ผลของสารสกัดรางจืดต่อเอนไซม์กลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรสในตับหนู และความเสถียรต่อความร้อนของกลุ่มสารพฤกษเคมี

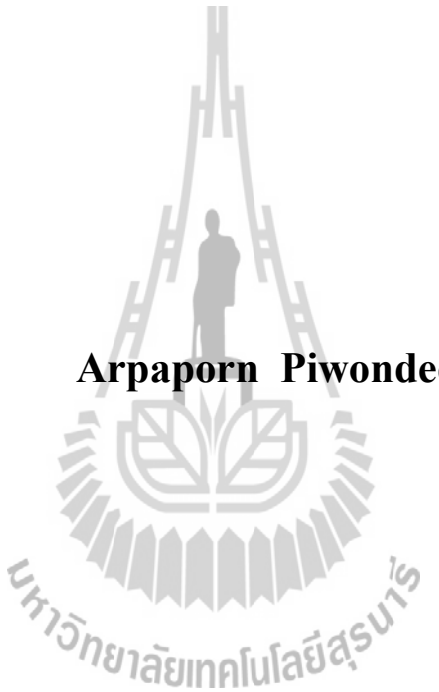
นางสาวอาภาภรณ์ ผิวอ่อนดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2556

EFFECT OF RANG CHUET EXTRACT ON GLUTATHIONE *S*-TRANSFERASES IN RAT LIVERS AND THERMAL STABILITY OF ITS PHYTOCHEMICALS

Arpaporn Piwondee



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

ผลของสารสกัดรางจืดต่อเอนไซม์กลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรสในตับหนูและความเสถียรต่อความร้อนของกลุ่มสารพฤกษเคมี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(ผศ. ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก)
ประธานกรรมการ

_____

(ผศ. ดร.รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(ผศ. ดร.เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์)
กรรมการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

_____ _____

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์) (ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

อาภาภรณ์ ผิวอ่อนดี : ผลของสารสกัดรางจืดต่อเอนไซม์กลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรสในตับหนูและความเสถียรต่อความร้อนของกลุ่มสารพฤกษเคมี (EFFECT OF RANG CHUET EXTRACT ON GLUTATHIONE *S*-TRANSFERASES IN RAT LIVERS AND THERMAL STABILITY OF ITS PHYTOCHEMICALS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, 74 หน้า.

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีส่วนประกอบพฤกษเคมีหลัก ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และสารประกอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมด รางจืดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH คุณสมบัติเหล่านี้ได้รับการติดตามการเปลี่ยนแปลงเมื่อสารสกัดรางจืดได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อน คือ กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) ชนิดอุณหภูมิสูงระยะเวลาสั้น ที่ระดับอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 วินาที, ชนิดอุณหภูมิต่ำระยะเวลานาน ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที และกระบวนการสเตอริไลส์ (sterilization) โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ผลการศึกษาพบว่า ส่วนประกอบพฤษเคมีหลัก ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และสารประกอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมด เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนดังกล่าว มีค่าไม่แตกต่างกันจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.01$) สารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลมีความเสถียรสูงสุดเมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิดอุณหภูมิสูงระยะเวลาสั้น รองลงมาคือเมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิดอุณหภูมิต่ำระยะเวลานาน และการสเตอริไลส์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามกระบวนการให้ความร้อนมีผลกระทบอย่างชัดเจนต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และถึงแม้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิดอุณหภูมิสูงระยะเวลาสั้น ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.01$) แต่กระบวนการผ่านความร้อนชนิดอุณหภูมิต่ำระยะเวลานาน และกระบวนการสเตอริไลส์ มีผลลดปริมาณสารพฤกษเคมีหลัก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาความสามารถในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ระยะที่ 2 ในกระบวนการเมตาบอลิซึมสารแปลกปลอมด้วยการติดตามกลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรส (Glutathione *S*-Transferases ; GSTs) ในตับหนูขาว หนูขาวสายพันธุ์วิสตาร์ (Wistar rats) เพศผู้และเพศเมีย ได้รับสารสกัดรางจืดด้วยการป้อน (gavage) สารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลในปริมาณเทียบเท่ากับการดื่มชาในคน คือเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 90 วัน และศึกษาผลย้อนกลับโดยการหยุดสารสกัดรางจืด แล้วเลี้ยงด้วยอาหารตามปกติเป็นเวลา 14 วัน ผล

การศึกษาพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ GSTs ทั้งในตับหนูขาวเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ARPAPORN PIWONDEE : EFFECT OF RANG CHUET EXTRACT ON GLUTATHIONE *S*-TRANSFERASES IN RAT LIVERS AND THERMAL STABILITY OF ITS PHYTOCHEMICALS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. RATCHADAPORN OONSIVILAI, Ph.D., 74 PP.

RANG CHUET/PASTEURIZATION/STERILLIZATION/GLUTATHIONE *S*-TRANSFERES/RAT LIVER

Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Linn.) is a Thai medicinal plant with major phytochemical contituents such as total phenolics, total flavonoids and total chlorophylls compounds. Rang Chuet is shown to exhibit antioxidant activity as assumed by DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity assay. Changes in antioxidant activity were monitored after Rang Chuet extracts were treated with different thermal processing ; pasteurization high-temperature short time (HTST) at 75^{o}C for 15 sec., low-temperature long time (LTLT) at 65^{o}C for 30 min. and sterilization at 121^{o}C for 15 min. The results showed that major phytochemical compounds such as total phenolic, total flavonoids and total chlorophylls in these treated samples were not significantly different from the control ($p > 0.01$). These phytochemicals in Rang Chuet water and ethanol extracts were best stable after HTST processing followed orderly less stable by LTLT and sterilization. However, the thermal processing clearly affected the antioxidant activity, although the antioxidant activity of the extract after HTST processing was not significantly different from the control ($p > 0.01$), the LTLT and sterilization lowered the phytochemicals and antioxidant activity of the extract compared to the control ($p < 0.01$).

This study also investigated the ability of Rang Chuet water and ethanol extracts to induce phase II xenobiotic-metabolizing glutathione *S*-transferases (GSTs) in rat liver. Wistar rats of both sexes were orally gavaged with suspension of water and ethanol Rang Chuet extracts at a dose of 50 mg/kg of body weight per day for 90 days at the equivalent dose of a typical tea drinking three times per day. The satellite group was given the same suspension at the same dose for 90 days and observed thereafter for 14 days to study the reversibility of adverse effects. The results showed that GSTs activities in livers of male and female rats treated with water and ethanol extract suspension were significantly higher than the control ($p < 0.05$).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Food Technology Student's Signature _____

Academic Year 2013 Advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนลยีสุรนารีที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ ในการศึกษาและวิเคราะห์วิจัย รวมไปถึงเงินทุนสนับสนุนในการศึกษา งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับความอนุเคราะห์ช่วยเหลือ และการสนับสนุนจนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี จากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ ที่ให้โอกาส ความรู้ ความไว้วางใจ ความเอาใจใส่ คำปรึกษา คำแนะนำ คำติชม และกำลังใจที่ดีเสมอมา ขอกราบพระคุณอย่างสูง ที่อาจารย์สละเวลาในการให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ และคำแนะนำตลอดระยะเวลาการศึกษา ตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณหน่วยงานต่าง ๆ ในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยเอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาวิจัย ขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือ 1, 3 และ 9 ทุกท่าน รวมถึงเจ้าหน้าที่อาคารสัตว์ทดลองทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในงานวิจัย ขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในรั้วมหาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกคน ที่คอยสนับสนุน ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจอย่างดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ต้องขอกราบขอบพระคุณแม่ ที่ให้ชีวิต ที่เป็นแบบอย่างที่ดีในการต่อสู้ ให้ก้าวผ่านอุปสรรคต่าง ๆ ไปให้จงได้ สนับสนุนทุกทางเพื่อให้ลูกเพื่อให้เรียนสูง ๆ และสำเร็จการศึกษา ขอบคุณคนในครอบครัวทุก ๆ ท่าน ที่คอยดูแลเอาใจใส่ ให้กำลังใจ ส่งเสริมการใช้ชีวิตจนสำเร็จการศึกษา และประสบความสำเร็จในชีวิตได้

อาภาภรณ์ ผิวอ่อนดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญรูป ..... ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฐ

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4
1.3 สมมติฐานของการวิจัย 5
1.4 ขอบเขตของการวิจัย 5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7
2.1 รางจืด 7
2.1.1 ลักษณะทางพฤษศาสตร์ 7
2.1.2 คุณสมบัติทางเคมีและเภสัชวิทยาของรางจืด 8
2.2 การศึกษาความเสถียรของสารเคมีที่สำคัญในสารสกัดรางจืด 14
2.2.1 การให้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปอาหาร (thermal processing) 15
2.2.2 การให้ความร้อนแบบพาสเจอไรซ์ (pasteurization) 17
2.2.3 การให้ความร้อนแบบสเตอริไลส์ (sterilization) 19
2.3 การศึกษาความเป็นพิษ 20
2.4 วิวัฒนาการทางพิษวิทยา 21
2.5 หนูขาวหรือหนูแรท (*Rattus norvegicus*) 30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.1 ลักษณะทั่วไป 30
2.5.2 ข้อมูลทางสรีระวิทยาของหนูขาว 30
2.5.3 การเลี้ยงสัตว์ทดลอง 30
2.6 สรีรวิทยาและหน้าที่ของตับ 32
2.6.1 สรีรวิทยาของตับ 32
2.6.2 หน้าที่ของเซลล์ตับ 32
3 วิธีดำเนินการวิจัย 34
3.1 กลุ่มตัวอย่าง วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี 34
3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้เตรียมสกัดรางจืด 34
3.1.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์สารสกัดรางจืด 34
3.1.3 สัตว์ทดลอง 35
3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง 35
3.1.5 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการป้อนสัตว์ทดลอง 35
3.1.6 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผ่าตัดหนูทดลอง 35
3.1.7 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้เตรียมตัวอย่างตับหนูทดลอง 36
3.1.8 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์โปรตีน cytosolic 36
3.2 การเตรียมสารสกัดรางจืด 36
3.2.1 การเตรียมใบรางจืดผง 36
3.2.2 การเตรียมสารสกัดรางจืด 36
3.2.3 การเตรียมสารสกัดรางจืดในกระบวนการให้ความร้อน 37
3.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติของสารสกัดรางจืด 37
3.3.1 การหาปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืด 37
3.3.2 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดรางจืด 38
3.3.3 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในสารสกัดรางจืด 38
3.3.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืด 39
3.4 การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง 39

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง 39
3.4.2 วิธีการป้อนสารสกัดให้แก่สัตว์ทดลอง 40
3.4.3 การเตรียมตัวอย่างตับเพื่อศึกษาระบบเอนไซม์ GSTs 40
3.4.4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ GSTs 41
3.5 สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล 42
3.6 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล 42
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 43
4.1 ผลการศึกษาสารสกัดรางจืดต่อกระบวนการให้ความร้อน 43
4.1.1 การเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลเมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิดต่าง ๆ 43
4.1.2 การเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิดต่าง ๆ 46
4.1.3 การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิดต่าง ๆ 47
4.1.4 การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิดต่าง ๆ 49
4.2 ผลการศึกษาผลของสารสกัดรางจืดต่อปริมาณเอนไซม์ glutathione *S*-transferases (GSTs) ในตับหนูขาว 51
4.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำ และสารสกัดเอทานอล 52
4.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำและสารสกัดเอทานอล 52
4.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำและสารสกัดเอทานอล 52

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดน้ำและสารสกัดเอทานอล 52
4.2.5 กิจกรรมของเอนไซม์ glutathione *S*-transferases (GSTs) ในตับหนูขาว 53
5 บทสรุป 58
5.1 สรุปผลการวิจัย 58
5.1.1 ผลการศึกษาสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลต่อกระบวนการให้ความร้อนชนิด LTLT, HTST และ sterilization 58
5.1.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์กลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรส; GSTs ในตับหนูที่ได้รับสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล 58
5.2 ข้อเสนอแนะ 59
รายการอ้างอิง 60
ภาคผนวก 67
ก กราฟมาตรฐานและการวิเคราะห์โปรตีน 67
ข หนูขาว 72
ประวัติผู้เขียน 74

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 แสดงปริมาณ total phenolic (TPC) และ ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC) ของชารางจืดเมื่อเปรียบเทียบกับชาทางการค้า 17

2.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในกระบวนการพาสเจอไรซ์ (pasteurization) 18

2.3 ตัวอย่างสารเคมีมีฤทธิ์เคมีป้องกันพบในพืชผักที่มีฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์กำจัดพิษ 28

2.4 กรงที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงหนูขาว 31

4.1 แสดงปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 52

ข.1 แสดงการเปรียบเทียบอายุระหว่างหนูกับคน 73

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะของใบรางจืด 8
2.2 แผนภูมิการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมสารแปลกปลอม 27
2.3 hepatic blood flow 33
4.1 การเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำ เมื่อผ่านกระบวนการ ให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization 43
4.2 การเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการ ให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization 44
4.3 การเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำ เมื่อผ่านกระบวนการ ให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization 45
4.4 การเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization 46
4.5 การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำ เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization 47
4.6 การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization 48
4.7 การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดน้ำ เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization 50
4.8 การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization 51
4.9 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์กลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรสในตับหนูขาว ที่ได้รับสารสกัดรางจืดน้ำ เป็นระยะเวลา 90 วัน (n = 5) 53
4.10 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์กลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรสในตับหนูขาว ที่ได้รับสารสกัดรางจืดเอทานอล เป็นระยะเวลา 90 วัน (n = 5) 54

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ก.1 แสดงกราฟมาตรฐานที่ใช้คำนวณเทียบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics) 68
ก.2 แสดงกราฟมาตรฐานที่ใช้คำนวณเทียบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids) .. 69
ก.3 แสดงกราฟมาตรฐานที่ใช้คำนวณเทียบหาปริมาณโปรตีน 71
ข.1 ลักษณะของหนูขาว 73

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALT	=	Alanine aminotranferase
AST	=	Aspatate aminotranferase
^{o}C	=	Degree celsius
EGCG	=	Epigallo-catechin gallate
GCL	=	Glutamylcystein ligase
GSTs	=	Glutathione *S*-transferases
HTg	=	Hepatic triglyceride
HTST	=	High-temperature shot time
LTLT	=	Low-temperature long time
MDA	=	Malondiadehyde
mg	=	Milligram
mL	=	Millilitre
nm	=	Nanometer
NOAEL	=	No observed adverse effect level
NQO1	=	NADPH-quinone oxidoreductase
PEITC	=	Phenethyl isothiocyanate
PSI	=	Pound-force per square inch
QR	=	Quinine reductase
SOD	=	Superoxide dismutase
SULT	=	Sulfotransferase
UGT	=	UDP-glucuronoxyltransferase

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและสำคัญของปัญหา

จากประวัติการใช้รางจืดที่ยาวนานในประเทศไทย ประกอบกับการศึกษาวิจัยที่สนับสนุนว่าการใช้รางจืดมีความปลอดภัยโดยใช้แก้ปัญหาเกี่ยวกับสารพิษและสารเสพติด รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ *Acanthaceae* เป็นสมุนไพรที่มีคุณสมบัติเด่นในเรื่องของการขับพิษ หรือถอนพิษไข้ แก้เบื่อเมา แก้ร้อนใน กระหายน้ำ และใช้รักษาผู้ป่วยที่ถูกพิษต่างๆ เช่น พิษจากสุรา เห็ดเมา พิษเนื่องจากอาการแพ้ หรือรับประทานสัตว์ที่มีพิษรวมทั้งใช้รักษาผู้ที่ได้รับสารเคมีที่มีพิษร้ายแรง เช่น สารหนู สตริ๊กนิน และสารกำจัดแมลงชนิดต่างๆ (พาณี และชัชวดี , 2523) นอกจากการให้ความสำคัญในเรื่องของความเป็นพิษจากพืชสมุนไพรแล้ว ผู้บริโภคอาจยังมีข้อสงสัยในส่วนของฤทธิ์หรือความสามารถของพืชสมุนไพรต่าง ๆ ว่ายังคงสภาพหลงเหลือประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตหรือไม่ นอกจากนั้น ผู้บริโภคยังมีความวิตกกังวลเกี่ยวกับผลข้างเคียงการบริโภคพืชสมุนไพรต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานติดต่อกันหลายวัน หรือหลายเดือน

คุณสมบัติเด่นของรางจืดในการขับพิษหรือสารแปลกปลอม (detoxification) หรือเรียกสั้นๆ ว่า ดีทอกซ์ (detox) หมายถึง กระบวนการกำจัดของเสียและสารพิษ หรือสารแปลกปลอมที่ตกค้างอยู่ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งใช้ในกระบวนการเลิกสารเสพติด เช่น การเลิกเหล้า เพื่อให้ร่างกายกลับเข้าสู่สมดุลย์อีกครั้งหนึ่ง สารพิษที่สะสมในร่างกายสามารถเกิดขึ้นได้จากการทานอาหาร ยา และมลพิษจากสภาพแวดล้อมรอบ ๆ ตัว โดยปกติแล้วร่างกายของเราสามารถอยู่ได้ด้วยกระบวนการเมตาบอลิซึม หรือการเผาผลาญอาหารให้พลังงานแก่เซลล์เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย แต่หลังการเผาผลายให้พลังงานแล้ว จะมีของเสียเกิดขึ้น เช่น กากอาหารจากระบบทางเดินอาหาร ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากระบบทางเดินหายใจ และของเสียในเซลล์เนื้อเยื่อ ซึ่งของเสียเหล่านี้ล้วนเป็นพิษต่อร่างกาย ดังนั้นร่างกายจะมีกระบวนการล้างพิษด้วยตนเองตลอดเวลา แต่ประสิทธิภาพจะลดหลั่นไปตามสภาพของร่างกาย หรือตามกาลเวลา ทำให้ของเสียจากกระบวนการเมตาบอลิซึมเกิดการสะสมในเนื้อเยื่อ และก่อให้เกิดการเป็นพิษ หากร่างกายได้รับสารพิษด้วยอัตราที่ร่างกายไม่สามารถกำจัดได้ ก็จะก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ตามมา ซึ่งจากการวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการรายงานว่า สมุนไพรรางจืดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ต้านสารฆ่าแมลง ต้านออกซิเดชั่น ต้านการเป็นเบาหวาน ต้านสารเสพติด และต้านการอักเสบ คุณสมบัติเด่นของรางจืดทางเภสัชวิทยาใช้เป็นสารถอนพิษจากยาฆ่าแมลง สารเสพติด สารพิษต่าง ๆ และต่อต้านหรือหยุดการทำงานของ

เชื้อโรค (ใช้เป็นยาปฏิชีวนะ) รวมถึงการต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกายได้ โดยทั่วไป เราบริโภครางจืดเป็นชาสมุนไพร เช่น การสกัดด้วยน้ำในใบสด ใบแห้ง รากแห้ง และเปลือกไม้ (Thongsaard, 2002)

ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารแปลกปลอม ถูกแบ่งปฏิกิริยาทางเคมีที่สำคัญออกเป็น 2 ช่วง คือ ปฏิกิริยาขั้นที่ 1 (phase I) เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่โมเลกุลของสารแปลกลอมหรือสารพิษ ที่ช่วยเพิ่มปฏิกิริยาการสูญเสียอิเล็กตรอนให้กับออกซิเจน (oxidative reaction) ทำให้มีหมู่โพลาร์เกิดขึ้น เพื่อให้สามารถละลายได้ดีในน้ำ สามารถทำให้สารแปลกปลอมถูกขับออกได้ในขั้นตอนนี้ และมีสมบัติที่เหมาะสมที่จะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นตัวใหม่ ช่วยส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยาขั้นที่ 2 (phase II) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของสารแปลกปลอมหรือสารพิษ โดยไปรวมกับสารประกอบบางชนิดที่อยู่ในร่างกายได้เป็นสารใหม่ที่ละลายได้ดีในน้ำ เรียกว่า ปฏิกิริยา conjugation และพร้อมที่จะถูกขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น (Low, 1998; นิธิยา และวิบูลย์, 2543)

โดยปกติร่างกายเราก็มีกลไกในการกำจัดสารพิษอยู่ในตัวเองอยู่แล้ว ซึ่งอวัยวะในร่างกายที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขับของเสียหรือสารพิษ ได้แก่ ผิวหนังขับสารพิษออกมาในรูปของเหงื่อ ปอดขับสารพิษออกมากับลมหายใจออก ไตกรองของเสียออกจากเลือดและส่งไปทางกระเพาะปัสสาวะ ลำไส้ใหญ่ขับของเสียออกทางอุจจาระ และตับเป็นอวัยวะสำคัญที่ทำหน้าที่ในการกำจัดและขับของเสียโดยใช้กระบวนการเมตาบอลิซึม กระบวนการเมตาบอลิซึมในตับ เป็นอวัยวะที่มีความสำคัญรวมไปถึงการเกิดพิษของสาร ดังนั้นการผลิตสารสกัดจากสมุนไพรซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติจำเป็นต้องผ่านกระบวนการทดสอบต่าง ๆ โดยเฉพาะการทดสอบที่เกี่ยวข้องกับอวัยวะตับ เพื่อให้ทราบถึงผลจากสารสกัดรางจืดต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม กลไกการทำลายสารพิษ และการขับออกจากร่างกาย ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากการทดสอบความเป็นพิษกึ่งระยะยาวของสารสกัดรางจืดในหนูขาว (คคนางค์, 2555) โดยศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลท์ ที่เกิดจากเอนไซม์กลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรส (glutathione *S*-transferases ; GSTs) ซึ่งมีบทบาทหน้าที่ในกระบวนการเมตาบอลิซึมสารแปลกปลอม และเกิดขึ้นมากที่สุดในเนื้อเยื่อตับของสิ่งมีชีวิต

ระบบเอนไซม์ในกระบวนการกำจัดสารพิษหรือสารแปลกปลอมจำเป็นต้องมีความหลากหลาย เพื่อรองรับความหลากหลายของสารเคมีที่ร่างกายได้รับเช่นกัน ซึ่งระบบเอนไซม์ถูกกำหนดโดยปัจจัยเฉพาะของแต่ละบุคคล เช่น อาหารการกิน ยาหรือสารเคมีที่ได้รับ อายุ เพศ ลักษณะทางพันธุกรรม และปัจจัยทางสภาพแวดล้อมเป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำ/กระตุ้น หรือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เช่นเมื่อร่างกายได้รับสารประเภทหนึ่งปริมาณมาก ๆ ส่งผลให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการกำจัดสารชนิดนี้ถูกเหนี่ยวนำให้ทำงาน

ในอัตราที่เพิ่มขึ้น และจากการเหนี่ยวนำเอนไซม์เพียงกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง จะทำให้เกิดความไม่สมดุลในกระบวนการกำจัดสารพิษหรือสารแปลกปลอม เช่น สารกลุ่มหนึ่งเหนี่ยวนำเอนไซม์ในกระบวนการขั้นที่ 1 ทำให้เกิดสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา หรือเมตาบอไลท์ที่มีความเป็นพิษเพิ่มขึ้น (reactive metabolites) เป็นจำนวนมาก ทำให้ปริมาณเอนไซม์ในขั้นที่ 2 มีไม่เพียงพอต่อการกำจัดสารเมตาบอไลท์ดังกล่าวได้ ส่งผลให้เกิดการสะสมของสารเมตาบอไลท์ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อ DNA, RNA และโปรตีน ซึ่งเป็นสาเหตุของความเป็นพิษต่อเซลล์ ตลอดจนการก่อกลายพันธุ์ และเกิดโรคมะเร็งในที่สุด นอกจากนี้ยังมีสารบางกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ซึ่งการยับยั้งเกิดขึ้นเมื่อมีสารมากกว่าหนึ่งชนิดที่ต้องการเอนไซม์ตัวเดียวกันในกระบวนการเมตาบอลิซึม เมื่อเอนไซม์ในกระบวนการกำจัดสารพิษถูกยับยั้งส่งผลให้ความเป็นพิษรุนแรงมากขึ้น

เอนไซม์กลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรส (glutathione *S*-transferases; GSTs) เป็นกลุ่มเอนไซม์ในปฏิกิริยา phase II ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการกำจัดสารพิษภายในร่างกาย และสารแปลกปลอมที่ชอบอิเล็กตรอน (xenobiotic electrophilic substance) โดยทำการเร่งปฏิกิริยาระหว่าง glutathione (GSH) (ที่มีกรดอะมิโน 3 ชนิดเป็นองค์ประกอบ (glutamyl - L- cysteinyl - glycine) กับสารแปลกปลอมในกลุ่มที่ชอบอิเล็กตรอน (electrophilic functional groups) (Xinhua *and others,*1992) กลุ่มเอนไซม์นี้มีอยู่ทั่วไปประมาณ 5% ของโปรตีนไซโทโซลิค (cytosolic) ทั้งหมดในเนื้อเยื่อของตับ และglutathione (GSH) เป็น antioxidant, antitoxin และเป็น cofactor ของเอนไซม์ ความเข้มข้นของ glutathione (GSH) ภายในเซลล์อยู่ในระดับมิลลิโมลาร์ และพบว่ามีความเข้มข้นมากที่สุดในตับ (10 มิลลิโมลาร์) (Samsonova *and others*, 2008) GSH สามารถไปรวมกับสารแปลกปลอม ได้สารใหม่เกิดขึ้น ที่มีความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้น และถูกขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น

การให้ความสำคัญต่อกระบวนการกำจัดสารพิษหรือสารแปลกปลอมในร่างกาย จากการได้รับสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์เสริมการกำจัดสารพิษหรือสารแปลกปลอมที่ร่างกายได้รับทั้งทางตรงและทางอ้อม ถึงแม้ว่าสมุนไพรรางจืดจะสามารถล้างพิษได้จริง แต่ยังไม่มีข้อมูลการวิจัยหรือเอกสารใดที่บ่งชี้ถึงผลกระทบ เมื่อใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน หรือใช้เป็นจำนวนมากในสิ่งมีชีวิต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาถึงความสามารถในกระบวนการเมทาบอลิซึมสารแปลกปลอมด้วยการติดตามเอนไซม์ GSTs ซึ่งเป็นตัวชี้วัดได้ถึงคุณสมบัติดังกล่าว ในหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดรางจืดติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน แล้วยังติดตามผลต่อเนื่องเมื่อหยุดให้สารสกัดรางจืดไปอีก 14 วัน (การศึกษาผลย้อนกลับหลังการหยุดได้รับสารสกัดรางจืด) เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ GSTs ว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างไร แต่ทั้งนี้ทั้งนั้น งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง ยังไม่มีการทดสอบในคนเป็นที่แน่ชัดว่าไม่มีผลข้างเคียงจริงในอนาคต จึงต้องมีข้อจำกัดในการรับประทานตามแต่จุดประสงค์ของผู้บริโภค การศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว ในหนูขาวที่ได้รับสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมของแต่ละกลุ่มตัวทำละลาย

นอกจากนี้มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเสถียรของสารออกฤทธิ์ของสารสกัดเมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนในระดับต่าง ๆ ของกระบวนการถนอมอาหาร โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณค่าทางอาหาร หรือไม่ก่อความเสียหายต่อผลิตภัณฑ์ก่อนการบริโภค กลุ่มสารออกฤทธิ์ที่สำคัญได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และสารประกอบคลอโรฟิลล์ ได้ถูกนำมาติดตามความเสถียรเมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนในแบบต่าง ๆ กระบวนการถนอมอาหารที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคือ กระบวนการพาสเจอไรซ์ (pasteurization) และกระบวนการสเตอริไลส์ (sterilization) โดยกระบวนการพาสเจอไรซ์ เป็นการให้ความร้อนที่ไม่รุนแรงนัก โดยอุณหภูมิจะต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการให้ความร้อนก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพอาหาร ดังนั้นจึงให้ความสำคัญต่ออุณหภูมิ และเวลาในการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ โดยมีการออกแบบกระบวนการพาสเจอไรซ์ที่สำคัญ 2 แบบ คือการใช้อุณหภูมิสูงเวลาสั้น (high-temperature short time, HTST) เช่น 88 องศาเซลเซียส, 15 วินาที จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงสุด และการใช้อุณหภูมิต่ำเวลานาน (low-temperature long time, LTLT) เช่น 62.5 องศาเซลเซียส, 30 นาที หรือ 65 องศาเซลเซียส, 30 นาที ซึ่งไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากทำให้เกิดความสูญเสียวิตามินมากกว่ากระบวนการ HTST เล็กน้อย ส่วนกระบวนการสเตอริไลส์ เป็นการให้ความร้อนที่สูงกว่าจุดเดือด คือประมาณ 100 – 130 องศาเซลเซียส เช่น กระบวนการฆ่าเชื้อด้วย autoclave โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที และทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว (วิไล, 2547)

ความเสถียรของสารออกฤทธิ์เมื่อนำไป ผ่านกระบวนการแปรรูปเพื่อยืดอายุของผลิตภัณฑ์อาหารให้นานหลายวัน หรืออาจจะหลายเดือน โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณค่าทางอาหาร หรือไม่ก่อความเสียหายต่อผลิตภัณฑ์ก่อนการบริโภค กระบวนการถนอมอาหารที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคือ การพาสเจอไรซ์ ซึ่งเป็นการให้ความร้อนที่ไม่รุนแรงนัก โดยอุณหภูมิจะต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการให้ความร้อนก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพอาหาร ดังนั้นจึงให้ความสำคัญต่ออุณหภูมิ และเวลาในการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความเสถียรของกลุ่มสารเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics) สารประกอบฟลาโวนอยด์ (total flavonoids) และสารประกอบคลอโรฟิลล์ (total chlorophylls) ของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล เมื่อผ่านสภาวะในกระบวนการให้ความร้อนแบบพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) และสเตอริไลซ์ (sterilization) รวมไปถึงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดรางจืดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ glutathione *S*-transferases (GSTs) ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารแปลกปลอมในตับหนูขาวที่ได้รับสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลนาน 90 วัน และศึกษาผลย้อนกลับหลังจากหยุดสารสกัดหลังจากนั้น 14 วัน

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสกัดรางจืดมีความเสถียรต่อสภาวะของกระบวนการให้ความร้อนแบบพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) และสเตอริไลส์ (sterilization) ในสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล

1.3.2 สารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลช่วยเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์ glutathione *S*-transferases (GSTs) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการกำจัดสารพิษหรือสารแปลกปลอม

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 การเตรียมสารสกัดรางจืด : เตรียมสารสกัดรางจืด 2 ชนิด คือ สารสกัดน้ำ และเอทานอล (Oonsivilai, 2006)

1.4.2 การศึกษาความเสถียรของสารเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยการเตรียมสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ผ่านการให้ความร้อนแบบ HTST กลุ่มที่ผ่านการให้ความร้อนแบบ LTLT และกลุ่มที่ผ่านการให้ความร้อนแบบสเตอริไลส์

1.4.2.1 การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics) ของกลุ่มควบคุม กับกลุ่มที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน

1.4.2.2 การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids) ของกลุ่มควบคุม กับกลุ่มที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน

1.4.2.3 การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (total chlorophylls) ของกลุ่มควบคุม กับกลุ่มที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน

1.4.2.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) ของกลุ่มควบคุม กับกลุ่มที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน ด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

1.4.3 สัตว์ทดลองหนูสายพันธุ์วิสตาร์ จากสำนักงานสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.4.4 การเตรียมตัวอย่างตับจากหนูขาวที่ผ่านการทดสอบความเป็นพิษกึ่งระยะยาวของสารสกัดรางจืดโดยการป้อนทางปาก เป็นระยะเวลา 90 วัน โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มหลัก ๆ ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มทดสอบ และกลุ่มศึกษาผลย้อนกลับหลังหยุดให้สารสกัดรางจืด

1.4.4.1 การเตรียมไซโทโซลิค (cytosolic) ซึ่งเป็นส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างตับหนูที่ผ่านกระบวนการ homogenization ด้วยสารละลาย homogenization buffer

1.4.4.2 การวิเคราะห์โปรตีนของส่วน cytosolic ที่เตรียมได้

1.4.4.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ glutathione *S*-transferases (GSTs)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยผ่านกระบวนการให้ความร้อนเพื่อการถนอมอาหารในระดับต่าง ๆ โดยที่คงความเสถียรของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ หรือในทางตรงกันข้ามสามารถหลีกเลี่ยงการใช้สภาวะที่มีผลต่อความเสื่อมลงของสารออกฤทธิ์ของสารสกัดรางจืดได้

1.5.2 องค์ความรู้เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดรางจืดต่อกิจกรรมเอนไซม์ glutathione *S*-transferases (GSTs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถเป็นดัชนีชี้วัดที่สำคัญในปฏิกิริยา phase II ของกระบวนการกำจัดสารพิษหรือสารแปลกปลอม (detoxification) เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม และสารพิษในตับหนูขาว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 รางจืด

รางจืด เป็นชื่อสามัญ และมีชื่อทางพฤกษศาสตร์คือ *Thunbergia Laurifolia* Lindl. เป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อเรียกได้หลายชื่อ ได้แก่ กำลังช้างเผือก ยาเขียว เครือเขาเขียว ขอบชะนางหนามแน่ (เหนือ) ย้ำแย้ (อุตรดิตถ์) น้ำนอง (สระบุรี) รางเย็น คาย (ยะลา) ดุเหว่า (ปัตตานี) ทิดพุด (นครศรีธรรมราช) จอลอดิเออ ปังกะล่ะ ซั้งกะ พอหน่อเตอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) แอดแอ (เพชรบูรณ์) และรางจืดเถา

2.1.1 ลักษณะทางพฤษศาสตร์

เป็นไม้พุ่ม ไม้เถา ไม่มีเนื้อไม้ สามารถเลื้อยไปตามพื้นดินหรือจะพาดพันขึ้นไปคลุมต้นไม้ใหญ่ ๆ ได้ทั้งต้น ส่วนของเถามีลักษณะกลมเป็นข้อปล้อง มีสีเขียว ใบเรียวรูปไข่ หรือกลมรี ใบเป็นไม้ใบเดี่ยวออกตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ และขนาดของใบจะไล่กันขึ้นไปตั้งแต่ขนาดใหญ่ตรงโคนก้านไปหาขนาดเล็กตรงปลายก้านใบ ใบสีเขียวผิวเกลี้ยง ลักษณะเป็นรูปหัวใจ ตรงโคนเว้า ปลายใบเป็นติ่งแหลม ดอกเป็นสีม่วงอ่อน ๆ หรือสีคราม มีการกระจายพันธุ์อยู่แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ขึ้นได้ในดินทุกชนิด พบทั่วไปตามชายป่าดิบ ป่าละเมาะ ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด ปักชำและตอนกิ่ง (รูปที่ 2.1)

รูปที่ 2.1 ลักษณะของใบรางจืด

2.1.2 คุณสมบัติทางเคมีและเภสัชวิทยาของรางจืด

2.1.2.1 คุณสมบัติทางเคมีของรางจืด

สารประกอบทางเคมีที่พบในดอกและใบรางจืดส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มฟลาวานอยด์ เช่น apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside, delphinidin-3,5-di-O-β-D-glucopyranoside และ chlorogenic acid (Purnima, 1978; Thongsaard and Marsden, 2002) นอกจากนี้ในใบรางจืด วีรยุทธ (2522) มีการวิเคราะห์ส่วนประกอบของใบรางจืดโดยการสกัดด้วยน้ำและเมทานอล ใช้วิธีโครมาโตกราฟีพบว่าน้ำสกัดรางจืดประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 ชนิดได้แก่ methionine, serine, glycine และ unidentified amino acid แต่ถ้าทำการสกัดด้วย petroleum ether ที่ 50-70 องศาเซลเซียส พบสารกลุ่มสเตอรอยด์ 8 ชนิด และแคโรทีนอยด์ นอกจากนี้ในใบรางจืดยังพบกลุ่ม iridoid glucosides ของ 8-*epi*-grandifloric acid และ3'-*O*-β-glucopyranosyl-stilbericoside, สารประกอบ 7 ชนิด ได้แก่ grandifloric acid, benzyl β-glucopyranoside, benzyl β-(2'-*O*-β-glucopyranosyl)-glucopyranoside,6-*C*-glucopyranosyl apigenin, 6,8-di-*C*glucopyranosyl apigenin, (*E*)-2-hexenyl-β-lucopyranoside, and hexanol-β-glucopyranoside (Kanchanapoom, Kasai and Yamasaki, 2002) ต่อมา Oonsivilai and others (2007) ได้ศึกษา phytochemical profiling ของสารสกัดรางจืดน้ำ อะซีโตน และเอทานอลโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า กรดคาเฟอิก (caffeic acid) และอพิจินิน (apigenin) เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัดน้ำ ขณะที่สารประกอบ chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, pheophorbide *a*, pheophytin *a* และ lutein เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัดอะซีโตนและสารสกัดเอทานอล

2.1.2.2 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของรางจืด

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงบทบาทของสมุนไพรรางจืดไว้ว่า ต้านอนุมูลอิสระ ต้านสารฆ่าแมลงและสารเคมี ต้านสารเสพติด ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ต้านการอักเสบ และต้านการเป็นเบาหวาน โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1.2.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

กระบวนการเมทาบอลิซึมของสารแปลกปลอม จะเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ที่ไม่มีความเฉพาะเจาะจง และสามารถแบ่งปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นออกเป็น 2 ขั้น คือขั้นที่ 1 (เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่โมเลกุลของสารแปลกปลอมหรือสารพิษ ทำให้มีหมู่โพลาร์เกิดขึ้น เพื่อให้สามารถละลายได้ดีในน้ำและมีสมบัติเหมาะสมที่จะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นตัวใหม่ คือพร้อมที่จะไปรับการเติมหมู่สำหรับปฏิกิริยาในขั้นที่ 2) และขั้นที่ 2 (เป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของสารแปลกปลอมหรือสารพิษ โดยไปรวมกับสารประกอบบางชนิดที่อยู่ในร่างกายได้เป็นสารใหม่ที่ละลายได้ดีในน้ำและพร้อมที่จะถูกขับออกจากร่างกาย ในปฏิกิริยาขั้นที่ 1 เกี่ยวข้องกับไซโทโครม P450 ทำให้เกิดปฏิกิริยา ซึ่งยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตจะเกิดปฏิกิริยา

ดีอัลคิลเลชั่น (dealkylation) เกิดที่อะตอมของ N-, O- และ S- ส่วนกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เกิดปฏิกิริยา S-oxidation สารไทโออีเทอร์จะถูกออกซิไดซ์ให้เป็นซัลฟอกไซด์ โดยอาศัยไซโทโครม P450 แล้วเปลี่ยนต่อไปเป็นซัลโฟน ปฏิกิริยาขั้นที่ 2 มักมีบทบาทในการกำจัดฤทธิ์ (detoxification) ของสารหรืออนุมูลว่องไวปฏิกิริยาให้หมดฤทธิ์ และช่วยการขับออกจากร่างกาย คือ glutathione *S*-transferase (GST) และ NADPH-quinone oxidoreductase (NQO1) โดยทำปฏิกิริยาชนิด conjugation กับสารตัวรับเช่น glutathione, glucuronate, sulfate มีการเติมโมเลกุลของน้ำ (trans-addition) และการรีดิวซ์สาร quinones ด้วย 2 อิเล็คตรอน ตามลำดับ การเพิ่มการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้จะลดโอกาสการทำปฏิกิริยาของสาร หรืออนุมูลอิสระของปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังเพิ่มคุณสมบัติการละลายน้ำและเร่งการกำจัดออกจากร่างกาย การยับยั้งสารก่อมะเร็งยังอาจทำได้ด้วยการเพิ่มการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ต่อต้านออกซิเดชัน (antioxidant enzyme) ได้แก่ glutathione *S*-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase, glutamy-cystein ligase (GCL), heme oxygenase-1 (HO-1) และที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น ferritin และ bilirubin เป็นต้น (นิธิยาและวิบูรณ์, 2543)

คุณสมบัติในด้านการแก้พิษของสารสกัดรางจืดโดยวัดค่าการเพิ่มการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ NAD(P)H : quinine oxidoreductase (NQO1) ในเซลล์ตับชนิด Hepa lclc7 พบว่าสารสกัดอะซีโตน (92 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร) มีฤทธิ์ในการเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ NQO1 สูงสุดถึง 2.8 เท่าเมื่อเทียบกับตัวควบคุม รองลงมาคือสารสกัดเอทานอล (120 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดน้ำ (1,000 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร) ซึ่งมีฤทธิ์ในการเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ 1.35 และ 1.56 เท่าของกลุ่มควบคุมตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ NQO1 นี้เป็นเอนไซม์ใน phase II ของกระบวนการกำจัดสารพิษในร่างกายมนุษย์ นอกจากนี้ยังทำการทดสอบฤทธิ์ของสารก่อกลายพันธุ์และการต่อต้านฤทธิ์ของสารก่อกลายพันธุ์ พบว่าสารสกัดรางจืดทุกชนิด ได้แก่ สารสกัดรางจืดน้ำ เอทานอล และอะซิโตน มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของ 2 amino-anthracene สูงที่สุดเมื่องทดสอบกับ *Salmonella* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 โดยที่สารสกัดรางจืดน้ำแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ที่ค่า EC_{50} สูงสุดที่ 0.13 มิลลิกรัมกรดกาลิคต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดเอทานอลและอะซีโตนแสดงค่า EC_{50} ที่ 0.26 และ 0.61 มิลลิกรัมกรดกาลิคต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้การแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการตรวจสอบด้วยวิธี FRAP สูงสุดที่ 0.93 มิลลิโมลต่อกรัมสารสกัดน้ำ รองลงมาเป็นสารสกัดเอทานอลและอะซีโตนที่ค่า 0.08 และ 0.04 มิลลิโมลต่อกรัมตามลำดับ (Oonsivilai, Ferruzzi and Ningsanond, 2008) นอกจากนี้ Jiwajinda and others (2002) ได้ค้นพบว่า สารสกัดเอทานอลจากใบรางจืด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ superoxide ด้วยอัตรา 50-69% และ xanthine oxidase

ฉัตรชัย (2551) ศึกษาผลของสมุนไพรรางจืดต่อการย่อยได้ของสารอาหารเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการทำงานของตับในไก่กระทงที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา โดยเติมสารสกัดรางจืดลงไปในอาหาร 2% พบว่ามีผลช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดของไก่กระทงให้อยู่ในระดับปกติได้ และสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหารจะลดสมรรถภาพการเจริญเติบโตของไก่กระทงในวันที่ 21-42 และเมื่อมีการเติมกลูโคแมนแนนเพิ่มอีก 1% ในอาหารไก่ ช่วยลดผลกระทบจากสารพิษจากเชื้อรา โดยส่งเสริมการย่อยได้ของสารอาหารและการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระของ glutathione peroxidase

2.1.2.2.2 ฤทธิ์ต้านสารฆ่าแมลงและสารเคมี

ธีระและธำรงค์ (2521) ได้ศึกษาการแก้พิษสตริกนินซัลเฟตด้วยรางจืด โดยการทดลองกรอกรางจืดในรูปของน้ำยาแขวนตะกอนในน้ำตาลกลูโคส 50% ขนาด 1, 1.5, 2 และ 4 กรัมต่อกิโลกรัม ในหนูขาวเป็นระยะเวลา 10 นาที ก่อนให้สตริกนินซัลเฟต พบว่าสามารถยับยั้งฤทธิ์ของสารสตริกนินซัลเฟตได้ เนื่องจากรางจืดช่วยเสริมความสามารถในการดูดซับสารพิษไว้แล้วชะล้างการดูดซับด้วยน้ำ ให้กำจัดออกจากร่างกายได้ง่าย ทำให้หนูขาวไม่แสดงอาการผิดปกติใด ๆ ต่อมา พาณี และชัชวดี (2523) ได้ศึกษาการต้านพิษเฉียบพลันของสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (โฟลิดอล 605®) ในหนูขาวโดยใช้สารสกัดรางจืดน้ำ พบว่าสามารถลดอัตราการตายของหนูขาวจาก 60% เป็น 25% ที่ได้ผลดีเท่ากับการใช้ atropine ร่วมกับ 2-PAM โดย atropine จะทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ส่วน 2-PAM จะไปทำปฏิกิริยากับ phosphorylated enzyme ทำให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อนขึ้น ซึ่งเมื่อเกิดสารเชิงซ้อนขึ้นแล้วจะถูกขบวนการ hydrolysis ปลดปล่อย acetylcholinesterase enzyme ทันที เอนไซม์จึงกลับเป็นอิสระอีกครั้งและสามารถทำงานต่อไปได้ เนื่องจากสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต จะทำให้เกิด phosphorylation ทำให้เอนไซม์ที่ถูกจับทำงานไม่ได้ ต้องรอให้เอนไซม์ถูกปล่อยโดยกระบวนการ hydrolysis ที่เกิดขึ้นเอง ซึ่งช้ามากถ้าปล่อยไว้นานจะทำให้ phosphorylated enzyme เกิด hydrolysis แล้วทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase แบบไม่คืนสภาพปกติ

กนกพร (2545) ใช้รางจืดต้านความเป็นพิษที่เกิดจากสารสกัดกวาวเครือขาวในหนูเพศผู้ ขนาดของกวาวเครือร่วมกับเอทานอล 400, 600 และ 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดปริมาณเม็ดเลือดแดงของหนู ชักนำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยการเพิ่มจำนวนไมโครนิวเคลียสและส่งผลให้น้ำหนักของหนูลดลง โดยใช้รางจืดแบบสดและแห้งควบคู่กับน้ำกวาวเครือ สามารถลดการชักนำให้เกิดไมโครนิวเคลียส แต่ไม่มีผลต้านฤทธิ์กวาวเครือในการลดปริมาณเม็ดเลือดแดงและน้ำหนักตับของหนู แสดงว่ารางจืดต้านการก่อกลายพันธุ์ สกาวรัตน์ (2547) ได้ศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำทำให้เกิดไมโครนิวเคลียส โดยสารฆ่าแมลงเมโธมิล ซึ่งสารเมโธมิลอยู่กลุ่มคาร์บาเมต มีฤทธิ์ในการก่อกลายพันธุ์ ความผิดปกติของ

DNA โดยทำการศึกษาในหลอดทดลองใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในคนและเซลล์ไขกระดูกในหนู พบว่าสารสกัดรางจืดเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell ที่เหนี่ยวนำด้วยเมโธมิล ในหนูก็เช่นเดียวกันที่ระดับความเข้มข้น 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลดลงเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารสกัดรางจืดที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าสารสกัดรางจืดไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม หรือเกิดการกลายพันธุ์ในลิมโฟไซต์ในคนและเซลล์ไขกระดูกในหนู แต่ป้องกันการเหนี่ยวนำทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสโดยสารฆ่าแมลงเมโธมิล

ปัญญา และคณะ (2542) ศึกษาการใช้สมุนไพรรางจืดขับสารฆ่าแมลงในร่างกายของอาสาสมัครเกษตรกรกลุ่มเสี่ยงในตำบลเมืองเดช อำเภอเดชอุดม จังหวัดอุบลราชธานี โดยเลือกกลุ่มตัวอย่างโดยสมัครใจและตรวจพบระดับสารฆ่าแมลงในร่างกายดูจากระดับเอนไซม์ cholinesterase ด้วย reactive paper อยู่ในระดับไม่ปลอดภัย ระดับเสี่ยงและระดับปลอดภัยทำการทดลองโดยให้สมุนไพรรางจืดขนาด 8 กรัมต่อวัน และให้ placebo ในกลุ่มควบคุมขนาดเดียวกัน และศึกษาการลดลงของสารฆ่าแมลงในร่างกายในวันที่ 7, 14 และ 21 วัน ภายหลังได้รับสมุนไพรรางจืด และ placebo หลังจากนั้นนำผลการทดลองมาวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ของการลดลงของระดับเอนไซม์ cholinesterase ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่า ในวันที่ 7 มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) ในวันที่ 14 ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและในวันที่ 21 มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีข้อเสนอแนะในการวิจัยว่าควรศึกษาเปรียบเทียบปริมาณยาในแต่ละกลุ่มเพื่อหาขนาดยาที่เหมาะสมและระยะเวลาที่ได้ผลที่ดีที่สุดในการลดระดับสารฆ่าแมลงในร่างกาย

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบรางจืดน้ำต่อกล้ามเนื้อเรียบ พบว่ามีผลต่อการทำงานของระบบไหลเวียนโลหิต ทำให้ความดันโลหิตลดลง มีผลต่อเส้นเลือดแดงของคนซึ่งแยกจากสายสะดือของทารกแรกคลอดเป็น 2 ระยะคือ ทำให้เส้นเลือดหดตัว (vasoconstriction) และตามด้วยการคลายตัว (vasodilatation) และหากใช้สารสกัดใบรางจืดน้ำในขนาดสูง การคลายตัวของเส้นเลือดในระยะที่สองจะเห็นชัดเจนกว่าการใช้ความเข้มข้นขนาดต่ำ มีผลทำให้กล้ามเนื้อเรียบของลำไส้เล็กของหนูขาวเกิดการคลายตัวในระยะสั้นและตามด้วยการหดตัว การเพิ่มของความตึงตัวและแรงบีบตัวของลำไส้ที่เกิดขึ้นไม่ได้เกี่ยวข้องกับ histaminic และ cholinergic receptor ผลต่อลำไส้หนูขาวทำให้ลำไส้คลายตัวก่อนในช่วงเวลาสั้น ๆ แล้วตามด้วยการหดตัวอย่างเด่นชัด นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมหนูตะเภา และกล้ามเนื้อเรียบของมดลูกหนูขาว ซึ่งผลต่อกล้ามเนื้อเรียบนี้ไม่สามารถต้านฤทธิ์ด้วย atropine และ diphenhydramine (วีระวรรณ, 2543) ต่อมา Kanokwan (2004) ได้รายงานการศึกษากล่าวว่า สารสกัดรางจืดน้ำสามารถต้านความเป็นพิษจากสารกำจัดแมลงในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์

โคลีนเอสเตอเรสได้ในหนูขาว คือ เมโธมิล ซึ่งมีความเป็นพิษสูงเพราะทำให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อเนื้อเยื่อที่ถูกควบคุมโดยสารสื่อประสาทกลุ่ม cholinergic โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase โดยทดสอบกับเอนไซม์ cholinesterase ในซีรัมคนและหนูขาว และระดับ cholinesterase ที่ระบบประสาทในผนังลำไส้เล็กของหนูขาวพันธุ์ Spraque dawley

2.1.1.2.3 ฤทธิ์ต้านสารเสพติด

Zhang (2004) ศึกษาการรักษาการติดสารเสพติดโดยใช้สารสกัดสมุนไพรในหนู พบว่าสารสกัดรางจืดสามารถยับยั้งพฤติกรรมการติดสารเสพติดในหนู ต่อมา Watchareewan (2005) ศึกษาผลของสารสกัดรางจืดในการรักษาการติดสารเสพติด โดยการตรวจคลื่นสมองในหนู เมื่อให้สารสกัดรางจืดในปริมาณสูงพบว่าทำให้เกิดสัญญาณจากสมองเพิ่มขึ้น โดยดูจาก nucleus accumbens, globus pallidus, amygdala, frontal cortex, caudate putamen และ hippocampus ซึ่งให้ผลเหมือนกับสภาวะก่อนมีอาการเสพติด cocaine หรือ amphetamine การให้สารสกัดรางจืดปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางผิวหนังหน้าท้อง ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบ แต่ทำให้ความดันเลือดลดลง แสดงว่าสารสกัดรางจืดช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบประสาทโดยเฉพาะสมองส่วนด้านการตัดสินใจและพฤติกรรมการเคลื่อนไหวไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ให้สารสกัดรางจืดกับกลุ่มที่ให้ยา

2.1.1.2.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส

ศิริวรรณ (2522) ทำการศึกษาการใช้สารสกัดรางจืดน้ำ diethyl ether และ petroleum ether ในการต้านเชื้อแบคทีเรียบางชนิดในตระกูล enterobacteriaceae พบว่าสารสกัดรางจืด diethyl ether ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่า สารสกัดรางจืด petroleum ether และน้ำตามลำดับ ต่อมา Bunkerd and others (1990) ได้ทดสอบการยับยั้งปริมาณไวรัส Herps simplex virus type 1 (HSV-1) พบว่าสารสกัดใบรางจืดด้วยน้ำสามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณของไวรัส HSV-1 และมีฤทธิ์ทำลายไวรัสโดยตรง เมื่อมีส่วนผสมของสารสกัดใบรางจืดด้วยน้ำอยู่ที่ระดับความเข้มข้นซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดวีโรผสมไวรัสปริมาณ 100 TCID50 (tissue culture infection dose 50) ต่อมา Wirotesangthong and Rattanakiat (2006) นำสารสกัดรางจืดน้ำผสมเอทานอล น้ำผสม ethylacetate และ ethylacetate อย่างเดียว สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส Herps simplex virus type 2 (HSV-2 : ไวรัสเริมริมฝีปาก) ได้เมื่อเปรียบเทียบกับ acyclovir ในการเพิ่มปริมาณในเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่สามารถขัดขวางการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสได้

2.1.1.2.5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ณัฏฐิยา (2546) ได้พัฒนาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเพื่อใช้เป็นยาทาภายนอก รางจืดสามารถยับยั้งการบวมได้ 70% เมื่อศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและเรื้อรัง รางจืดไม่มีผลทำให้หนูตาย Nattiya (2003) ศึกษาผลของสารสกัดรางจืดในการต้านการอักเสบ พบว่าสาร

สกัดรางจืดมีค่า EC_{50} เท่ากับ 2.5 กรัมต่อกิโลกรัม และสารสกัดเปลือกมังคุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 5.51 กรัมต่อกิโลกรัม สารสกัดรางจืดต้านการอักเสบได้ดีกว่าสารสกัดเปลือกมังคุด เป็น 2 เท่า เมื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดรางจืดในหนู โดยให้ขนาด 1, 2, 4 และ 8 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ไม่มีหนูตายภายใน 30 วัน แสดงว่าสารสกัดรางจืดมีประสิทธิภาพและปลอดภัย Prayomthin (2005) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบรางจืดในการป้องกันการทำลายเซลล์ตับของหนูที่ได้รับแอลกอฮอล์ และมีการเปรียบเทียบผลกับสาร silymarin พบว่า สารสกัดใบรางจืด และสาร silymarin สามารถเพิ่มอัตราเซลล์ตับปกติขึ้น 2-3 เท่า และลดปริมาณเอนไซม์ aspatate aminotranferase (AST), alanine aminotranferase (ALT) ส่วนระดับการทำลายเซลล์ตับนั้นอยู่ระดับที่ปกติ และระดับของ hepatic triglyceride (HTg) ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ซึ่งจากผลการทดลองแสดงว่าทั้งสารสกัดใบรางจืดและสาร silymarin มีความสามารถในการป้องกันการทำลายเซลล์ตับจากแอลกอฮอล์ ปราชญ์ (2549) กล่าวว่า การนำเอารางจืดมาเคี้ยวและอมในปากระหว่างดื่มเหล้า โดยเชื่อว่ารางจืดจะทำให้ไม่เกิดอาการเมาแอลกอฮอล์ ซึ่งแอลกอฮอล์เป็นอันตราย โดยเฉพาะตับซึ่งสร้างสารเคมีที่จำเป็น เช่น น้ำดี วิตามิน สารทำให้เลือดแข็งตัว ขจัดสารพิษต่าง ๆ ออกนอกร่างกาย เป็นสาเหตุให้ตับทำงานหนัก ถึงขั้นตับแข็ง ทำให้เสียชีวิตเร็วขึ้น เนื่องจากการสูญเสียเซลล์ตับทุกเซลล์ซึ่งปราศจากการสร้างเซลล์ตับทดแทน เพราะตับเป็นแหล่งสันดาปที่สำคัญของแอลกอฮอล์ ตับจึงเป็นอวัยวะที่ได้รับพิษจากเหล้ามากที่สุด เซลล์ตับที่ถูกทำลายจะมีไขมันเข้าไปแทนที่ ทำให้เกิดการคั่งของไขมันในตับซึ่งเป็นสาเหตุแรก ๆ ของอาการตับอักเสบ ส่งผลให้เซลล์ตับถูกทำลายเพิ่มมากขึ้น เมื่อเซลล์ตับตายลงถึงระดับหนึ่ง จะมีการสร้างพังผืดขึ้นที่บริเวณนั้น ในลักษณะคล้ายแผลเป็นทำให้ตับที่เคยอ่อนนุ่ม แข็งตัวขึ้น เกิดอาการที่เรียกว่า ตับแข็ง (Naegle and D'avanzo, 2001)

ต่อมา Boonyarikpunchai, Sukrong and Towiwat (2014) ได้มีการสกัดแยกสารชนิด กรดโรสแมรินิก (rosmarinic acid; RA) จากสารสกัดใบรางจืดเอทานอล เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการแสดงความเจ็บปวดในหนู mice (antinociceptive) ที่ผ่านการทำให้เจ็บปวดด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การวางบนแผ่นร้อน (hot-plate), ทดสอบการบิดตัวหลังการได้รับกรดอะซิติก (acetic acid-induced writhing test) และการฉีดฟอร์มาลีน (formalin test) โดยพบว่าการป้อนสารชนิดกรดโรสแมรินิก (50, 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มีฤทธิ์ต้านการแสดงความเจ็บปวดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) จากการวางหนูทดลองบนแผ่นร้อน ส่วนกรดโรสแมรินิก 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วยลดการบิดตัวของหนูทดลองหลังการได้รับกรดอะซิติกได้ 52% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และ 85% ($p < 0.001$) ตามลำดับ และกรดโรสแมรินิก 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีผลยับยั้งความเจ็บปวดจากการได้รับฟอร์มาลีนในช่วงแรก (0-5 นาทีหลังการฉีดฟอร์มาลีน) และในช่วงหลัง (15-30 นาทีหลังการฉีดฟอร์มาลีน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) จาก

แบบจำลอง 2 แบบได้แก่ carrageenan-induced paw edema และ cotton pellet-induced granuloma formation ซึ่งกรดโรสแมรินิก 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูที่เหนี่ยวนำด้วยคาราจีแนนได้ (carrageenan-induced paw edema) ที่ 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมงหลังการฉีดคาราจีแนน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ) รวมถึงสามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูที่เหนี่ยวนำด้วย prostaglandin (PGE_2-induced paw edema) ได้ และยับยั้งการอักเสบจากแบบจำลอง cotton pellet-induced granuloma formation ได้

2.1.1.2.6 ฤทธิ์ต้านการเป็นเบาหวาน

จากการใช้สารสกัดรางจืดเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ป้อนหนูที่เป็นเบาหวานเป็นเวลา 15 วัน พบว่า ระดับน้ำตาลในเลือดในหนูที่เป็นเบาหวานลดลง และมีแนวโน้มลดน้ำตาลในเลือดหนูที่เป็นเบาหวานจนเกือบเป็นปกติได้ แต่ไม่ชัดเจน และสารสกัดรางจืดปริมาณดังกล่าวยังไม่มีผลในการรักษาความเสื่อมสภาพของระบบสืบพันธุ์ที่เกิดจากเบาหวานได้ (Salika, 2002)

2.2 การศึกษาความเสถียรของสารเคมีที่สำคัญในสารสกัดรางจืด

การศึกษาถึงคุณประโยชน์จากสารสกัดรางจืด รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษ พบว่ามีสรรพคุณหลากหลาย และไม่ก่อให้เกิดพิษถ้าได้รับเข้าสู่ร่างกายในระดับที่ผ่านการทดสอบว่าปลอดภัย และพบว่าสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดรางจืด (น้ำ เอทานอล และอะซีโตน) ประกอบด้วย สารประกอบสารประกอบฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ และคลอโรฟิลล์ จากการตรวจหาส่วนประกอบหลักโดยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) พบว่ากรดคาเฟอิก และ อะพิจินิน (apeginin) เป็นส่วนประกอบหลักในสารสกัดน้ำ และสารประกอบคลอโรฟิลล์ เป็นสารประกอบหลักในสารสกัดเอทานอล และสารสกัดอะซีโตน (Oonsivilai and others, 2007) สารประกอบฟีนอลิกมีความเสถียรสูงในสภาวะที่เป็นกรด (Zhu and others,1997) อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่า การเก็บรักษาในระยะเวลานานถึง 6 เดือนในสภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกันไป (4, 23 และ 40 องศาเซลเซียส) และเก็บในที่มืด พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิตู้เย็น ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารประกอบฟีนอลิกแสดงว่าสามารถรักษาความเสถียรของสารประกอบไว้ได้ แต่อุณหภูมิที่สูงขึ้น (23 และ 40 องศาเซลเซียส) มีผลต่อการลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (Chang and others, 2006) ดังนั้นความเสถียรของสารประกอบฟีนอลิกจำเป็นต้องคำนึงปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาวะความเป็นกรด-ด่าง, อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเก็บรักษารวมถึงเก็บในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นต้น ส่วนแคโรทีนอยด์ และคลอโรฟิลล์ จะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อน โดยคลอโรฟิลล์ จะเปลี่ยนเป็นฟีโอไฟตินได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อนำไปเก็บรักษาจะเปลี่ยนแปลงมากขึ้น อัตราการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับ

ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นในกระบวนการแปรรูปอาหารด้วย และคลอโรฟิลล์เอ เปลี่ยนเป็นฟีโอไฟตินเอ ได้รวดเร็วกว่าคลอโรฟิลล์บี เปลี่ยนเป็น ฟีโอไฟตินบี นอกจากนี้ คลอโรฟิลล์ ยังสามารถสลายตัวเมื่อถูกแสง และออกซิเจน ซึ่งจะคืนกลับไม่ได้ ไม่ว่าจะอยู่ในใบพืชหรืออยู่ในสารละลาย และคลอโรฟิลล์เอ จะสลายตัวได้รวดเร็วกว่า คลอโรฟิลล์บี และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ แคโรทีนอยด์ ซึ่งส่วนใหญ่พบในรูปของ trans จะเปลี่ยนเป็น cis เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงสีเข้มเป็นสีที่จางลง เป็นต้น ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ แคโรทีนอยด์ และคลอโรฟิลล์ ได้แก่ แสง ความร้อน และกรด เป็นต้น (นิธิยา, 2545)

2.2.1 การให้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปอาหาร (thermal processing)

การให้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปอาหาร (thermal processing) หมายถึง การใช้อุณหภูมิสูงเพื่อช่วยถนอมรักษาผลผลิตทางการเกษตร หรืออาหาร โดยความร้อนจะทำให้โปรตีนและส่วนประกอบภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เสียสภาพไป (irreversible denaturation) รวมไปถึงพวกที่สร้างสปอร์ (จิราภรณ์, 2550)

2.2.1.1 ชนิดของอาหารตามลักษณะการถ่ายเทความร้อน

การถ่ายเทความร้อนมีความสำคัญมากในชีวิตประจำวันและอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร การถ่ายเทความร้อน เกิดขึ้นเนื่องจากความแตกต่างของอุณหภูมิ โดยความร้อนจะเคลื่อนที่จากที่ที่มีอุณหภูมิสูงไปยังที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ ความแตกต่างของอุณหภูมิจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการถ่ายเทความร้อน โดยแบ่งการถ่ายเทความร้อนที่สำคัญได้ 4 วิธีดังต่อไปนี้ (จิราภรณ์, 2550; พิชญา, ศรีสุวรรณ และ นพพล, 2555)

2.2.1.1.1 การนำความร้อน (conduction heat transfer)

การส่งผ่านความร้อนจากโมเลกุลตัวกลางตัวหนึ่งไปยังอีกโมเลกุลหนึ่ง ซึ่งตัวกลางนี้อาจเป็นตัวกลางเดียวกัน หรือต่างชนิดที่อาจอยู่ติดกัน เช่น จากผิวกระป๋องด้านนอกไปยังผิวกระป๋องด้านใน ซอสข้น แยม แซนวิชสแปรด

2.2.1.1.2 การพาความร้อน (convection heat transfer)

การส่งผ่านความร้อนของโมเลกุลตัวกลางที่เคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ เกิดจากความแตกต่างของอุณหภูมิภายในก้อนของไหลเนื่องมาจากการที่ของไหลสัมผัสกับผิวของวัตถุที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน จนทำให้เกิดแรงลอยตัวขึ้น เช่น น้ำ น้ำเชื่อม น้ำมัน อากาศร้อน (เร็วกว่าการนำ) เช่น น้ำผัก น้ำผลไม้ นม ผลไม้ในน้ำเชื่อม

2.2.1.1.3 การแผ่รังสี (radiation heat transfer)

การส่งผ่านความร้อนด้วยการแผ่รังสีคลื่นความร้อน ต่างจากการนำ และการพาความร้อน เพราะไม่จำเป็นต้องอาศัยตัวกลาง การถ่ายเทความร้อนด้วยวิธีนี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทำแห้ง รวมไปถึงกระบวนการให้ความร้อนและหล่อเย็นในทางอุตสาหกรรม

2.2.1.1.4 แบบผสม

การถ่ายเทความร้อนขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของอาหารและลักษณะการบรรจุของอาหารในภาชนะ เช่น การอบอาหารในตู้อบจะเป็นการถ่ายเทความร้อนแบบพาและแผ่รังสีร่วมกัน และการให้ความร้อนครีมข้าวโพดบรรจุกระป๋อง ช่วงแรกเป็นแบบพาความร้อน ช่วงหลังเป็นแบบนำความร้อนเพราะแป้งเปลี่ยนสภาพเป็นเจลเมื่อได้รับความร้อน

2.2.1.2 การใช้ความร้อนในการฆ่าจุลินทรีย์มี 2 วิธี คือ

2.2.1.2.1 ความร้อนแห้ง ได้แก่ความร้อนจากเปลวไฟโดยตรง หรือเผาไฟ หรือใช้ความร้อนแห้งที่ได้รับจากการแผ่รังสีความร้อนเช่น ในตู้อบไอร้อน (hot air oven) ซึ่งใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง ใช้ฆ่าจุลินทรีย์บนวัสดุที่ไม่เสื่อมสลายเมื่อสัมผัสกับความร้อนสูงโดยตรง

2.2.1.2.2 ความร้อนชื้น ใช้ความร้อนฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในขณะที่มีความชื้นหรือน้ำอยู่ด้วย ได้แก่ การต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้น จุลินทรีย์ที่มีสปอร์ การพาสเจอไรส์ (pasteurization) ที่อุณหภูมิประมาณ 63 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือประมาณ 75 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว ใช้ฆ่าจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในน้ำนมและเซลล์เจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของน้ำนมและผลิตภัณฑ์บางอย่าง เช่น น้ำผลไม้ ไวน์ เป็นต้น

การศึกษาผลจากวิธีการทำแห้งใบรางจืด (2 กรัม) ด้วยวิธีการอบที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง 30 นาที การทำแห้งด้วยแสงอาทิตย์ และไมโครเวฟ นาน 16 ชั่วโมง และ 4 นาทีตามลำดับ ซึ่งผลของการทำแห้งด้วยการอบและด้วยแสงอาทิตย์ ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณกรดแอสคอบิคต่ำลง 73 และ 76%, และ 80 และ 89% ตามลำดับ ส่วนการทำแห้งด้วยไมโครเวฟ ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณกรดแอสคอบิคต่ำลง 38-41%, และ 50-51% ตามลำดับ การทำแห้งใบรางจืดด้วยไมโครเวฟ มีผลทำให้สีเขียวและกลิ่นของสารสกัดยังคงสภาพ ซึ่งการสกัดด้วยน้ำร้อน ทำให้สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดด้วยเมทานอล และเมื่อเปรียบเทียบกับชาจากหญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon aristatus*) และชารอยบอสหรือชาแดง (*Aspalathus linearis*) พบว่า ชารางจืดแสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าชาทั้ง 2 ชนิดในระดับการผลิตทางการค้า (Chan, 2004; Chan and Lim, 2006) การให้ความร้อนด้วยการทำแห้งใบรางจืด (15 กรัม) สำหรับผลิตชา ในแบบต่าง ๆ ได้แก่ การใช้ไมโครเวฟ (microwave-dried) นาน 1.5 นาที, การอบด้วยตู้อบ (oven-dried) นาน 3 ชั่วโมง, การระเหิดแห้งด้วยการแช่แข็ง (freeze-dried) นานข้ามคืน และการทำให้เหี่ยวแห้งด้วยการแช่แข็ง (freeze-withered) นาน 2 ชั่วโมง แล้วสกัดใบรางจืดแห้งโดยการแช่ด้วยน้ำร้อนนาน 1

ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกและ/หรือค่าที่แสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดน้ำที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเป็นชารางจืด ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งมีลำดับปริมาณฟีนอลิกและ/หรือค่าที่แสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากสูงไปต่ำได้แก่ การทำแห้งด้วย freeze-dried, microwave-dried, oven-dried ซึ่งมากกว่าชาทางการค้า (commercial tea) และการทำแห้งด้วย freeze-withered ตามลำดับ (Eng, Tan and Wong, 2011)

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณ total phenolic (TPC) และ ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC) ของชารางจืดเมื่อเปรียบเทียบกับชาทางการค้า

Tea infusion	TPC (mg GAE/100 g)	AEAC (mg AA/100 g)
Freeze-dried	3850 ± 127 [a]	4520 ± 100 [a]
Microwave-dried	3080 ± 202 [b]	3450 ± 273 [b]
Oven-dried	1800 ± 57 [c]	1590 ± 55 [c]
Commercial tea	577 ± 39 [d]	398 ± 22 [d]
Freeze-withered	488 ± 44 [e]	219 ± 63 [e]

TPC and AEAC are means ± SD ($n = 3$). Abbreviations: GAE = gallic acid equivalent and AA = ascorbic acid.

แหล่งที่มา : Chan and others (2011)

ความเสถียรของสารออกฤทธิ์เมื่อนำไป ผ่านกระบวนการแปรรูปเพื่อยืดอายุของผลิตภัณฑ์อาหารให้นานหลายวัน หรืออาจจะหลายเดือน โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณค่าทางอาหาร หรือไม่ก่อความเสียหายต่อผลิตภัณฑ์ก่อนการบริโภค กระบวนการถนอมอาหารที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคือ การพาสเจอไรซ์ ซึ่งเป็นการให้ความร้อนที่ไม่รุนแรงนัก โดยอุณหภูมิจะต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการให้ความร้อนก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพอาหาร ดังนั้นจึงให้ความสำคัญต่ออุณหภูมิ และเวลาในการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ (จิราภรณ์, 2550)

2.2.2 การให้ความร้อนแบบพาสเจอไรซ์ (pasteurization)

กระบวนการพาสเจอไรซ์ (pasteurization) ที่สำคัญ 2 แบบ (วิไล, 2547) ได้แก่ การใช้อุณหภูมิสูงเวลาสั้น (high-temperature shot time, HTST) เช่น 88 องศาเซลเซียส 15 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงสุด และการใช้อุณหภูมิต่ำเวลานาน (low-temperature long time, LTLT) เช่น 62.5 องศาเซลเซียส 30 นาที หรือ 65 องศาเซลเซียส 30 นาที หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันที ซึ่งไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากทำให้เกิดความสูญเสียวิตามินมากกว่ากระบวนการ HTST เล็กน้อย

กระบวนการให้ความร้อนแบบพาสเจอไรซ์ ต้องทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า ควรเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการพาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิตู้เย็น เพราะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำสามารถยับยั้งการงอก หรือหากต้องการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ต้องใช้วิธีการถนอมอาหารอื่นร่วมด้วย เช่น การลด a_w (water activity) การใช้น้ำตาล เกลือ ความเข้มข้นสูง การปรับให้เป็นกรด (acidification) การใช้สารกันเสีย (preservative) เป็นต้น (จิราภรณ์, 2550) ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในกระบวนการพาสเจอไรซ์ในอุตสาหกรรมมอาหารได้แสดงไว้ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในกระบวนการพาสเจอไรซ์ (pasteurization)

ผลิตภัณฑ์	อุณหภูมิ	เวลา	ระบบ
นม	72-75	15 วินาที	HTST
ไวน์เบียร์	82-87	1-2 วินาที	HTST
ผลไม้แห้ง	65.6-85	30-90 นาที	LTLT
น้ำองุ่น	76.7	30 นาที	LTLT
ครีม	> 80	3-5 วินาที	HTST

แหล่งที่มา : จิราภรณ์ (2550)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.2.2.1 ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการให้ความร้อนแบบพาสเจอไรส์

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการให้ความร้อนแบบพาสเจอไรส์มีรายละเอียดที่สำคัญดังต่อไปนี้ (จิราภรณ์, 2550)

2.2.2.1.1 องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ ค่า pH โดยค่า pH ต่ำมีผลช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ ปริมาณเกลือ เนื่องจากเกลือมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ และปริมาณน้ำตาลมีผลต่อ ค่า a_w ของอาหาร ความเข้มข้นมากค่า a_w (water activity) ลดลง

2.2.2.1.2 คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์

2.2.2.1.3 ลักษณะทางกายภายของผลิตภัณฑ์

2.2.2.1.4 จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นและจำนวนจุลินทรีย์ที่ยังเหลืออยู่

2.2.2.2 การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์พาสเจอไรส์

วิธีการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์พาสเจอไรส์มีข้อกำหนดดังต่อไปนี้ (จิราภรณ์, 2550)

2.2.2.2.1 ต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น

2.2.2.2.2 อาจมีการเติมกรดในผลิตภัณฑ์

2.2.2.2.3 มีการควบคุมสภาพบรรยากาศ (vacuum)

2.2.2.2.4 การดึงน้ำออกจากผลิตภัณฑ์

2.2.2.2.5 อาจมีการเติมวัตถุกันเสีย

2.2.3 การให้ความร้อนแบบสเตอริไลส์ (sterilization)

เป็นการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าพาสเจอไรส์ อาจเป็นอุณหภูมิภายใต้น้ำเดือดหรือสูงกว่า มีวัตถุประสงค์ของเพื่อทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหาร รวมทั้งสปอร์และสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น แต่ในทางอุตสาหกรรมอาหาร การเสตอริไลส์คือการให้ความร้อนในระดับที่เพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย และทำให้ผู้บริโภคปลอดภัยเมื่อบริโภคอาหารนั้นภายใต้สภาวะการเก็บรักษาและขนถ่ายในสภาวะปกติ ปริมาณความร้อนที่ใช้เรียกว่าความร้อนระดับ commercial sterilization อาหารที่ผ่านการให้ความร้อนแบบ sterilization เป็นอาหารปลอดเชื้อสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิปกติได้โดยไม่ต้องแช่เย็น จนกว่าจะเปิดภาชนะ (จิราภรณ์, 2550)

2.2.3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการให้ความร้อนในระดับสเตอริไลส์

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการให้ความร้อนระดับสเตอริไลส์ มีรายละเอียดที่สำคัญดังต่อไปนี้ (จิราภรณ์, 2550)

2.2.3.1.1 สภาพอาหาร เช่น ค่า pH

2.2.3.1.2 สภาพการเก็บรักษา เช่น อุณหภูมิ ภาชนะบรรจุ

2.2.3.1.3 ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์และสปอร์ที่มีในอาหาร

2.2.3.1.4 ลักษณะการถ่ายเทความร้อนของอาหาร

2.2.4 ผลของการใช้ความร้อนที่มีต่อคุณภาพอาหาร (จิราภรณ์, 2550)

การใช้ความร้อนในการถนอมอาหารหรือการแปรรูปอาหารมีทำโดยการให้ความร้อนอย่างต่อเนื่อง เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและ/หรือทำให้อาหารเน่าเสียที่มีอยู่ในอาหารให้หมดไปหรือให้มีอยู่ในปริมาณที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยทั่วไปจุลินทรีย์แต่ละชนิดทนความร้อนได้ไม่เท่ากัน จุลินทรีย์บางชนิดทนความร้อนได้สูงมากสามารถเติบโต เพิ่มจำนวนและสร้างสารพิษได้ที่อุณหภูมิสูง บางครั้งแม้ตัวจุลินทรีย์ถูกทำลายแต่สปอร์และสารพิษยังคงอยู่ ทำให้อาหารเป็นพิษได้ เช่น *Clostridium botulinm* ในขณะที่ผลผลิตทางการเกษตรแต่ละชนิดมีองค์ประกอบและคุณสมบัติที่ต่างกันเมื่อถูกความร้อนจะเกิดปฏิกิริยาและการเปลี่ยนแปลงที่ต่างกันมีผลทำให้ลักษณะทางกายภาย ทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการแตกต่างกัน ดังนั้นการแปรรูปอาหารโดยใช้ความร้อนจำเป็นต้องใช้ระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมกับผลผลิตทางการเกษตรแต่ละชนิด และที่สำคัญต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภค ผลที่จะเกิดขึ้นมีรายละเอียดดังนี้

2.2.4.1 ทำลายและยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและทำให้อาหารเสื่อมเสีย

2.2.4.2 ทำลายและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่พบตามธรรมชาติและทำให้อาหารเสื่อมสภาพ

2.2.4.3 ทำลายสารพิษ พยาธิ และแมลงต่างๆ

2.2.4.4 ช่วยยับยั้งปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้อาหารเสื่อมสภาพ

2.2.4.5 ทำให้ปริมาณและคุณภาพของสารอาหารเปลี่ยนแปลงไป เช่น โปรตีนเสียสภาพ วิตามินลดลง

2.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดรางจืด

การศึกษาด้านความเป็นพิษของพืชสมุนไพร ทำให้ผู้บริโภคลดความเสี่ยงต่อการใช้สมุนไพร และอาจก่อให้เกิดพิษต่อร่างกาย ซึ่งสมุนไพรรางจืดได้ผ่านการทดสอบความเป็นพิษมาแล้ว 2 ระดับด้วยกัน ได้แก่ การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน และความเป็นพิษกึ่งระยะยาว โดยการศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบรางจืดเมื่อบริโภคในขนาดสูง และขนาดเทียบเท่ากับการดื่มชาในคนทุกวันต่อเนื่องกัน โดยใช้หนูสายพันธุ์วิสตาร์ เป็นสัตว์ทดลอง พบว่าน้ำสกัดใบรางจืด 10 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่เปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไปของหนูและไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายใน และเมื่อทดสอบให้น้ำสกัดใบรางจืดขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่เปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไปของหนูและไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายใน และเมื่อทดสอบให้น้ำสกัดใบรางจืดขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 28 วัน พบว่าไม่มีหนูตัวใดเสียชีวิตระหว่างการทดสอบ และไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในทั้งหมด ยกเว้นน้ำหนักของตับ ไต และผลทางโลหิตวิทยาบางค่าของกลุ่มหนูเพศผู้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มควบคุม ในกลุ่มหนูที่ได้รับน้ำสกัดใบรางจืดเป็นเวลา 28 วันและหยุดให้เพื่อสังเกตอาการต่อไปอีกเป็นเวลา 14 วัน พบว่าน้ำหนักตับและไตของหนูเพศเมียต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (วีระวรรณ และคณะ, 2546) นอกจากนี้ คคนางค์ (2555) ยังพบว่า สารสกัดรางจืดน้ำ เอทานอล และอะซีโตน ขนาด 2,000 และ 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน มีผลไม่เปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไป และไม่เปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนู รวมทั้งไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในทั้งหมด เมื่อศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางเคมีคลินิคพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันจากกลุ่มควบคุม และทำให้สามารถกำหนด LD_{50} (Lethal dose 50%) ของสารสกัดรางจืดน้ำ เอทานอล และอะซีโตน เท่ากับ 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า NOAEL (No observed adverse effect level) เท่ากับ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อนำค่าไปกำหนดขนาดสารสกัดรางจืดในการศึกษาความเป็นพิษกึ่งระยะยาวต่อไป และจากการศึกษาความ

เป็นพิษเฉียบพลัน พบว่าสารสกัดอะซีโตน มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับเล็กน้อย แต่อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ การศึกษาความเป็นพิษกึ่งระยะยาวใช้ระยะเวลานานขึ้น ทำให้สามารถก่อให้เกิดพิษในระยะยาวได้ จึงยกเลิกการศึกษาสารสกัดรางจืดอะซีโตนในการศึกษาความเป็นพิษกึ่งระยะยาว และได้มีการศึกษาต่อในด้านความเป็นพิษกึ่งระยะยาวของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล ขนาดเทียบเท่าการดื่มชาในคน 3,000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 90 วัน ซึ่งเป็นกลุ่มทดสอบกลุ่มย้อนกลับ (หยุดสารสกัด และสังเกตอาการต่ออีก 14 วัน) และกลุ่มควบคุม พบว่า ไม่เปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไปของหนู และหนูน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นตามปกติ มีบางอวัยวะที่มีน้ำหนักสัมพัทธ์เฉลี่ยลดลง คือ ปอด หัวใจ และไต ส่วนน้ำหนักสัมพัทธ์เฉลี่ยของอวัยวะเพิ่มขึ้น คือ ต่อมหมวกไต จึงนำไปพิจารณาควบคู่กับค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางเคมีคลินิคพบว่าค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางเคมีคลินิค มีค่าอยู่ในช่วงปกติของหนู แม้จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมก็ตาม ส่วนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยวัดระดับของ Malondiadehyde (MDA) พบว่าทุกกลุ่มมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นกลุ่มย้อนกลับในเพศผู้และที่ได้รับสารสกัดเอทานอลขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

จากการศึกษาจึงสามารถบอกค่า NOAEL (No observed adverse effect level) ของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลได้เท่ากับ 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และค่าความปลอดภัยของสารพิษในมนุษย์ คือ ค่า NOAEL/100 โดย 100 มาจากค่าความแตกต่างของความไวต่อสารพิษในแต่ละคน (10) x ค่าความแตกต่างของความไวต่อสารพิษระหว่างคนกับสัตว์ทดลอง (10) ทำให้ได้ค่าความปลอดภัยของสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอลในมนุษย์ เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เมื่อเทียบกลับเป็นน้ำหนักของผงรางจืดแห้ง เท่ากับ 10.27 กรัมต่อน้ำหนักตัว 60 กิโลกรัมต่อวัน

2.4 วิวัฒนาการทางพิษวิทยา

รางจืดเป็นพืชสมุนไพรที่รู้จักและใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์แผนโบราณ จากตำรายาสมุนไพร รางจืดมีรถเย็นใช้ปรุงเปียาเขียวถอนพิษไข้ แก้เบื่อเมา แก้ร้อนในกระหายน้ำ ประจำเดือนมาไม่ปกติ ปวดหู อักเสบ ปวดบวมและใช้ในการถอนพิษ (detoxification) จากยาฆ่าแมลง (เสงี่ยม, 2508; ชะลอ, 2519 และ วุฒิ, 2540) จากการนำสารสกัดรางจืดมาทดสอบการลดพิษจากพาราควอทในหนูขาว พบว่าสารสกัดรางจืดสามารถลดอัตราการตายของหนูขาวได้ต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) (สกุลรัตน์ และธานี, 2543)

ตำรายาสมุนไพรยังกล่าวอีกว่ารางจืดสามารถถอนพิษที่เกิดจากสัตว์ โดยเฉพาะพิษจากปลาปักเป้าและแมงดาทะเล และมีการรายงานข่าวว่าผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษ tetrodotoxin จากการ

รับประทานไข่แม่งดาทะเล ถูกนำส่งโรงพยาบาลและได้รับการรักษาตามอาการ พบว่าผู้ป่วยไม่มีอาการดีขึ้น ญาติผู้ป่วยรายดังกล่าวจึงขออนุญาตจากแพทย์ให้ผู้ป่วยได้ดื่มน้ำคั้นจากใบรางจืด ภายหลังพบว่า ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นและรอดตายในที่สุด สุวรรณา และคณะ (2554) ได้ทำการทดสอบการต้านพิษ tetrodotoxin ของสารสกัดรางจืดน้ำ ทดสอบความเป็นพิษในหนูขาวสายพันธุ์ ICR (*Mus Musculus:* outbred strain) ด้วยวิธี Acute Oral Toxicity โดยป้อนสารสกัดรางจืดในขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่มีความเป็นพิษต่อตับโดยที่ระดับเอนไซม์ AST ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่มีอัตราการตายของหนูในกลุ่มทดสอบในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนการศึกษาความเป็นพิษของ tetrodotoxin พบว่า สารสกัดรางจืดขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พร้อมพิษชนิดนี้ หรือได้รับสารสกัดรางจืดก่อนรับพิษ 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ในขนาด LD_{50} เท่ากับ 1,200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถช่วยยืดระยะเวลาในการตายของหนูทดลอง ได้นานกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่การให้สารสกัดรางจืดพร้อมพิษจะมีอัตราการรอดชีวิตของหนูเท่ากับ 80% และการให้สารสกัดรางจืดครึ่งชั่วโมงก่อนได้รับพิษมีอัตราการรอดชีวิต 30% ซึ่งอาจเป็นผลของสารสกัดที่มีต่อการดูดซึมพิษที่ผนังลำไส้ ทำให้พิษเข้าสู่กระแสเลือดช้าหรือน้อยลง หรืออาจมีผลทำให้มีการขับพิษออกจากร่างกายได้เร็วขึ้น หรือมีการต้านฤทธิ์ tetrodotoxin ได้โดยตรง ซึ่งยังให้คำตอบไม่แน่ชัดว่าสารสกัดรางจืดมีกลไกในการต้านพิษอย่างไร

ปัจจุบันการพัฒนาทางด้านพิษวิทยาเจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็ว เมื่อมีการพัฒนาวิธีการและเครื่องมือในการวิเคราะห์สารเคมีชนิดต่าง ๆ ในร่างกายคนและสัตว์ทดลองซึ่งทำให้สามารถศึกษากลไกการออกฤทธิ์ได้ลึกซึ้ง (ปราณีรัตน์, ม.ป.ป.)

2.4.1 สาขาพิษวิทยา

พิษวิทยามีการศึกษาในหลายสาขา โดยมีสาขาที่สำคัญ เช่น

วิธีการสกัดแยกสารจากพืช สัตว์ และการผลิตสารเคมี ตลอดจนศึกษาโครงสร้างของสารเคมีดังกล่าวเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในด้านเกษตรกรรม อุตสาหกรรม เช่น การสังเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืช หรือการสังเคราะห์ยาเพื่อใช้ในการรักษาโรค โดยมีหลักการของการสังเคราะห์สารเคมีที่สำคัญคือ สารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นมาต้องเป็นประโยชน์มากที่สุดแต่มีอันตรายน้อยที่สุดต่อมนุษย์ สัตว์ ตลอดจนสิ่งแวดล้อม

2.4.1.2 พิษวิทยาด้านการวิเคราะห์ (Analytical Toxicology) เป็นการศึกษาถึงวิธีการตรวจสอบสารเคมีที่อาจเป็นพิษหรือไม่เป็นพิษ ในด้านกลไกการออกฤทธิ์ (mechanism of action) การศึกษาทดลองสารเคมีที่อาจทำให้เกิดพิษในสัตว์ทดลองหรือในมนุษย์ (experimental toxicology) ตลอดจนศึกษาถึงลักษณะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารเคมี การสะสม และการกำจัดออกจากร่างกาย เพื่อป้องกันและควบคุมไม่ให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต

2.4.1.3 พิษวิทยาด้านคลินิก (Clinical Toxicology) เป็นการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารเคมีที่ทำให้เกิดพิษต่อมนุษย์ที่ปรากฏอาการ อาการแสดง และการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษ

2.4.1.4 นิติพิษวิทยา (Forensic Toxicology) เป็นการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารพิษหรือยาชนิดใดชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ทำให้เกิดภยันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิต ในลักษณะถูกฆาตกรรม ลอบทำร้าย หรือฆ่าตัวตาย หรือเกิดอุบัติเหตุ เพื่อนำความรู้ต่าง ๆ ที่ได้จากการตรวจร่างกายหรือผ่าชันสูตรพลิกศพ ตลอดจนการตรวจทางห้องปฏิบัติการมาประมวลผลและให้ความเห็นในกระบวนการยุติธรรมเพื่อให้เกิดความเป็นธรรมในสังคม

2.4.1.5. พิษวิทยาสิ่งแวดล้อม (Environmental toxicology) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับผลของสารพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ปัญหาจากการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืชในการเกษตรกรรม และสารเคมีจากอากาศและน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น

2.4.1.6 พิษวิทยาด้านการควบคุม (Regulatory Toxicology) เป็นการศึกษาถึงมาตรการควบคุมดูแลการใช้สารเคมีให้เป็นไปตามมาตรฐานที่ถูกต้องตามทั่วโลกยอมรับ ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความปลอดภัยแก่มนุษย์และสิ่งแวดล้อม เช่น การควบคุมการใช้สาร CFCs ในการผลิตเครื่องทำความเย็น หรือสเปรย์ เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อไม่ให้สาร CFCs ฟุ้งกระจายขึ้นไปในชั้นบรรยากาศของโลก ทำลายโอโซน มาตรการควบคุมที่สำคัญได้แก่ การออกกฎหมายมาบังคับใช้ในสังคมนั้น ๆ หรือสร้างข้อตกลงระหว่างประเทศบังคับใช้กับประชาคมโลก ดังเช่นการสกัดสารเคมีจากพืชสมุนไพรรางจืดที่มีฤทธิ์ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งได้จากภูมิปัญญาชาวบ้านที่เห็นถึงประโยชน์ที่แท้จริงมาแล้ว เพียงแต่จำเป็นต้องนำมาพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์เพื่อหาหลักฐานประกอบ แสดงความชัดเจนว่ามีประโยชน์อย่างไร หรือข้อควรระวังในการใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด แต่มีอันตรายน้อยที่สุด

2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความเป็นพิษ

มีปัจจัยหรือองค์ประกอบหลายประการต่อการเกิดพิษในคน หรือสัตว์ในลักษณะที่มีผลมากขึ้นหรือน้อยลง แบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะดังนี้ (ปราณีรัตน์, ม.ป.ป.)

2.4.2.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสารพิษหรือยา ได้แก่ ความบริสุทธิ์และความเสถียรของสารพิษ สภาวะความเป็นกรด/ด่างที่สารพิษละลายอยู่และสารที่ใช้จับกับสารพิษเพื่อความเสถียร ได้แก่ การใช้ตัวทำละลาย (vehicle) เช่น น้ำ, น้ำเกลือ หรือตัวทำละลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ , ตัวเสริม (adjuvant) เป็นสารที่จับกับสารพิษและเสริมการเป็นพิษของสารพิษให้มากขึ้น เช่น piperonyl butoxide เสริมฤทธิ์การกำจัดแมลงของสาร pyrethrins หรือการใช้สาร mercapto benzothiazole เสริมฤทธิ์ฆ่าเชื้อราของสาร dithiocarbaomate, ตัวจับ (binding agent) เป็นสารที่จับกับสารพิษทำให้

การดูดซึมช้าลง ลดความเป็นพิษ เช่น petrolatum หรือ kaolin เป็นต้น และตัวเคลือบ (coating) เป็นสารที่จับกับสารพิษทำให้การดูดซึมสารพิษลดลง

2.4.2.2 การดูดซึมสารพิษ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาตรและความเข้มข้นของสารพิษที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับตำแหน่งของร่างกายและเวลา หรือฤดูกาลที่ได้รับสารพิษ ซึ่งจะมีผลทำให้การดูดซึมสารพิษเข้าสู่ร่างกายมากขึ้นหรือน้อยลง

2.4.2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับคนหรือสัตว์ ความแตกต่างทางพันธุกรรม, ภาวะโภชนาการ, ฮอร์โมนเพศ, การทำงานของตับและไต แม้แต่สภาวะของอารมณ์ ทำให้มีความแตกต่างกันในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษ, ความแตกต่างในการขับถ่ายสารพิษออกทางไตหรือตับ และความแตกต่างของการกระจายตัวของสารพิษและการจับตัวกับตำแหน่งเฉพาะ (receptor site) ซึ่งสิ่งต่าง ๆ ดังกล่าวมีผลต่อการเกิดพิษในคนหรือสัตว์ เช่น ในกรณีที่รับประทานอาหารที่มีโปรตีนต่ำทำให้สร้างเอนไซม์ใน microsome ได้น้อยซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถเปลี่ยนสารพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลง ดังนั้นผู้ที่มีภาวะขาดโปรตีนจะทำให้เกิดความเป็นพิษจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสารพิษหลายชนิดได้มากกว่าเมื่อเทียบกับผู้ที่มีภาวะโภชนาการปกติ แต่ในทางตรงข้ามกลับลดความเป็นพิษของสาร carbon tetrachloride ที่มีต่อตับ

2.4.2.4 ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม อุณหภูมิ ความดันอากาศ ความชื้น แรงดึงดูดของโลก ทำให้สารพิษเปลี่ยนแปลงได้ เช่น nicotine, atropine และ marathion จะเกิดความเป็นพิษต่อร่างกายสูงขึ้นในภาวะที่อุณหภูมิภายนอกลดลง หรือความดันออกซิเจนเพิ่มขึ้น จะทำให้การเกิดพิษจาก cyanide, barbiturate และ carbonmonoxide ลดลง

2.4.3 การดูดซึม การกระจาย และการกำจัดสารพิษและยา

การเกิดพิษของสารพิษและยาที่มีต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นขึ้นอยู่กับการหมุนเวียนและการออกฤทธิ์ของสารพิษในร่างกายได้แก่ 4 กระบวนการหลัก ๆ ดังนี้ (ปราณีรัตน์, ม.ป.ป.)

2.4.3.1 การดูดซึมสารพิษและยาเข้าสู่ร่างกาย (Absorption) สารพิษและยาเข้าสู่ร่างกายได้หลายทางที่สำคัญ คือ ทางเดินอาหาร ทางหายใจ ทางผิวหนัง ทางหลอดเลือด ทางช่องท้อง เป็นต้น สามารถจำแนกตำแหน่งการดูดซึมสารพิษหรือยา ได้ดังนี้

2.4.3.1.1 ในปาก เช่น ยาที่อมใต้ลิ้นสามารถดูดซึมผ่านหลอดเลือดใต้ลิ้นเข้าสู่กระแสโลหิตได้โดยตรง

2.4.3.1.2 กระเพาะอาหาร ภายในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรดทำให้สารที่เป็นกรด เช่น แอสไพริน จะแตกตัวเป็นไอออนได้น้อย จึงถูกดูดซึมได้ดีกว่าสารที่เป็นเบส

2.4.3.1.3 ลำไส้เล็ก เป็นอวัยวะที่มีพื้นที่ผิวมากจากรอยหยักของผนังลำไส้ทำให้การดูดซึมสารส่วนใหญ่เกิดขึ้นในลำไส้เล็ก สารที่สามารถละลายในไขมันได้ดี และเป็นกรดอ่อนซึ่งไม่แตกตัวในภาวะ pH ที่เป็นกรดจะถูกดูดซึมมากที่ลำไส้เล็กส่วนต้นซึ่งมี pH ประมาณ 4

ส่วนสารที่เป็นเบสอ่อนนั้นจะถูกดูดซึมในลำไส้เล็กส่วนปลายที่มี pH เท่ากับ 8 แต่ขณะที่สารพิษหรือยาถูกดูดซึมในกระเพ าะอาหารหรือลำไส้เล็ก สารบางส่วนอาจถูกทำลายโดยเอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อบุผิวกระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็ก นอกจากนั้นเมื่อสารพิษหรือยาถูกดูดซึมจากกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วจะถูกนำเข้าสู่ตับทาง hepatic portal circulation ซึ่งเป็นระบบเลือดไหลเวียนโลหิตไปยังตับ ก่อนที่จะเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตที่ส่งเลือดไปยังอวัยวะต่าง ๆ เนื่องจากตับมีเอนไซม์จำนวนมากจึงทำให้สารพิษหรือยาถูกเปลี่ยนรูปไปก่อนที่ยานั้นจะไปออกฤทธิ์ต่อเนื้อเยื่อร่างกาย กระบวนการดังกล่าวจึงเรียกว่า first pass effect or pre-systemic elimination

2.4.3.1.4 ลำไส้ใหญ่ มีการดูดซึมสารได้น้อย ยกเว้นบริเวณลำไส้ตรง (rectum) ซึ่งมีเยื่อเมือกอ่อนที่สารสามารถผ่านได้ และสารที่ผ่านบริเวณนี้จะถูกดูดซึมเข้ากระแสโลหิตโดยไม่ผ่าน hepatic portal circulation เช่นเดียวกับการให้ยาอมใต้ลิ้น ดังนั้นที่ตำแหน่งนี้จึงเหมาะสำหรับการให้ยาในผู้ป่วยที่ไม่รู้สึกตัว หรือยาที่จะให้มีฤทธิ์ระคายเคืองต่อกระเพาะอาหารและลำไส้

2.4.3.1.5 ระบบทางเดินหายใจ สารพิษหรือยาถูกดูดซึมได้ทั้งทางเยื่อบุทางเดินหายใจส่วนบนและถุงลมปอด โดยสารที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมครอน จะถูกกักไว้ที่ช่องจมูก ส่วนสารที่มีขนาดเล็กกว่า 2 ไมครอน จะเข้าได้ถึงบริเวณหลอดลมใหญ่ (trachea) และแขนงหลอดลม และมีเพียงสารที่มีขนาดเล็กกว่า 1 ไมครอนเท่านั้นที่จะเข้าถึงถุงลมปอด (alveolar sacs) บริเวณเยื่อบุถุงลมเป็นตำแหน่งที่มีเลือดมาเลี้ยงมาก ดังนั้นการดูดซึมสารพิษหรือยาจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว และการดูดซึมทางระบบทางเดินหายใจนี้สารจะเข้าสู่ร่างกายไปยังอวัยวะต่าง ๆ โดยตรงไม่ต้องผ่านตับก่อน

2.4.3.1.6 ผิวหนัง มีคุณสมบัติกั้นการดูดซึมสารต่าง ๆ แต่ในกรณีที่ได้รับสารพิษในปริมาณมาก หรือผิวหนังสัมผัสสารพิษในบริเวณกว้างหรือนานพอ และสารพิษนั้นมีโมเลกุลขนาดเล็ก ก็จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตโดยผ่านผิวหนังทางรูเปิดต่อมไขมันและต่อมเหงื่อ

2.4.3.1.7 การฉีดยาเข้าหลอดเลือดหรือกล้ามเนื้อ ยาที่ฉีดเข้าหลอดเลือดโดยตรงจะมีปริมาณยาที่ถูกดูดซึมสูงสุด และทางการฉีดยาเข้าหลอดเลือด และเข้ากล้ามเนื้อ จะเข้าสู่ระบบไหลเวียนไปยังอวัยวะต่าง ๆ โดยไม่ต้องผ่านตับก่อน

2.4.3.2 การกระจายตัวของสารพิษในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย (distribution) สารพิษหรือยาในกระแสเลือดจะมีการกระจายตัวไปสู่ส่วนต่างๆของร่างกาย ขึ้นอยู่กับอัตราการไหลเวียนของโลหิต, อัตราการซึมผ่านผนังเส้นเลือดฝอย เยื่อหุ้มเซลล์, คุณสมบัติการละลายในไขมันและการแตกตัวเป็นไอออนของสารพิษหรือยา นอกจากนี้สารพิษหรือยาบางชนิดมีความจำเพาะต่ออวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง

2.4.3.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษในร่างกาย (metabolism หรือ Biotransformation) สารพิษหรือยาที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนรูป โดยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในร่างกาย กระบวนการนี้ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ตับ สารพิษหรือยาที่ถูกเปลี่ยนรูปนั้นอาจได้สารใหม่ที่มีฤทธิ์มากขึ้น เท่าเดิมหรือน้อยลงก็ได้ตามแต่ชนิดของสารนั้น ขั้นตอนในการเปลี่ยนรูปแบ่งเป็น 2 ระยะได้แก่

- Phase I (non synthetic reaction) เป็นระยะที่สารพิษเข้าสู่เซลล์ของอวัยวะต่าง ๆ และมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างซึ่งอาจทำให้สารพิษหมดฤทธิ์ หรือมีฤทธิ์เพิ่มมากขึ้น โดยเอนไซม์พบอยู่ใน cytoplasm, mitochondria และsmooth endoplasmic reticulum ซึ่งจัดเป็น microsomal enzymes ที่มี cytochrome P450 ร่วมในการทำงาน แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูป

- Phase II (synthetic or conjugation reaction) เป็นระยะที่มีการจับตัว (conjugation) กับสารอนุพันธ์คาร์โบไฮเดรตหรือกรดอะมิโนที่มีอยู่ในเซลล์ (glucuronide, glycine, glutathione เป็นต้น) จนได้เป็นสารที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีเพื่อง่ายต่อการขับออกจากร่างกาย เช่น glutathione conjugation

2.4.3.4 การกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย (excretion)

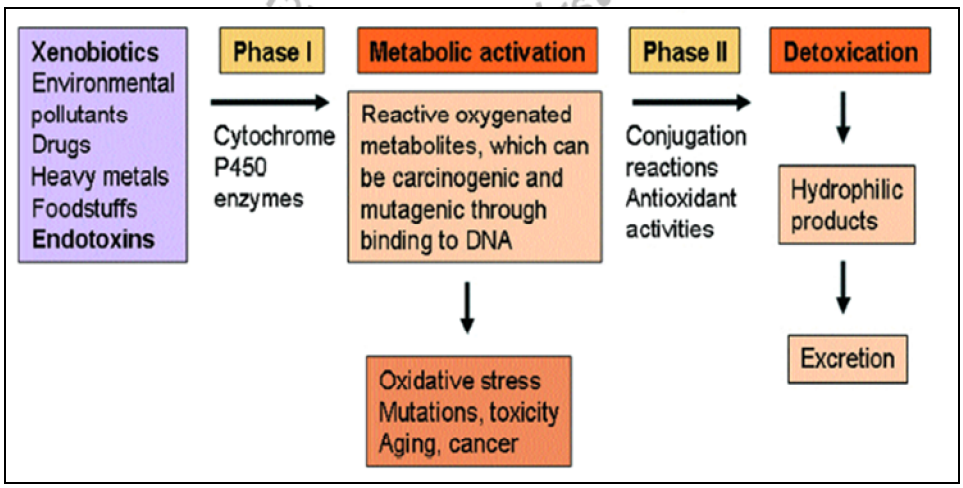
สารพิษหรือยาส่วนใหญ่ถูกขับออกทางปัสสาวะ มีส่วนน้อยที่ขับออกทางเหงื่อ ลมหายใจ น้ำตา หรืออุจจาระ โดยมีไตเป็นอวัยวะที่สำคัญในการขับสารพิษหรือยาในรูปของสารที่ละลายน้ำได้แล้วขับออกมากับปัสสาวะ ส่วนตับเป็นอวัยวะที่สามารถทำลายและขับสารพิษหรือยาออกทางน้ำดีซึ่งจะถูกส่งต่อไปยังลำไส้แล้วขับออกทางอุจจาระ

การขับถ่ายทางน้ำดี เมื่อสารพิษถูกดูดซึมผ่านทางระบบทางเดินอาหารจะผ่านตับก่อนกระจายตัวไปตามกระแสเลือดสู่ส่วนต่างๆของร่างกาย ตับจะมีขบวนการเปลี่ยนแปลงสารพิษให้กลายเป็นเมตาบอไลท์ (biotransformation) แล้วขับออกทางน้ำดีซึ่งจะถูกส่งต่อไปยังลำไส้แล้วขับออกทางอุจจาระ หรือสารที่ละลายในไขมันได้สูงจะถูกดูดซึมกลับเข้าสู่กระแสเลือดแล้วเกิดวนเวียนแบบนี้อีก เรียกว่า enterohepatic circulation ดังนั้นสารพิษหลายชนิดที่เป็นสารประกอบอินทรีย์จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ดีหรือจับกับสารบางชนิดที่ตับสร้างขึ้นเพื่อทำให้ยากแก่การดูดซึมกลับสู่กระแสเลือด (ปราณีรัตน์, ม.ป.ป.)

สารเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นเอนไซม์กลุ่มเดียว (mono-functional inducers) เช่น สารกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbon จากควันบุหรี่ สาร aryl amine จากอาหารปิ้งย่าง สามารถ เหนี่ยวนำหรือกระตุ้นเอนไซม์ Cyp1A1 และ Cyp1A2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 1 แต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์ในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 เช่นเดียวกันกับสารกลุ่ม glucocorticoids หรือ anticonvul-sants ที่สามารถเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นเอนไซม์ Cyp3A4 และสาร ethanol, acetone และ isoniazid ที่เหนี่ยวนำหรือกระตุ้นเอนไซม์ Cyp2E1 การเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นเอนไซม์เพียงกลุ่ม

เดียว จะทำให้เกิดความไม่สมดุลในกระบวนการกำจัดสารพิษ ยกตัวอย่างเช่น สารกลุ่มที่กล่าวข้างต้นซึ่งเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นเอนไซม์ในปฏิกิริยาขั้นที่ 1 จะทำให้เกิดสารเมตาบอไลท์ที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (reactive metabolites) เป็นจำนวนมาก ทำให้ปริมาณเอนไซม์ในปฏิกิริยาขั้นที่ 2 มีไม่เพียงพอต่อการกำจัดสารเมตาบอไลท์ดังกล่าว ส่งผลให้เกิดการสะสมของสารเมตาบอไลท์ที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อ DNA, RNA และโปรตีน ซึ่งเป็นสาเหตุของความเป็นพิษต่อเซลล์ ตลอดจนภาวะการก่อกลายพันธุ์และโรคมะเร็งในที่สุด ดังนั้นการเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการกำจัดสารแปลกปลอมจะต้องเป็นไปอย่างเหมาะสมเพื่อให้เกิดการกำจัดสารพิษอย่างมีประสิทธิภาพ (พรทิพย์, 2547: ออนไลน์)

เนื่องจากกลไกของการเกิดพิษในร่างกายมีโอกาสเปลี่ยนแปลงสารทั้งการทำให้ความเป็นพิษเพิ่มขึ้น หรือลดลงจากการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการกำจัดสารแปลกปลอม ซึ่งเป็นเอนไซม์ในปฏิกิริยา phase I และปฏิกิริยา phase II เป็นการต่อต้านสารอนุมูลอิสระทางอ้อมโดยการลดกิจกรรมของเอนไซม์ phase I และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ phase II ซึ่งเอนไซม์ 2 กลุ่มนี้เป็นกลุ่มหลักของกระบวนการเมตาบอลิซึมในการกำจัดสารแปลกปลอม รวมไปถึงยาที่อาจสะสมจนเกิดพิษและสารก่อมะเร็งต่างๆ โดยทั่วไปเอนไซม์ phase I จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาของสารที่ไม่ชอบน้ำ หรือสารที่ไม่ละลายในน้ำ ซึ่งสารพิษจะมีคุณสมบัติดังกล่าว หลังจากนั้นจะส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยา phase II และสุดท้ายแล้วนั้นก็เพื่อเพิ่มคุณสมบัติของการละลายน้ำได้ดีขึ้นของสาร แล้วส่งผลในการเกิดการขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น อธิบายกลไกไว้ดังรูปที่ 2.2 (Schmid, Schürch, Müller and Zülli, 2007)



รูปที่ 2.2 แผนภูมิการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมสารแปลกปลอม
แหล่งที่มา : Schmid, Schürch, Müller and Zülli (2007)

เอนไซม์เปลี่ยนแปลงสาร phase II มักมีบทบาทในการกำจัดสารพิษ (detoxification) ของสารหรืออนุมูลว่องไวปฏิกิริยาให้หมดฤทธิ์ และช่วยการขับออกจากร่างกาย เช่น glutathione *S*-transferases (GSTs), UDP-glucuronoxyltransferase (UGT), sulfotransferase (SULT), epoxide hydrolase และ NADPH-quinone oxidoreductase (NQO1) โดยทำปฏิกิริยาชนิด conjugation กับ glutathione, glucuronate หรือ sulfate มีการเติมโมเลกุลของน้ำ (trans-addition) และการรีดิวซ์สาร quinines ด้วย 2 อิเล็คตรอน ตามลำดับ เป็นต้น การเพิ่มการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้จะลดโอกาสการทำปฏิกิริยาของสารก่อมะเร็ง (Chen and Kong, 2004; Kwak, Wakabayashi, Kensler, 2004)

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างสารเคมีมีฤทธิ์เคมีป้องกันพบในพืชผักที่มีฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์กำจัดพิษ

Class of chemicals		Representatives	Source
Phenolic	Phenols	Ferulic acid	Rice, fruits,
		Curcumin	Ginger, curry
		EGCG, EGC, EC, ECG	Green tea (Camellia sinensis)
		Resveratrol	Grape
	Flavonoids	Quercetin	Citrus fruits
		Genistein	Soy bean
		Silymarin	Milk thristle
Sulfur-containing	Isothiocyanates	Allyl isothiocyanate	Brussel sprouts
		Benzyl isothiocyanate	Garden cress
		Phenethyl isothiocyanate	Turnips, watercress
		Sulforaphane	Broccoli
	Organosulfur	Allicin	Garlic, onion
		Diallyl trisulfide, S-allyl cysteine	Garlic, garlic oil
Miscellaneous	Indoles	Brassinin, indole-3-carbinol	Cruciferous vegetables
	Diterpenes	Cafestol, kahweol	Green coffee bean
	Coumarins & lactones	Coumarins	Leguminosae species
		Auraptene	Citrus species
	Inorganic	Selenium	Meat, wheat, dairy & fish

แหล่งที่มา : Chen and Kong (2004)

นอกจากนี้ยังเพิ่มคุณสมบัติการละลายน้ำและเร่งการกำจัดออกจากร่างกาย การยับยั้งสารก่อมะเร็งยังอาจทำได้ด้วยการเพิ่มการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ต่อต้านออกซิเดชัน (antioxidant enzyme) ได้แก่ glutathione *S*-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase, glutamyl cystein ligase (GCL), heme oxygenase-1 (HO-1) และที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น ferritin และ bilirubin เป็นต้น สารเคมีจำนวนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารจากธรรมชาติ กลุ่ม polyphenol, coumarin, และสารที่มีอะตอม sulfur อยู่ภายในโมเลกุล สาร 2 กลุ่มนี้สามารถกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงสาร phase II

และเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน สารเคมีดังกล่าวพบในอาหารประเภทผักและผลไม้ต่างๆ จำนวนมาก สารที่มีการศึกษากันมากได้แก่ curcumin ที่พบในขมิ้นชัน epigallo-catechin gallate (EGCG) และสาร catechin อื่นๆ ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavanol ในชาเขียว quercetin และ rutin (Chen and Kong, 2004; Surh, 2003) พบในพืชผลไม้แทบทุกชนิดเช่น กลุ่ม citrus (ส้ม, มะนาว) และยังพบในใบหม่อน ใบฝรั่ง สารในกลุ่มที่เข้า sulfur ได้แก่ sulforaphane, phenethyl isothiocyanate (PEITC) พบในผักบรอคคอรี่ ผักกะหล่ำ และผักอื่น ๆ ดังตารางที่ 2.2 (Chen and Kong, 2004)

การทดสอบคุณสมบัติในด้านการแก้พิษของสารสกัดรางจืดโดยวัดค่าการเพิ่มการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ NAD(P)H : quinine oxidoreductase (NQO1) ในเซลล์ตับชนิด Hepa lclc7 พบว่า สารสกัดอะซีโตน (92 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร) มีฤทธิ์ในการเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ NQO1 สูงสุดถึง 2.8 เท่าเมื่อเทียบกับตัวควบคุม รองลงมาคือสารสกัดเอทานอล (120 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดน้ำ (1,000 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร)ซึ่งมีฤทธิ์ในการเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ 1.35 และ 1.56 เท่าของกลุ่มควบคุมตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ NAD(P)H : quinine oxidoreductase (NQO1) นี้เป็นเอนไซม์ใน phase II กระบวนการกำจัดสารพิษ (Oonsivilai and others, 2007)

จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับความสามารถของสารสกัดที่มีผลยับยั้งคุณสมบัติการเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น ความสามารถของ *Rosmarinus officinalis* ที่ยับยั้งคุณสมบัติการเป็นสารก่อมะเร็งของโครงสร้างทางเคมีที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อสารอยู่ในสัตว์ทดลอง (Singletary and others, 1996) กลไกดังกล่าวอาจจะมีผลการตอบสนองที่สำคัญของระยะแรกของการเกิดมะเร็งโดยสารสกัดโรสแมรี่ เป็นการบังคับให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของสารก่อมะเร็งเปลี่ยนแปลงเป็นสารเมตาบอไลท์ที่ไม่สามารถทำงานได้ และ/หรือการกำจัดสารพิษของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาไปสู่การร่วมกันของการทำปฏิกิริยาร่วมกันเพื่อให้ง่ายต่อการขับออกจากร่างกาย ดังนั้นการป้อนสารสกัดโรสแมรี่ จึงส่งผลให้ในตับมีกิจกรรมของเอนไซม์ GST และ NAD(P)H: quinine reductase (QR) เพิ่มขึ้น (Singletary, 1996; Singletary and Rokusek, 1997) นอกจากองค์ประกอบทางเคมีที่มีคุณสมบัติให้กลิ่น เช่น monoterpenes ในส่วนของใบโรสแมรี่ประกอบด้วยสารที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น phenolic diterpenes, phenolic acids และ flavonoids กลุ่ม phenolic diterpenes เช่น carnosol หรือ carnosic acid มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ GST ในตับของหนูทดลอง (Singletary, 1996) นอกจากนี้ carnosol และ carnosic acid ยังเพิ่ม GST และ QR ในเซลล์ของมนุษย์ (Offord and others, 1995, 1997)

2.5 หนูขาวหรือหนูแรท (*Rattus norvegicus*) (สำนักงานสัตว์ทดลองแห่งชาติ, 2550)

หนูขาวสายพันธุ์วิสตาร์ นิยมนำไปศึกษาและวิจัยในด้านต่าง ๆ เช่น ด้านโภชนาการ (nutrition) ได้แก่ การศึกษาประโยชน์และโทษของโภชนะต่าง ๆ เป็นต้น ด้านพยาธิ (pathology) ได้แก่ การศึกษาด้านการงอกเกิดเนื้องอก เป็นต้น ด้านเภสัชวิทยา (pharmacology) ได้แก่ การทดสอบความปลอดภัยของยาชนิดต่าง ๆ (drug testing) ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน (vaccine testing) การทดสอบความเป็นพิษ (toxicology) เป็นต้น ด้านสรีรวิทยา (physiology) ได้แก่ การศึกษาด้านสรีรวิทยาการสืบพันธุ์ วิทยาการต่อมไร้ท่อ ระบบไหลเวียนเลือด เป็นต้น และด้านพฤติกรรมศาสตร์ (behavioral study) เป็นต้น

2.5.1 ลักษณะทั่วไป

หนูขาว (รูปภาคผนวกที่ ข.1) เป็นหนูที่มีขนาดใหญ่ หางยาว แต่ไม่มีขนที่หาง ขนทั้งตัวสีขาว ตาแดง เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว มีวงจรการเป็นสัดสั้นและสม่ำเสมอตลอดปี ระยะการตั้งท้องสั้น ให้ลูกดก จับต้องได้ง่าย และเป็นที่นิยมนำมาใช้ทดลองอย่างแพร่หลายนั้น เป็นสัตว์ที่มีพฤติรรมอยู่รวมกันได้ไม่มีการต่อสู้ทำร้ายร่างกาย แย่งตัวผู้หรือตัวเมียกัน

2.5.2 ข้อมูลทางสรีระวิทยาของหนูขาว

ระยะการเป็นสัด 4-5 วัน ช่วงเป็นสัด 13-15 ชั่วโมง ระยะตั้งท้อง 20-22 วัน จำนวนลูกต่อครอก 8-12 ตัว อายุเมื่อหย่านม 19-21 วัน น้ำหนักตัวเมื่อหย่านม (ตัวผู้และตัวเมีย) 45-70 กรัม น้ำหนักตัวเมื่อโตเต็มวัยตัวผู้ 300-350 กรัม ตัวเมีย 200-250 กรัม อายุเมื่อพร้อมผสมพันธุ์ (ตัวผู้และตัวเมีย) 8-10 สัปดาห์ อายุยืน 2-3.5 ปี ซึ่งเทียบเท่าอายุคน 60-105 ปี (ตารางภาคผนวกที่ ข.1)

2.5.3 การเลี้ยงสัตว์ทดลอง

นำหนูขาวสายพันธุ์ วิสตาร์เพศผู้และเมีย มาเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองตามข้อบังคับของสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ (2550) ดังนี้ วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานเลี้ยง : ขนาดของพื้นที่และส่วนสูงที่ไม่เพียงพอของกรงมีส่วนสร้างความกดดัน และความเครียดกับหนู กรงที่มีขนาดเล็กส่วนสูงเตี้ยเกินกว่าที่หนูยืนได้ และพื้นที่กรงไม่เหมาะสม เป็นสาเหตุที่สร้างความกดดันแก่หนูได้ทั้งสิ้น วัสดุอุปกรณ์ที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงหนูขาวมีดังนี้

2.5.3.1 อาหาร

หนูขาวต้องการอาหารประมาณ 20-30 กรัมต่อตัวต่อวัน อาหารเป็นอาหารอัดเม็ด เป็นวิวัฒนาการมาจากอาหารป่น โดยพ่นไอน้ำเข้าไปคลุกอาหารป่น ผสมตามสูตรก่อนเข้าเครื่องอัดเม็ดหรือปั้นเป็นก้อนให้ได้ขนาดที่ต้องการ เม็ดไม่แข็งเกินไป

2.5.3.2 น้ำ

หนูขาวต้องการน้ำประมาณ 20-35 มิลลิลิตรต่อวัน น้ำดื่มหนูขาวเป็นน้ำสะอาดปราศจากเชื้อ *Psudomonas aeroginosa* โดยเป็นน้ำกรองผสมคลอรีนที่มีความเข้มข้น 12 ppm

2.5.3.3 กรง

ตารางที่ 2.4 กรงที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงหนูขาว

ชนิดกรง	ขนาด	จำนวนหนูต่อกรง	ลักษณะหนู
กรงแขวนใหญ่	12” x 11” x 7.5”	2	แม่หนูผสมและตั้งท้อง 0-1 สัปดาห์
กรงแขวนเล็ก	10” x 7” x 10”	1	แม่หนูตั้งท้อง 1-2 และ 2-3 สัปดาห์
กรงอลูมิเนียมใหญ่	14” x 29” x 6”	5-10	หนูพักท้อง, หนูรอผสมพันธุ์
กรงสแตนเลสใหญ่	14” x 29” x 6”	5-10	หนูอายุ 3-8 สัปดาห์
กรงสแตนเลสเล็ก	10” x 17.5” x 7”	1-14	แม่พร้อมลูก

แหล่งที่มา : สำนักงานสัตว์ทดลองแห่งชาติ (2550)

2.5.3.4 วัสดุรองนอน

ใช้ขี้กบเป็นวัสดุจากโรงไม้ ซึ่งนิยมใช้เป็นวัสดุรองนอนกันทั่วโลก เนื่องจากซึมซับน้ำได้ดีและไม่ยุ่ย ขี้กบควรมาจากไม้เนื้ออ่อน ถ้ามาจากไม้เนื้อแข็งมักมีหลี่ยม มีมุมแข็งและแหลมคม และมียางที่เป็นอันตรายต่อสัตว์ได้ วัสดุรองนอน เช่น ขี้กบ แกลบ และกระดาษ

2.5.3.5 การจัดสภาพแวดล้อมที่พอเหมาะ

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงหนูเป็น 25±2 องศาเซลเซียส ความต่างไม่เกิน 8 องศาเซลเซียส เป็นช่วงที่สัตว์สามารถปรับตัวได้ เมื่ออุณหภูมิสูง สัตว์จะเบื่ออาหาร กินน้ำมาก ไม่ผสมพันธุ์ หงุดหงิด ไม่เลี้ยงลูก กัดลูก เหนื่อย หอบ เลียตัวเอง เมื่ออุณหภูมิต่ำมีปัญหาคือ กินอาหารมาก กินน้ำน้อย นอน ไม่ผสมพันธุ์ ไม่เลี้ยงลูก

2.5.3.6 ความชื้นสัมพัทธ์

คือปริมาณไอน้ำในอากาศวัดค่าเป็นเปอร์เซนต์ ความชื้นสัมพัทธ์มีผลต่อการระเหยของน้ำ การเจริญเติบโตของเชื้อโรค เชื้อรา ความชื้นสัมพัทธ์ในห้องเลี้ยงหนูขาวคือ 60-90 เปอร์เซนต์ ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำจะทำให้หนูขาวเป็นโรคหางสั้น

2.5.3.7 การถ่ายเทอากาศ

เพื่อถ่ายเทอากาศใหม่เข้ามาแทนอากาศเก่า เป็นการถ่ายเทออกซิเจนเข้ามาแทนคาร์บอนไดออกไซด์ในห้อง เป็นการถ่ายเอาอากาศสะอาดเข้ามาแทนอากาศที่มีกลิ่นในห้องเป็นการเอาอากาศแห้งเข้ามาแทนอากาศชื้นในห้องสามารถทำได้โดยการติดตั้งพัดลมดูดอากาศออกและเข้า

2.5.3.8 แสง

แสงมีความสำคัญต่อวงจรการเป็นสัด หนูขาวมีความต้องการแสง 350-400 ลักซ์ นาน ไม่น้อยกว่า 10 ชั่วโมง แต่ที่นิยมใช้คือมีอัตราส่วนของ 12 ชั่วโมงมืด และ 12 ชั่วโมงสว่าง

2.5.3.9 เสียง

วัดค่าเป็นเดซิเบล ความถี่วัดเป็นเฮิร์สซ์ เสียงเป็นอันตรายที่เกิดดับสัตว์ได้ ตกใจ เครียด ไม่สืบพันธุ์ พฤติกรรมเปลี่ยนไป ไม่เลี้ยงลูก ปกติหนูรับเสียงได้ 50 เดซิเบล

2.6 สรีรวิทยาและหน้าที่ของตับ

2.6.1 สรีรวิทยาของตับ

ตับเป็นศูนย์กลางของกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย โดยสารเคมีหรือยาถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือดจะไหลผ่าน superior mesenteric vein เข้าไปใน portal vein ของตับก่อนที่จะเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดทั่วร่างกาย และกระจายไปยังตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ ดังรูปที่ 2.4 สารเคมีเหล่านี้จะถูกพาเข้าไปใน hepatocyte ทั้งทางตรง และทางอ้อม ทำหน้าที่หลักในกระบวนการเมตาบอลิซึม

เนื่องจากใน hepatocyte cell (เซลล์ตับ) ประกอบไปด้วยกลุ่มของเอนไซม์ cytochrome P450 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมขั้นที่ 1 และ conjugation enzymes ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการขั้นที่ 2 ดังนั้นตับจึงเป็นอวัยวะแรกที่สัมผัสกับสารเคมีที่เป็นพิษ (first-pass effect) เมื่อสารเคมีหรือสิ่งแปลกปลอมเข้ามาใน hepatocyte สารจะถูกเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (biotransformation) เป็น metabolized compounds โดย hepatocyte cell มีความสามารถสูงในการเปลี่ยนแปลงสารเคมีหรือยาเป็นสารประกอบจำนวนมาก/น้อย หรือเป็นพิษ ซึ่งสารประกอบที่ยังมีฤทธิ์ส่วนใหญ่จะเป็นพิษต่อ organelles ของ hepatocyte มีผลทำลายเซลล์นั้น (วรัปศร, ม.ป.ป.: ออนไลน์)

2.6.2 หน้าที่ของเซลล์ตับ

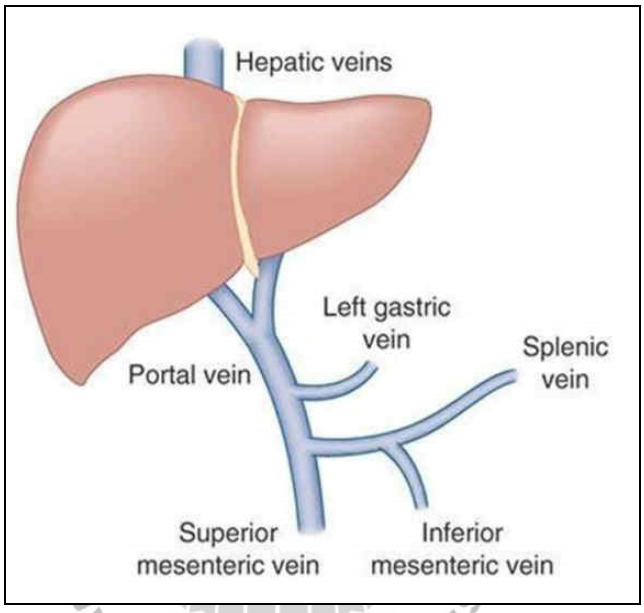
หน้าที่ของเซลล์ตับมีหลายอย่างซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 4 ประเภท คือ

1. การสังเคราะห์ (biosynthesis) ได้แก่การสังเคราะห์พลาสม่าโปรตีน และสารที่จำเป็นสำหรับการทำงานของเนื้อเยื่ออื่น

2. Metabolic regulation ควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารชนิดต่าง ๆ ในเลือดให้อยู่ในระดับที่คงที่โดย metabolic pathway ในตับ

3. การทำให้สารบางอย่างหมดฤทธิ์หรือมีพิษน้อยลง (inactivation และdetoxification) เช่น การสลายฮอร์โมน การกำจัดสารพิษหรือสารแปลกปลอมออกจากกระแสเลือด การเปลี่ยนแปลงยาที่ร่างกายได้รับ และการขับถ่ายของเสียออกนอกร่างกายทางน้ำดี

4. การส่งสารออกจากเซลล์ตับ (secretion) มี 2 ทาง คือ การส่งออกจากตับเข้าสู่กระแสเลือด และการส่งออกจากตับเข้าสู่ทางเดินน้ำดี การทำหน้าที่ของตับแต่ละอย่างเกิดขึ้นใน organelle ต่าง ๆ กัน เช่น การสังเคราะห์โปรตีนเพื่อส่งออกเกิดที่ rough endoplasmic reticulum และ golgi complex การกำจัดสารพิษและสลายยาเกิดที่ smooth endoplasmic reticulum การขนส่งสารเข้าออกจากเซลล์เกิดที่ cell membrane ตับจึงมี organelle ภายในเซลล์มากมายสำหรับทำหน้าที่ นอกจากนี้ตับต้องใช้พลังงานมากในการทำหน้าที่ต่าง ๆ ดังนั้นตับจึงเป็นอวัยวะที่มีไมโตคอนเดรียอยู่มาก และมีอุณหภูมิสูงกว่าอวัยวะอื่น (สมพงษ์, 2536)



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 2.3 hepatic blood flow

แหล่งที่มา : The liver (n.d.): Online

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่าง วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้เตรียมสกัดรางจืด

ใบรางจืดของโรงพยาบาลครบุรี อ.ครบุรี จ.นครราชสีมาในช่วงเดือนมิถุนายน–ตุลาคม โดยทำแห้งด้วยตู้อบ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง

3.1.1.1 เครื่องปั่น (Mitsubishi, MX-T1PW, Thailand)

3.1.1.2 เครื่องปิดผนึกแบบสุญญากาศ (Food EQ,VP-580A,Thailand)

3.1.1.3 ห้องแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

3.1.1.4 shaking water bath (JULABO, SW22, USA)

3.1.1.5 centrifuge (Hettich, universal 16R, USA)

3.1.1.6 freeze dryer (GEA, LYOVAC GT2-S, MD)

3.1.1.7 rotary evaporator (BUCHI, R-200, Switzerland)

3.1.1.8 therbo vap (Caliper, LV, USA)

3.1.1.9 vortex mixer

3.1.1.10 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.1.1.11 hot air oven

3.1.1.12 กระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

3.1.1.13 เอทานอล 95%

3.1.1.14 น้ำกลั่น

3.1.1.15 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.1.1.16 sonicate (Elma, T700/H,Germany)

3.1.1.17 autoclave (SANYO,MLS-3020,Japan)

3.1.1.18 หลอด centrifuge พลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร

3.1.1.19 thermometer

3.1.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์สารสกัดรางจืด

3.1.2.1 สารละลาย Folin-Ciocalteu

3.1.2.2 gallic acid

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.1.2.3 Na_2Co_3

3.1.2.4 $NaNO_2$

3.1.2.5 $AlCl_3$

3.1.2.6 NaOH

3.1.2.7 สารมาตรฐาน catechin

3.1.2.8 สารละลาย DPPH

3.1.2.9 เมทานอล

3.1.2.10 spectrophotometer (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK)

3.1.3 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูสายพันธุ์วิสตาร์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย น้ำหนักประมาณ 170-250 กรัม อายุไม่เกิน สัปดาห์ จากสำนักงานสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

3.1.2.1 ถาดล้อเลื่อนแบบกรงลิ้นชักขนาด 25 x 45 x 20 เซนติเมตรต่อกรง

3.1.2.2 ขวดน้ำ

3.1.2.3 วัสดุรองพื้น (ขี้กบ)

3.1.2.4 อาหารสำหรับหนูทดลองชนิดเม็ดของบริษัท เครือเจริญโภคภัณฑ์ อาหารสัตว์ จำกัด

3.1.5 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการป้อนสัตว์ทดลอง

3.1.5.1 กระบอกฉีดยา 3 มิลลิลิตร

3.1.5.2 feeding tube (Rat) No.18 จากสำนักงานสัตว์ทดลองแห่งชาติ จ.นครปฐม

3.1.5.3 tween 80 5%

3.1.5.4 น้ำกลั่นที่ผ่านการ autoclave

3.1.5.5 เอทานอล 0.24%

3.1.6 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผ่าตัดหนูทดลอง

3.1.6.1 ถาด paraffin

3.1.6.2 แอลกอฮอล์ 70%

3.1.6.3 สำลี

3.1.6.4 กรรไกรผ่าตัด

3.1.6.5 ปากคีบ

3.1.6.6 กระดาษชำระ

3.1.6.7 เข็มฉีดยาเบอร์ 18

3.1.7 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้เตรียมตัวอย่างตับหนูทดลอง

3.1.7.1 centrifuge (Hettich, universal 16R, USA)

3.1.7.2 ultracentrifuge

3.1.7.3 teflon-glass homogenizer

3.1.7.4 1.15% KCl ในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.4

3.1.7.5 ไนโตรเจนเหลว

3.1.7.6 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

3.1.8 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์โปรตีน cytosolic

3.1.8.1 Na_2CO_3

3.1.8.2 NaOH

3.1.8.3 sodium tartrate

3.1.8.4 สารละลาย Folin-Ciocalteu

3.1.8.5 สารมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

3.1.8.6 CDNB

3.1.8.7 glutathione, reduced form (GSH)

3.1.8.8 sodium phosphate buffer pH 6.5

3.1.8.9 spectrophotometer (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การเตรียมสารสกัดรางจืด

3.2.1 การเตรียมใบรางจืดผง

ใช้ใบรางจืดของโรงพยาบาลครบุรี อ.ครบุรี จ.นครราชสีมาในช่วงเดือนมิถุนายน–ตุลาคม โดยทำแห้งด้วยตู้อบ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (Mitsubishi, MX-T1PW, Thailand) เพื่อให้ได้ใบรางจืดผง และบรรจุแบบสุญญากาศ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.2.2 การเตรียมสารสกัดรางจืด

การเตรียมสารสกัดรางจืด 2 ชนิด คือ สารสกัดน้ำ และเอทานอล ตามวิธีของ รัชฎาพร และคณะ (2006) คือ นำใบรางจืดผง 100 มิลลิกรัม นำไปใส่ในหลอด centrifuge พลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำร้อน (100 องศาเซลเซียส) หรือเอทานอล ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าใน shaking water bath (JULABO, SW22, USA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ต่อมานำปั่นเหวี่ยงในเครื่อง centrifuge (Hettich, universal 16R, USA) ที่ 3,000 g 3 นาที แล้ว

แยกส่วนของเหลวโดยกรองด้วยกระดาษกรอง และทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำส่วนที่เป็นของเหลวทั้ง 3 ครั้งรวมกัน และกรองอีกครั้งพร้อมกับปรับปริมาตรใน volumetric flask 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดใส่หลอดทดลอง (ขนาด 5 มิลลิลิตร) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เฉพาะสารสกัดน้ำนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งโดยเครื่อง freeze dryer (GEA, LYOVAC GT2-S, MD) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนสารเอทานอล นำไปเข้าเครื่อง rotary evaporator เพื่อกำจัดตัวทำละลายเอทานอล หลังจากนั้นจัดเก็บสารสกัดน้ำและเอทานอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในภาชนะทึบแสง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.2.3 การเตรียมสารสกัดรางจืดในกระบวนการให้ความร้อน

การเตรียมสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลในกระบวนการให้ความร้อน ปรับการใช้สภาวะการให้ความร้อนจาก วิไล (2547) โดยการละลายสารสกัดรางจืดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้นของสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไว้ในหลอดพลาสติก เตรียมไว้เข้าสู่สภาวะการให้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) ด้วยการนำหลอดสารสกัดที่เตรียมไว้วางใน water bath (JULABO, SW22, USA) แล้วควบคุมอุณหภูมิสารสกัดให้ถึงจุดที่ต้องการด้วยเทอร์โมมิเตอร์ (thermometer) และสเตอริไลซ์ (sterilization) ด้วยการนำหลอดสารสกัดที่เตรียมไว้เข้า Autoclave โดยแบ่งการทดลองการให้ความร้อนเป็น 3 สภาวะ ได้แก่

3.2.3.1 การพาสเจอร์ไรส์ที่ระดับ LTLT (low-temperature long time) : การให้ความร้อนต่ำ 65 องศาเซลเซียส เวลานาน 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) รอการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญและการต้านอนุมูลอิสระ

3.2.3.2 การพาสเจอร์ไรส์ที่ระดับ HTST (high-temperature shot time) : การให้ความร้อนสูง 75 องศาเซลเซียส เวลาสั้น 15 วินาที แล้วทำให้เย็นทันทีในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) รอการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญและการต้านอนุมูลอิสระ

3.2.3.3 การสเตอริไลซ์ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) รอการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญและการต้านอนุมูลอิสระ

3.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติของสารสกัดรางจืด

3.3.1 การหาปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืด

การหาปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืด ตามวิธีของ Waterhouse (2002) โดยการนำทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลาย น้ำ หรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่น 1.58 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ทิ้งไว้ 5 นาที เติม 300 ไมโครลิตร Na_2CO_3 (20% w/v) ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วจึงเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้น

จึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และหาฟีนอลลิกทั้งหมดโดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐานใน 95% เอทานอล (ภาคผนวก) ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปสมมูลของมิลลิกรัม gallic acid ต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง

3.3.2 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดรางจืด

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดรางจืด ตามวิธีของ Zhishen and others (1999) โดยการนำทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำ หรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างละ 250 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 5% $NaNO_2$ 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ทิ้งไว้ 6 นาที หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่เตรียมไว้เติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เมื่อผ่านไป 5 นาที จึงเติม 1 M NaOH 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นอีก 275 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยใช้ catechin เป็นสารมาตรฐานใน 95% เอทานอล (ภาคผนวก) ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปสมมูลของมิลลิกรัม catechin ต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง

3.3.3 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในสารสกัดรางจืด

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด โดยปรับใช้จากวิธีของ Ramesh and Devasenapathy (2006) ซึ่งปรับปริมาตรสารสกัดรางจืดจากสารสกัดน้ำ และเอทานอล ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 652 นาโนเมตร และคำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (µg /g Dry RC)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 652 nm x V}}{34.5 \times RW}$$

โดย V คือ ปริมาตรของสารละลายที่นำมาวัด (มิลลิลิตร)

RW คือ ปริมาณรางจืดแห้งในสารสกัด (มิลลิกรัม)

34.5 คือ specific absorption coefficient for this wavelength

3.3.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืด

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity โดยมีหลักการว่า DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนคลื่นแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนโมตร โดย $DPPH^{\bullet}$ จะเกิดปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (RH) จากนั้นสีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (DPPH-H) ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง ความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงจะลดลง ตามสมการดังนี้ (Blois, 1958; Schlesier, Harwat, Bohm, and Bitsch, 2002)

$$\underset{\text{สีม่วง}}{DPPH^{\bullet}} + \underset{\text{ตัวอย่างทดสอบ}}{RH} \longrightarrow \underset{\text{สีเหลือง}}{DPPH\text{-}H} + R^{\bullet}$$

โดยการทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำ หรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DPPH 1.90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และคำนวณหา % inhibition จากสูตร

$$\%\ Inhibitttion = \left(\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}}\right) \times 100$$

โดย A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

3.4 การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

3.4.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ใช้หนูสายพันธุ์วิสตาร์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย น้ำหนักประมาณ 170-250 กรัม อายุไม่เกิน 6 สัปดาห์ จากสำนักงานสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ควบคุมอุณหภูมิตลอดเวลาที่ 22 ± 3 องศาเซลเซียส เปิดและปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง เปลี่ยนถาดรองปัสสาวะและอุจจาระหนูทุกวัน ให้อาหารเม็ดมาตรฐานและน้ำตามต้องการ ระยะเวลาการศึกษา 3 เดือน และได้มีการศึกษาวิจัยใน

หนูที่ผ่านการอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองเพื่อการศึกษาวิจัย โดยคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4.2 วิธีการป้อนสารสกัดให้แก่สัตว์ทดลอง

นำกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร มาต่อด้วย feeding tube (Rat) No.18 ยาวประมาณ 7 เซนติเมตร จากนั้นดูดสารสกัดรางจืดเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่จะใช้ป้อนครั้งละ 1 มิลลิลิตร ต่อหนู 1 ตัว ใช้นิ้วชี้ และนิ้วหัวแม่มือข้างซ้ายดึงส่วนหนังบริเวณด้านต้นคอด้านบนของหนู ใช้อุ้งมือและนิ้วทั้งสามที่เหลือจับหนังตรงบริเวณหลังของหนูให้แน่น การจับโดยวิธีนี้ทำให้หนูไม่ดิ้นและอ้าปากออกเล็กน้อย จึงสอด feeding tube ผ่านบนลิ้นเข้าถึงลำคอแล้วค่อยสอดลงไปให้ลึกพอประมาณ จึงป้อนสารลงไปอย่างระมัดระวังและรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดแผลกับหลอดอาหาร และการสำลักของหนู

3.4.3 การเตรียมตัวอย่างตับเพื่อศึกษาระบบเอนไซม์ GSTs

3.4.3.1 การสลบหนูก่อนผ่าตัด

นำหนูใส่ลงไปในกล่องเพื่อให้ดมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จนกระทั่งสลบ นำหนูออกมาและทำดึงคอเพื่อเคลื่อนกระดูกคอของหนู แล้วนำมาวางไว้ที่ถาด paraffin และจัดท่าหนูให้นอนหงาย ตรึงที่เท้าทั้งสี่ข้าง

3.4.3.2 การเตรียมเนื้อเยื่อตับ

เมื่อครบอายุการเลี้ยงหนูทดลอง นำหนูทดลองมาผ่าตัด โดยทำตามข้อ 3.4.3.1 ก่อนจากนั้นจึงเริ่มทำการผ่าตัด หลังจากนั้นใช้กรรไกรค่อย ๆ เลาะเนื้อเยื่อที่ติดกับตับและส่วนต่าง ๆ ของอวัยวะทางเดินอาหารออกแล้วจึงตัดส่วนทั้งหมดของตับออกมา เลาะเนื้อเยื่อไขมันที่ติดออกให้หมดอีกครั้ง ต่อจากนั้นแบ่งตัวอย่างตับ มาล้างด้วยสารละลาย 1.15% KCl ใน 0.1 โมลาร์ โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.4 (homogenization buffer) ที่แช่เย็น และเก็บอย่างรวดเร็วในสารละลายไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปเก็บในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปบด

3.4.3.3 การเตรียมไซโทโซลิค (cytosolic) จากเนื้อเยื่อตับ (Ishii *and others*, 1986)

นำตับละลายด้วยสารละลาย 1.15% KCl ใน 0.1 M โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.4 (homogenization buffer) แช่เย็น ปริมาณ 3 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมของตับ แล้วบดด้วย teflon-glass homogenizer จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Hettich, universal 16R, USA) ที่ 9,000 g 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และนำส่วนใส (supernatant) มาผ่านการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยเครื่อง ultracentrifugeที่ 105,000 g 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แยกเฉพาะส่วนใสเป็นส่วนของไซโทโซลิค (cytosolic) เก็บไว้วิเคราะห์ ซึ่งก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ GSTs จะแบ่งส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์โปรตีนตามวิธี Lowry (Lowry *and others*, 1951) และส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์

3.4.4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ GSTs

3.4.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน Lowry

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนไซโทโซลิค (cytosolic) โดยมี bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน ใช้ปริมาณโปรตีนไซโทโซลิค (cytosolic) เพื่อการคำนวณเทียบกับปริมาณเอนไซม์ เพื่อรายงานกิจกรรมของเอนไซม์ GSTs ในหน่วย μmole/min/mg protein ในข้อ 3.4.4.2 ซึ่งได้นำเสนอวิธีการการเตรียมสารและขั้นตอนการวิเคราะห์โปรตีนตามวิธีของ Lowry and others (1951) ไว้ในภาคผนวก

3.4.4.2 การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ GSTs

เอนไซม์ GSTs เป็นเอนไซม์ที่มีความสัมพันธ์ต่อกระบวนการกำจัดสารแปลกปลอม/สารพิษในกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายของสิ่งมีชีวิต สามารถติดตามตรวจวัดได้จากกิจกรรมของปฏิกิริยาคอนจูเกต (conjugation) ระหว่าง 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) กับ glutathione, reduced form (GSH) โดยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ของ 2, 4-dinitrophenylgluathione (G-SDNB conjugate) ที่ 340 นาโนเมตร ตามแผนภาพดังนี้

$$\text{G-SH + CDNB} \xrightarrow{\text{GSTs}} \text{G-SDNB conjugate + HCl}$$

ปฏิกิริยาของเอนไซม์ GSTs ได้จากการผสมสาร 100 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate buffer pH 6.5 ปริมาณ 2.7 มิลลิลิตร, 75 มิลลิโมลาร์ glutathione, reduced form (GSH) 0.1 มิลลิลิตร และ30 มิลลิโมลาร์ CDNB 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย votex ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้หลังจากเติม 0.1 มิลลิลิตรของเอนไซม์ GSTs ที่ได้จากส่วนของไซโทโซลิค (cytosolic) ผสมแล้ววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงทันที ภายในระยะเวลา 5 นาที เป็นช่วงที่มีการเพิ่มขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ได้คงที่ที่สุด ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยวัดและจดบันทึกค่าการดูดกลืนคลื่นแสงไว้ทุก ๆ 1 นาที แล้วคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ GSTs ในหน่วย μmole/min/mg protein (Habig *and others*, 1974) จากสูตร

$$\text{ปริมาณเอนไซม์ (Units/ml enzyme)} = \frac{(\Delta\text{A340nm/min Test} - \Delta\text{A340nm/min Blank})(3.0)(\text{df})}{(9.6)(\text{V})}$$

3.0 = ปริมาตรทั้งหมดของสารผสม (มิลลิลิตร)

df = Dilution factor

9.6 = mM extinction coefficient ของ Glutathione-2, 4-Dinitrobenzene conjugate ที่ 340 nm

V = ปริมาตรของไซโทโซลิคโปรตีน (0.1 มิลลิลิตร)

$$\text{ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีน (μmole/min/mg protein)} = \frac{\text{Units/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

3.5 สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้ซอฟท์แวร์สถิติโปรแกรม SPSS 17.0 คำนวณผลแสดงเป็นค่า mean ± standard deviation ($\bar{x}$ ±S.D) อาจมีตัวอย่างตับของสัตว์ทดลองที่ยังมีชีวิตไม่นำมารวมในการหาค่าเฉลี่ย สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดลองระหว่างกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุมใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (mean difference) ด้วยวิธี Turkey-Kramer post-hoc test ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ รวมไปถึงการเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณสารออกฤทธิ์ของสารสกัดในตัวทำละลายเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างโมเดลสารสกัดรางจืดที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนกับกลุ่มควบคุม ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$

3.6 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

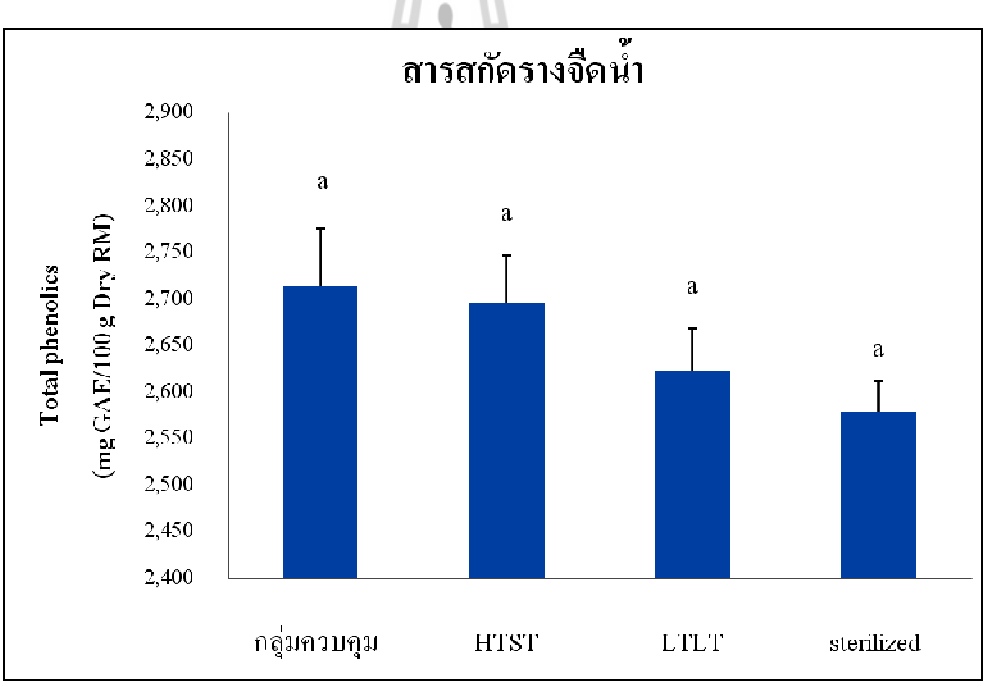
ห้องปฏิบัติการเคมี ห้องปฏิบัติการแปรรูปอาหาร ณ อาคารเครื่องมือ 3 อาคารสัตว์ทดลอง ห้องจุลทรรศน์ อาคารเครื่องมือ 9 ฝ่ายวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ และห้องเตรียมตัวอย่าง อาคารเครื่องมือ 1 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาสารสกัดรางจืดต่อกระบวนการให้ความร้อน

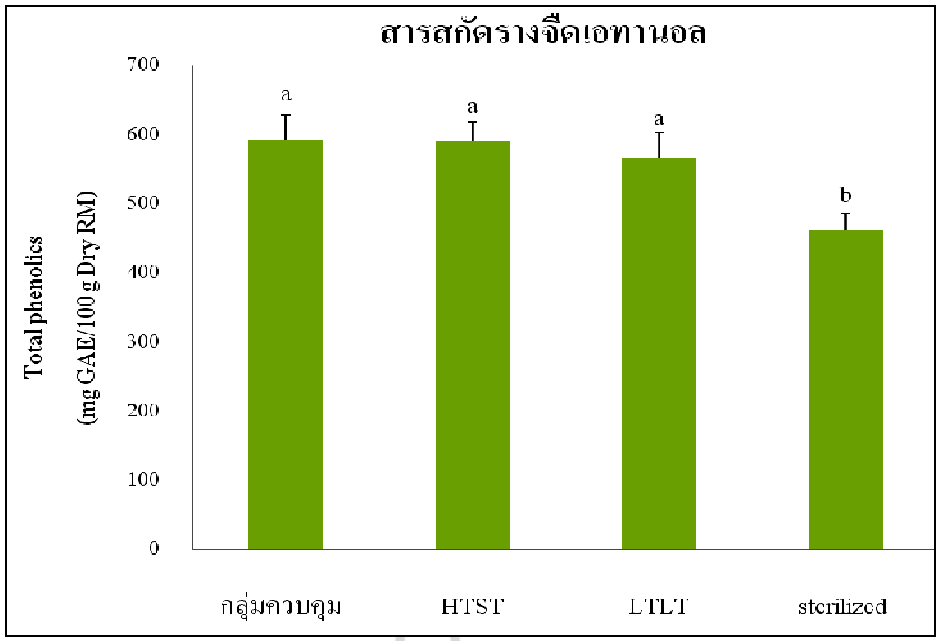
4.1.1 การเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิดต่าง ๆ

จากผลการวิจัย พบว่าสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนในระดับต่าง ๆ มีปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมด (total phenolics) ที่ตรวจสอบด้วย Folin–Ciocalteu ตามวิธีของ Waterhouse (2002) แสดงในรูปที่ 4.1 และ4.2



รูปที่ 4.1 การเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำ เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization

หมายเหตุ : HTST (high-temperature short time) : การให้ความร้อนสูง 75°C เวลาสั้น 15 วินาที
LTLT (low-temperature long time) : การให้ความร้อนต่ำ 65°C เวลานาน 30 นาที
sterilized : autoclave ที่ 121°C นาน 15 นาที
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.01$)

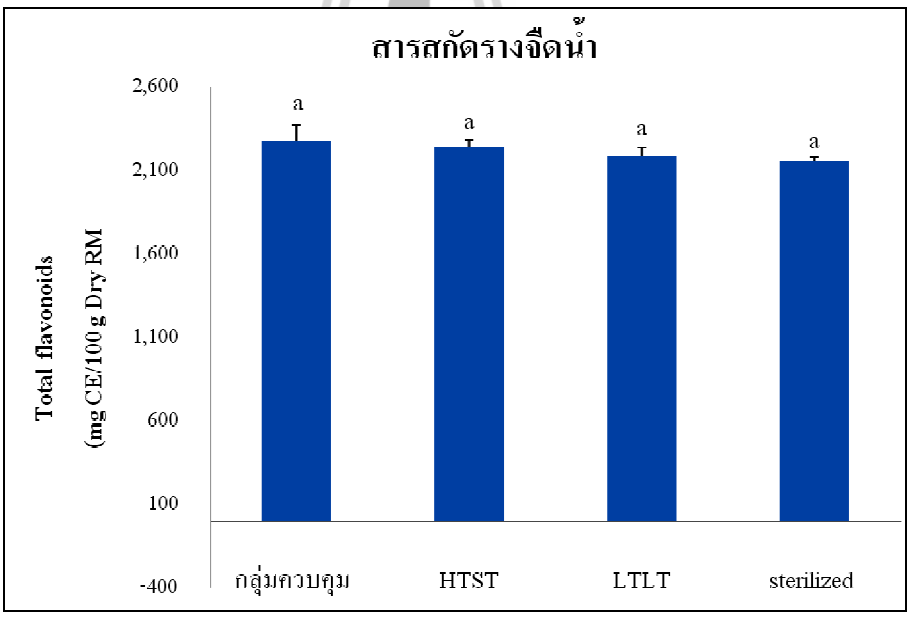


รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization

หมายเหตุ : HTST (high-temperature short time) : การให้ความร้อนสูง 75°C เวลาสั้น 15 วินาที
LTLT (low-temperature long time) : การให้ความร้อนต่ำ 65°C เวลานาน 30 นาที
sterilized : autoclave ที่ 121°C นาน 15 นาที
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.01$)

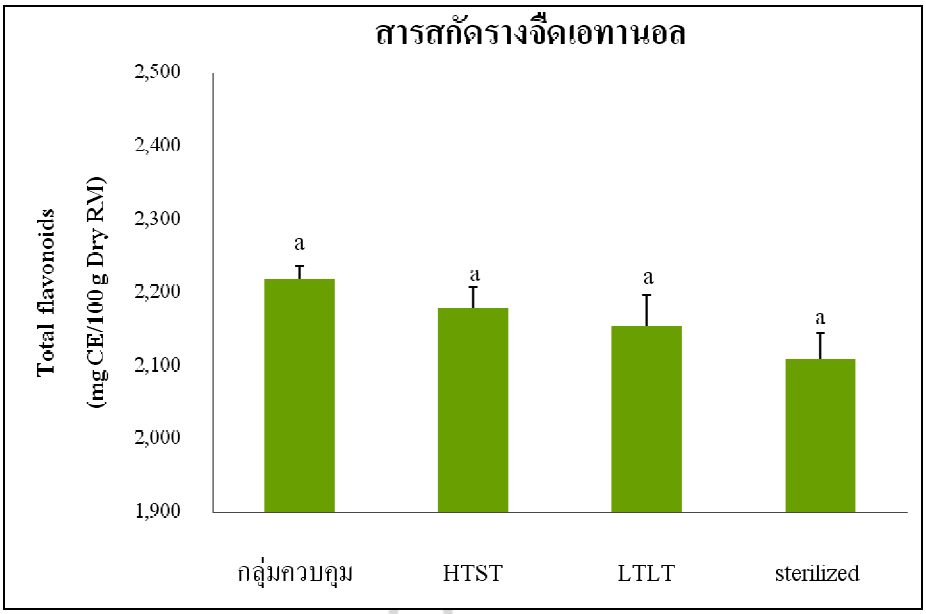
โดยเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของทั้งสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization หากเปรียบเทียบความเสถียรของสารสกัดรางจืดที่แตกต่างกันในกระบวนการให้ความร้อน จะสังเกตได้ว่าการให้ความร้อนสูง 75 องศาเซลเซียส เวลาสั้น 15 วินาที (HTST) มีความเสถียรใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมมากที่สุด รองลงมาคือในกลุ่มที่ได้รับความร้อนต่ำ 65 องศาเซลเซียส เวลานาน 30 นาที (LTLT) ซึ่งข้อมูลจากรูปที่ 4.1 และ 4.2 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบว่าสารสกัดรางจืดเอทานอลที่ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (sterilization) มีความเสถียรลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งจากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืดน้ำมีความเสถียรเมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ และเวลาต่าง ๆ แต่ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ จิราพร (2554) ว่าอุณหภูมิและเวลามีผลต่อการสลายตัวของกรดฟีนอลิกชนิดต่าง ๆ โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 100, 150, 200 และ 250 องศาเซลเซียส

นาน 30, 60, 90 และ 120 นาที ทำให้ปริมาณกรดฟีนอลิกชนิดต่าง ๆ สลายตัวมากขึ้น ทั้งนี้ทั้งนั้นเนื่องมาจากงานวิจัยนี้ใช้สภาวะของกระบวนการพาสเจอไรส์โดยใช้ความร้อนภายใต้อุณภูมิของน้ำใน water bath ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส และเวลาสั้นกว่า 30 นาที และการนึ่งโดยใช้ความดันไอน้ำ (autoclave) ที่ระดับอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลาเพียง 15 นาที จึงไม่เกิดการสลายตัวของฟีนอลิกที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่ผลวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Ulrike and others (2013) ซึ่งได้ทำการศึกษาหาปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดในน้ำผลไม้ทับทิมก่อนและหลังให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 30, 60, 120 และ 300 นาที ผลการทดลองที่ได้คือ ปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมด ที่ตรวจสอบด้วยวิธี Folin–Ciocalteu ในน้ำทับทิมก่อนและหลังให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 30, 60, 120 และ 300 นาที มีค่าคงที่ และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.01$) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลมีความเสถียรและไม่มีการสลายตัวหลังจากผ่านกระบวนการให้ความร้อนด้วยการพาสเจอไรส์ที่ระดับ LTLT, ระดับ HTST และกระบวนการ sterilization



รูปที่ 4.3 การเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำ เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization

หมายเหตุ : HTST (high-temperature short time) : การให้ความร้อนสูง 75°C เวลาสั้น 15 วินาที
LTLT (low-temperature long time) : การให้ความร้อนต่ำ 65°C เวลานาน 30 นาที
sterilized : autoclave ที่ 121°C นาน 15 นาที
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.01$)



รูปที่ 4.4 การเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization

หมายเหตุ : HTST (high-temperature short time) : การให้ความร้อนสูง 75°C เวลาสั้น 15 วินาที
LTLT (low-temperature long time) : การให้ความร้อนต่ำ 65°C เวลานาน 30 นาที
sterilized : autoclave ที่ 121°C นาน 15 นาที
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.01$)

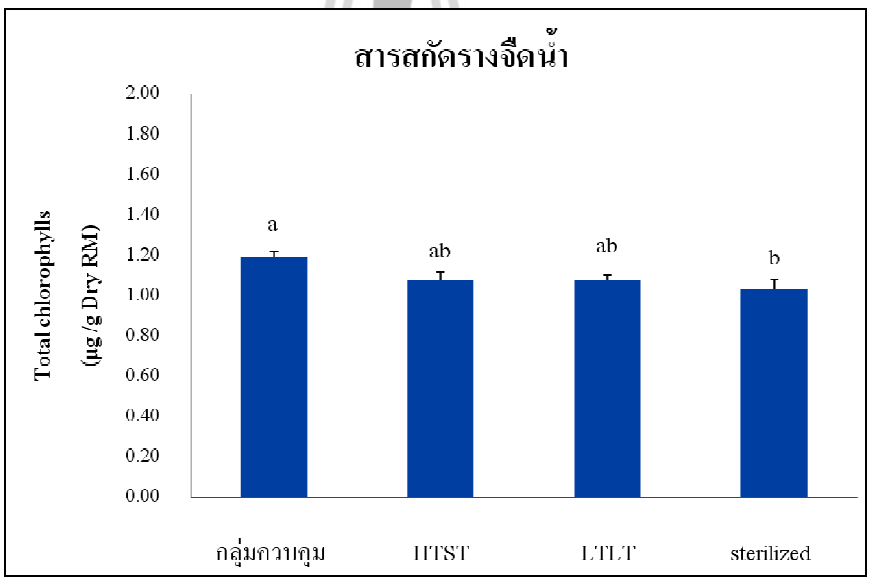
4.1.2 การเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลเมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิดต่าง ๆ

นอกจากนี้ยังมีสารสำคัญของสมุนไพรรางจืดที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกอีกกลุ่มหนึ่งที่สอดคล้องและมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเป็นไปในทิศทางเดียวกัน นั่นคือ กลุ่มของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids) ทั้งหมด ตามวิธีของ Zhishen and others (1999) ดังแสดงปริมาณสารไว้ในรูปที่ 4.3 และ 4.4 เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมามีการรายงานความเสถียรของสารประกอบฟีนอลิก ในสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก มีความเสถียรสูงในสภาวะที่เป็นกรด (Zhu and others, 1997) และมีงานวิจัยที่ผ่านมารายงานว่า การเก็บรักษาสารประกอบฟีนอลิกในระยะเวลานานถึง 6 เดือนในสภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกันไป ได้แก่ ที่อุณหภูมิ 4, 23 และ 40 องศาเซลเซียส และเก็บในที่มืด พบว่า ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิตู้เย็น ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารประกอบฟีนอลิกแสดงว่าสามารถรักษาความเสถียรของสารประกอบไว้ได้ แต่อุณหภูมิที่สูงขึ้น (23 และ 40 องศาเซลเซียส) มีผลต่อการลดลงของสารประกอบฟีนอลิก (Chang

and others, 2006) ดังนั้นความเสถียรของสารประกอบฟีนอลิก จำเป็นต้องคำนึงปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาวะความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเก็บรักษารวมถึงเก็บในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นต้น

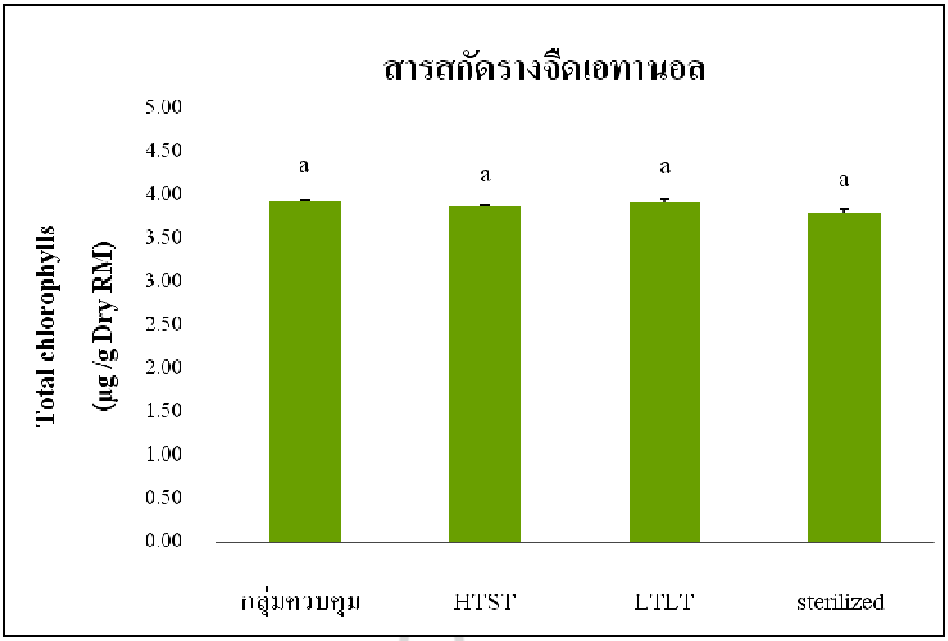
4.1.3 การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิดต่าง ๆ

หากเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนในระดับต่าง ๆ จะพบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ผ่านความร้อนระดับ sterilized มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ในกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านความร้อนด้วยการพาสเจอไรส์ที่ระดับ LTLT และระดับ HTST ไม่มีความแตกต่างกันทั้งจากการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและการให้ความร้อนระดับ sterilized อีกทั้งสารสกัดรางจืดเอทานอลทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันเมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนประเภทดังกล่าวข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4.5 การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำ เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization

หมายเหตุ : HTST (high-temperature short time) : การให้ความร้อนสูง 75°C เวลาสั้น 15 วินาที
LTLT (low-temperature long time) : การให้ความร้อนต่ำ 65°C เวลานาน 30 นาที
sterilized : autoclave ที่ 121°C นาน 15 นาที
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.01$)



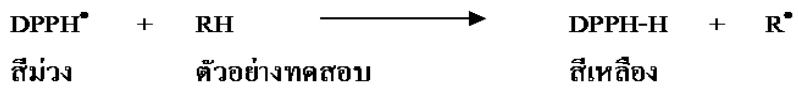
รูปที่ 4.6 การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization

หมายเหตุ : HTST (high-temperature short time) : การให้ความร้อนสูง 75°C เวลาสั้น 15 วินาที
LTLT (low-temperature long time) : การให้ความร้อนต่ำ 65°C เวลานาน 30 นาที
sterilized : autoclave ที่ 121°C นาน 15 นาที
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.01$)

ซึ่งปกติแล้ว คลอโรฟิลล์ จะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อน แต่จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีจาก คลอโรฟิลล์ เปลี่ยนเป็นฟีโอไฟตินอย่างรวดเร็ว ซึ่งเมื่อนำไปผ่านการเก็บรักษาจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้อัตราการเปลี่ยนแปลงยังขึ้นอยู่กับปริมาณกรดที่เกิดขึ้นในกระบวนการแปรรูปอาหารด้วย โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ คลอโรฟิลล์เอ จะเปลี่ยนเป็น ฟีโอไฟตินเอ ได้รวดเร็วกว่าคลอโรฟิลล์บี เปลี่ยนเป็น ฟีโอไฟตินบี นอกจากนี้ คลอโรฟิลล์ ยังสามารถสลายตัวเมื่อถูกแสง และออกซิเจน ซึ่งจะคืนกลับไม่ได้ ไม่ว่าจะอยู่ในใบพืชหรืออยู่ในสารละลาย และ คลอโรฟิลล์เอ จะสลายตัวได้รวดเร็วกว่า คลอโรฟิลล์บี และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ แคโรทีนอยด์ ซึ่งส่วนใหญ่พบในรูปของ trans จะเปลี่ยนเป็น cis เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงสีเข้มเป็นสีที่จางลง เป็นต้น ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ แคโรทีนอยด์ และ คลอโรฟิลล์ ได้แก่ แสง ความร้อน และกรด เป็นต้น (นิธิยา, 2545) การเสื่อมสลายของปริมาณสารคลอโรฟิลล์ระหว่างการเข้าสู่

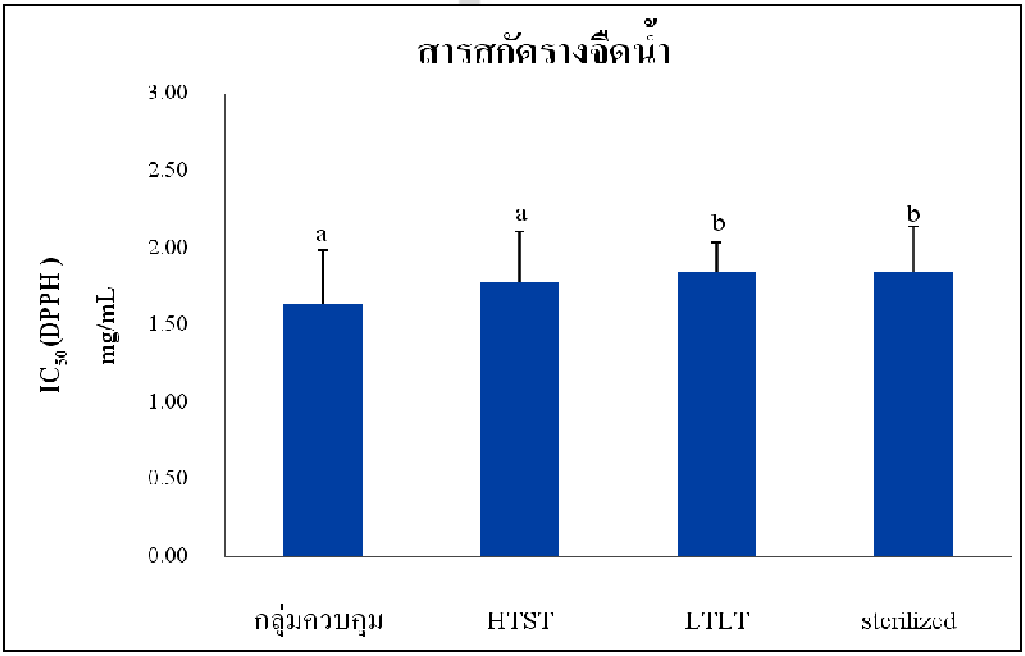
กระบวนการแปรรูปนั้นมีการศึกษาไว้อย่างกว้างขวาง (Teng & Chen, 1999; van Boekel, 1999) ปฏิกิริยาเคมีมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ (chlorophyll derivatives) ส่วนใหญ่เป็นคลอโรฟิลล์ที่มีสารประกอบเหมือนกันแต่โครงสร้างต่างกัน (chlorophyll isomers; chloropylls a' และ chloropylls b') และฟีโอไฟติน เอและบี (pheophytins a และb) โดยปกติคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่มีสีเขียวสามารถถูกทำให้เปลี่ยนเป็นฟีโอไฟตินซึ่งมีสีเขียวเข้ม หรือเป็นสีเขียวมะกอก (Clydesdale and Francis, 1976) เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีถูกเปลี่ยนโดยคลอโรฟิลล์สูญเสียอะตอมของแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ซึ่งตรงกลางของโมเลกุลในโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ โดยถูกแทนที่ด้วยอะตอบของไฮโดรเจน 2 อะตอม ปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นเมื่อคลอโรฟิลล์ทำปฏิกิริยากับกรด เช่นกรดอินทรีย์ที่เติมในอาหารและ/หรือ เกิดจากการได้รับความร้อนเป็นเวลานาน (Gordon L. Robertson, 1985) ซึ่ง Sanchez and others (2014) ได้เสนอแนวทางในการให้สารสีเขียวในผักยังคงสภาพเป็นสีเขียวสดได้ด้วยการทำให้สภาวะกรดเป็นกลาง และการให้ความร้อนสูงในเวลาสั้น (high temperature short time processing ; HTST) และจากผลการวิจัยนี้พบความแตกต่างของสารคลอโรฟิลล์ทั้งหมดน้อยมาก หรือไม่แตกต่างกันทางสถิติ (แสดงค่าชัดเจนในสารสกัดรางจืดเอทานอล) เมื่อระดับการให้ความร้อนและเวลาแตกต่างกัน อาจจะเนื่องมากจากปริมาณสารที่วัดได้เป็นปริมาณคลอโรฟิลล์รวม แม้ว่าจะสลายกลายเป็นในรูปอื่น เราก็ยังคงสามารถใช้ประโยชน์จากสารประกอบคลอโรฟิลล์ได้เช่นเดิม อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบปริมาณสารคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในสารสกัดรางจืดเอทานอล ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sanchez and others (2014) โดยพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์หลังจากผ่านกระบวนการให้ความดันบวกกับความร้อนสูง (high pressure high temperature ; HPHT) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส, 625 MPa เป็นเวลา 5 นาที มีผลต่อการสลายตัวของสารประกอบคลอโรฟิลล์ได้ และ เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิอยู่ที่ 117 องศาเซลเซียส, 625 MPa เป็นเวลา 5 นาที ยิ่งจะมีการสูญเสียเพิ่มขึ้น ให้ผลสนับสนุนแนวโน้มของความเสถียรต่องานวิจัยนี้ว่า ความเสถียรน้อยลงเมื่อมีการผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่สูงขึ้น

4.1.4 การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิดต่าง ๆ



ถึงแม้ว่าปริมาณของสารสำคัญอันได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และสารประกอบคลอโรฟิลล์ จะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ไม่เห็นความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% แต่ส่งผลกระทบอย่างชัดเจนต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ

สารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.7 และ 4.8 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ของสารสกัดรางจืด เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อสารละลาย DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร ในตัวทำละลายเมทานอล (สารละลายสีม่วง) และสามารถรับอิเล็กตรอนได้ ซึ่งเมื่อ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนจากสารสกัด ทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ (สารละลายสีเหลือง) รายงานเป็นค่า IC_{50} (50% Inhibition concentration) ซึ่งได้คำนวณจากสมการเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้น (แกน x) ของสารสกัดกับค่าดูดกลืนแสง (แกน y) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (Blois, 1958; Schlesier, Harwat, Bohm, and Bitsch, 2002)

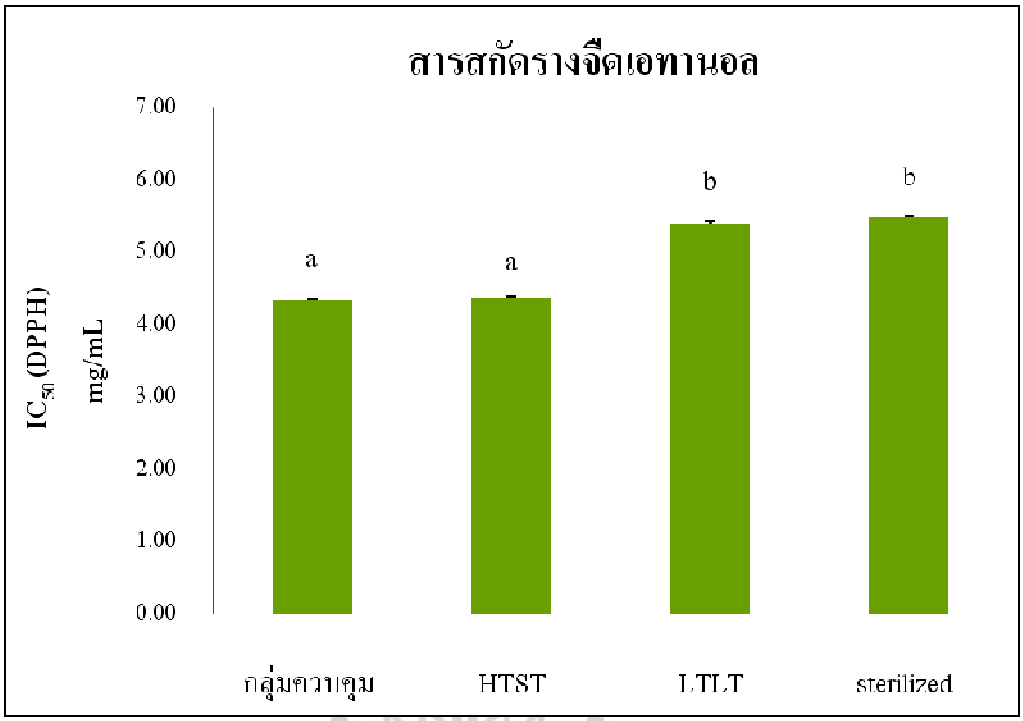


รูปที่ 4.7 การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดน้ำ เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization

หมายเหตุ : HTST (high-temperature short time) : การให้ความร้อนสูง 75°C เวลาสั้น 15 วินาที
LTLT (low-temperature long time) : การให้ความร้อนต่ำ 65°C เวลานาน 30 นาที
sterilized : autoclave ที่ 121°C นาน 15 นาที
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.01$)

จากการวัดค่า IC_{50} (50% Inhibition concentration) พบว่า สารสกัดรางจืดน้ำหลังจากผ่านไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมในทางสถิติ ($P > 0.01$) แต่ในกลุ่มตัวอย่างสารสกัดรางจืดน้ำที่ผ่านความ

ร้อนแบบพาสเจอไรส์ความร้อนต่ำ LTLT และในระดับ sterilized มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4.8 การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดเอทานอล เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST, LTLT และ sterilization

หมายเหตุ : HTST (high-temperature short time) : การให้ความร้อนสูง 75°C เวลาสั้น 15 วินาที
LTLT (low-temperature long time) : การให้ความร้อนต่ำ 65°C เวลานาน 30 นาที
sterilized : autoclave ที่ 121°C นาน 15 นาที
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.01$)

4.2 ผลการศึกษาผลของสารสกัดรางจืดต่อปริมาณเอนไซม์ glutathione *S*-transferases (GSTs) ในตับหนูขาว

4.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำ และสารสกัดเอทานอล

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล ด้วย Folin–Ciocalteu ตามวิธีของ Waterhouse (2002) พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล มีปริมาณแตกต่างกันในตัวทำละลายที่ต่างชนิดกัน ดังที่

ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 คือตัวอย่างสารสกัดรางจืดน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดรางจืดเอทานอล โดยสารสกัดรางจืดน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 2,735.56 ± 54.76 mg GAE/100 g Dry RM ขณะที่สารสกัดรางจืดเอทานอลมีปริมาณฟีนอกลิกทั้งหมดเท่ากับ 588.62 ± 34.79 mg GAE/100 g Dry RM (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อรางจืด 100 กรัม)

4.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำ และสารสกัดเอทานอล

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอลตามวิธีของ Zhishen and others (1999) พบว่า ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล มีปริมาณไม่แตกต่างกันในตัวทำละลายที่ต่างชนิดกัน ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 คือตัวอย่างสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 2,358.19 ± 17.72 และ 2,299.82 ± 14.59 mg CE/100 g Dry RM (มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อรางจืด 100 กรัม) ตามลำดับ

4.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำ และสารสกัดเอทานอล

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล โดยปรับใช้จากวิธีของ Ramesh and Devasenapathy (2006) พบว่า มีปริมาณสารคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล แตกต่างกันในตัวทำละลายที่ต่างชนิดกัน ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 คือตัวอย่างสารสกัดรางจืดน้ำมีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดต่ำกว่าสารสกัดรางจืดเอทานอล ได้แก่ 1.24 ± 0.04 และ 3.89 ± 0.02 µg /g Dry RM (ไมโครกรัมต่อรางจืด 1 กรัม) ตามลำดับ

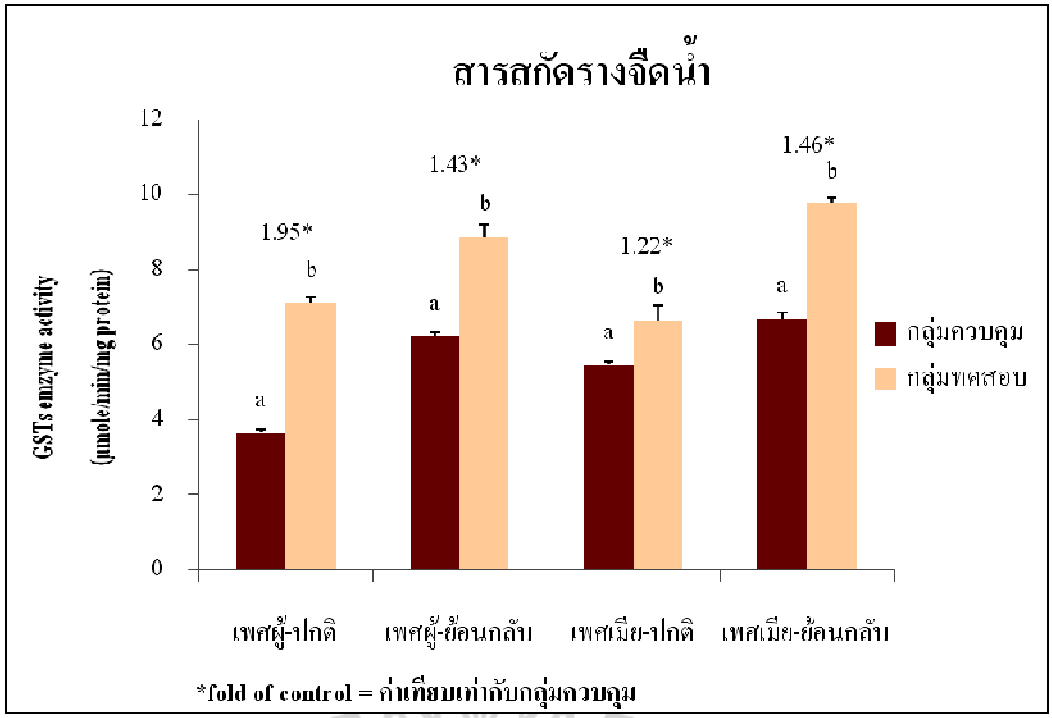
ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัดรางจืด	total phenolics (mg GAE/100g Dry RM)	total flavonoids (mg CE/100 g Dry RM)	total chlorophylls (µg /g Dry RM)
น้ำ	2,735.56 ± 54.76	2,358.19 ± 17.72	1.24 ± 0.04
เอทานอล	588.62 ± 34.79	2,299.82 ± 14.59	3.89 ± 0.02

4.2.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดน้ำ และสารสกัดเอทานอล

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอล ด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity (Blois, 1958; Schlesier, Harwat, Bohm, and Bitsch, 2002) โดยพบว่า สารสกัดรางจืดน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ มี

ระดับ IC_{50} เท่ากับ 1.83±0.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าสารสกัดรางจืดเอทานอล ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.31±1.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.7-4.8)



รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์กลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรสในตับหนูขาวที่ได้รับสารสกัดรางจืดน้ำเป็นระยะเวลา 90 วัน (n = 5)

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของแต่ละกลุ่ม

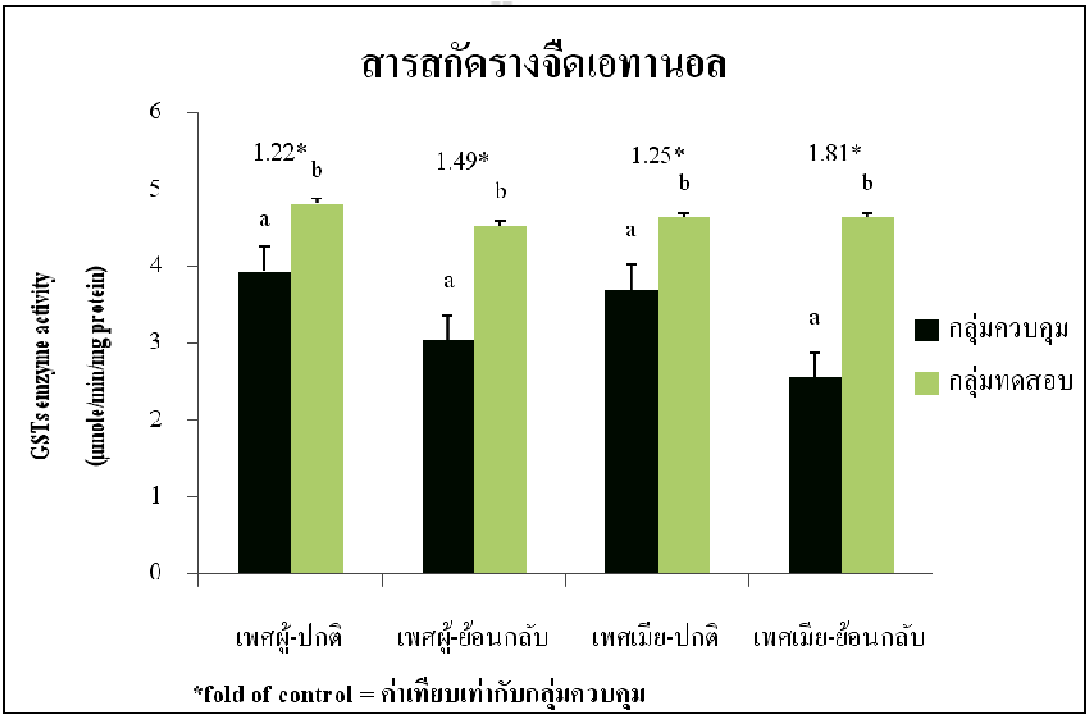
- กลุ่มทดสอบสารสกัด คือกลุ่มหนูทดลองที่ผ่านการได้รับสารสกัดรางจืดน้ำเป็นระยะเวลา 90 วัน จึงนำตับมาทดสอบ
- กลุ่มศึกษาผลย้อนกลับ คือกลุ่มหนูทดลองที่ผ่านการได้รับสารสกัดรางจืดน้ำเป็นระยะเวลา 90 วัน แล้วหยุดให้สารสกัดต่อไปอีก 14 วัน จึงนำตับมาทดสอบ

4.2.5 กิจกรรมของเอนไซม์ glutathione *S*-transferases (GSTs) ในตับหนูขาว

ผลจากสารสกัดรางจืดน้ำต่อกิจกรรมของเอนไซม์ GSTs ในตับหนูขาว โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (รูปที่ 4.9) พบว่าในตับหนูที่ได้รับสารสกัดรางจืดน้ำมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในกลุ่มทดสอบการได้รับสารสกัดเป็นระยะเวลา 90 วัน และกลุ่มทดสอบผลย้อนกลับหลังจากนั้น 14 วัน และพบทั้งในเพศผู้ และเพศเมีย

ของหนูทดลอง โดยกลุ่มทดสอบสารสกัดรางจืดน้ำในหนูเพศผู้, เพศเมีย และกลุ่มศึกษาผลย้อนกลับ เพศผู้, เพศเมีย มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GSTs เป็น 1.95, 1.22, 1.43 และ 1.46 เท่าของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ

เช่นเดียวกับผลจากสารสกัดรางจืดเอทานอล (รูปที่ 4.10) พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มทดสอบสารสกัดรางจืดเอทานอลในหนูเพศผู้ เพศเมีย และกลุ่มศึกษาผลย้อนกลับ เพศผู้, เพศเมีย มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GSTs เป็น 1.22, 1.25, 1.49 และ 1.81 เท่าของกลุ่มควบคุมตามลำดับ



รูปที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์กลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรสในตับหนูขาวที่ได้รับสารสกัดรางจืดเอทานอล เป็นระยะเวลา 90 วัน (n = 5)

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของแต่ละกลุ่ม

- กลุ่มทดสอบสารสกัด คือกลุ่มหนูทดลองที่ผ่านการได้รับสารสกัดรางจืดเอทานอล เป็นระยะเวลา 90 วัน จึงนำตับมาทดสอบ
- กลุ่มศึกษาผลย้อนกลับ คือกลุ่มหนูทดลองที่ผ่านการได้รับสารสกัดรางจืดเอทานอล เป็นระยะเวลา 90 วัน แล้วหยุดให้สารสกัดต่อไปอีก 14 วัน จึงนำตับมาทดสอบ

จากการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ GSTs ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แสดงถึงความสามารถในการกำจัดสารแปลกปลอม หรือฤทธิ์ในการต้านพิษของสมุนไพรรางจืด จากการศึกษาที่ผ่านมา ได้มีการรายงานว่า สมุนไพรรางจืดสามารถใช้ถอนพิษจากยาฆ่าแมลง สารเสพติด สารพิษต่าง ๆ เช่น พิษจากสุรา เห็ด เมา พิษเนื่องจากอาการแพ้ หรือรับประทานสัตว์ที่มีพิษ รวมถึงการต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกายได้ (Thongsaard, 2002 ; พาณี และ ชัชวดี, 2523) นอกจากนั้น Oonsivilai and others (2007) ได้ทดสอบคุณสมบัติในด้านการแก้พิษของสารสกัดรางจืดโดยวัดค่าการเพิ่มการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ NAD(P)H : quinine oxidoreductase (NQO1) ในเซลล์ตับชนิด Hepa lclc7 พบว่า สารสกัดอะซีโตน (92 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร) มีฤทธิ์ในการเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ NQO1 สูงสุดถึง 2.8 เท่าเมื่อเทียบกับตัวควบคุม รองลงมาคือสารสกัดเอทานอล (120 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร)และสารสกัดน้ำ (1,000 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร) ซึ่งมีฤทธิ์ในการเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ 1.35 และ 1.56 เท่าของกลุ่มควบคุมตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ NAD(P)H : quinine oxidoreductase (NQO1) นี้เป็นเอนไซม์ใน phase II ในกระบวนการกำจัดสารพิษของร่างกายมนุษย์ และได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารก่อกลายพันธุ์และการต่อต้านฤทธิ์ของสารก่อกลายพันธุ์ พบว่าสารสกัดรางจืดน้ำ, เอทานอล และอะซิโตน มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของ 2 amino-anthracene สูงที่สุดเมื่อทำการทดสอบกับ *Salmonella* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 สารสกัดน้ำแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ที่ค่า IC_{50} สูงสุดที่ 0.13 มิลลิกรัมกรดกาลิคต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดเอทานอลและอะซีโตนแสดงค่า IC_{50} ที่ 0.26 และ 0.61 มิลลิกรัมกรดกาลิคต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้การแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการตรวจสอบด้วยวิธี FRAP สูงสุดที่ระดับ 0.93 มิลลิโมลต่อกรัมสารสกัดน้ำ รองลงมาเป็นสารสกัดเอทานอลและอะซีโตนที่ค่า 0.08 และ 0.04 มิลลิโมลต่อกรัม ตามลำดับ ในส่วนของงานวิจัยนี้ แสดงความสามารถในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องต่อกระบวนการกำจัดสารแปลกปลอม (detoxification) ด้วยสารสกัดรางจืดในตับหนูขาว โดยทดสอบทั้งสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล โดยการศึกษาในหนูขาวสายพันธุ์วิสตาร์ ที่ผ่านการทดสอบความเป็นพิษกึ่งระยะยาวเป็นระยะเวลา 90 วัน ซึ่งพบว่าสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลสามารถเหนี่ยวนำระดับของเอนไซม์ GSTs ในตับหนูขาวให้เพิ่มขึ้นได้หลังจากได้รับสารสกัดรางจืดในปริมาณเทียบเท่าการดื่มชาในคน ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อกล่าวถึง phase II conjugation enzymes เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถส่งผลในการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักโมเลกุลและการละลายน้ำได้ (Low 1998) ด้วยองค์ประกอบที่สำคัญของสารสกัดรางจืดอาจเป็นตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมสารแปลกปลอม รวมไปถึงการทดสอบในหนูขาวที่ศึกษาผลย้อนกลับหลังจากหยุดให้สารสกัดรางจืดไปอีก 14 วัน พบว่าสารสกัดรางจืดยังคงมีผลส่งเสริมให้เอนไซม์ GSTs เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบ

กับกลุ่มหนูขาวที่ไม่ได้รับสารสกัดรางจืด Oonsivilai and others (2007) รายงานว่าสารสกัดรางจืดอะซีโตนมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุด รองลงมาคือในสารสกัดรางจืดเอทานอล และสารสกัดรางจืดน้ำตามลำดับ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ NQO1 ในเซลล์ตับชนิด Hepa lclc7 เพิ่มขึ้นสูงตามลำดับเช่นกัน ยิ่งไปกว่านั้น Fahey and others (2005) ยังแสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ของสารคลอโรฟิลล์มีอิทธิพลต่อการเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์ NQO1 ในเซลล์มะเร็งตับหนู (murine hepatoma cells) ด้วย แต่ในการศึกษานี้แสดงผลความสามารถในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ GSTs ในสารสกัดรางจืดน้ำได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$) และสูงกว่าสารสกัดรางจืดเอทานอล ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการกล่าวถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์หรือสารประกอบฟีนอลิก และสารพฤษเคมีอื่น ๆ ที่อาจไปมีผลทางอ้อมต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์ในขั้นตอนที่ 2 ของกระบวนการเมตาบอลิซึมสารแปลกสารพิษ หรือสารแปลกปลอม (Stevenson and Hurst, 2007; Dinkova and others, 2007; Nelson and other, 2006; Moon and others, 2006) ดังนั้นสามารถอธิบายได้ว่าสารสกัดรางจืดน้ำที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าในสารสกัดรางจืดเอทานอล รวมถึงการมีสารอนุพันธ์คลอโรฟิลล์ประกอบอยู่ด้วยอาจมีส่วนเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ GSTs ให้สูงขึ้นมากกว่าได้ ถึงแม้ว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและอนุพันธ์คลอโรฟิลล์ที่พบในสารสกัดรางจืด ที่เตรียมไว้เพื่อการตรวจสอบที่เฉพาะเจาะจงต่อคุณสมบัติการป้องกันสารพิษจากอาหารหรือสิ่งแวดล้อม เนื่องจากองค์ประกอบที่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ NQO1 อาจจะมีผลต่อการเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์ GSTs ด้วยเช่นกัน ดังนั้นอาจเป็นการประเมินค่าของเอนไซม์ระยะที่ 2 ทั่วไปที่มีความสอดคล้องต่อกระบวนการกำจัดสารแปลกปลอมได้ (Hashimoto, Kawamata, Usui, Tanaka, and Uda, 2002) อย่างไรก็ตาม ศักยภาพของคุณสมบัติดังกล่าวที่จะปรากฏขึ้นได้จากผลการตรวจสอบก็ต้องขึ้นอยู่กับประเภทของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ทดสอบ และช่องทางการได้รับสารที่ต้องการทดสอบด้วย (Kelly and others, 2003)

GSTs เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการกำจัดสารแปลกปลอม (detoxification) ของสารภายในร่างกาย และสารแปลกปลอมที่ชอบอิเล็กตรอน (xenobiotic electrophilic substance) โดยทำการเร่งปฏิกิริยาระหว่าง glutathione (GSH) (ที่มีกรดอะมิโน 3 ชนิดเป็นองค์ประกอบ (glutamyl-L-cysteinyl - glycine) กับสารแปลกปลอมในกลุ่มที่ชอบอิเล็กตรอน (electrophilic functional groups) (Xinhua and others, 1992) กลุ่มเอนไซม์นี้มีอยู่ทั่วไปประมาณ 5% ของโปรตีน cytosolic ทั้งหมดในเนื้อเยื่อของตับ และglutathione (GSH) เป็น antioxidant, antitoxin และเป็น cofactor ของเอนไซม์ ความเข้มข้นของ glutathione (GSH) ภายในเซลล์มักจะได้มาเป็นมิลลิโมลาร์ และพบว่ามีความเข้มข้นมากที่สุดในตับ (10 mM) (Samsonova and others, 2008)

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเฉพาะอวัยวะตับหนูขาวเพียงอย่างเดียว ไม่ใช่เพราะอวัยวะอื่นภายในร่างกาย จะไม่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ แต่เป็นเพราะอวัยวะตับเป็นศูนย์กลางของกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย โดยสารเคมีหรือยาที่มีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมันจะถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือดไหลผ่านเข้าไปในตับก่อนที่จะเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดทั่วร่างกาย และกระจายตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ ดังนั้นตับจึงเป็นอวัยวะแรกที่สัมผัสกับสารเคมีที่เป็นพิษ (first-pass effect) เมื่อสารเคมีหรือยาเข้ามาใน hepatocyte สารจะถูกเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (biotransformation) เป็น metabolized compounds โดย hepatocyte cell มีความสามารถสูงในการเปลี่ยนแปลงสารเคมีหรือยาเป็นสารประกอบจำนวนมาก/น้อย หรือเป็นพิษ ซึ่งสารประกอบที่ยังมีฤทธิ์ส่วนใหญ่จะเป็นพิษต่อ organelles ของ hepatocyte มีผลทำลายเซลล์นั้น (วรัปศร, ม.ป.ป.: ออนไลน์) คุณสมบัติของสารที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ GSTs จะมีความสัมพันธ์กับการยับยั้งปฏิกิริยาของสารก่อมะเร็งได้ (Tsuchida and Sato, 1992) มีการรายงานว่าสารประกอบซึ่งช่วยป้องกันสารเคมีที่เสริมปฏิกิริยาของสารก่อมะเร็ง มีผลเหนี่ยวนำให้กิจกรรมของเอนไซม์ GSTs เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้าม สารประกอบที่ไม่มีผลต่อการยับยั้งเนื้องอกมะเร็ง carcinogen-induced neoplasia จะไม่มีผลช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ GSTs (Sparnins and others, 1982) จากผลงานวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการรายงานว่าใบรางจืดมีผลยับยั้งการเกิดมะเร็งในเซลล์เม็ดเลือดขาวผิดปกติ (leukemia cells) โดยเหนี่ยวนำให้วงจรของเซลล์หยุดชะงัก (Ruela-de-Sousa RR, 2010)

เนื่องจากความหลากหลายของสารเคมีที่ร่างกายได้รับ ทำให้ระบบเอนไซม์ในกระบวนการกำจัดสารพิษต้องมีความหลากหลายเพื่อที่จะกำจัดสารพิษได้อย่างสมบูรณ์ ระบบเอนไซม์ดังกล่าวถูกกำหนดโดยปัจจัยเฉพาะของแต่ละบุคคล เช่น อาหารที่บริโภค ยาหรือสารเคมีที่ได้รับ อายุ เพศ ลักษณะทางพันธุกรรม การดำเนินชีวิต สุขนิสัย เช่น การสูบบุหรี่ ดื่มเหล้า และยังรวมไปถึงภาวะโรคต่าง ๆ ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำ/กระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ยกตัวอย่างเช่น เมื่อร่างกายได้รับสารประเภทหนึ่งปริมาณมาก ๆ ส่งผลให้เอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดสารชนิดนี้ถูกเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นให้ทำงานในอัตราที่เพิ่มขึ้น โดยทั่วไปการเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นเอนไซม์ในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 โดยเฉพาะการกระตุ้นเอนไซม์ glutathione *S*-transferase (GSTs) และ glucuronyl transferase (GT) ด้วยการใช้สารกระตุ้นเอนไซม์หลายกลุ่มหรือหลายชนิด (multi-functional inducers) เป็นกลไกสำคัญในการกำจัดสารพิษที่สมบูรณ์ ซึ่งสนับสนุนฤทธิ์ต้านมะเร็งของผัก และผลไม้ต่าง ๆ ดังตัวอย่างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่พบในผัก และผลไม้ เช่น ellagic acid ซึ่งพบในผิวองุ่นแดง เป็นสารเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นเอนไซม์หลายชนิดในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 และยังเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 1 เช่นเดียวกันกับกระเทียม (garlic oil) ถั่วเหลือง โรสแมรี่ (rosemary) และพืชตระกูลกระหล่ำที่เป็นสารเหนี่ยวนำเอนไซม์หลายชนิดในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 (พรทิพย์, 2547 : ออนไลน์)

บทที่ 5
บทสรุป

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 ผลการศึกษาสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลต่อกระบวนการให้ความร้อนชนิด LTLT, HTST และ sterilization

พบว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญอันได้แก่ กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และสารประกอบคลอโรฟิลล์ เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST (high-temperature shot time) : การให้ความร้อนสูง 75 องศาเซลเซียส เวลาสั้น 15 วินาที, LTLT (low-temperature long time) : การให้ความร้อนต่ำ 65 องศาเซลเซียส เวลานาน 30 นาที และ sterilization : autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ลดลงจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการดังกล่าว แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.01$) โดยแนวโน้มที่ปรากฏเป็นทิศทางเดียวกันคือ สารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนชนิด HTST ให้ความเสถียรใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่สุด รองลงมาคือในกลุ่ม LTLT และ sterilization ตามลำดับ แต่การให้ความร้อนทั้งหมดมีผลกระทบอย่างชัดเจนต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลหลังจากผ่านสภาวะความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรส์ในระดับ HTST มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมในทางสถิติ ($P > 0.01$) แต่ในกลุ่มตัวอย่างสารสกัดที่ผ่านความร้อนแบบพาสเจอไรส์ในระดับ LTLT และในระดับ sterilization มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

5.1.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ glutathione *S*-transferases (GSTs) ในตับหนูที่ได้รับสารสกัดรางจืดน้ำ และเอทานอล

พบว่าในตับหนูที่ได้รับสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลมีกิจกรรมของเอนไซม์ GSTs เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งในกลุ่มทดสอบการได้รับสารสกัดเป็นระยะเวลา 90 วัน และกลุ่มทดสอบผลย้อนกลับหลังจากนั้น 14 วัน และพบทั้งในเพศผู้ และเพศเมียของหนูทดลอง และสามารถเป็นตัวชี้วัดว่า สารสกัดรางจืดที่มีสารสำคัญอันได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และสารประกอบคลอโรฟิลล์ มีส่วนส่งเสริมฤทธิ์ดังกล่าว การเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ GSTs อาจช่วยลดโอกาสการทำปฏิกิริยาของสารพิษหรือสารแปลกปลอม นอกจากนี้ยังเพิ่มคุณสมบัติการละลายน้ำและเร่งการกำจัดออกจากร่างกาย การยับยั้งสารก่อมะเร็ง

ยังอาจทำได้ด้วยการเพิ่มการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจเป็นกลไกสำคัญในการกำจัดสารพิษหรือสารแปลกปลอม (detoxification)

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษาสารสกัดรางจืดน้ำและเอทานอลต่อกระบวนการให้ความร้อน เนื่องจากงานวิจัยนี้ให้ความสำคัญเพียงอุณหภูมิและเวลาระหว่างการให้ความร้อนในกระบวนการเท่านั้น จึงได้ควบคุมปัจจัยอื่น ๆ ให้คงที่ ได้แก่การเก็บรักษาในภาชนะทึบแสง ไม่มีการปรับค่า pH และอุณหภูมิในการเก็บ stock ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนแล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาตรวจสอบปริมาณสารดังกล่าว ดังนั้นหากต้องการศึกษาผลกระทบจากปัจจัยอื่น ๆ เช่น การทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นมีสภาวะเป็นกรด-เบส การเพิ่มน้ำตาลหรือเกลือ ในส่วนของปัจจัยเนื่องจากปริมาณของแข็งในผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นต้น จะต้องมีการควบคุมปัจจัยดังกล่าวให้ชัดเจน

5.2.2 จากการศึกษาผลของสารสกัดรางจืดต่อปริมาณเอนไซม์ glutathione *S*-transferases (GSTs) ในตับหนูขาว ที่กล่าวมานั้นทำให้มองเห็นอย่างชัดเจนว่าระบบกำจัดสารพิษของร่างกายมีความซับซ้อนและมีความสำคัญเพียงใด ความซับซ้อนทำให้การใช้วิธีใดวิธีหนึ่งเพื่อศึกษากระบวนการกำจัดสารพิษนั้นย่อมไม่ครอบคลุม ดังนั้นการวิจัยจึงต้องดำเนินต่อไปเพื่อค้นหาวิธีที่เหมาะสมที่สามารถแยกแยะลักษณะปัจจัยที่หลากหลายที่มีผลกระทบต่อกระบวนการกำจัดสารแปลกปลอมหรือสารพิษของแต่ละบุคคลเพิ่มมากขึ้น เช่นการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมสารแปลกปลอมอื่น ๆ และในส่วนของแผนการทดลองผลย้อนกลับ 14 วัน ถ้ามีการติดตามผลของกิจกรรมเอนไซม์ GSTs ต่อเนื่องไปอีกหรือมากกว่า 14 วัน อาจทำให้ทราบระยะเวลาที่เอนไซม์ GSTs คงสภาพอยู่ได้นานเท่าไรในระบบร่างกาย

รายการอ้างอิง

กนกพร แสนเพชร. (2545). การขจัดพิษของสารกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica airy shaw* and *suvatabandhu*) โดยรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.). **วิทยานิพนธ์ปริญามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**.

คคนางค์ โพศรีดี. (2555). การศึกษาความเป็นพิษกึ่งระยะยาวของสารสกัดรางจืดในหนูขาว. **วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.**

คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา. (2518). วิทยาศาสตร์กายภาพ ปัญหาเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิต เล่ม 1. **สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**: 224 – 226.

จิราพร เพลินจิตต์. (2554). ความเสถียรของกรดฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต. การประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาศิลปากรระดับชาติ ครั้งที่ 1. สาขาเทคโนลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร.

จิราภรณ์ สิริสัณห์. (2550). การใช้ความร้อนเพื่อการแปรรูปผลผลิตเกษตร. **เอกสารประกอบการเรียนวิชาอุตสาหกรรมเกษตรเบื้องต้น สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**.

ฉัตรชัย คอนโคตรจันทร์. (2551). ผลของสมุนไพรรางจืดต่อการย่อยได้สารอาหารเอนไซม์ต้านออกซิเดชั่นและการทำงานของตับในไก่กระทงที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อรา.

ชะลอ อุทกภาชน์. (2519). **ยาสมุนไพรกับโรคในประเทศเขตร้อนและวิธีการบำบัดรักษา.** กรุงเทพฯ : แพร่พิทยาอินเตอร์เนชั่นแนล. 244-252.

วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะสรีรวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณัฏฐิยา พงศ์ผาสุก. (2546). การพัฒนาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเพื่อใช้เป็นยาทาภายนอก. **วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.**

ธีระ พงศ์วิวัฒน์ และ ธำรง สมบุญตนนท์ (2521). การแก้พิษสตริกนินซัลเฟตด้วยรางจืด. **รายงานปัญหาพิเศษ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.**

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2545). **เคมีอาหาร.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 504: 415-440.

นิธิยา และวิบูลย์ รัตนาปนนท์. (2543). **สารพิษในอาหาร.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ปราณีรัตน์ แสงเกษตรชัย. (ม.ป.ป.). เรื่อง พิษวิทยาคลีนิก 1 (Clinical Toxicology I). **เอกสารประกอบการสอนวิชา เคมีคลินิก 3 (Clinical Chemistry)**. มหาวิทยาลัยรังสิต.

ปราชญ์ บุณยวงค์วิโรจน์. (2549). **เกษตรกรเชื่อกินเหล้า-ขับสารเคมี อันตรายถึงขั้น ตับพัง-ตายเร็ว**. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.thairath.co.th

พรทิพย์ วิรัชวงศ์. (2547). ขบวนการกำจัดสารพิษของร่างกาย. **วิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์.** [ออนไลน์]. ได้จาก: https://www.gpo.or.th/rdi/html/detoxi.html

พาณี เตชะเสน และ ชัชวดี ทองทาบ. (2523). การทดลองใช้รางจืดแก้พิษยาฆ่าแมลง. **เชียงใหม่เวชสาร** 19(2): 105-114.

พิชญา บุญประสม, ศรีสุวรรณ นฤนาทวงศ์สกุล และ นพพล เล็กสวัสดิ์. (2555). การถ่ายเทความร้อนและเครื่องแลกเปลี่ยนความร้อน. **ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**.

วรัปศร อนุสรณ์เสงี่ยม. **เอกสารประกอบการสอนวิชาเภสัชกรรมบำบัด 1.** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://cyberclass.msu.ac.th [25 กรกฎาคม 2553]

วีรยุทธ จิตรผิวงาม. (2522). การศึกษาสารประกอบรางจืด. **วิทยานิพนธ์ปริญญาหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.**

ศิริวรรณ ศิลปะสุวรรณ. (2522). การศึกษาผลของสมุนไพรบางชนิดต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางอย่างในตระกูล Enterobacteriaceae. **วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.**

สกุลรัตน์ อุษราวงค์ และธานี เทศศิริ. (2543). ผลของรางจืดต่อการลดพิษพาราควอท. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น**. 6: 50-51.

สมพงษ์ องอาจยุทธ. (2536). **หนังสือชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ไทยเขษม.

สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ. (2540). **รายงานผลการดำ เนินงานประจำ ปีงบประมาณ 2540.** (หน้า 21). นครปฐม: มหาวิทยาลัยมหิดล.

สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ. (2550). **หนูแรท (*Rattus nuvergicus*).** มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.nlac.mahidol.ac.th/nlacwwwtha/spec_outSDRat.htm

สกาวรัตน์ บุญยะรัตน์. (2547). ผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสโดยสารฆ่าแมลงเมโธมิล. **วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.**

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. (2508). **ไม้เทศเมืองไทย.** กรุงเทพฯ: การพิมพ์ไชยวัฒน์. 465-466.

สุวรรณา โควะวินทวีวัฒน์, ศรีนวล สมรูป, อรฤดี ขันติสิทธพร และเอนก ภู่ทอง. (2554). การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านฤทธิ์ Tetrodotoxin ของสารสกัดรางจืด. **วารสารเทคนิคการแพทย์** ปีที่ 39. ฉบับที่ 2 สิงหาคม.

วุฒิ วุฒิธรรมราช. (2540). สารานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 390.

นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์. (2543). **สารพิษในอาหาร.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 5.

พรทิพย์ วิรัชวงศ์. (2547). ขบวนการกำจัดสารพิษของร่างกาย. **วิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์.** [ออนไลน์]. ได้จาก: https://www.gpo.or.th/rdi/html/detoxi.html

พาณี เตชะเสน และชัชวดี ทองทาบ. (2523). การทดลองใช้รางจืดแก้พิษยาฆ่าแมลง. **เชียงใหม่เวชสาร** 19(2): 105-114.

วรัปศร อนุสรณ์เสงี่ยม. **เอกสารประกอบการสอนวิชาเภสัชกรรมบำบัด 1.** (ออนไลน์). ได้จาก: http://cyberclass.msu.ac.th [25 กรกฎาคม 2553]

วิไล รังสาดทอง. (2547). เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. **สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.** กรุงเทพฯ, 500 หน้า.

Boonyarikpunchai, W., Sukrong, S. and Towiwat, P. (2014). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** 124: 67–73.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature 181**: 1199-1200.

Chang, Q., Zuo, Z, Chow, M.S.S. and Ho, W.K.K. (2006). Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (Crataegus pinnatifida var. major) fruits and a hawthorn drink. **Food Chemistry**, 98: 426–430.

Chan, E.W.C. (2004). Antioxidant activity of flavonoids in *Thunbergia laurifolia* Lindl. B.Sc. **Thesis of Monash University Sunway Campus**, Malaysia.

Chan, E.W.C., Eng, S.Y., Tan, Y.P. and Wong, Z.C. (2011). Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Thunbergia laurifolia*: A Review. **Pharmacognosy Journal**. 3(24).

Chan, E.W.C. and Lim, Y.Y. (2006). Antioxidant activity of *Thunbergia laurifolia* tea. **Journal of Tropical Forest Science**; 18(2): 130-6.

Chen, C. and Kong, A.N. (2004). Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. **Free Radical Biology and Medicine**. 36: 1505-16.

Clydesdale, F.M. and Francis, F.J. (1976). Pigments. In O. R. Fennema (Ed.), **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker. 417–430.

Dinkova-Kostova, A.T., Cheah, J., Samouilov, A., Zweier, J.L., Bozak, R.E., Hicks, R.J. and Talaly, P. (2007). Phenolic Michael reaction acceptors: combined direct and indirect antioxidant defenses against electrophiles and oxidants. **Medicinal Chemistry**. 3: 261–8.

Eng, S.Y., Tan, Y.P. and Wong, Z.C. (2011). Antioxidant and sensory properties of herbal teas of *Thunbergia laurifolia.* B.Sc. theses**, Faculty of Applied Sciences**, UCSI University, Kuala Lumpur, Malaysia.

Fahey, J.W., Stephenson, K.K., Dinkova-Kostova, A.T., Egner, P.A., Kensler, T. and Talalay, P. (2005). Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes. **Carcinogenesis**. 26(7): 1247 – 1255.

Gordon, L. and Robertson. (1985). Changes in the chlorophyll and pheophytin concentrations of kiwifruit during processing and storage. **Original Research Article Food Chemistry**. 17(1): 25-32.

Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione-S-transgerase; The first enzymatic step in mercaptruic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**. 249: 7130-7139.

Hashimoto, K., Kawamata, S., Usui, N., Tanaka, A. and Uda, Y. (2002). In vitro induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in human hepatoma cells by food extracts. **Cancer letters**. 180: 1-5.

Ishii, K., Yamazoe, Y., Kamataki, Y., and Kato, R. (1986). Metabolic activation of mutagenic tryptophan pyrolysis product by rat liver microsomes. **Cancer Research.** 40: 2596-2600.

Jiwajinda, S., Santisopasri V., Murakami A., Kim O.K., Kim, H.W. and Ohigashi, H. (2002). Suppressive effects of edible Thai plants on superoxide and nitric oxide generation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. 3: 215-23.

Kanchanapoom, T., Kasai, R. and Yamasaki, K. (2002). Iridoid glucosides from *Thunbergia laurifolia.* **Phytochemistry**; 60: 769-71.

Kelly, C., Jewell, C. and O'Brien, N.M. (2003). The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin and nomilin on xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat . **Nutrition Research**. 23: 681–690.

Kwak, M.K., Wakabayashi, N. and Kensler, T.W. (2004). Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. **Mutation Research**. 555: 133-48.

Low, L.K. (1998). Metabolic changes of drugs and related organic compounds. In: Delgado, J.N., Remers, W.A. (Eds.), Wilson and gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. **Lippincott-Raven, Philadelphia**. 43–122.

Lowry, Q. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. A. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193: 265-275.

Moon, Y.J., Wang, X. and Morris, M.E. (2006). Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in Vitro**. 20: 187–210.

Naegle, M.A. and D'Avanzo, C.E. (2001). **Addiction and substance abuse: Strategies for advanced practice nursing.** New Jersey: Prentice Hall.

Nelson, S.K., Bose, S.K., Grunwald G.K., Myhill, P. and McCord, J.M. (2006). The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. **Free Radical Biology and Medicine**. 40: 341–7.

Offord, E.A., Mace, K., Avanti, O. and Pfeifer, A.M., (1997). Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells. **Cancer Letters**. 114: 275–281.

Offord, E.A., Mace, K., Ruffieux, C., Malnoe, A. and Pfeifer, A.M., (1995). Rosemary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. **Carcinogenesis**. 16: 2057–2062.

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

Oonsivilai, R., Ferruzzi, M.G. and Ningsanond, S. (2008). Antioxidant activity and cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) extracts. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**. 1(2): 116-28.

Oonsivilai, R., Cheng, C., Ningsanond, S., Bomser, J.A. and Ferruzzi, M.G. (2006). Induction of quinine reductase activity in murine hepatoma cells by extracts *Thunbergia laurifolia* Linn. **Presented at EB 2006. Moscone Convection center**. April 1-5. San Francisco: CA.

Pramyothin, P., Chrdchupunsare, H., Rungsipipat, A. and Chaichatipyuth, C. (2005). Hepatoprotective activity of *Thunbergia laurifolia* Linn. Extracts in rat treated with ethanol: in vitro and in vivo studies. **Journal of Ethanopharmacology**. 102: 408-411.

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

Ramesh, T. and Devasenapathy, P. (2006). Physiological response of cowpea in a rainfed alfisol ecosystem to the impulse of soil moisture conservation pracyives. **General and Applied Plant Physiology.** 32: 181-190.

Ruela-de-Sousa, R.R., Fuhler, G.M, Blom, N., Ferreira, C.V., Aoyama, H. and Peppelenbosch, M.P. (2010). Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. **Cell Death and Disease**.1: e19.

Samsonova, J.V., Douglas, A.J., Cooper, K.M., Kennedy, D.G. and Elliott, C.T. (2008). The identification of potential alternative biomarkers of nitrofurazone abuse in animal derived food products. **Food and Chemical Toxicology**. 46: 1548–1554.

Sanchez, C., Baranda, A.B. and Maranon, I.M. (2014). The effect of High Pressure and High Temperature processing on carotenoids and chlorophylls content in some vegetables. **Food Chemistry.** 163: 37–45.

Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V. and Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. **Free radical research**. 36 (2): 177-178.

Schmid, D., Schürch, C., Müller, S., Zülli, F. (2007). Second Generation Antioxidants from Cress Sprouts. **SÖFW-Journal**.

Sengupta, P. (2013). The laboratory rat: Relating its age with human's. **International journal of preventive medicine**. 4(6): 624-630.

Singletary, K.W. (1996). Rosemary extract and carnosol stimulate rat liver glutathione-S-transferase and quinone reductase activities. **Cancer Letters**. 100: 139–144.

Singletary, K.W. and Rokusek, J.T. (1997). Tissue-specific enhancement of xenobiotic detoxification enzymes in mice by dietary rosemary extract. **Plant Foods for Human Nutrition.** 50: 47–53.

Surh, Y.J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**. 3: 768-80.

Stevenson, D.E., Hurst R.D. (2007). Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more? **Cellular and Molecular Life Sciences**. 64: 2900–16.

Teng, S.S. and Chen, B.H. (1999). Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. **Food Chemistry.** 65(3): 367–373.

The liver. (Online). Available: http://hepatologist.eu/default.aspx**.** [2010, August 1]

Thongsaard, W. and Marsden, C.A. (2002). A herbal medicine used in the treatment of addiction mimics the action of amphetamine on *in vitro* rat striatal dopamine release. **Neuroscience Letters**. 329: 129-32.

Thongsaard, W., Mardsden, C.A., Morris, P., Prior, M. and Shah, Y.B. (2005). Effect of *Thunbergia laurifolia*, a thai natural product used to treat drug addiction, on cerebal activity detected by functional magnetic resonance imaging in the rat. **Journal of Psychopharmacology.** 180: 752-760.

Tsuchida, S. and Sato, K. (1992). Glutathione transferases and cancer. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. 27: 337.

Waterhouse, A.L. **Current protocols in food analytical chemistry. Unit I1.1**. John Wiley & Sons, Inc. USA.

Wirotesangthong, M. and Rattanakiat, S. (2006). Anti-herpes simplex virus type 2 activities of some Thai medicinal plants. **Thai Journal Pharmaceutical Sciences**. 30: 19-27.

Ulrike, A., Fischer, Reinhold, C., Dietmar, R. and Kammerer. (2013). Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (Punica granatum L.) juices and model solutions. **Food Chemistry**. 138 : 1800-1809.

Van Boekel, M.A.J.S. (1999). Testing of kinetic models: Usefulness of the multiresponse approach as applied to chlorophyll degradation in foods. **Food Research International**, 32(4): 261–269.

Xinhua, J., Zhang, P., Armstrong, R. N. and Gilliland, G. L. (1992). The three-dimensional structure of a glutathione *S*-transferase from the Mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3–3 and glutathione at 2·2-Å resolution. **Biochemistry**. 31: 10169-10184.

Zhang, Y. and Talalay, P. (1994). Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. **Cancer Research**. 54 (Suppl.) : 1976s- 1986s.

Zhu, Q.Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y. and Chen, Z. Y. (1997). Stability of green tea catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 45: 4624–4628.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

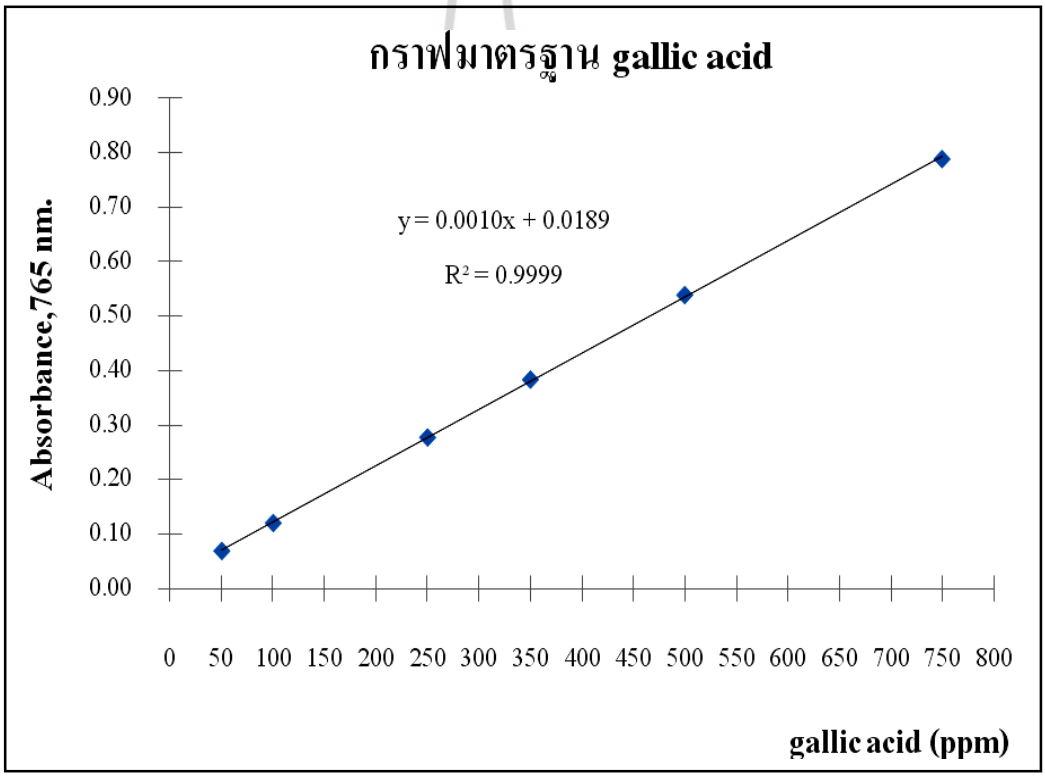
ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานและการวิเคราะห์โปรตีน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. กราฟมาตรฐาน gallic acid

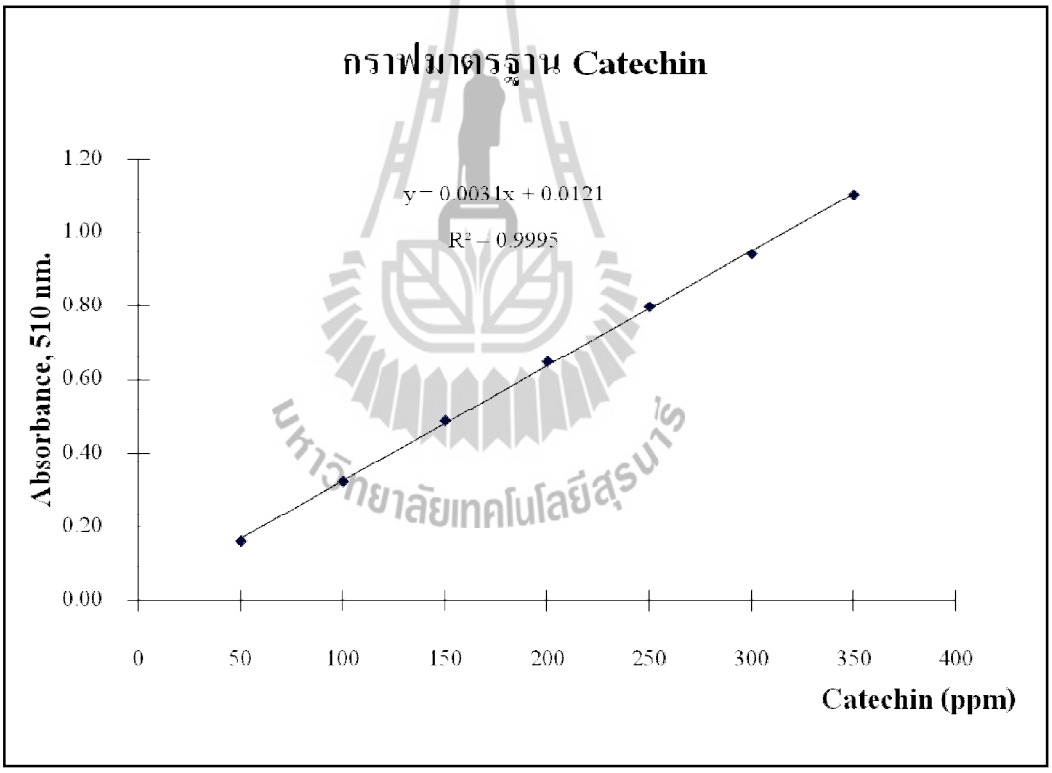
gallic acid เป็นสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics) ตามวิธีของ Waterhouse (2002) ระดับความเข้มข้นของ gallic acid ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานคือ 50, 100, 250, 350, 500 และ 750 ppm ใน 95% เอทานอล แล้วปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่น 1.58 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ทิ้งไว้ 5 นาที เติม 300 ไมโครลิตร Na_2CO_3 (20% w/v) ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วจึงเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ซึ่งแสดงไว้ดังรูปที่ ก.1



รูปที่ ก.1 แสดงกราฟมาตรฐานที่ใช้คำนวณเทียบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics)

2. กราฟมาตรฐาน catechin

catechin เป็นสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids) ตามวิธีของ Zhishen and others (1999) ระดับความเข้มข้นของ catechin ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานคือ 50, 100, 150, 200, 250, 300 และ 350 ใน 95% เอทานอล แล้วปิเปตสารละลายมาตรฐานปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 5% $NaNO_2$ 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ทิ้งไว้ 6 นาที หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่เตรียมไว้เติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เมื่อผ่านไป 5 นาที จึงเติม 1 M NaOH 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นอีก 275 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ซึ่งแสดงไว้ดังรูปที่ ก.2



รูปที่ ก.2 แสดงกราฟมาตรฐานที่ใช้คำนวณเทียบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids)

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Lowry *and others*, 1951)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายด้วย Folin-ciocalteu phenol สามารถวัดความเข้มข้นของโปรตีนได้ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวกว่าวิธีไบยูเรตประมาณ 60 เท่า สีโมลิบดีนัมบลูที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชั่นของสารละลายกรดฟอสฟอทังสทิกฟอสโฟโมลิบดิกด้วยฟีนอล โปรตีแต่ละชนิดจะให้ความเข้มสีต่างกัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโนตัวสำคัญ 2 ตัว คือไทโรซีนและทริปโทเฟน เป็นเทคนิคการวัดโดยวัดโปรตีนที่มีวงแหวนเบนซีน แล้ววัดสีโมลิบดีนัมบลูที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

<u>สารเคมี</u>

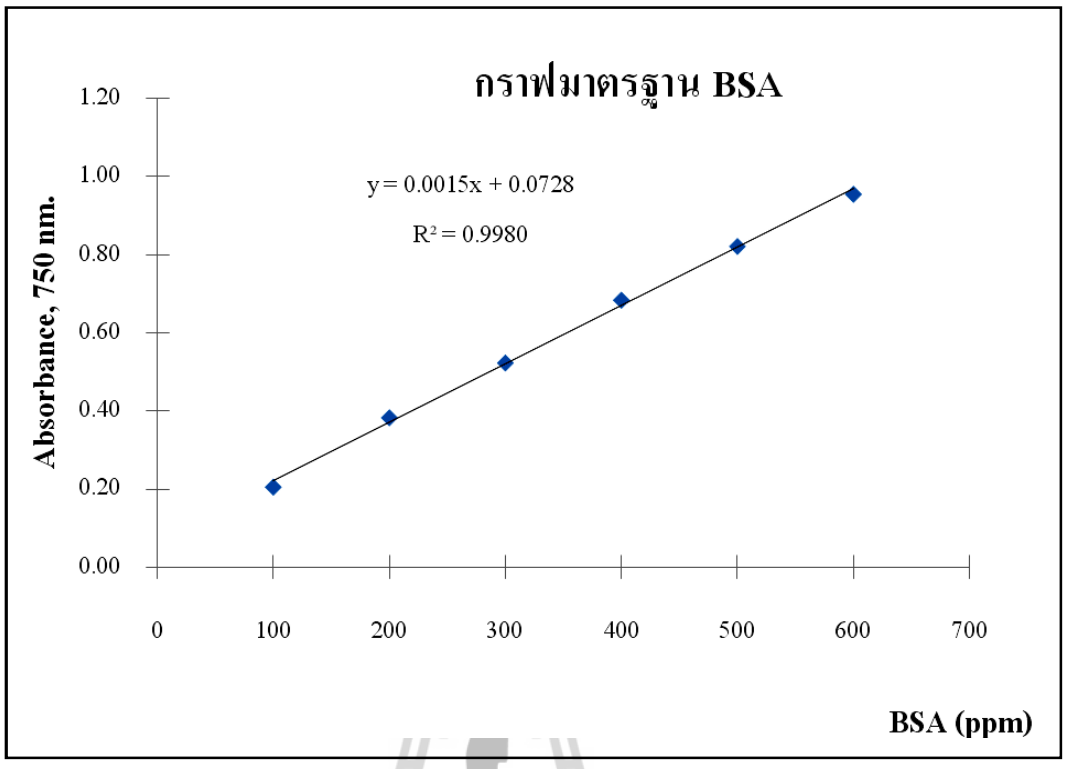
1. สารละลาย 2% Na_2CO_3 ในสาละลาย 0.1 N NaOH
2. สารละลาย 0.5% $CuSO_4.5H_20$ ใน 1.0% sodium tartrate
3. สารละลาย 1N Folin-ciocatrus phenol เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 : 1 (ใช้ทันที)
4. สารละลาย alkali copper เตรียมสารผสมจากข้อ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับข้อ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ใช้ทันที)
5. สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

<u>วิธีการ</u>

1. ใช้สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 ppm หรือตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 100 ไมโครลิตร
2. เติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
3. เติมสารละลาย Folin-ciocatrus phenol เจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมทิ้งไว้ 30 นาที (ไม่ควรเกิน 60 นาที)
4. วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 750 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตรฐานจากสารมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 ppm แสดงไว้ดังรูป ก.3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

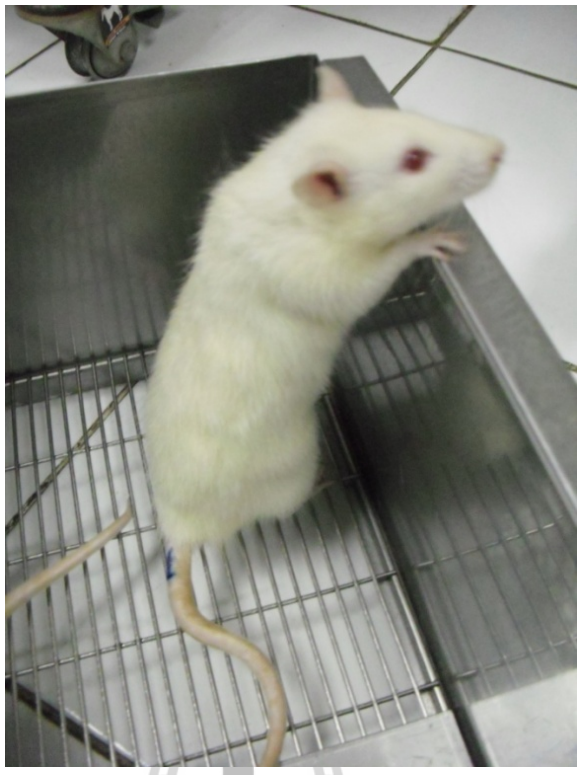


รูปที่ ก.3 แสดงกราฟมาตรฐานที่ใช้คำนวณเทียบหาปริมาณโปรตีน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข

หนูขาว



รูปที่ ข.1 ลักษณะของหนูขาว

ตารางที่ ข.1 แสดงการเปรียบเทียบอายุระหว่างหนูกับคน

Rat age (years)	**Human age (years)**
6 months (0.5)	**18**
12 months (1.0)	**30**
18 months (1.5)	**45**
24 months (2.0)	**60**
30 months (2.5)	**75**
36 months (3.0)	**90**
42 months (3.5)	**105**
45 months (3.75)	**113**
48 months (4.0)	**120**

แหล่งที่มา : Sengupta (2013).

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอาภาภรณ์ ผิวอ่อนดี เกิดเมื่อวันที่ 25 กันยายน พ.ศ. 2529 ที่ตำบลอู่ทอง อำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี จบการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนรัตนศึกษา และเข้าศึกษาต่อในระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนอู่ทอง อำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี ในปีการศึกษา 2551 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และในปีการศึกษา 2552 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี