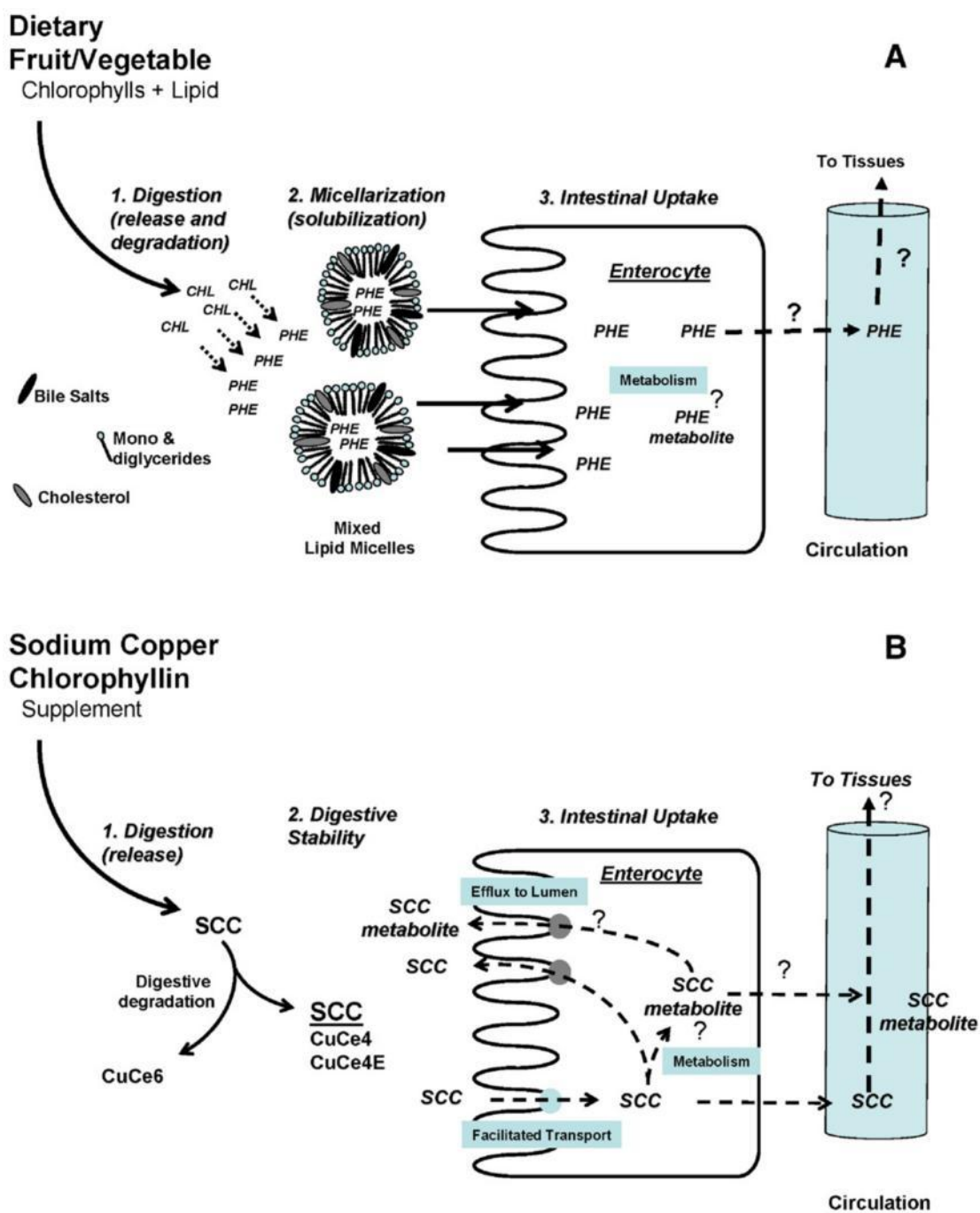
หากเปรียบเทียบ % micellarization ของแคโรทีนอยด์ชนิดต่าง ๆ สามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ไลโคพีน > อัลฟา-แคโรทีน > เบต้า- แคโรทีน > ลูทีน การดูดซึมของแคโรทีนอยด์มีความสัมพันธ์กับสารที่สามารถปลดปล่อยออกจากอาหารได้เล็กน้อยเพียงใด และรวมตัวกับไขมันกลายเป็นไมเซลล์ ซึ่งสามารถถูกดูดซึมด้วยเซลล์ลำไส้เล็ก การประเมินการคงอยู่ทางชีวภาพและการนำไปใช้ทางชีวภาพของแคโรทีนอยด์ค่อนข้างมีความซับซ้อน เนื่องจากผลของสารอาหารต่าง ๆ และปัจจัยด้านชีวเคมีต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ ความสัมพันธ์อาหารที่ผลต่อแคโรทีนอยด์ ได้แก่ ปริมาณและ โครงสร้างของแคโรทีนอยด์ ประเภทของกระบวนการแปรรูป รวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างแคโรทีนอยด์กับองค์ประกอบต่าง ๆ ที่มีอยู่ใน

อาหาร จากการศึกษา พบว่า ไขมันเพิ่มความสามารถในการดูดซึมของแคโรทีนอยด์ ในขณะที่ไฟเบอร์ ทำให้ความสามารถในการดูดซึมของ แคโรทีนอยด์ ลดลง (Rodriguez-Amaya et al., 2010)

ตารางที่ 2.3 % micellarization ของแคโรทีนอยด์จากงานวิจัยต่าง ๆ

ตัวอย่าง	แคโรทีนอยด์			
	อัลฟา-แคโรทีน	เบต้า- แคโรทีน	ลูทีน	ซีแซนทีน
Broccoli, raw		54	38	
Broccoli, boiled		18	10	
Broccoli, boiled		17	6	
Carrot, raw, pulped	23	21		
Carrot, boiled, pulped	40	27		
Carrot, raw, pieces	3	3		
Carrot, boiled, pieces	11	6		
Carrot, boiled	72	75	33	
Spinach, raw		30	19	
Spinach, boiled		26	4.6	6.7

แหล่งที่มา: Rodriguez-Amaya et al. (2010)



รูปที่ 2.7 การย่อยและการดูดซึมของ คลอโรฟิลล์ (A: อนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ และ B: อนุพันธ์ของ โยเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลิน)

แหล่งที่มา: Ferruzzi et al. (2007)

2.5.5 ชีวภาพพร้อมใช้และชีวภาพการนำไปใช้ของสารประกอบฟีนอลิก

นอกจากสารประกอบคลอโรฟิลล์แล้ว ในรางจืดยังมีสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบหลักทางเคมี คือ กรดโพรโตคาเทคชินิก, กรดคาเฟอิก, อะพิจินิน และสารกลุ่มกลูโคไซด์

กรดกาแลคเป็นสารอีกประเภทหนึ่งที่พบในสารสกัดรางจืด แต่มีปริมาณเพียงน้อยเท่านั้น จากการศึกษาของ Shahrzad et al.(2011) โดยทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ (pharmacokinetics) ของกรดกาแลคต่อชีวภาพการนำไปใช้ของมนุษย์ พบว่า เมื่อให้ gallicum tablets ที่มี 10% gallic และ 90% กลูโคส ต่อผู้ทดสอบ จำนวน 10 คน และตรวจสอบการนำไปใช้จากปริมาณของกรดกาแลคและ GA metabolite 4-O-methylgallic acid (4OMGA) พบว่ากรดกาแลคสามารถดูดซึมและส่งต่อไปยังกระแสเลือดได้ Zeng et al. (2013) ได้ศึกษา ความคงอยู่ทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก ในสัตว์ทดลอง และการดูดซึม โดยเซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่า กรดคาเฟอิก ดูดซึมในเซลล์ไลน์ Caco-2 ได้ค่อนข้างต่ำ และมีค่า oral bioavailability ในหนูทดลองต่ำเช่นกัน

Bernúdez-Soto et al. (2007) ได้ทำการศึกษาความคงตัวของสารประกอบโพลีฟีนอลในโชนเคเบอร์รี่ (*Aroniamelanocarpa*) เมื่อผ่านกระบวนการ *in vitro* gastric และ pancreatic digestion โดยตรวจวัดปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด หลังจากผ่านกระบวนการย่อยในกระเพาะอาหาร พบว่า ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกหลัก ซึ่งได้แก่ แอนโทไซยานิน, flavan-3-ols, flavonols และ อนุพันธ์ของกรดคาเฟอิก อย่างไรก็ตามส่วนประกอบเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากผ่านกระบวนการ pancreatic digestion อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะ แอนโทไซยานิน ซึ่งมีการสูญเสียปริมาณ 43% ส่วน flavan-3-ols และ flavonols ลดลง 26% และ 19% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่าสารโพลีฟีนอล มีความไวสูงต่อภาวะด่างอ่อน ๆ ในลำไส้เล็กและสัดส่วนของสารประกอบเหล่านี้สามารถเปลี่ยนไปเป็นรูปแบบโครงสร้างใหม่ที่มีผลต่อคุณสมบัติทางเคมี และผลต่อเนื่องต่อการนำไปใช้ได้ทางชีวภาพ และฤทธิ์ทางชีววิทยา ในตารางที่ 2.4 เป็นการแสดงถึงความคงตัวของโพลีฟีนอลในอาหารชนิดต่าง ๆ พบว่าการย่อยในกระเพาะอาหารไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารประกอบทางเคมีของโพลีฟีนอล ได้แก่ ฟลาโวน, ไอโซฟลาโวนอนด์, เอนโทไซยานิน, ไมริซิทริน และแคทาทิน แต่จะมีการลดลงเมื่อผ่านการย่อยในลำไส้เล็ก โดยเฉพาะสารกลุ่มแอนโทไซยานินและฟลาโวนอยด์ ส่วนสารกลุ่มไอโซฟลาโวนมีความเสถียรหลังจากผ่านกระบวนการย่อยอาหาร

ตารางที่ 2.4 ความคงตัวของสารโพลีฟีนอลในอาหารชนิดต่าง ๆ

Food	Phenolic compounds	In vitro gastric conditions	Stability results	In vitro intestinal conditions	Stability results
Orange juice	Flavonones	Pepsin-HCl, pH 2.0, 2 h	No changes detected	Pancreatin-Bile NaHCO ₃ , pH 7.5, 2 h	50-60% conversion in to chalcones
Pomegranate juice	Anthocyanins	Pepsin-HCl, pH 2.0, 2 h	10% increase	Pancreatin-Bile	About 80% decrease
Cocoa	(-)-Epicatechin, (+)-Catechin, Dimers B ₂ , B ₅	NaCl- HCl, pH 1.8, 1 h	Monomers stable Isomerization and Degradation of dimers	NaHCO ₃ , pH 7.5, 2 h NaHCO ₃ , pH 8.5 Several hours	Almost complete Degradation between 2 And 8 h
Brocoli	Flavonoids, hydroxycinnamoyl derivatives	Pepsin-HCl, pH 2.0, 2 h	Flavonoids stable, 6-25% Losses of cinnamides	Pancreatin-Bile NaHCO ₃ , pH 7.5, 2 h	About 80-85% losses
Soy bread	Isoflavonoids	Pepsin-HCl, pH 2.0, 2 h, N ₂	No changes detected	Pancreatin-Bile	Isoflavonoids mostly
Raspberry	Anthocyanins	Pepsin-HCl, pH 2.0, 2 h	No changes detected	NaHCO ₃ , pH 6.9, N ₂ 2 h Pancreatin-Bile NaHCO ₃ , pH 7.5, 2 h	Stable, Some conversion To aglycones 30% losses

แหล่งที่มา: Bermudez-Soto et al. (2007)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 สกั้ตรงจืด

3.1.1.1 ใบร่างจืดของโรงพยาบาลครบุรี จ.นครราชสีมาในช่วงเดือนมิถุนายน-ตุลาคม พ.ศ. 2553

3.1.1.2 กระดาษกรอง (Whatman No.4)

3.1.1.3 เครื่องปั่น (Mitsubishi, MX-T1PW, Thailand)

3.1.1.4 ตู้อบลมร้อน

3.1.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend Mach 1.6R, DE)

3.1.1.6 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (JULABO, SW22, USA)

3.1.1.7 Volumetric flask 50 มิลลิลิตร

3.1.1.8 Conical tube 15 มิลลิลิตร

3.1.1.9 พาราฟิล์ม

3.1.1.10 หลอดทดลอง

3.1.1.11 เครื่องทำความร้อน

3.1.1.12 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (JULABO, SW22, USA)

3.1.1.13 Therbovap (Caliper, LV, USA)

3.1.2 การวิเคราะห์สารประกอบทางเคมีของสกั้ตรงจืด

3.1.2.1 เครื่อง HPLC Agilent รุ่น 1100

3.1.2.2 Stationary phase (Column) คือ Grace-Vydac 201TP54 reversed- phase (4.6 มิลลิเมตร i.d. x 250 มิลลิเมตร)

3.1.2.3 Waters NovaPak C18 (3.8 มิลลิเมตร i.d. x 150 มิลลิเมตร) Polymeric C 18

3.1.2.4 Syringe filter (polytetrafluoroethylene) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูล

อิสระ

3.1.3.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK)

3.1.3.2 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (JULABO, SW22, USA)

3.1.3.3 หลอดทดลอง

3.1.3.4 เครื่อง Vortex

3.1.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และการทดสอบการดูดซึม

3.2.4.1 Caco-2 cells (ได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยยอร์ค
จ.พิษณุโลก)

3.2.4.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend Mach 1.6R, DE)

3.2.4.3 Inverted microscope

3.2.4.4 Light microscope

3.2.4.5 เครื่องชั่งแบบสองแขน

3.2.4.6 เครื่องวัด pH

3.2.4.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.2.4.8 ตู้ปลอดเชื้อ

3.2.4.9 ตู้บ่มเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

3.2.4.10 96 well plate(Corning)

3.2.4.11 T75 cm²(Corning)

3.2.4.12 T25 cm²(TPP)

3.2.4.13 Pipette aid (Corning)

3.2.4.14 Pasteur pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร (Corning)

3.2.4.15 Pasteur pipette ขนาด 5 มิลลิลิตร (Corning)

3.2.4.16 Microcentrifuge tube

3.2.4.17 Cryovial (TPP)

3.2.4.18 Haematocytometer and cover slip

3.2.4.19 sonicator

3.1.5 การศึกษาแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (*In vitro* simulated digestion models)

- 3.1.5.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend Mach 1.6R, DE)
- 3.1.5.2 Magnetic bar
- 3.1.5.3 เครื่องวัด pH
- 3.1.5.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath)
- 3.1.5.5 เครื่องกลั่นระเหยแห้ง (Buchi Rotavapor R-124, CH)
- 3.1.5.6 Propylene tube ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 3.1.5.7 Syringe filter 0.22 ไมโครเมตร
- 3.1.5.8 เข็มฉีดยา
- 3.1.5.9 พาราฟิล์ม
- 3.1.5.10 Vortex mixer
- 3.1.5.11 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 3.1.5.12 Volumetric flask 100 มิลลิลิตร
- 3.1.5.13 Buret
- 3.1.5.14 sonicator

3.2 สารเคมี

3.2.1 การสกัดรางจืด

- 3.2.1.1 เอทานอล
- 3.2.1.2 อะซีโตน
- 3.2.1.3 น้ำกลั่น

3.2.2 การวิเคราะห์สารประกอบทางเคมีของสกัดรางจืด

- 3.2.2.1 อะซีโตน (acetone)
- 3.2.2.2 อะซีโตนไนไตรล์ (acetonitrile)
- 3.2.2.3 เอทานอลเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate)
- 3.2.2.4 เมทานอล (ethanol)
- 3.2.2.5 น้ำกลั่น
- 3.2.2.6 กรดอะซิติก (acetic acid)
- 3.2.2.7 ไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)
- 3.2.2.8 คลอโรฟิลล์เอ (Sigma)

3.2.2.9 คลอโรฟิลล์บี (Sigma)

3.2.2.10 ลูทีน (lutein) (Sigma)

3.2.2.11 กรดกาลิก (gallic acid) (Sigma)

3.2.2.12 กรดโปรโตคาเทคชูอิก (protocatechuic acid) (Sigma)

3.2.2.13 กรดคาเฟอิก (caffeic acid) (Sigma)

3.2.2.14 อะพิจินิน (apigenin) (Sigma)

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

3.2.3.1 น้ำกลั่น

3.2.3.2 เอทานอล

3.2.3.3 เมทานอล (methanol)

3.2.3.4 โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3)

3.2.3.5 กรดกาลิก (Gallic acid) (Sigma)

3.2.3.6 Folin-Ciocalteu

3.2.3.7 DPPH

3.2.3.8 FRAP

3.2.3.9 โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate)

3.2.3.10 อะซิเตต บัฟเฟอร์ (acetate buffer)

3.2.3.11 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

3.2.3.12 Ferrous chloride

3.2.3.13 Ferric sulfate

3.2.3.14 ABTS

3.2.3.15 กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid)

3.2.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และการทดสอบการดูดซึม

3.2.4.1 น้ำสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

3.2.4.2 เอทานอล

3.2.4.3 เมทานอล (methanol)

3.2.4.4 High glucose DMEM

3.2.4.5 Fetal bovine serum (Gibco)

3.2.4.6 แอล กลูตามีน (L-glutamine)

3.2.4.7 Non-essential amino acid (Gibco)

- 3.2.4.8 เจนตาไมซิน (gentamicin)(Gibco)
- 3.2.4.9 แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B) (Gibco)
- 3.2.4.10 HEPES
- 3.2.4.11 โซเดียมไบคาร์บอเนต(NaHCO_3)
- 3.2.4.12 0.25%Trypsin/ EDTA
- 3.2.4.13 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate buffer saline)
- 3.2.4.14 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide)
- 3.2.4.15 Trypan blue
- 3.2.4.16 MTT

3.2.5 การศึกษาแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (*In vitro* simulated digestion models)

- 3.2.5.1 Pepsin from porcine stomach mucosa (Sigma Co. P-7125, USA)
- 3.2.5.2 Bile extract porcine (Sigma Co. B8631, USA)
- 3.2.5.3 Pancreatin from porcine pancreas (Sigma Co. P-1500, USA)
- 3.2.5.4 Lipase (Sigma Co. L3126, USA)
- 3.2.5.5 กรดไฮโดรคลอริก (Carlo)
- 3.2.5.6 โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) (Merck, USA)
- 3.2.5.7 โซเดียมคลอไรด์ (Merck, USA)

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารสกัดรางจืด

3.3.1.1 การเตรียมใบรางจืดผง

ใช้ใบรางจืดสดของโรงพยาบาลนครบุรี อ.นครบุรี จ.นครราชสีมาในช่วงเดือน มิถุนายน – ตุลาคม พ.ศ. 2553 โดยทำแห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (Mitsubishi, MX-T1PW, Thailand) เพื่อให้ได้รางจืดผง และบรรจุแบบสุญญากาศ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

การเตรียมสารสกัดรางจืด เตรียมสารสกัดรางจืด 3 ชนิด คือ สารสกัดน้ำ อะซีโตน และเอทานอล ตามวิธีของ Oonsivilai et al. (2006) โดยนำใบรางจืดผง 100 มิลลิกรัม นำไปใส่ในหลอด Centrifuge พลาสติก ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำร้อน (100 องศาเซลเซียส) หรืออะซีโตน หรือเอทานอล ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (JULABO, SW22, USA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ต่อมานำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend

Mach 1.6R, DE) ที่ 3,000 g นาน 3 นาที โดยแยกส่วนของเหลวกรองด้วยกระดาษกรอง และทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวทั้ง 3 ครั้งรวมกัน และกรองด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ ปรับปริมาตรใน volumetric flask 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดใส่หลอดทดลอง (ขนาด 5 มิลลิลิตร) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เฉพาะสารสกัดนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งโดยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drier) (GEA,LYOVAC GT2-S, MD) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดอะซีโตนและเอทานอล นำไปเข้าเครื่องทำแห้ง (Therbovap) (Caliper, LV, USA) เพื่อกำจัดตัวทำละลายอะซีโตนและเอทานอล จัดเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดฝาให้แน่นและพันบริเวณฝาหลอดด้วยพาราฟิล์ม เก็บตัวอย่างในภาชนะที่บดแสง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.3.2 การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีของสารสกัดรางจืดโดยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถสูง (HPLC)

เตรียมสารละลาย คือ อะซีโตน อะซีโตนไนไตรล์ เอทานอล เอทิลอะซิเตต และเมทานอล เกรด HPLC เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตต 1.0 โมลาร์ นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 2 เท่า และปรับ pH 4.6 โดยใช้กรดอะซิติกเข้มข้น โดยมีสารละลายมาตรฐาน คือ กลอโรฟิลล์เอ, กลอโรฟิลล์บี, ลูทีน, กรดฟีนอลิก และ อะพิจินิน ส่วน ฟิโอฟิตินเอ และ ฟิโอฟิตินบี เตรียมสารมาตรฐานจาก กลอโรฟิลล์เอ และ กลอโรฟิลล์บี โดยกลอโรฟิลล์เอ หรือ กลอโรฟิลล์บี ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซีโตน 10 มิลลิลิตร เติมไฮโดรคลอริก 1.0 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

3.3.2.1 การวิเคราะห์ กลอโรฟิลล์ และ แคโรทีนอยด์

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 3.1 สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้การวิเคราะห์กลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

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

3.3.2.2 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก

ใช้ reverse phase column คือ Waters NovaPak C18 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.8 มม. x ความยาว 150 มิลลิเมตร) ส่วน guard column คือ Waters NovaPak C18 โดยช่วงเริ่มต้นมีอัตราส่วนของสารละลาย A/B คือ 99 :1 v/v ถึง 70 :30 v/v นาน 20 นาที ทิ้งไว้อีก 5 นาที จะกลับมาเป็นอัตราส่วนเดิม และ 5 นาที ถัดไปเข้าสู่สมดุล รวมเป็น 30 นาทีในแต่ละตัวอย่าง

ตารางที่ 3.2 สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้การวิเคราะห์ สารประกอบ ฟีนอลิก

สภาวะ	รายละเอียด
เฟสเคลื่อนที่	reservoir A: น้ำต่ออะซีติก (98:2 v/v) reservoir B: อะซีโตน ไตรคลอโรเอทิลีน
อัตราการไหล	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิ	35 องศาเซลเซียส
ตัวตรวจวัดสัญญาณ	Diode Array Detector(DAD) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
ปริมาณที่ฉีด	25 ไมโครลิตร

3.3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืด

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืดใช้วิธีของ Oonsivilai et al. (2007) โดยการละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลาย น้ำ หรือ อะซีโตน หรือ เอทานอล แล้วนำ sonicate เป็นเวลา 2 นาที แล้วเปิดสารละลายตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.58 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ทิ้งไว้ 5 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (20% w/v) 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และหาฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้กรดกาอิกเป็นมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นของกรดกาอิกที่ใช้ในการสร้างกราฟสารมาตรฐานคือ 0, 50, 100, 150 และ 200 ppm ใน 95% เอทานอล ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปสมมูลของมิลลิกรัม กรดกาอิกต่อ 100 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดรางจืด

3.3.3.1 วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

ละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำ อะซีโตน หรือเอทานอล แล้วเปิด สารละลายตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DPPH 1.90 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลัง

จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และคำนวณหา % inhibition จากสูตร

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

3.3.3.2 วิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)

ทำการเตรียมสารละลาย FRAP จากสารละลาย acetate buffer (pH 3.6), TPTZ 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric) ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (ferric chloride) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v/v) ตามลำดับ สารละลาย FRAP จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน และนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาใช้ (Oonsivilai et al., 2006)

ในการทดสอบด้วยวิธีนี้ ใช้สารสกัดปริมาณ 50 ไมโครกรัม แล้วเติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร โดยทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอรัสซัลเฟต (ferrous sulfate) ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100-2000 ไมโครโมลาร์ โดยทำการทดลองจำนวนสามซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

3.3.3.3 วิธี Scavenging activity of ABTS radical cation

ทำการเตรียมสารละลาย ABTS ที่มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ตามวิธีของ (Meot-Duros et al., 2009) โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate) ที่มีความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ ผสมสารละลาย ABTS ที่มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตรกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate) 140 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 35.5 ไมโครลิตร ในขวดสีชาตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาใช้งานจะได้ stock ABTS radical cation แล้วเจือจาง Stock ABTS radical cation ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm เท่ากับ 0.700 ± 0.02 (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน)

เตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตรในหลอดทดลองและใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุมเติม ABTS 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้อง 6 นาทีและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการดังนี้

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

3.3.4 การทดสอบความเป็นพิษ

เลี้ยงเซลล์ไลน์ Caco-2 ใน 96-well plate โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5×10^3 เซลล์/ช่อง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดรังจืดที่เตรียมได้เจือจางด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัด สารสกัดรังจืดน้ำละลายกลับด้วย PBS ส่วนสารสกัดรังจืดเอทานอล ละลายกลับด้วยเอทานอล และละลายสารสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ ซึ่งอยู่ในช่วง 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ถึง 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้เอทานอล (ethanol) 1.0% และ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาลิน (PBS) 1.0% เป็นตัวอย่างควบคุม

ทำการบ่มสารสกัดในเซลล์ไลน์ Caco-2 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าว ปิดสารสกัดออกจากเซลล์ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใหม่ บ่มต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบด้วย MTT โดยเติม MTT ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเปิดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์และ MTT ออก แล้วล้างด้วย PBS 100 ไมโครลิตร ปิด PBS แล้วเติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละช่อง เพื่อละลายผลึกของ Formazan product นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio-Rad Benchmark Plus, UK) นำค่าดูดกลืนแสงไปพล็อตกราฟ dose-response โดยพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจำนวน 6 ระดับ ใช้ค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้นเข้มข้น จาก 96-well plate จำนวน 5 ช่อง แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถทำลายเซลล์ได้ 50% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด (LC_{50})

3.3.5 การศึกษาการชีวภาพพร้อมใช้และชีวภาพการนำไปใช้ของสารสกัดรังจืด

3.3.5.1 แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (In vitro simulated digestion models)

3.3.5.1.1 Gastric phase (ตามวิธีของ Ferruzzi et al. 2001)

แบบจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารใช้วิธี ของ Ferruzzi et al. (2001) โดยนำสารสกัดรังจืดน้ำ เอทานอล และอะซีโตน โดยปริมาณของรังจืดสกัดเมื่อเทียบกับปริมาณใบรังจืดสดเท่ากับ 2 กรัม โดยทำการเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 120 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใน polypropylene tube ขนาด 50 มิลลิลิตรแล้วนำ homogenized แล้วปรับ pH เป็น 2.0 ± 0.1 ด้วย HCl 1 โมลาร์ แล้วเติม pepsin ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 40 มิลลิลิตรด้วย 120 มิลลิโมลาร์ NaCl จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดฝาให้แน่นและพันบริเวณฝาหลอดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

3.3.5.1.2 Small intestinal phase

แบบจำลองการย่อยในลำไส้เล็กใช้วิธี ของ Ferruzzi et al. (2001) โดยใช้ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยในกระเพาะอาหาร ทำการปรับ pH 6.0 ± 0.1 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) เติม crude bile extract ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และ pancreatin ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ต้องการทำปฏิกิริยา จากนั้นทำการปรับ pH ของตัวอย่างให้เป็น 6.5 ± 0.1 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝาให้แน่น ปิดผนึกฝาหลอดด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

หลังจากผ่าน small intestinal phase แล้ว ส่วนที่ได้เรียกว่า digesta เปิด digesta 10 มิลลิลิตร ใส่ใน polypropylene tube ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดฝาให้แน่น พันบริเวณฝาหลอดด้วยพาราฟิล์ม และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ % digestive stability

3.3.5.1.3 การแยกส่วนของ aqueous fraction

การแยกส่วนของ aqueous fraction จาก digesta ใช้วิธีของ Ferruzzi et al. (2001) โดยนำส่วนของ digesta ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 8,000 rpm (Sorvall Legend Mach 1.6R, DE) เป็นเวลา 90 นาที เพื่อที่จะแยกตะกอนออก แล้วใช้เข็มขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายส่วนใส หลังจากนั้น กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมครอน สารละลายที่ได้นำไปไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดผนึกฝาให้แน่น ปิดผนึกบริเวณฝาหลอดด้วยพาราฟิล์ม และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.5.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้วิธี ของวิธีของ Ferruzzi et al. (2001) และ Garretet at al., (1999) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cells) จากมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ใช้ passage ที่ 22-35 ทำการเลี้ยงเซลล์ใน T-75 flask โดยมี seeding density เท่ากับ 4×10^5 cells/cm² ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ complete medium ที่มีกลูโคสในปริมาณสูง (DMEM) ใช้ 10.0 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), กรดอะมิโนไม่จำเป็น (non-essential amino acid) 10 มิลลิโมล/ลิตร, แอล-กลูตามีน (L-glutamine) 2.0 มิลลิโมล/ลิตร, แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร, เจนตาไมซิน (gentamicin) 50 มิลลิกรัม/ลิตร, HEPES 15 มิลลิโมล/ลิตร และ โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) 44 มิลลิโมล/ลิตร (รายละเอียดการเตรียมสารและวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์อยู่ในภาคผนวก ก) อัตราส่วนของอากาศและคาร์บอนไดออกไซด์ เท่ากับ 95 : 5

3.3.5.3 ความคงตัวในกระบวนการย่อย

การศึกษาความคงตัวในกระบวนการย่อยใช้วิธีของ Ferruzzi et al. (2001) นำสารสกัดรังจืดทั้งที่ผ่านการย่อยและไม่ผ่านการย่อยมาทำละลายที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำเอทานอล 90% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไป sonicate เป็นระยะเวลา 10 นาที และนำไป vortex เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 3,500 rpm เป็นระยะเวลา 15 นาที โดยทำซ้ำ 3 รอบ นำส่วนใสที่ได้ทั้งหมดไประเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้ง (BuchiRotavapor R-124, CH) ที่ระดับอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่วนของสารละลายเข้มข้นที่ได้นำไปละลายด้วยเมทานอล

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

3.3.5.4 การวิเคราะห์ไมเซลล์

การวิเคราะห์ไมเซลล์ใช้วิธีของ Ferruzzi et al. (2001) โดยนำส่วนของ aqueous fraction มาทำละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำเอทานอล ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยคลื่นเสียง (sonicate) เป็นเวลา 10 นาที แล้วผสมให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 2 นาที ปิเปตส่วนของไมเซลล์ใส่ใน round bottom flask ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำแห้ง (Buchi Rotavapor R-124, CH) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำสารที่ผ่านการทำแห้งแล้วไปละลายด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไปด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และคำนวณหา % micellization

$$\% \text{ micellization} = \frac{\text{ปริมาณสารในไมเซลล์}}{\text{ปริมาณของสารหลังการย่อย}} \times 100$$

3.3.5.5 การทดสอบการดูดซึมของสารสกัดรังจืดด้วยเซลล์ไลน์ Caco-2

หลังจากที่ทำการเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลาประมาณ 21 วัน ทำการล้างเซลล์ด้วย Hank's balanced salt solution ครั้งละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเจือจาง aqueous fraction ที่ได้ จากข้อ 3.3.5.1.3 ด้วย basal DMEM ในอัตราส่วน 1 : 3 ใส่ในภาชนะที่มีเซลล์อยู่ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ทำการปิเปตส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างเซลล์ monolayer ด้วย ice-cold Hank's balanced salt solution ที่มี sodium taurocholate ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมล/ลิตร จำนวน 2 ครั้ง ทำการเก็บเซลล์ด้วย cell scraper เก็บไว้

ใน 1 มิลลิลิตรของ ice-cold Hank's balanced salt solution ที่มีเอทานอล 10.0% และ BHT เข้มข้น 45 ไมโครโมล ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.5.6 การวิเคราะห์ การดูดซึมของสารสกัดรังจืดด้วยเซลล์ไลน์ Caco-2

การวิเคราะห์การดูดซึมสารสกัดรังจืดด้วยเซลล์ไลน์ Caco-2 ใช้วิธีของ Ferruzzi et al. (2006) โดยนำสารตัวอย่างที่ได้จากเซลล์ไลน์ Caco-2 ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์ และ ส่วนของ aqueous fraction ไปทำให้อุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) ที่ระดับ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยเติมสารละลายเอทานอลที่มี ส่วนผสมของ BHT 0.1% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และอะซีโตนที่มีส่วนผสม BHT 0.2% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วเติมสารไดเอทิลอีเทอร์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ 10% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4500 กรัม เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนของ ไดเอทิลอีเทอร์ ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำส่วนที่ได้ทั้งหมด ไปทำแห้งโดยใช้ไนโตรเจน แล้ววิเคราะห์ต่อ ด้วย วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อคำนวณหา % การถูกดูดซึม

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

3.3.6 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ใช้การวิเคราะห์ด้วย SPSS for window version 13.0 (SPSS Inc. USA) ในการหาค่า Mean และ Standard deviation standard error of mean (SEM) และวิเคราะห์ความแตกต่างของ ค่าเฉลี่ยด้วย Duncan post hoc test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การเตรียมสารสกัดรางจืด

ในสารสกัดรางจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน คือ น้ำ เอทานอล และอะซีโตน พบว่า ร้อยละของผลผลิต (%yield) ของสารสกัดรางจืดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันแต่ละชนิด มีค่าดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่าตัวอย่างสารสกัดรางจืดอะซีโตน มีร้อยละของผลผลิต สูงที่สุด (30.5 กรัมต่อรางจืดแห้ง 100 กรัม) รองลงมาคือ สารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล ตามลำดับ (29.5 กรัมต่อรางจืดแห้ง 100 กรัม 20.7 กรัมต่อรางจืดแห้ง 100 กรัม) โดย ร้อยละของผลผลิตที่ได้จากสารสกัดรางจืดมีปริมาณใกล้เคียงกับการศึกษาของ Oonsivilai et al. (2006)

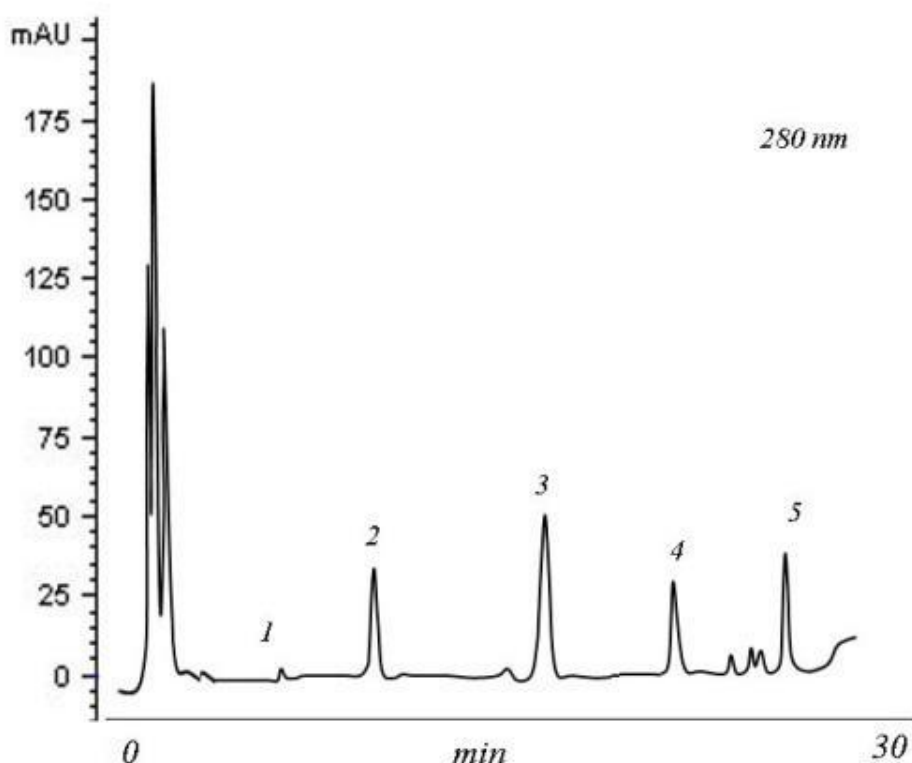
ตารางที่ 4.1 ร้อยละของผลผลิตของสารสกัดรางจืดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ชนิดของตัวทำละลาย(กรัม/กรัม*100)		
น้ำ	เอทานอล	อะซีโตน
29.5	20.7	30.5

4.2 การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีของสารสกัดรางจืดโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

4.2.1 การวิเคราะห์สารประกอบ ฟีนอลิก

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดรางจืดโดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ในสารสกัดรางจืดน้ำ พบว่าสารประกอบหลักที่พบส่วนใหญ่คือ กลุ่มของกรดฟีนอลิก ซึ่งได้แก่ กรดโปรโตคาเทคชูอิก, กรดคาเฟอิก และ อะพิจินิน ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งทำการตรวจวัดปริมาณที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์ดังกล่าวตรงกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Oonsivilai et al. (2008) ซึ่งทำการศึกษาสารประกอบทางเคมีในสกัดรางจืดที่ได้จากพื้นที่ในจังหวัดนครราชสีมาเช่นเดียวกัน



รูปที่ 4.1 โครมาโตแกรมแสดงการแยกของฟีนอลิกจากสารสกัดรางจืดน้ำ ดังนี้: (1) กรดโปรโตคาเทคชอิก ; (2) กรดคาเฟอิก; (3) unknown ; (4) unknown 2 และ (5) อะพิจินิน

นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมา ยังพบว่า ส่วนของดอกรางจืดและใบรางจืด ยังพบ สารกลุ่มฟีนอลิกกลุ่มอื่น ได้แก่ delphinidin 3:5-di-o- β -D-glucopyranoside, อะพิจินิน, apigenin-7-o- β -D-glucopyranoside และ chlorogenic acid (Purnima และ Gupta, 1978 Thongsaard และ Marsden., 2002)

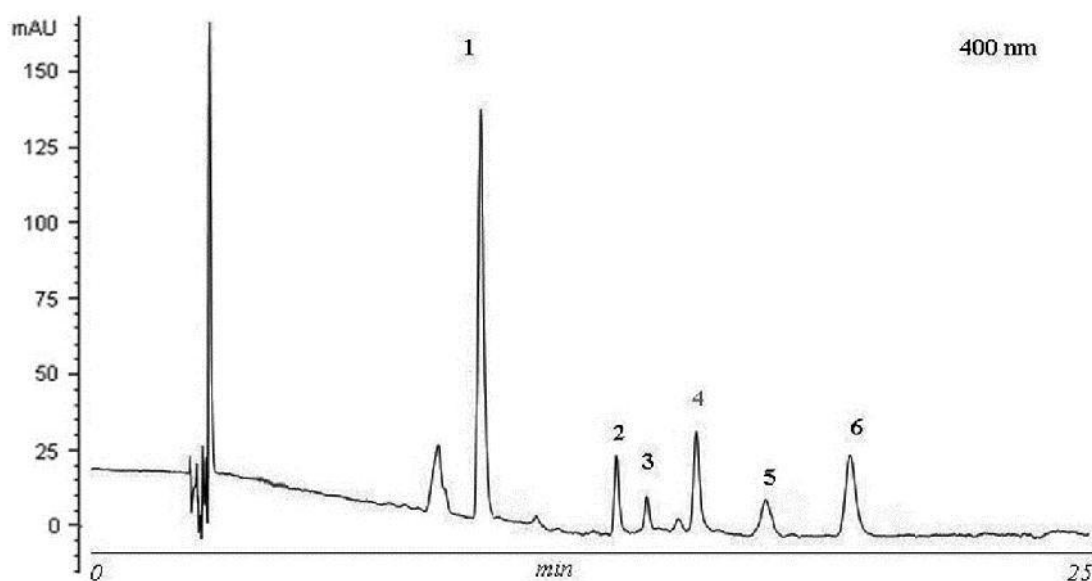
4.2.2 การวิเคราะห์ คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์

จากการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ ในสารสกัดรางจืดเอทานอล โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และทำการวิเคราะห์ด้วย DAD detector ระดับความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร หากพิจารณาในรูปที่ 4.1 พบว่า ในสารสกัดประกอบไปด้วย คลอโรฟิลล์ และอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ ซึ่งหากเรียงลำดับจากปริมาณมากไปน้อย มีดังต่อไปนี้ คือ ฟีโอฟอร์บายด์เอ ฟีโอไฟตินเอ คลอโรฟิลล์เอ และ คลอโรฟิลล์บี นอกจากนี้ยังพบสารประเภทแคโรทีนอยด์ คือ ลูทีน

ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Oonsivilai et al. (2007) ซึ่งทำการศึกษารายละเอียดของสารสกัดรางจืด ซึ่งได้จากพื้นที่ในเขตจังหวัดนครราชสีมา พบว่า นอกจากสารที่พบดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังพบอิพิเมอร์ของฟีโอไฟดินเอ

การศึกษาที่ผ่านมาของ Kanchanapoom, Kasai and Yamasaki (2002) พบว่า ในสารสกัดรางจืดที่ได้จากส่วนเถาของรางจืด มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ เป็นกลุ่มกลูโคไซด์ ได้แก่ *epi-grandifloric* and *3'-O-β-glucopyranosyl-35 stibericoside*, *benzyl β-glucopyranoside*, *benzyl β-2'-O-β-glucopyranosyl*, *glucopyranoside*, *grandifloric acid*, *E-2-hexenyly β-glucopyranoside*, *hexanol β-glucopyranoside*, *6-C-glucopyranosylapigenin*, and *6,8-di-C-glucopyranosylapigenin*.

การศึกษาสารประกอบทางเคมีในสารสกัดรางจืดเอทานอลนั้น เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบทางเคมีที่มีในสารสกัดที่นำมาใช้ทดสอบเกี่ยวกับความคงตัวของสารสกัดรางจืดในแบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง โดยศึกษาชีวภาพพร้อมใช้ (bioavailability) และการนำไปใช้ทางชีวภาพ (bioaccessibility) ของสารสกัดรางจืดเอทานอล และสารสกัดรางจืดน้ำ



รูปที่ 4.2 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณของ คลอโรฟิลล์ และอนุพันธ์ ในสารสกัดรางจืดเอทานอล ดังนี้: (1) ฟีโอโพรบายด์เอ ; (2) ลูทีน ; (3) คลอโรฟิลล์บี; (4) คลอโรฟิลล์เอ; (5) ฟีโอไฟดิน บี และ (6) ฟีโอไฟดินเอ

จากการศึกษาของ Chitchumroonchokchai et al.(2004) ซึ่งได้ทำการศึกษากำหนดนำไปใช้ทางชีวภาพของลูทีนในอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยการใส่แบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลองร่วมกับเซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่าในตัวอย่างผักโขม พบปริมาณของ all-trans-lutein เท่ากับ 58.7 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ 13-cis-lutein เท่ากับ 1.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่วนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพบเฉพาะ all-trans-lutein ในปริมาณ 22.5 มิลลิกรัม/แคปซูล

ทั้งนี้สารประกอบทางเคมีประเภทคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์จะมีปริมาณที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสถานที่ในการปลูก ฤดูกาล ปริมาณแร่ธาตุในดิน วิธีการเก็บเกี่ยว และขั้นตอนการเตรียมสารสกัด อาจทำให้สารบางกลุ่มสลายไป (Gross et al., 1991)

4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันคือ น้ำ เอทานอล และอะซีโตน วิเคราะห์โดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดแต่ละชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าเอทานอลและอะซีโตน โดยรางจืดที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด (3037.1 มิลลิกรัมกาลีค /100 กรัมรางจืดผง) และรางจืดที่สกัดด้วยอะซีโตนมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่ำสุด (120.9 มิลลิกรัมกาลีค/100 กรัมรางจืดผง) โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืดมีปริมาณใกล้เคียงกับการศึกษาของ Oonsivilai et al. (2006)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ฟีนอลิกทั้งหมด(มิลลิกรัมกาลีค / 100 กรัม)		
น้ำ	เอทานอล	อะซีโตน
3037.1 ± 107.1 ^a	1768.4 ± 198.5 ^b	120.9 ± 18.8 ^c

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

a, b และ c หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(p<0.05)

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดรางจืด

4.3.1 วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรในสารละลาย และสามารถรับอิเล็กตรอนได้เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระและดูดกลืนแสงที่ระดับ 515 นาโนเมตร

การศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัด ในการทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50%; IC_{50}) โดยใช้ BHT และ กรดแอสคอร์บิก เป็นสารมาตรฐานได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.3 พบว่าค่า IC_{50} สารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล เท่ากับ 2.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 4.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนสารสกัดรางจืดอะซีโตนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด (51.91 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH

ตัวอย่าง	IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
สารสกัดน้ำ	2.44 ± 0.18^a
สารสกัดเอทานอล	4.70 ± 1.53^b
สารสกัดอะซีโตน	51.91 ± 8.99^c
BHT	0.34 ± 0.04^a
กรดแอสคอร์บิก	0.04 ± 0.00^a

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

a, b และ c หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.3.2 วิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)

ส่วนการวิเคราะห์ด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดซึ่งเกิดจากการรีดิวซ์โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก Fe^{3+} กับ TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+} กับ TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระ ใช้ BHT เป็นตัวควบคุม และแสดงไว้ในตารางที่ 4.4 พบว่าในสารสกัดน้ำ เอทานอล และอะซีโตน มีค่าเท่ากับ 0.294 ± 0.089 , 0.048 ± 0.102 และ 0.018 ± 0.082 mmol Fe^{2+} /g RM เปรียบเทียบกับ BHT ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.379 ± 0.871 mmol Fe^{2+} /g RM

ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี FRAP

ตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (mmol Fe ²⁺ / g RM)
สารสกัดน้ำ	0.294 ± 0.089 ^b
สารสกัดเอทานอล	0.048 ± 0.002 ^c
สารสกัดอะซีโตน	0.018 ± 0.002 ^d
BHT	2.379 ± 0.071 ^a

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

a, b, c และ d หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05)

จากการศึกษาของ Chan et al. (2010) ซึ่งได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาสมุนไพร ชนิดต่างๆ พบว่า เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP รังจืด มีค่าเท่ากับ 4.3 มิลลิกรัมกาลีค/กรัม ซึ่งถือว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับชาสมุนไพรชนิดอื่น เช่น Lemon myrtle, Guava, Misai kucing, Legundi เป็นต้น แม้ว่าชาชงสมุนไพร จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ แต่ถือว่ายังมีฤทธิ์น้อยกว่าชาชง ที่อยู่ในกลุ่ม *Camellia* เช่น ชาเขียว และ ชาอู่หลง

4.3.3 วิธี Scavenging activity of ABTS radical cation

การวิเคราะห์ด้วยวิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติมโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K₂S₂O₈) และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดโดยใช้ BHT และ กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า สารสกัดรังจืดน้ำ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ สารสกัดรังจืดเอทานอล (25.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดอะซีโตนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด ที่ระดับค่า IC₅₀ เท่ากับ 65.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี ABTS

ตัวอย่าง	IC ₅₀ (มิลลิกรัม / มิลลิลิตร)
สารสกัดน้ำ	1.20 ± 0.21 ^b
สารสกัดเอทานอล	25.48 ± 0.16 ^c
สารสกัดอะซีโตน	65.69 ± 0.91 ^d
BHT	0.09 ± 0.01 ^a
กรดแอสคอร์บิก	0.05 ± 0.01 ^a

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

a, b, c และ d หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(p<0.05)

โดยภาพรวมความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืด เมื่อประเมินด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่า สารสกัดน้ำ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระระดับสูงสุด และรางจืดที่สกัดด้วยอะซีโตนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระระดับต่ำสุด ซึ่งหากเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ BHT และ กรดแอสคอร์บิก พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสอดคล้องกับปริมาณของฟีนอลิกที่มีในตัวอย่าง หากสารสกัดใดมีปริมาณของฟีนอลิกมาก จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกกับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ Jacobo-Velazquez et al. (2009) เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการวิธี DPPH, FRAP และ ABTS พบว่ามีความสัมพันธ์กัน เนื่องจากทั้ง 3 วิธี อาศัยหลักการที่คล้ายคลึงกัน คือ การถ่ายโอนอิเล็กตรอน (Huang et al., 2014) ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว ทำซ้ำได้ และมี sensitivity ดี

4.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรางจืด (Cytotoxicity Test)

ในการทดลองเมื่อทำการเติม MTT ในหลุมของเพลทที่มีการยึดเกาะของเซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่าเมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ จะพบผลิตภัณฑ์ควาสีม่วงเกิดขึ้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้เกิดจาก mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเปลี่ยน MTT ให้กลายเป็น formazan product ซึ่งจะไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ใน 100% DMSO และสามารถวัดสีของ formazan product ที่เกิดขึ้นได้จากค่าดูดกลืนแสงที่ระดับความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.6 ความเป็นพิษของสารสกัดรางจืดต่อเซลล์ไลน์ Caco-2 หลังผ่านการย่อยด้วยแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง

สารสกัดรางจืด	LC ₅₀ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
น้ำ	132±12
เอทานอล	>200
Water (digesta)	>200
Ethanol (digesta)	>200

ในการศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดรางจืดที่มีต่อเซลล์ไลน์ Caco-2 หากค่าดูดกลืนแสงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับตัวควบคุม แสดงว่าเซลล์มีการตายเกิดขึ้น ซึ่งสามารถนำไปคำนวณเป็น อัตราการรอดชีวิต(%viability) เทียบกับตัวควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้เติมสารสกัด) โดยตัวควบคุมมี อัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 100% ผลการทดลองพบว่า สารสกัดรางจืดน้ำมีค่า LC₅₀ เท่ากับ 132 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดรางจืดเอทานอล และ digesta จากสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Caco-2 จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับพิษของสารสกัดรางจืดของ Oonsivilai et al. (2008) ต่อเซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่าสารสกัดรางจืดน้ำมี ค่า LC₅₀ เท่ากับ 147 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดรางจืดเอทานอลไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ทางทฤษฎี สารที่มีค่า LC₅₀ มากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จัดอยู่ในกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่ำ (Okanogi et al., 2006)

ในการทดสอบความเป็นพิษของ digesta ต่อเซลล์ไลน์ Caco-2 นั้นเพื่อประเมินความเป็นพิษเบื้องต้น ก่อนทำการทดสอบการดูดซึมของเซลล์ (Cellular uptake) จากตารางที่ 4.6 พบว่า เมื่อเจือจาง digesta(DG) กับ DMEM ในอัตราส่วน 1:3 ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองการดูดซึมในเซลล์ไลน์ Caco-2 ไม่พบความเป็นพิษในเซลล์

4.5 ศึกษาความคงตัวต่อกระบวนการย่อย (Digestive stability) ของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดรางจืด

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

ในการศึกษาความคงตัวของกระบวนการย่อยอาหาร ใช้ปริมาณสารสกัดเทียบกับปริมาณรังสี ผง 2 กรัม โดยอ้างอิงตามปริมาณ ที่ระบุในบัญชียาสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ ซึ่งประกาศในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2554 (ภาคผนวก ง) ในการศึกษาโดยใช้แบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง โดยทดสอบการย่อยสารสกัดของปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก แต่เนื่องจากสารที่ต้องการทดสอบนี้ ไม่มีส่วนของคาร์โบไฮเดรต จึงได้ยกเว้นการทดสอบการย่อยของสารสกัดในปาก จากการศึกษาของ Laurent et al. (2007) ซึ่งทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างฟลาโวนอยด์จากเมล็ดองุ่นที่มีต่อสารที่หลั่งออกมาจากระบบย่อยอาหาร โดยการใช้แบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลองควบคู่กับการทดสอบการดูดซึมโดยเซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่าน้ำลายไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารฟีนอลิก

4.5.1 ความคงตัวของกระบวนการย่อยของสารสกัดรางจืดน้ำ

จากการวิเคราะห์ความคงตัวของกระบวนการย่อยของสารสกัดรางจืดน้ำ ในตารางที่ 4.7 ซึ่งแสดงปริมาณสารประกอบทางเคมีในสารสกัดรางจืดน้ำก่อนการย่อย และหลังการย่อยในกระเพาะอาหาร พบว่า สารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่ ได้แก่ อะพิจินิน, กรดโปรโตคาเทคซุอิก และ กรดคาเฟอิก ค่อนข้างเสถียรต่อกระบวนการย่อยในกระเพาะอาหาร โดยมี % recovery เท่ากับ 91.54, 89.54% และ 82.72% ตามลำดับ และมี % recovery ของฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 87.05% จากผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Bernúdez-Soto et al. (2007) ซึ่งได้ศึกษาความคงตัวของสารประกอบโพลีฟีนอลในไอซ์เบอร์รี่ (*Aronia melanocarpa*) หลังจากผ่านการย่อยที่กระเพาะอาหาร พบว่า ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบฟีนอลิกหลัก เช่น อนุพันธ์ของกรดคาเฟอิก แต่จากการศึกษาของ Shim et al. (2012) ซึ่งได้ศึกษาผลของน้ำตาล และกรด ต่อความเสถียรของแคทาทิน (catechins) เมื่อผ่านกระบวนการย่อยในทางเดินอาหาร พบว่า เมื่อผ่านการย่อยในกระเพาะอาหาร ปริมาณแคทาทินเกิดการสูญเสีย เท่ากับ 30.14%

หลังจากการย่อยในลำไส้เล็ก พบว่า ปริมาณของสารประกอบ อะพิจินิน, กรดคาเฟอิก และ กรดโปรโตคาเทคซุอิก มี %recovery เท่ากับร้อยละ 70.00, 82.49 และ 65.43 ตามลำดับ โดย %recovery ของฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 89.04% ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากปริมาณคงเหลือหลังการย่อยในลำไส้เล็ก แสดงให้เห็นว่า สารสกัดรางจืดน้ำมีความเสถียรเมื่อผ่านแบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง แตกต่างจากการศึกษาของ Shim et al. (2012) ได้ศึกษาผลของน้ำตาล และกรดต่อความเสถียรของแคทาทิน เมื่อผ่านกระบวนการย่อยในลำไส้เล็ก พบว่า มีปริมาณของแคทาทินที่คงเหลือจากกระบวนการย่อยในลำไส้เล็ก เท่ากับ 5.3% โดยปริมาณของแคทาทินที่ลดลงหลังจากผ่านการย่อยในลำไส้เล็ก เนื่องจาก ออกซิเจนที่อยู่ในตัวอย่าง สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาเคมีที่มีผลต่อปริมาณของฟีนอลิก เช่น อีพิเมอร์ไรเซชัน (epimerization) และ ออกซิเดชัน (auto-oxidation) เป็นต้น (Green et al., 2007) และในลำไส้

เล็กมีสภาวะ pH ที่เป็นกลาง ทำให้กลุ่มไฮดรอกซี (hydroxyl) ที่อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 3', 4' และ 5' ของ EGC และ EGCG มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซมิควิโนนฟรีเรดิคัล (semiquinone free radicals) (Green et al., 2007, Chen et al., 1998) หากลดปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในสารละลายในกระบวนการย่อยอาหารได้ สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ มีการใช้ก๊าซไนโตรเจนเพื่อแทนที่ออกซิเจนในหลอดทดลอง จึงลดการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่มีผลต่อฟีนอลิกได้

จากตารางที่ 4.7 พบว่าปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดเมื่อผ่านกระบวนการย่อยในแบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง มีค่าใกล้เคียงปริมาณเดิมที่ระดับร้อยละ 90 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Krook et al. (2012) เกี่ยวกับความเสถียรของสารโพลีฟีนอลิกในชา ได้แก่ epigallocatechin gallate (EGCG) และ pentagalloyl glucose (PGG) ต่อกระบวนการย่อยอาหารในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ พบว่า การย่อยในกระเพาะและลำไส้เล็กไม่ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ EGCG และ PGG ซึ่งความเสถียรของ PGG นั้นเกิดจากปฏิสัมพันธ์กันระหว่างสารโพลีฟีนอลโปรตีน หรือ สารชีวโมเลกุลอื่นๆ

4.5.2 ความคงตัวของกระบวนการย่อยของสารสกัดรางจืดเอทานอล

จากการวิเคราะห์ความคงตัวของสารสกัดรางจืดเอทานอล ในตารางที่ 4.8 ซึ่งแสดงปริมาณสารประกอบทางเคมีในสารสกัดรางจืดเอทานอลก่อนการย่อย และหลังผ่านกระบวนการย่อยในระบบทางเดินอาหาร พบว่า สารประกอบทางเคมีประเภท ลูทีน มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญสำคัญทางสถิติ โดยก่อนกระบวนการย่อยมีปริมาณลูทีน เท่ากับ 0.03 ไมโครกรัม/กรัมของน้ำหนักแห้ง หลังผ่านกระบวนการย่อยในกระเพาะอาหารลดลง เหลือ 0.02 ไมโครกรัม/กรัมของน้ำหนักแห้ง มี% recovery เท่ากับร้อยละ 66.00

และหลังผ่านกระบวนการย่อยในลำไส้เล็กลดลง เหลือ 0.008 ไมโครกรัม/กรัมของน้ำหนักแห้ง มี% recovery เท่ากับร้อยละ 26.67 แสดงให้เห็นว่า ลูทีนมีการสูญเสียในกระลำไส้เล็กค่อนข้างมาก จากการศึกษาของ Chichumroonchokchai et al. (2004) ซึ่งได้ทำการศึกษานำไปใช้ทางชีวภาพของลูทีนในผักโขมบดละเอียดและในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม พบว่า ลูทีนค่อนข้างเสถียรต่อกระบวนการย่อยในกระเพาะอาหาร และหลังผ่านกระบวนการย่อยในลำไส้เล็ก ปริมาณของลูทีนมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$) การศึกษาความเสถียรของ คลอโรฟิลล์เมื่อผ่านกระบวนการย่อยอาหารในกระเพาะอาหารดังแสดงในตารางที่ 4.9 ไม่พบปริมาณของ คลอโรฟิลล์เอ และ คลอโรฟิลล์บี หลงเหลืออยู่ และปริมาณของ ฟีโอไฟดินเอ และ ฟีโอไฟดินบี เพิ่มขึ้น เท่ากับร้อยละ 103.00 และ 344.00 เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร โดยที่ระดับ pH ประมาณ 2-3 คลอโรฟิลล์ส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ ได้แก่ ฟีโอไฟดินเอ และ ฟีโอไฟดินบี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ferruzzi et al. (2007)

ตารางที่ 4.7 ปริมาณสารประกอบทางเคมีในสารสกัดรางจืดนำก่อนและหลังผ่านกระบวนการย่อยในระบบทางเดินอาหาร

สารประกอบทางเคมี	ก่อนการย่อย	เมื่อผ่านกระเพาะอาหาร	% recovery	เมื่อผ่านลำไส้เล็ก	% recovery
อะพิจินิน (มิลลิกรัม/100 กรัม)	2514.80±4.5 ^a	2302.20±3.5 ^b	91.54±3.18	1760.36±2.4 ^c	70.00±7.55
กรดคาเฟอิก (มิลลิกรัม/100 กรัม)	162.56±2.1 ^a	115.56±3.1 ^c	89.54±2.21	134.09±2.5 ^b	82.49±4.55
กรดโปรโตคาเทกซูอิก (มิลลิกรัม/100 กรัม)	361.34±3.5 ^a	298.90±2.1 ^b	82.72±1.90	235.42±4.5 ^c	65.43±5.69
ฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัม/100 กรัม)	3037.07±5.2 ^a	2463.33±4.2 ^c	87.05±4.38	2704.21±6.9 ^b	89.04±5.6

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) และ a, b และ c หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณสารประกอบทางเคมีในสารสกัดรางจืดก่อนและหลังผ่านกระบวนการย่อยในระบบทางเดินอาหาร

สารประกอบทางเคมี	ก่อนการย่อย	เมื่อผ่านกระเพาะอาหาร	% recovery	เมื่อผ่านลำไส้เล็ก	% recovery
คูทิน (ไมโครกรัม/ 100 กรัม)	30.00 ± 0.0	20.00 ± 0.0	66.00%	0.80 ± 0.0	26.67
คลอโรฟิลล์เอ (ไมโครกรัม/100 กรัม)	60.00 ± 0.0	n.d.	-	n.d.	-
คลอโรฟิลล์ (ไมโครกรัม/ 100 กรัม)	130.00 ± 0.2	n.d.	-	n.d.	-
ฟิโอฟิตินเอ (ไมโครกรัม/ 100 กรัม)	260.00 ± 0.1	270.00 ± 0.1	103.00	280.00 ± 0.1	107.00
ฟิโอฟิตินบี (ไมโครกรัม/100 กรัม)	54.00 ± 0.0	186.00 ± 0.1	344.00	86.00 ± 0.1	159.00
ฟิโอฟอร์บายด์เอ (ไมโครกรัม/100 กรัม)	170.00 ± 0.0	40.00 ± 0.1	23.53	n.d.	-
คลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ไมโครกรัม/100 กรัม)	620.00 ± 0.1	496.00 ± 0.1	80.05	505.00 ± 0.1	81.58

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

เนื่องจากความเป็นกรดใน กระเพาะอาหาร ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างคลอโรฟิลล์ โดยโครงสร้างที่ปราศจาก Mg^{2+} ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสีของคลอโรฟิลล์จากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า ฟีโอไฟติไนเซชัน (pheophytinization) และมี % recovery ของคลอโรฟิลล์ เท่ากับ ร้อยละ 80.0 ส่วนประกอบทางเคมีประเภทคลอโรฟิลล์ ผ่านกระบวนการย่อยอาหารในลำไส้เล็ก ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ไม่พบคลอโรฟิลล์เอ, คลอโรฟิลล์บี และ ฟีโอโพรบายด์เอ แต่พบว่ามีปริมาณของ ฟีโอไฟตินเอ และฟีโอไฟตินบีเพิ่มขึ้น ส่วน % recovery ของคลอโรฟิลล์ทั้งหมด เท่ากับ ร้อยละ 81.58

4.6 ชีวภาพการนำไปใช้ของสารสกัดรางจืด

การศึกษาชีวภาพการนำไปใช้ของสารสกัดรางจืด (bioaccessibility) ของสารต่างๆ เช่น แคโรทีนอยด์ โพรตีน สารสกัดจากสมุนไพร รวมถึงสารประกอบอื่นๆ ส่วนใหญ่ทดสอบด้วยเซลล์ไลน์ Caco-2 โดยการเจือจางสารที่ต้องการทดสอบด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (DMEM) และบ่มกับเซลล์เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อทดสอบว่าเซลล์สามารถดูดซึมสารเหล่านั้นไปนานได้มากน้อยเพียงใด เซลล์ที่ใช้ อยู่ระหว่าง passage ที่ 22-35 เนื่องจากเป็นช่วงที่เซลล์สามารถ differentiate ไปเป็น enterocyte ได้ใกล้เคียงกับลำไส้เล็กของมนุษย์มากที่สุด เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 4.3 ซึ่งแสดงลักษณะของเซลล์ไลน์ Caco-2 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 21 วัน ในระยะแรกเซลล์จะมีลักษณะเป็นวงกลม เมื่อผ่านไป 1 วันจะเริ่มเกาะพื้นผิวหลุมของแพลท ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุก 3-4 วันเป็นระยะเวลา 21 วัน จากนั้นจึงสามารถนำไปใช้ทดลองเกี่ยวกับถูกดูดซึมได้

4.6.1 ความสามารถในการถูกดูดซึม (% cell uptake) ของสารสกัดรางจืดน้ำ

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.9 แสดงความสามารถในการถูกดูดซึมในเซลล์ของสารสกัดรางจืดน้ำ พบว่า สารประกอบทางเคมี คือ อะพิจินิน, กรดคาเฟอิก, กรดโปรโตคาเทคชูอิก สามารถถูกดูดซึมได้เท่ากับ ร้อยละ 70.00, 80.48 และ 65.43 ตามลำดับ ร้อยละของการถูกดูดซึมของฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 56 โดยชีวภาพพร้อมใช้ (bioavailability) สารสกัดรางจืดน้ำขึ้นกับขนาดและความเป็นไอออนของสาร โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยการเกิดไมเซลล์ สามารถซึมผ่าน basolateral membrane ได้ทันที ส่วนของอะพิจินินเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ สามารถเกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในเซลล์ลำไส้เล็กได้เช่นกัน เนื่องจากในลำไส้เล็กมีกลุ่มเอนไซม์ β -galactosidase ได้แก่ lactase-phlorizin hydrolase (LPH) และ cytosolic β -glucosidase (CBG) โดย LPH จะพบในส่วนของ brush border ซึ่งนอกจากมีหน้าที่ในการย่อยแลคโตส (lactose) ไปเป็นกลูโคสและกาแลคโตสแล้ว ยังทำหน้าที่ในการย่อยฟลาโวนอยด์ ได้ส่วนของอะไกลโคน (aglycone) และ ไกลโคไซด์ (glycoside) โดยส่วนของอะไกลโคนสามารถแพร่ผ่านเซลล์ลำไส้เล็กได้ดี เนื่องจากมีความสามารถในการละลาย

ในน้ำมัน ได้ดีกว่า และส่วนของไกลโคไซด์จะต้องอาศัยโปรตีนขนส่ง ที่เรียกว่า sodium-dependent glucose transporter (SGLT 1) เป็นตัวช่วยขนส่งเข้าสู่เซลล์ (Lewandowska et al., 2013)

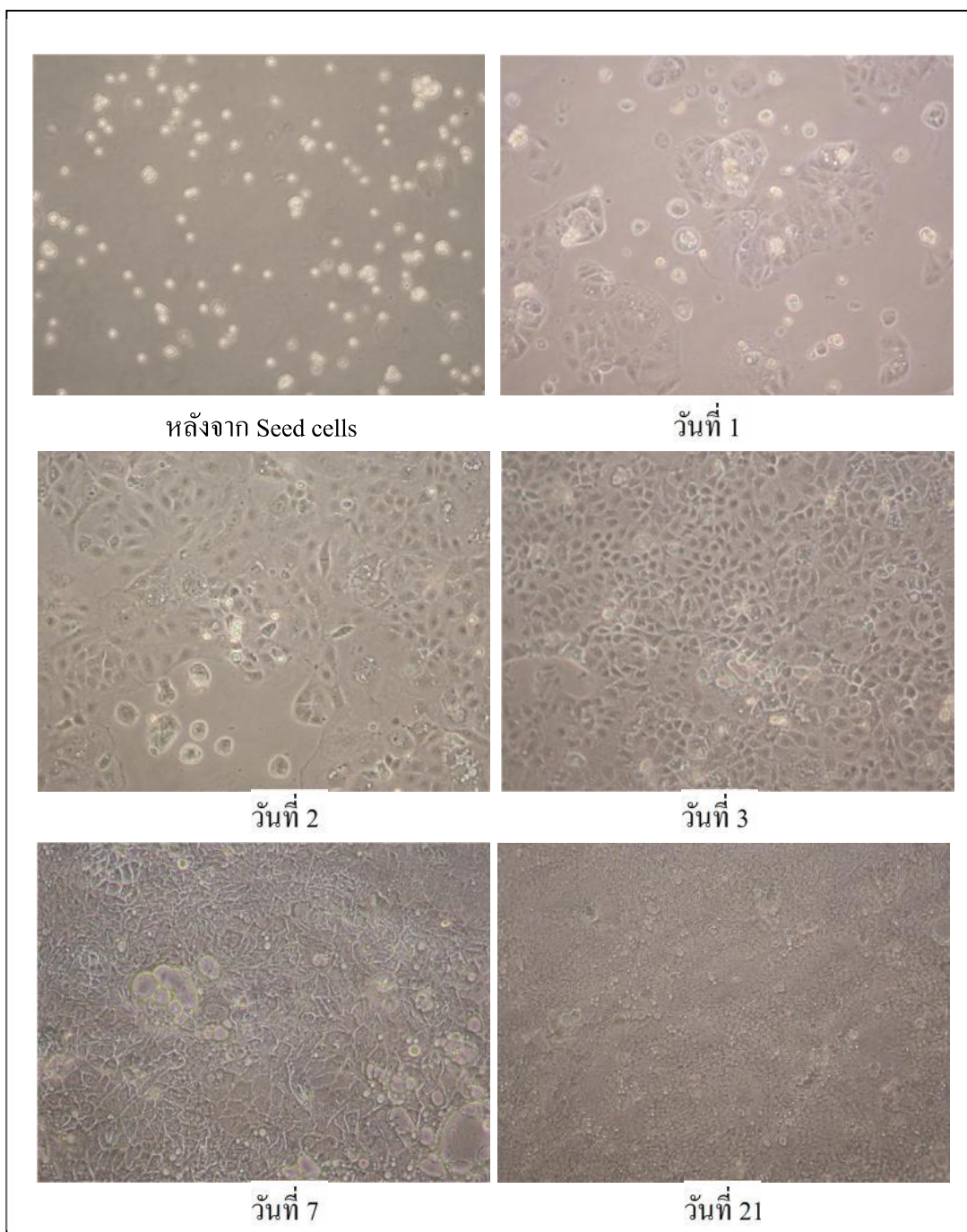
ตารางที่ 4.9 ความสามารถในการถูกดูดซึม (% cell uptake) ของสารสกัดรางจืดน้ำ

สารประกอบทางเคมี	cell uptake (%)
อะพิจินิน	70.00±7.55
กรดคาเฟอิก	80.48±4.55
กรดกาลิก	n.d
กรดโปรโตคาเทคชินิก	65.43± 5.69
ฟีนอลิกทั้งหมด	56.00±5.90

หมายเหตุ: n.d หมายถึง not detected

จากผลการศึกษาดังกล่าว พบว่าสารฟลาโวนอยด์ คือ อะพิจินิน มีความสามารถในการถูกดูดซึมในเซลล์ไลน์ Caco-2 ได้ดี และสอดคล้องกับการศึกษาของ Baba et al.(2001), Olthof et al. (2001) ซึ่งทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบปริมาณของโปรไซยานิดิน (procyanidins) และ flavan 3-ols ในพลาสมา แสดงให้เห็นว่าสารดังกล่าวสามารถถูกดูดซึมในลำไส้เล็กได้

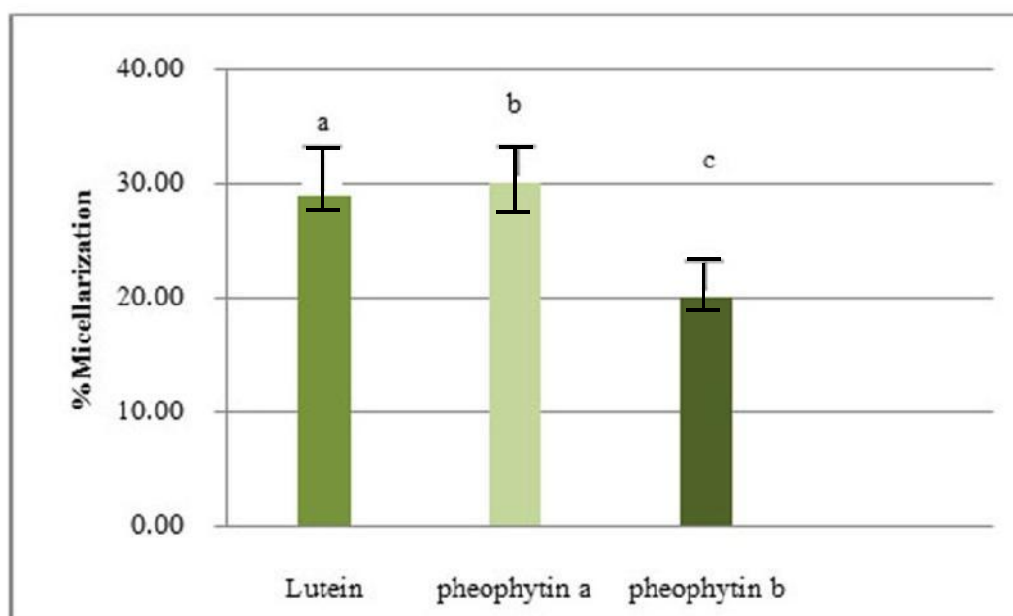
แต่จากการศึกษาของ Laurent et al. (2007) ซึ่งทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างฟลาโวนอยด์จากเมล็ดคองุ่นสกัดและสารที่คัดหลังจากระบบย่อยอาหารและลำไส้เล็ก ไม่พบฟลาโวนอยด์ ใน cell monolayer เนื่องจากอาจเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟลาโวนอยด์เหล่านั้นในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ ส่วนการศึกษาของ Cambon Roques et al. (2002) พบว่า สารประกอบฟีนอลิกทำปฏิกิริยาเคมีกับอาหารเลี้ยงเซลล์ มีผลทำให้เกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของปริมาณฟลาโวนอยด์ และจากการศึกษาผลของสารเคลือบ (coating) ต่อความเสถียรของแคททีชินในชา และความสามารถในการขนส่งออกภายนอกเซลล์ พบว่า ฟลาโวนอยด์เกิดการสูญเสียจากกระบวนการย่อยในทางเดินอาหาร เนื่องจากระดับ pH ที่มีค่าค่อนข้างต่ำในกระเพาะอาหาร และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน การเพิ่มความเสถียรของสารฟีนอลิก อาศัยการเคลือบตัวอย่างด้วยสารบางชนิด จากการศึกษาทดลองเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างปกติและตัวอย่างที่เคลือบด้วย hydroxypropyl methyl cellulose phthalate (S-HPMCP) มีค่าความคงตัวจากกระบวนการย่อย เท่ากับ ร้อยละ 12.33 และ 33.73 ตามลำดับ และความสามารถในการขนส่งออกนอกเซลล์ไลน์ Caco-2 เท่ากับร้อยละ 6.70 และ 22.98 (Chung et al.,2014) แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการถูกดูดซึม และขนส่งออกภายนอกเซลล์ขึ้นอยู่กับชีวภาพการนำไปใช้ (bioavaccessibility) ของสารเหล่านั้น



รูปที่ 4.3 ลักษณะของเซลล์ไลน์ Caco-2 ตั้งแต่เริ่มเลี้ยง (seeded cells) จนมีอายุ 21 วัน (กำลังขยาย 100 เท่า)

4.6.2 ความสามารถในการถูกดูดซึม (% cell uptake) ของสารสกัดรางจืดเอทานอล

ความสามารถในการถูกดูดซึมของสารสกัดรางจืดเอทานอล ซึ่งมีสารประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ คลอโรฟิลล์และลูทีน ประเมินได้จาก %micellarization ของลูทีน และคลอโรฟิลล์ ดังกล่าว ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม lipophilic หากสามารถเกิดไมเซลล์ ได้ดี ย่อมสามารถถูกดูดซึมได้ดี เช่นเดียวกัน จากผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าการเกิดเป็นไมเซลล์ ของ ลูทีน, คลอโรฟิลล์ เอ และ คลอโรฟิลล์บีในสารสกัดรางจืดเอทานอล มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยฟีโอฟิตินเอ มี % micellarization สูงสุด รองลงมาคือ ลูทีน และ ฟีโอฟิตินบี ตามลำดับ โดย % micellarization ของคลอโรฟิลล์ขึ้นอยู่กับโครงสร้างที่แตกต่างกันของคลอโรฟิลล์ หากในโครงสร้างมีหมู่ของฟอร์มิล (formyl groups) จะเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ (hydrophilicity) จากการวิเคราะห์ปริมาณของคลอโรฟิลล์ในสารสกัดรางจืดเอทานอล ด้วย HPLC พบว่าคลอโรฟิลล์บีจะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าคลอโรฟิลล์เอ ดังนั้นคลอโรฟิลล์บีจึงมีสามารถเกิดเป็นไมเซลล์ได้น้อยกว่าคลอโรฟิลล์เอ (Ferruzzi et al., 2001)



รูปที่ 4.4 การเกิด micellarization ของสารสกัดรางจืดเอทานอล

หมายเหตุ: a, b และ c หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หากเปรียบเทียบ %micellarization ของแคโรทีนอยด์ พบว่า ลูทีนในสารประกอบเอทานอล มีความสามารถเกิดเป็นไมเซลล์ได้ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแคโรทีนอยด์ประเภทอื่นๆ ได้แก่ ไลโคพีน อัลฟา-แคโรทีน และ เบต้า-แคโรทีน โดยลูทีน สามารถเกิดเป็นไมเซลล์ได้ประมาณ 5-40% แม้จะเป็นอาหารประเภทเดียวกัน แต่ปริมาณของแคโรทีนอยด์นั้นแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ขนาดอนุภาคของอาหาร การเตรียมตัวอย่าง และเทคนิคที่ใช้ในการสกัดแคโรทีนอยด์จากตัวอย่างและไมเซลล์ เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของลูทีนเปรียบเทียบกับอัลฟา-แคโรทีน และ เบต้า-แคโรทีน พบว่าลูทีนมีออกซิเจนในโครงสร้างมากกว่า ซึ่งเกิดควมมีขั้วมากกว่าและสามารถถูกละลายได้โดยไขมันได้น้อยกว่า ดังนั้นจึงเกิดเป็นไมเซลล์ได้น้อยกว่า (Simpson et al., 1989)

จากการศึกษาของ Chitchumroonchokchai et al. (2014) ซึ่งทำการศึกษา ซึ่งได้ทำการศึกษาชีวภาพพร้อมใช้ของลูทีนในอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยการใช้แบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลองร่วมกับเซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่า %micellarization ของแคโรทีนอยด์ในตัวอย่างอาหารผักโขม หลังผ่านกระบวนการย่อยอาหาร มีค่าประมาณ ร้อยละ 25-53 ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่นำมาศึกษา

จากการทดสอบความสามารถในการถูกดูดซึมในเซลล์ไลน์ Caco-2 ดังแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่า % การดูดซึมของลูทีน เท่ากับ 27.50% แม้ว่าลูทีนจะสามารถเกิดไมเซลล์ได้ 30% ซึ่งสูงกว่าคลอโรฟิลล์เอ แต่เนื่องจากสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จะสลายตัวเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent), ไลโปโซม (liposomes) และ water-dispersible beadlet (Xu et al., 1999) นอกจากนี้ แสงสว่าง ความร้อน และอนุมูลอิสระสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไอโซเมอร์ไรเซชัน ของลูทีนได้เช่นเดียวกัน (Simpson et al., 1995)

ตารางที่ 4.10 ความสามารถในการถูกดูดซึมในเซลล์ไลน์ Caco-2 ของสารสกัดรางจืดเอทานอล

สารประกอบทางเคมี	cell uptake (%)
ลูทีน	27.50
คลอโรฟิลล์เอ	n.d
คลอโรฟิลล์บี	n.d
ฟีโอไฟดินเอ	50.33
ฟีโอไฟดินบี	33.33
ฟีโอฟอร์บายด์เอ	n.d
คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	47.85

หมายเหตุ: n.d. = not detected

การถูกดูดซึมของแคโรทีนอยด์โดยเซลล์ไลน์ Caco-2 จะสูงขึ้นหากเป็นไมเซลล์ชนิดสังเคราะห์ (synthetic micelles) ไม่ใช่ไมเซลล์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อย (natural micelle) โดยความแตกต่างระหว่างไมเซลล์ดังกล่าว คือ ขนาดของอนุภาค (particle size) ประจุบริเวณพื้นผิว (surface charge) และความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่าง brush border surface ของเซลล์ลำไส้เล็ก ส่วนความสามารถในการถูกดูดซึมของคลอโรฟิลล์ทั้งหมด เท่ากับร้อยละ 47.85 โดยฟิโอโฟดินเอ ถูกดูดซึมได้มากกว่าฟิโอโฟดินบี เนื่องจากโครงสร้างของโมเลกุลที่มีความเป็น hydrophobicity มากกว่า (Ferruzzi et al., 2007) เมื่อผ่านแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง แสดงให้เห็นว่าสารประกอบ คลอโรฟิลล์สามารถนำไปใช้ได้ในร่างกายมนุษย์ในบางโครงสร้าง โดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นฟิโอโฟดิน โดยจะรวมเกิดไลโปฟิลิกไมเซลล์ (lipophilic micelle) ซึ่งลักษณะกลไกการดูดซึมของ คลอโรฟิลล์ นั้นมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับการดูดซึมสารประกอบอื่นๆเช่น แคโรทีนอยด์ (Garrett et al, 1999) ส่วน การดูดซึมของคลอโรฟิลล์ที่ได้จากธรรมชาติจะน้อยกว่าคลอโรฟิลล์สังเคราะห์ ได้แก่ โซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลลิน ซึ่งสามารถถูกดูดซึมได้มากถึงร้อยละ 60 โดยโครงสร้างที่ดูดซึมได้ คือ Cu-chlorin e₄



บทที่ 5

บทสรุป

จากการศึกษา Phenolic profile ของสารสกัดรางจืดน้ำโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าส่วนใหญ่เป็นสารประเภทฟีนอลิก ได้แก่ กรดโปรโตคาเทคชินิก กรดคาเฟอิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ อะพิจินิน รวมถึงกลุ่มกลูโคไซด์

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดทั้งสามชนิดด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่า รางจืดที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และรางจืดที่สกัดด้วยอะซิโตนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ BHT และ กรดแอสคอร์บิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

จากการศึกษาความเสถียรของสารประกอบทางเคมีในสารสกัดรางจืดน้ำ พบว่าสารสกัดรางจืดน้ำค่อนข้างเสถียรในแบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง โดยสารกลุ่มฟีนอลิกจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ส่วนสารสกัดรางจืดเอทานอล ซึ่งมีสารพิษเคมีหลัก คือ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี ฟิโอฟราบายด์เอ ฟิโอฟิตินเอ และลูทีน เมื่อผ่านแบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง มีการเปลี่ยนแปลง คือ คลอโรฟิลล์ ส่วนใหญ่จะมีการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปของ ฟิโอฟิติน

จากการทดสอบความสามารถในการถูกดูดซึมของสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอลใน เซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่า สารสกัดรางจืดน้ำ สามารถถูกดูดซึมได้ เนื่องจาก มีสารประกอบทางเคมีหลัก คือ ฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้ ดังนั้นจึงมีความสามารถในการแพร่เข้าไปเซลล์ไลน์ Caco-2 ส่วนสารสกัดรางจืดเอทานอลมีสารประกอบทางเคมีหลักที่เป็นสารประกอบ คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ ซึ่งเมื่อผ่านแบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง พบว่า สารประกอบ คลอโรฟิลล์ สามารถถูกดูดซึมได้ ประมาณ 47% โดยความสามารถในการถูกดูดซึมผ่านเนื้อเยื่อบุผิวของเซลล์ไลน์ Caco-2 จะแตกต่างกันไปตามชนิดของอนุพันธ์คลอโรฟิลล์ ซึ่งอธิบายได้ถึงการนำอนุพันธ์คลอโรฟิลล์ไปใช้ได้บางโครงสร้าง

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากยังไม่มีงานวิจัยใด ที่ศึกษาชนิดของสารออกฤทธิ์ในรังจีด ที่มีผลโดยตรงต่อการขับพิษออกจากร่างกาย ส่วนใหญ่ทราบเพียงองค์ประกอบหลักทางเคมีเท่านั้น ดังนั้นการวิจัยในอนาคตควรมีการสกัด และการทำบริสุทธิ์สารสกัด เพื่อได้สารประกอบทางเคมีหลักที่มีผลโดยตรงต่อระบบการขับพิษออกจากร่างกาย

2. เมื่อทราบถึงประเภทของสารออกฤทธิ์จากข้อ 5.1 ควรมีการศึกษาความสามารถในการขนส่งผ่านเซลล์ไลน์ Caco-2 โดยการใช้ transwell plate เพื่อพิจารณาความสามารถในการขนส่งผ่านเซลล์ลำไส้เล็ก

3. การประเมินความเสถียรและการนำไปใช้ทางชีวภาพโดยการใช้แบบจำลองกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง และการใช้เซลล์ไลน์ Caco-2 สามารถประเมินความเสถียรของสารออกฤทธิ์หลักและความสามารถในการถูกดูดซึมของสารดังกล่าวได้เบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจากในร่างกายของมนุษย์มีโครงสร้างและกลไกการทำงานที่ซับซ้อนมาก ปัจจัยบางอย่างไม่สามารถจำลองได้ในหลอดทดลอง ดังนั้นหากต้องการศึกษา ปริมาณที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้จริง ควรมีการทดสอบโดยตรงกับสัตว์ทดลอง แล้วทำการตรวจสอบปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่พบในพลาสมา เพื่อทราบปริมาณที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ทางชีวภาพได้อย่างถูกต้อง

บรรณานุกรม

- ชะลอ อุทกภาชนัน. (2519). ยาสมุนไพรกับโรคในประเทศเขตร้อนและวิธีการบำบัดรักษา. กรุงเทพฯ: แพร์พิทยา อินเตอร์เนชันแนล. 244 - 252.
- พินดา ไใหญ่ธรรมสาร. (2542). รางจืด. **จุดสารข้อมูลสมุนไพร**. 16 (1): 4-7.
- พานิช เตชะเสน และ ชัชวดี ทองทาป. (2523). การทดลองใช้รางจืดแก้พิษยาฆ่าแมลง. **เชียงใหม่เวชสาร**. 19(2): 105 - 114.
- วีรยุทธ จิตรพิวงม. (2522). การศึกษาสารประกอบรางจืด. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**.
- วีรวรรณ เรืองยุทธการณ. (2523). การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของใบรางจืด. **วิทยานิพนธ์การวิจัยวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา)**. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วุฒิ วุฒิธรรมราช. (2540). สารานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 390.
- ศิริวรรณ ศิลปะสุวรรณ. (2522). การศึกษาผลของสมุนไพรรางจืดต่อการเจริญของแบคทีเรียบางอย่างในตระกูล *Enterobacteriaceae*. **วิทยานิพนธ์การวิจัยวิทยาศาสตร์ (การสอนชีววิทยา)**. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สุพร จารุมณี และคณะ. (2541). รายงานการวิจัยเรื่องการพัฒนายาทาภายนอกสำหรับต้านการอักเสบจากเถารางจืด ตอนที่ 1. **คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**. 1 - 4.
- สุภาภรณ์ ปิติพร. (2554). รางจืดล้างพิษสารเคมีกำจัดศัตรูพืช. **นิตยสารหมอชาวบ้าน**. 385.
- เสงี่ยม ปิ่นเครือ. (2535). ไม้เทศเมืองไทย. กรุงเทพฯ: การพิมพ์ไชยวัฒน์, 455 - 456.
- Aritajat, S., Wutterapol, S. and Saenphet, K., 2004, Anti-diabetic effect of *Thunbergia laurifolia* Lindl. aqueous extract. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 35: 53 - 57.
- Bermúdez-Sota, M.-J., Tomás-Barberán, F.-A. and García-Conesa., (2007). Stability of polyphenols in Chokeberry (*Aroniamelanocarpa*). **Food Chemistry**. 102: 865 - 874.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Chong, K.L., Tan, J.B.L. and Wong, S.K. (2010). Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. **Journal of Food Composition and Analysis**. 23: 185 – 189.

- Chanawirat, A., Toshulkao, C., Temcharoen, P., Glinsukon, T.(2000). Protective effect of *Thunbergia laurifolia* extract on ethanol-induced hepatotoxicity in mice. **Thesis, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University**, Bangkok, Thailand.
- Charumane, S., Vejabhikul, S., Taesotikul, T., Nelsingha, W., Sirisaard, P. and Leelapornpisit, P., (1998). Development of topical anti-inflammatory preparations from *Thunbergia laurifolia* Lindl. **Research Report, Faculty of Pharmacy, Chiangmai University, Chiangmai.**
- 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.
- Chung, J.H.et al. (2014). Effect of hydroxyl propyl methyl cellulose phthalate coating on digestive stability and intestinal transport of green tea catechin. **Intech Med Res.** 3: 34-37.
- De Robertis, E.D.P., Saez, F.A. and De Robertis, E.M.F. (1975). **Cell Biology.** London: W.B. saunders company.
- Egner, P.A., Stansbury, K.H., Snyder, E.P., Rogers, M.E., Hinz, P.A.andKensler, T.W. (2000). Identification and characterization of chlorine 4 ethyl ester in sera of individuals participating in the chlorophyll in chemoprevention trial. **Chemical Research in Toxicology.** 13:900 - 906.
- Failla, M.L., Huo,T.and Thakkar, S.K. (2008). *In vitro* screening of relative bioaccessibility of carotenoids from foods. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.**17 (S1):200 - 203.
- Ferruzzi, M.G and Blaskeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research .**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, micellarization, 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 – 4309.
- Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., Ferreres, F., and Tomas-Barberan, F. (2001). *In vitro* availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49: 1035 – 1041.
- Green, R.J., Murphy, A.S., Schulz, B., Watkins, B.A., and Ferruzzi, M.G. (2007). Common tea formulation modulate *in vitro* recovery of green tea catechins. **Molecular Nutrition and Food Research**. 51: 1152 - 1162
- Kanchanapoom, T., Kasai, R. and Yamasaki, K. (2002). Iridoid glucosides from *Thunbergia laurifolia* Lindl. **Phytochemistry**. 60: 769 - 771.
- Kongyingyos, B., Plentong, C., Ekalaksananan, T. et al. (1990) Antiviral activity of Thai medicinal herbs on herpes simplex virus. **16th Conference on Science and Technology of Thailand**.
- Lewandowska, U., Szewczyk, K., Hrabec, E., Janecka, A and Grolach, S. (2013). Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 61: 12183 - 12199.
- Marshall, N.J, Goodwin, C.J, Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Plant Growth Regulation*. 5(2): 69 – 84
- Meot-Duros, L. and Magne, C. (2009). Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**. 47: 37 – 41.
- Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**. 65: 55 - 63

- 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] Faculty of graduate studies. Mahidol University.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C., Katan, M.B., 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Journal of Nutrition**. 131(1): 66 – 71.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Ningsanond, S., Bomser, J.A. and Ferruzzi, M.G. (2006). Induction of quinone reductase activity in murine hepatoma cells by *Thunbergia laurifolia* Lindl. extracts. **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* Lindl. (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* Lindl.) extracts. **Presented at FoSTAT . BITEC. June 14 - 15. Bangkok, Thailand.**
- Pramyothin, P., Chirdchupunsare, H., Rungsipipat, A. and Chaichantipyuth, C., (2005). Hepatoprotective activity of *Thunbergia laurifolia* Lindl. extract in rats treated with ethanol: *In vitro* and *in vivo* studies, **Journal of Ethnopharmacol**. 102: 408 - 411.
- Purina, GPC. (1978). Coloring matters from flowers of *Thunbergia laurifolia* (Lindl). **Journal of the Indian chemical society**. 55(6): 622 - 623.
- Ruangyuttikarn, W., Chattaviriya, P., Morkmek, N., Chuncharunee, S. and Lertprasertsake, N., (2013). *Thunbergia laurifolia* leaf extract mitigates cadmium toxicity in rats. **Journal of Science Society of Thailand**. 39: 19 - 25.
- 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.
- Shim, S.M., et al. (2012). Digestive stability and absorption of green tea polyphenols: Influence of acid and xylitol addition. **Food Research International**. 45: 204 - 210.
- Twentyman, P.R. and Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer**. 56: 279 - 285.

- Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Perez-Vicente, A., and Garcia-Viguera, C. (2004). *In vitro* gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates and vitamin C. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 52: 135 - 138.
- Usanawarong, S., Thesiri, T., Mahakunakorn, P. and Parasupattana, S. (2000). Effect of *Thunbergia laurifolia* Lindl. on detoxification of paraquat. **KKU Research Journal**. 5: 11 - 17.
- Zeng, J., Wang, S.J., Yang, B.K., Zhong, Y.M., Zang, L.Q., Wang, L.L. (2013). Absolute bioavailability of caffeic acid in rats and its intestinal absorption properties. **Pharmaceutical Biology**. 38(23): 4152 - 4156.





ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด
ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 1) การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 % (w/v)
ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร
- 2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดกาฬิก 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
ละลายกรดกาฬิก 0.5 กรัม ใน 95% เอทานอล 10 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร
- 3) การเตรียมสารละลาย DPPH 62.5 ไมโครโมลาร์
ละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 2.4643 มิลลิกรัม ในเมทานอลเล็กน้อย จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร
- 4) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
ละลาย BHT 50.0 มิลลิกรัม ในเอทานอล 95% และปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร
- 5) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
ละลายกรดแอสคอร์บิก 25.0 มิลลิกรัม ในเมทานอลและปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร
- 6) การเตรียมสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6
ละลายโซเดียมอะซีเตตไตรไฮเดรต 1.55 กรัม ในกรดอะซีติก 8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร
- 7) การเจือจางกรดไฮโดรคลอริก ให้มีความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์
ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (12.04 โมลาร์) 1.66 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

8) การเตรียมสารละลาย TPTZ 10 มิลลิโมลาร์

ละลาย TPTZ 0.0312 กรัม ใน 10 มิลลิลิตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลาร์ โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำมาวิเคราะห์

9) การเตรียมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์

ละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.054 กรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำมาวิเคราะห์

10) การเตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต 2 มิลลิโมลาร์

ละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.0278 กรัมในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

11) การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 4.9 มิลลิโมลาร์

ละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.0662 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

12) การเตรียมสารละลาย ABTS 14 มิลลิโมลาร์

ละลาย ABTS 0.0385 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด



ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Medium ชนิดเตรียมจากผง D-MEM

- D-MEM high glucose (D7777)	1.35	กรัม
- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3)	3.7	กรัม
- น้ำบริสุทธิ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์	1	ลิตร

วิธีการเตรียม

- 1) ชั่ง D-MEM ตามปริมาณที่ต้องการ เติลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำอยู่ประมาณ 300-400 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วย stirrer
- 2) ชั่งโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) ตามปริมาณที่กำหนด แล้วเติลงในบีกเกอร์ เดิม แล้วกวนให้เข้ากัน
- 3) เทสารในบีกเกอร์ข้อ 3 ลงใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร
- 4) ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ ให้ได้ 1 ลิตร
- 5) นำไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน ทำการกรองในตู้ปลอดเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 3 เดือน

หมายเหตุ: D-MEM ที่มีส่วนประกอบของแอล-กลูตามีน ซึ่งมี Half life เพียง 1 เดือน ถ้าใช้ไม่หมดต้องเติมแอล-กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ ทุกเดือน

การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (1X)

- 1) ละลายสารต่างๆ เหล่านี้ในน้ำกลั่น ได้แก่

- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.00	กรัม
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.20	กรัม
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.44	กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.24	กรัม
- 2) ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล
- 3) ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
- 4) นำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)

การเตรียม Supplement อื่นๆ

Heat Inactivation Procedure

- 1) นำซีรัมออกจากตู้แช่แข็ง แล้วทิ้งไว้ให้ละลายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และต้องทำการเขย่าให้ผสมเข้ากันดีก่อนจะทำการ Heat inactivate
- 2) ตั้งอุณหภูมิของน้ำในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เท่ากับ 56 องศาเซลเซียส
- 3) เมื่ออุณหภูมิถึงที่กำหนดไว้ให้นำซีรัมลงแช่เป็นเวลา 30 นาที โดยนำออกมาเขย่าทุก 10 นาที
- 4) เมื่อครบกำหนดให้นำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อลดอุณหภูมิของซีรัม
- 5) ปิเปตซีรัม 40 มิลลิลิตร ลงใน conical tube ปิดฝาให้แน่นและซีลด้วยพาราฟิล์ม นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารเคมีอื่นๆ

1) แอล-กลูตามีน

ให้ทำการปิเปตแอล-กลูตามีน 10 มิลลิลิตร ใส่ conical tube แล้วซีลด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2) เพนนิซิลิน-สเตรปโตไมซิน (Penicilin-streptomycin)

ให้ทำการปิเปตเพนนิซิลิน-สเตรปโตไมซิน 10 มิลลิลิตร ใส่ conical tube แล้วซีลด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3) กรดอะมิโนไม่จำเป็น (Non-essential amino acids)

ให้ทำการปิเปตกรดอะมิโนไม่จำเป็น 10 มิลลิลิตร ใส่ conical tube แล้วซีลด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : สารเคมีทุกชนิดจะต้องระบุชื่อสาร, วันที่เตรียม, วันหมดอายุ, และชื่อผู้เตรียมให้เรียบร้อย

น้ำยาเลี้ยงเซลล์

ส่วนประกอบ

- High glucose DMEM (pH 7.4) ที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 4.5 กรัม/ลิตร
- heat-inactivated fetal bovine serum 10% (v/v)
- 2 มิลลิโมลาร์ แอล กลูตามีน (1%v/v)
- Non-essential amino acid 1% (v/v)

- เจนตาไมซิน (50 มิลลิกรัม/ลิตร)
- แอมโฟเทอริซิน บี (0.5 มิลลิกรัม/ลิตร)
- HEPES buffer (15 มิลลิโมล/ลิตร)
- โซเดียมไบคาร์บอเนต (44 มิลลิโมล/ลิตร)

การแยกเซลล์เพาะเลี้ยง

1) ใช้ pipette man และ serological pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร ปิเปตเอาอาหารเก่าออกออก จากภาชนะเพาะเลี้ยง โดยกระทำในตู้ปลอดเชื้อ

2) ล้างเซลล์ ด้วย PBS 2 มิลลิลิตร สำหรับ Flask 25 ตารางเซนติเมตร และ 5 มิลลิลิตร สำหรับ Flask 75 ตารางเซนติเมตร ในการเติม PBS ควรปิเปตลงด้านข้างภาชนะ เพื่อหลีกเลี่ยงการ ทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายและหลุดออกไป แกว่งเบาๆ ประมาณ 1 นาทีและปิเปต PBS ทั้ง เพื่อ กำจัดส่วนที่เหลือของซีรัม ซึ่งยับยั้งการทำงานของ 0.25% trypsin/EDTA

3) เติม 0.25% trypsin/EDTA 1 มิลลิลิตร (Flask 25 ตารางเซนติเมตร) และ 5 มิลลิลิตร สำหรับ(Flask 75 ตารางเซนติเมตร) กลับด้านให้มาท่วมอยู่บนเซลล์โดยทั่วถึงประมาณ 1 นาที

4) นำภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวางภาชนะในแนวราบ ประมาณ 5 นาที ในระหว่างนี้เซลล์จะกลมตัวและหลุด ออกมาจากพื้นผิว

5) เมื่อพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่หลุดออกจากพื้นผิวแล้ว ให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (Complete medium) ในอัตราส่วน 1:1 โดยเปรียบเทียบกับ 0.25% trypsin/EDTA ทำการกระจายเซลล์ออกจาก กัน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้น-ลงเบาๆบนพื้นผิวที่เซลล์เกาะ และต้องระวังไม่ให้เกิดฟอง

6) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1100 rpm 5 นาที เซลล์ที่ได้มาควรแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ อย่างสม่ำเสมอ ทั้งนี้จะทำให้การนับเป็นไปอย่างถูกต้องแม่นยำ นำไปเพาะเลี้ยงใหม่ได้เซลล์ที่เจริญดีและสม่ำเสมอ

7) นับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer

8) แยกเซลล์ที่ได้ลงใน การเพาะเลี้ยงเซลล์ flask และนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อภายใต้ก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5%

ความหนาแน่นของเซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงตอนเริ่มต้น คือ 3×10^4 ถึง 5×10^4 เซลล์/ตาราง เซนติเมตร อัตราส่วนในการ subculture คือ 1:6- 1:8 เช่นหากเลี้ยงเซลล์ใน T75 1 flask จะสามารถ ขยายได้เพิ่มเป็น 6-8 flasks และ ตรวจสอบการลงเกาะของเซลล์ในวันรุ่งขึ้น

การแช่แข็งเซลล์

วิธีการเตรียม

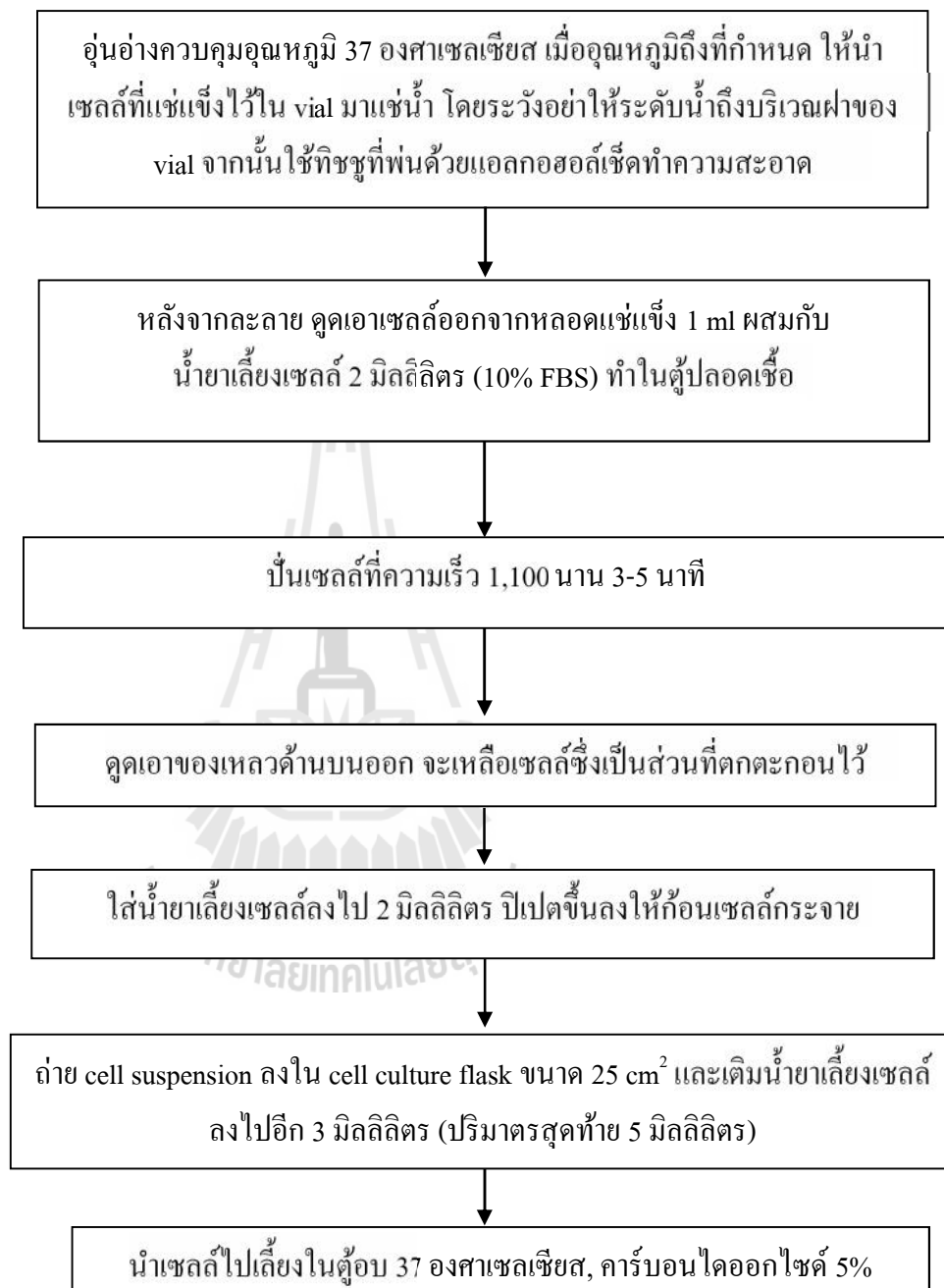
- 1) ทำการ passage cell ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ข้างต้น
- 2) ทำการนับจำนวนเซลล์ที่ได้
- 3) คำนวณเซลล์ที่จะแช่แข็ง โดยจำนวนที่แช่แข็งใน 1 หลอด คือ $1.5 \times 10^6 - 2.0 \times 10^6$ เซลล์/

มิลลิลิตร

น้ำยาสำหรับแช่แข็งเซลล์ไลน์ Caco-2 (60%DMEM+30%FBS+10%DMSO)

- 1) เตรียม DMSO โดยกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ลงใน conical tube ปลดเชื้อ จากนั้นห่อฟอยด์เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 2) ผสมน้ำยาแช่แข็งเซลล์ โดยใช้อัตราส่วนดังนี้
 - 30% DMEM (อีก 30% ที่เหลือผสมกับเซลล์ไว้ และแช่ไว้ในน้ำแข็ง)
 - 30% FBS
 - 10% DMSO
- 3) ค่อยๆ หยด ลงในหลอดน้ำยาแช่แข็งที่เตรียมได้ลงในเซลล์ที่เตรียมไว้ ในระหว่างนี้ให้เขย่าหลอดเบาๆ เป็นระยะ เพื่อให้ น้ำยาเข้ากันดี
- 4) ดูดใส่หลอด Cryovial แช่ในน้ำแข็งแล้วนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส หรือเก็บในไนโตรเจนเหลว

การละลายและนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ (Thawing cell)



หมายเหตุ: ในช่วงแรกที่นำเซลล์มาละลายเพื่อเลี้ยงเพิ่มจำนวน อาจต้องเพิ่ม %FBS เป็น 20% หลังจากการแยกเซลล์เพาะเลี้ยง จึงค่อยปรับเป็น 10% เช่นเดิม

การนับจำนวนเซลล์โดยวิธี Trypan blue exclusion

1) นำ cell suspension ที่ได้ปรับให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนับใช้เซลล์ 100 ไมโครลิตร

และใช้ 0.4% trypan blue ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ ประมาณ 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

3) ใส่สารละลายเซลล์ ที่มี trypan blue 1 หยดลงใน haemocytometer และนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4) นับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี และเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินแยกกัน จำเป็นต้องรีบนับเซลล์ภายใน 3-5 นาทีหลังจากใส่ trypan blue (ถ้าทิ้งเซลล์ใน trypan blue เป็นเวลานาน เซลล์จะติดสีน้ำเงินหมด)

5) จำนวน % เซลล์ที่มีชีวิตจากสูตรดังนี้:

$$\% \text{ เซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (ติดสี + ไม่ติดสี)}}$$



ภาคผนวก ค

บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.2555 (ร่างจีด)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หน้า ๑๗ เล่ม ๑๒๕ ตอนพิเศษ ๘๕ ง ราชกิจจานุเบกษา ๒๕ พฤษภาคม ๒๕๕๕

ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ

ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ

เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๕๕

อาศัยอำนาจตามความในข้อ ๘ (๔) แห่งระเบียบสำนักนายกรัฐมนตรีว่าด้วยคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๕๑ ได้กำหนดให้คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ มีอำนาจหน้าที่ในการจัดทำบัญชียาหลักแห่งชาติ เพื่อให้บัญชียาหลักแห่งชาติมีการปรับปรุงแก้ไข ตามสภาพของปัญหาสุขภาพ วิทยาการ และข้อมูลเกี่ยวกับยาที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างต่อเนื่องทันสถานการณ์ คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ จึงออกประกาศไว้ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ให้ยกเลิก

- (๑) ประกาศคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๕๑ ลงวันที่ ๒๑ มกราคม พ.ศ. ๒๕๕๑
- (๒) ประกาศคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๕๑ ลงวันที่ ๑ กุมภาพันธ์ พ.ศ. ๒๕๕๑
- (๓) ประกาศคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ ๓) พ.ศ. ๒๕๕๑ ลงวันที่ ๒๐ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๕๑
- (๔) ประกาศคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ ๔) พ.ศ. ๒๕๕๒ ลงวันที่ ๑๖ กุมภาพันธ์ พ.ศ. ๒๕๕๒
- (๕) ประกาศคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ ๕) พ.ศ. ๒๕๕๒ ลงวันที่ ๗ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๒
- (๖) ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๕๓ ลงวันที่ ๑๓ ตุลาคม ๒๕๕๓
- (๗) ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๕๓ ลงวันที่ ๑๕ ธันวาคม ๒๕๕๓
- (๘) ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ ๓) พ.ศ. ๒๕๕๔ ลงวันที่ ๕ พฤษภาคม ๒๕๕๔
- (๙) ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ ๔) พ.ศ. ๒๕๕๔ ลงวันที่ ๒๕ พฤษภาคม ๒๕๕๔

ข้อ ๒ ให้ใช้รายการยาในบัญชีแนบท้ายประกาศฉบับนี้เป็นยาในบัญชีหลักแห่งชาติ
ทั้งนี้ ให้มีผลบังคับใช้ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๒๕ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๕๕

พลเอก ยุทธศักดิ์ ศศิประภา

รองนายกรัฐมนตรี

ประธานกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ

รายการบัญชียาหลักแห่งชาติ

ท้ายประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.

๒๕๕๕

รายการบัญชียาหลักแห่งชาติ ประกอบด้วย

(๑) บัญชียาสำหรับโรงพยาบาลและสถานบริการสาธารณสุข

(๒) บัญชียาจากสมุนไพร

“บัญชียาสำหรับโรงพยาบาลและสถานบริการสาธารณสุข” หมายความว่า รายการ

ยาแผนปัจจุบันสำหรับใช้ในโรงพยาบาลและสถานบริการสาธารณสุข ตามภาคผนวก ๑ ซึ่งระกอบ
ด้วยบัญชีย่อย ๕ บัญชี ได้แก่ บัญชี ก บัญชี ข บัญชี ค บัญชี ง และบัญชี จ รวมทั้งรายการยาเภสัช
ตำรับโรงพยาบาล ตามภาคผนวก ๒

บัญชี ก หมายความว่า รายการยามาตรฐานที่ใช้ในการป้องกันและแก้ไขปัญหาสุขภาพที่พบบ่อย มี
หลักฐานชัดเจนที่สนับสนุนการใช้ มีประสพการณ์การใช้ในประเทศไทยอย่างพอเพียงและเป็นยาที่
ควรได้รับการเลือกใช้เป็นอันดับแรกตามข้อบ่งชี้ของยานั้น

บัญชี ข หมายความว่า รายการยาที่ใช้สำหรับข้อบ่งชี้หรือโรคบางชนิดที่ใช้ยาในบัญชี ก ไม่ได้
หรือไม่ได้ผล หรือใช้เป็นยาแทนยาในบัญชี ก ตามความจำเป็น

บัญชี ค หมายความว่า รายการยาที่ต้องใช้ในโรคเฉพาะทาง โดยผู้ชำนาญ หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย
จากผู้อำนวยการของสถานพยาบาลนั้นๆ โดยมีมาตรการกำกับการใช้ซึ่งสถานพยาบาลที่ใช้จะต้อง
มีความพร้อม ตั้งแต่การวินิจฉัยจนถึงการติดตามผลการรักษา เนื่องจากยาในกลุ่มนี้ เป็นยาที่ถ้าใช้ไม่
ถูกต้อง อาจเกิดพิษหรือเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยหรือเป็นสาเหตุให้เกิดเชื้อดื้อยาได้ง่าย หรือเป็นยาที่มี
แนวโน้มในการใช้ไม่ตรงตามข้อบ่งชี้หรือไม่คุ้มค่าหรือมีการนำไปใช้ในทางที่ผิด หรือมีหลักฐาน
สนับสนุนการใช้ที่จำกัด หรือมีประสพการณ์การใช้ในประเทศไทยอย่างจำกัด หรือมีราคาแพงกว่า
ยาอื่นในกลุ่มเดียวกัน

บัญชี จ หมายความว่า รายการยาที่มีหลายข้อบ่งใช้ แต่มีความเหมาะสมที่จะใช้เพียงบางข้อบ่งใช้ หรือมีแนวโน้มจะมีการสั่งใช้ยาไม่ถูกต้อง หรือเป็นรายการยาที่มีราคาแพง จึงเป็นกลุ่มยาที่มีความจำเป็นต้องมีการระบุข้อบ่งใช้และเงื่อนไขการสั่งใช้ยา การใช้บัญชียาหลักแห่งชาติไปอ้างอิงในการเบิกจ่ายควรนำข้อบ่งใช้และเงื่อนไขการสั่งใช้ยาไปประกอบในการพิจารณาอนุมัติการเบิกจ่ายจึงจะก่อประโยชน์สูงสุด ทั้งนี้ยาในบัญชี จ จำเป็นต้องใช้สำหรับผู้ป่วยบางราย แต่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วยหรือก่อปัญหาเชื้อดื้อยาที่ร้ายแรง การสั่งใช้ยาซึ่งต้องให้สมเหตุผลเกิดความคุ้มค่าสมประโยชน์ จะต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยและพิจารณาโดยผู้ชำนาญเฉพาะโรคที่ได้รับการฝึกอบรมในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้องจากสถานฝึกอบรม หรือได้รับวุฒิบัตร หรือหนังสืออนุมัติจากแพทยสภาหรือทันตแพทยสภาเท่านั้น และโรงพยาบาลจะต้องมีระบบการกำกับประเมินและตรวจสอบการใช้ยา (Drug Utilization Evaluation, DUE) โดยต้องมีการเก็บข้อมูลการใช้ยาเหล่านั้นเพื่อตรวจสอบในอนาคตได้

บัญชี จ(๑) รายการยาสำหรับโครงการพิเศษของกระทรวง ทบวง กรม หรือหน่วยงานของรัฐ ที่มีการกำหนดวิธีการใช้และการติดตามประเมินการใช้ยาตามโครงการ โดยมีหน่วยงานนั้นรับผิดชอบ และมีการรายงานผลการดำเนินงานต่อคณะกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติเป็นระยะตามความเหมาะสม เพื่อพิจารณาจัดเข้าประเภทของบัญชียอย่อยอื่นในบัญชียาหลักต่อไปเมื่อมีข้อมูลเพียงพอ

บัญชี จ(๒) รายการยาสำหรับผู้ป่วยที่มีความจำเป็นเฉพาะ ให้เข้าถึงยาได้อย่างสมเหตุผลและคุ้มค่า ซึ่งมีการจัดกลไกกลางเป็นพิเศษในกำกับการใช้ยาภายใต้ความรับผิดชอบร่วมกันของระบบประกันสุขภาพ ซึ่งดูแลโดยกรมบัญชีกลาง กระทรวงการคลัง สำนักงานประกันสังคมกระทรวงแรงงาน สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ และหน่วยงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง โดยมีแนวทางกำกับการใช้ยาตามภาคผนวก ๓

“รายการยาสำหรับผู้ป่วยที่มีความจำเป็นเฉพาะ” ตามบัญชี จ(๒) หมายความว่า ยาที่จำเป็นต้องใช้สำหรับผู้ป่วยเฉพาะราย โดยยาที่มีความเหมาะสมที่จะใช้เพียงบางข้อบ่งใช้ หรือมีแนวโน้มจะมีการสั่งใช้ยาไม่ถูกต้อง หรือ เป็นยาที่ต้องอาศัยความรู้ ความชำนาญเฉพาะโรค หรือใช้เทคโนโลยีขั้นสูง และ เป็นยาที่มีราคาแพงมาก หรือส่งผลอย่างมากต่อความสามารถในการจ่ายตัวของสังคมและผู้ป่วย จึงต้องมีระบบกำกับและอนุมัติการสั่งใช้ยา (authorized system) ที่เหมาะสม โดยหน่วยงานสิทธิประโยชน์หรือหน่วยงานกลางที่ได้รับมอบหมาย ทั้งนี้ เพื่อให้เป็นไปตามข้อบ่งใช้และเงื่อนไขการสั่งใช้ยา จึงจะก่อประโยชน์สูงสุด โรงพยาบาลจะต้องมีระบบการกำกับประเมินและตรวจสอบการใช้ยา และมีเก็บข้อมูลการใช้ยาเหล่านั้น เพื่อให้ตรวจสอบโดยกลไกกลางในอนาคตได้

“บัญชียาจากสมุนไพร” หมายความว่า รายการยาจากสมุนไพรที่เป็นยาแผนไทยหรือยาแผนโบราณ และยาพัฒนาจากสมุนไพร ซึ่งมีตัวยานในสูตรตำรับ และรายละเอียดตาม ภาคผนวก ๔ โดยมีรายการ

ยาจากสมุนไพรที่แนบรายการเภสัชตำรับโรงพยาบาลรวมอยู่แก่ “เภสัชตำรับโรงพยาบาล” หมายความว่า รายการยาที่โรงพยาบาลสามารถผลิตขึ้นใช้ภายในโรงพยาบาลตามเภสัชตำรับของโรงพยาบาล หรือตามที่ระบุในภาคผนวก ๒ หรือยาจากสมุนไพรที่ปรากฏรวมอยู่ในบัญชียาจากสมุนไพรด้วย

ภาคผนวก

2.6 ยาแก้ไข้ แก้ร้อนใน

ยารางจืด ยาแคปซูล (รพ.) ยาขง (รพ.)

ตัวยาสําคัญ ผงใบรางจืด โตเต็มที (*Thunbergia laurifolia* Lindl.)

ข้อบ่งใช้ ถอนพิษไข้ แก้ร้อนใน

ขนาดและวิธีใช้

ชนิดขง

รับประทานครั้งละ 2 - 3 กรัม ชงน้ำร้อน 120 - 200 มิลลิลิตร วันละ 3 ครั้ง ก่อนอาหาร หรือเมื่อมีอาการ

ชนิดแคปซูล

รับประทานครั้งละ 500 มิลลิกรัม - 1 กรัม วันละ 3 ครั้ง ก่อนอาหาร

- ให้ใช้ในผู้ที่สงสัยว่าเป็นไข้เลือดออก เนื่องจากอาจบ่ง

- หากใช้ยาเป็นเวลานานเกิน 3 วันแล้ว อาการไม่ดีขึ้น ควรปรึกษาแพทย์
 - เพราะอาจเกิดภาวะน้ำตา อดต่ำ
 - ควรระวังการใช้ในผู้ป่วยที่ต้องใช้ยาอื่นอย่างต่อเนื่องเพราะยารางจืด อาจ
- นำนํ้าออกจากร่างกาย ทำ

ข้อมูลเพิ่มเติม

และคั้นน้ำชาขง

2.7 ยาถอนพิษเบื่อเมา (.)

ผงใบรางจืด โทเต็มที (*Thunbergia laurifolia* Lindl.)

ถอนพิษเบื่อเมา

รับประทานครั้งละ 2 - 3 กรัม ชงน้ำรอนประมาณ 120 - 200

3 ครั้ง ก่อนอาหาร หรือเมื่อมีอาการ

-

- ควรระวังการใช้ในผู้ป่วยเบาหวาน เพราะอาจเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ

- ควรระวังการใช้ในผู้ป่วยที่ต้องใช้ยาอื่นอย่างต่อเนื่องเพราะยารางจืด อาจ
ฉานนั้นออกจากร่างกาย ทำให้

-

ข้อมูลเพิ่มเติม

และคั้นน้ำชาขี้ขาว



ประวัติผู้เขียน

นางสาวทัศนาวรรณ สีสัน เกิดเมื่อวันที่ 15 มีนาคม พ.ศ. 2529 เริ่มศึกษาชั้นประถมศึกษาและชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1-3 ที่โรงเรียนบ้านจี้นาค ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4-6 ที่โรงเรียนผักไหมวิทยานุกูล และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ.2551 โดยหลังจากสำเร็จการศึกษา ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปี พ.ศ.2552 โดยขณะศึกษาได้รับทุนเรียนดี และเป็นผู้ช่วยสอนวิชาปฏิบัติการวิศวกรรมอาหาร 1 และ 2 เป็นผู้ช่วยวิจัยโครงการวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ทางชีวภาพ และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดย่านาง เครื่องหมาน้อย และรางจืด

