ศรัยลักษณ์ เมือง : การระบุสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดรางจืดและฤทธิ์ของสารสกัดในการกำจัดพิษในเซลล์ตับ (IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN *THUNBERGIA LAURIFOLIA* LINDL. (RANG CHUET) EXTRACT AND THEIR DETOXIFICATION IN LIVER CELLS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, 72 หน้า.

คำสำคัญ: การระบุกลุ่ม/ *Thunbergia Laurifolia* LINDL. (รางจืด)/ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ/ ฟีโอไฟติน เอ/ ไฮดรอกซิลฟีโอไฟติน เอ/ HEPG2, AML12

วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อระบุสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดรางจืดแบบหยาบ และตรวจสอบคุณสมบัติการล้างพิษด้วยเซลล์ไลน์ HepG2 และ AML12 วิธีการสกัดรางจืดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยใช้เทคนิคสกัดสารด้วยซอกห์เลต จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (Tchl) แคโรทีนอยด์รวม (Tcar) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) ของสารสกัด นอกจากนี้ใช้โครมาโตกราฟีแบบแบบแผ่นบาง (TLC) ระบุสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น และทำการตรวจสอบยืนยันด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) นอกจากนี้ส่วนของสารสกัดรางจืดถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดย MTT assay และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ NQO1 โดยส่วนของสารสกัดรางจืดการผ่านการแยกสารที่แสดงกิจกรรมเหนี่ยวนำเอนไซม์ NQO1 ที่สูงที่สุด คือส่วนแยกที่ 3 (F3) ถูกนำไประบุชนิดของสารพฤกษเคมีเบื้องต้นโดยโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) จากนั้นจึงใช้เครื่องมือวิเคราะห์ ได้แก่ ลิควิดโครมาโตกราฟีประสิทธิภาพสูง (HPLC) และลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (LC-MS/MS) เพื่อยืนยันชนิดของสารประกอบพฤกษเคมีจากสารสกัดส่วนแยกที่ 3

ผลการศึกษาพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (Tchlo) แคโรทีนอยด์รวม (Tcar) เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัด, ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) ของสารสกัดรางจืดแบบหยาบมีค่า 0.375 ± 0.032 มก./กรัม, 2.682 ± 0.125 มก./กรัม วัตถุดิบ, 15.3 ± 0.1%, 363.776 ± 3.491 มก./กรัม ของสารสกัด และ 112.22 ± 0.367 มก./กรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีของสารสกัดคลอโรฟอร์มของรางจืดด้วย HPLC พบกรดฟีนอลิก (กรดแกลลิก, กรดคาเฟอีน), ฟลาโวนอยด์ (อาพิจินิน), คลอโรฟิลล์ (คลอโรฟิลล์เอ, คลอโรฟิลล์บี, ฟีโอไฟตินเอ, ฟีโอไฟตินบี) และแคโรทีนอยด์คือลูทีน จากผลของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และความมีชีวิตของเซลล์ หลังจากใช้ระดับความเข้มข้นของการแยกส่วนตั้งแต่ 0.03125 – 2 มก./มล. พบว่าเปอร์เซ็นต์ของการมีชีวิตรอดของเซลล์ในเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดสูงกว่า 50 % นอกจากนี้ ค่า IC_{50} ยังสูงกว่า 2 มก./มล. ดังนั้น ส่วนแยกที่ 3 (F3) ถือเป็นส่วนแยกที่มีความสำคัญ ซึ่งมีผลกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ NQO1 ทั้งในเซลล์ไลน์ HepG2 และ AML12 ที่ระดับ 3.908 ± 0.079 เท่า และ 1.99 ± 0.047 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ ในกระบวนการระบุสารพฤกษเคมีใน ส่วนแยกที่ 3

(F3) ประกอบด้วย pheophytin *a* และ hydroxypheophytin *a* ที่มีโครงสร้างทางเคมี $C_{55}H_{74}N_4O_6$ และ $C_{55}H_{74}N_4O_5$.

กล่าวโดยสรุป สารสกัดรางจืด ประกอบด้วยสารพฤกษเคมี ซึ่งสามารถแยกส่วนและระบุชนิดของสารพฤกษเคมีในแต่ละส่วนแยกได้ นอกจากนี้ สารพฤกษเคทีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดรางจืด สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ล้างพิษ NQO1 ในเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิด ดังนั้น การค้นพบชนิดของสารพฤกษเคมีในสารสกัดรางจืดที่ออกฤทธิ์ด้านการล้างพิษ สามารถนำไปประยุกต์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

SREYLAK MOEURNG : IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN *THUNBERGIA LAURIFOLIA* LINDL. (RANG CHUET) EXTRACT AND THEIR DETOXIFICATION IN LIVER CELLS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. RATCHADAPORN OONSIVILAI, Ph.D., 72 PP.

Keyword: Identification/ *Thunbergia Laurifolia LINDL*. (RANG CHUET)/ Bioactive Compound/ Pheophytin-a/ Hydroxypheophytin –a/ HEPG2/ AML12 Cells Line.

The objective of the study was to identify a group of bioactive compounds in *Thunbergia laurifolia* Lindl. (Rang Chuet: RC) crude extract that provided the highest detoxification properties in HepG2 and AML12 cell lines. The soxhlet method was performed to extract phytochemical from RC leave powder then bioactive compounds of RC crude extract were separated by flash column chromatography (TLC). The percentage of yield extract, total chlorophylls (Tchl), total carotenoids (Tcar), total phenolic content (TPC), and total flavonoid content (TFC) were determined. Moreover, Thin-layer chromatography (TLC) was used as a primary identification of bioactive compounds following verification with High- performance liquid chromatography (HPLC). Furthermore, RC fractions (0.031 – 5 mg/mL) were applied to HepG2 and AML12 cell lines, and then cell viability and cytotoxicity were investigated by tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Next, NADPH: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) activity was investigated in all fractions. Bioactive compounds in a fraction was further identified by TLC and verified by HPLC, and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS).

The results showed that the percentage of yield extract, Tchl, Tcar, TPC, and TFC were 15.3 ± 0.1 %, 2.682 ± 0.125 mg/g raw materials (RM), 0.375 ± 0.032 mg/g RM, 363.776 ± 3.491 mg/g of extract, and 112.22 ± 0.367 mg/g of extract, respectively. RC chloroform extract consisted of phenolic acids (gallic acid, caffeic acid), flavonoids

(apigenin), chlorophyll (chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, pheophytin *a*, pheophytin *b*), and lutein. As a result of cytotoxicity and cell viability, the percentages of cell viabilities in both cell lines were higher than 50 % and IC_{50} values were higher than 2 mg/mL. Consequently, fraction 3 (F3) was considered as a significant fraction, which induced NQO1 enzyme activity in HepG2 at 3.908 ± 0.079 fold and AML12 1.99 ± 0.047 folds, were compared to control. In the process of compound identification, F3 consisted of pheophytin *a* and hydroxypheophytin *a* with the chemical structures $C_{55}H_{74}N_4O_6$ and $C_{55}H_{74}N_4O_5$.

In conclusion, RC consists of phytochemical constituents which could be purified and identified. Bioactive compounds in RC could induce detoxification enzyme activity NQO1 in cell lines. Thus, phytochemicals in RC extract could be applied for functional food development.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Food Technology

Academic Year 2021

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____ Ratchadaporn. D.

Co-advisor's Signature _____