บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.สารประกอบฟีนอลในพืชและคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน

คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอล คือการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และสารต้านการกลายพันธุ์ (antimutagrns) ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ (free radical) และการใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วดังปฏิกิริยาต่อไปนี้(Husain และคณะ 1989; Rice-Evans และคณะ 1997)

$$ROO^{\bullet} + PPH \longrightarrow ROOH + PP^{\bullet} \text{ ---------- 1.1)}$$

$$RO^{\bullet} + PPH \longrightarrow ROH + PP^{\bullet} \text{ ---------- (1.2)}$$

เมื่อ $ROO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ คือ free radicals, PPH คือ polyphenolic compound

เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$ROO^{\bullet} + PP^{\bullet} \longrightarrow ROOPP \text{ ---------- (1.3)}$$

$$RO^{\bullet} + PP^{\bullet} \longrightarrow ROPP \text{ ---------- (1.4)}$$

สารประกอบฟีนอลที่ถูกพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน นั้น สามารถพบได้ในส่วนต่างๆของพืช เช่น เมล็ด (ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย ข้าวและงา) ผล (ได้แก่ องุ่น ส้ม และ พริกไทยดำ) ใบ (ได้แก่ ชา และเครื่องเทศต่างๆ) และส่วนอื่นๆ (ได้แก่ มันเทศ และหัวหอม) และหนึ่งในสารประกอบฟีนอลที่เป็นที่รู้จักกันดีก็คือ flavonoids (ได้แก่ flavones, flavonols, isoflavones, catechins, flavononcs และ chalcones) และ cinnamic acid derivatives (caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid และ อื่นๆ) โดยสามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืชแต่จะมีความแตกต่างกันออกไปในด้านของชนิดและปริมาณ

2. อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ โมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมาก 10-13-10-10 วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยสามารถตรวจวัดด้วยเทคนิค electron spin resonance (ESR) โมเลกุลหรือไอออนชนิดนี้เป็นตัว

ก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ยกตัวอย่างเช่น superoxide anion radical ($O_2^{\bullet}$), hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$) และ peroxide radical ($ROO^{\bullet}$) เป็นต้น (Punchard and Kelly,1996)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมตามปกติในร่างกาย หรือเกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมา เพื่อสู้กับเชื้อโรคบางชนิด

2. อนุมูลอิสระที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งได้แก่ สารเคมีและ สิ่งปนเปื้อนที่มากับอากาศที่เราหายใจเข้าไป สารเติมแต่งอาหาร สีผสมอาหาร สารเคมีปนเปื้อนในอาหาร สารกันบูด หรือสารเคมี ต่างๆ ที่ใช้ในการเกษตร ฯลฯ

จากที่กล่าวมาแล้วว่า อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยภาวะที่ผิดปกติ จะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกัน สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองก็คือ ระบบต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ก็สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบต้านอนุมูลอิสระจะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้นมา ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต และรุนแรงไปถึงการเกิดโรค

ด้วยเหตุนี้มนุษย์เราจึงจำเป็นต้องรับประทานอาหารที่เป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชัน ได้แก่ วิตามิน เอ วิตามิน ซี วิตามิน อี สารสกัดจากพืชชนิด

คุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลทางเคมีที่ใช้มีความหมายว่า เป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระ (radical) ซึ่งนั่นคือ ความสามารถในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล สำหรับสารประกอบฟีนอล สามารถนิยามความหมายของคำว่า สารต้านออกซิเดชัน ได้โดยอาศัยหลักพื้นฐาน 2 ข้อ ดังนี้คือ

1. ที่ความเข้มข้นต่ำๆ สารตั้งต้นก็จะสามารถถูกชะลอ หรือสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้

3. อนุมูลอิสระ (radical) ที่ถูกกำจัดออกไปแล้วจะต้องมีความเสถียร (stable)

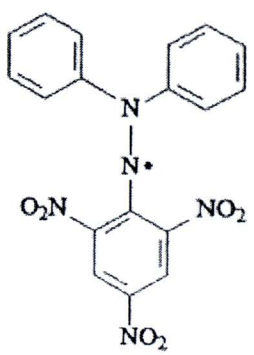
3.วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลและตรวจสอบความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชัน

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระ

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระเป็นการความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันของโมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว โดยวิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ 2, 2-azobis (3-ethyl-benzothialzoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ the oxygen radical absorption capacity (ORAC) และอื่นๆ ซึ่งมักนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ

3.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (รูปที่ 1) เป็น stable radical ในตัวทำละลาย methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm



DPPH

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical) (Osman, 2011)

โดย $DPPH^{\bullet}$ จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species ($R^{\bullet}$) ได้ดังสมการที่ (1.1) และ (1.2)

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \quad \text{----------(1.5)}$$

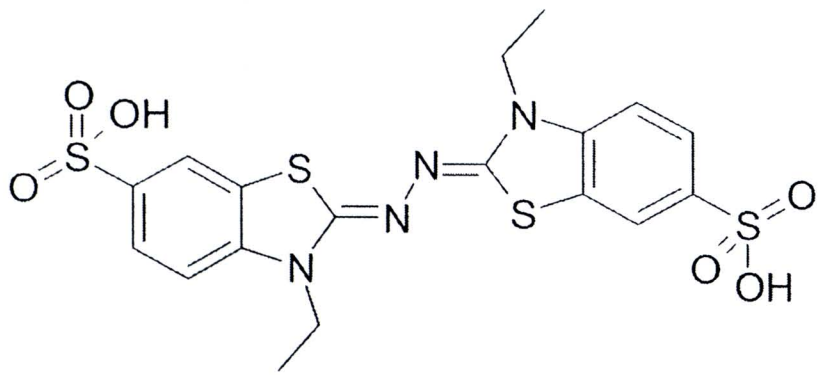
$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R \quad \text{----------(1.6)}$$

ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึง

ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH$^{\bullet}$ เหลืออยู่ 50% (Brand- William et al., 1995 และ Gil et al., 2002)

3.2 วิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical -scavenging assay : (ABTS assay)

ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (รูปที่ 1.15) เป็น stable radical ใน aqueous solution สารละลายนี้มีสีเขียว ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 nm รูปที่ 1.15 สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

การทำให้เกิด ABTS cation radical ทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. ใช้ enzyme reaction คือ ใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิด ABTS cation radical เช่น peroxidase, myoglobin เป็นต้น
2. ใช้ chemical reaction โดยใช้สารเคมี เช่น manganese dioxide, potassium persulfate,2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane)(ABAP) เป็นต้น

$$OH + ABTS \longrightarrow ABTS+ + H2O \text{ ----------(1.6)}$$

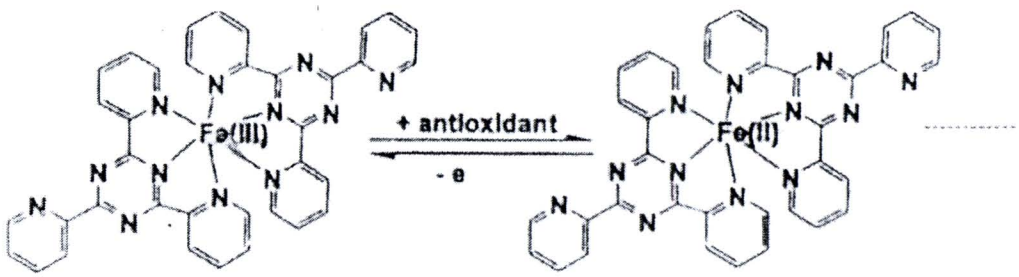
antioxidant (AH) จะทำปฏิกิริยากับ ABTS+ ดังนี้

$$ABTS+ AH \longrightarrow ABTS + A \text{ ---------- (1.7)}$$

มีผลให้ความเข้มของสารละลายสีเขียวลดลงด้วย โดยจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ $ABTS^{+}$ เหลืออยู่ 50% หรือรายงานผลเป็น 50% inhibition concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS+ ลดลง 50%

3.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

FRAP assay เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัย ปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน คือ เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe3+-TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe2+-TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ดังสมการ



รูปที่ 3 ปฏิกิริยาของ FRAP assay

วิธี FRAP สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า absorbance ที่ 595 nm จากนั้นศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันในสารตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Ferrous sulfate แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ เสียค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก รวดเร็ว มีขั้นตอนในการทดลองไม่ยุ่งยาก ซับซ้อนและมี reproducibility ดี (Benzie and Strain, 1999; Guo et al., 2003; Jimenez-Escrig et al., 2001)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ หมายถึง การรักษาสภาพมีชีวิต การเจริญเติบโต และพัฒนาการของเซลล์สัตว์ ภายใต้สภาวะนอกร่างกาย (ในอาหารเลี้ยงเซลล์) ที่เหมาะสม ติดต่อกันเป็นเวลานาน เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เกิดขึ้นจากความต้องการศึกษาพฤติกรรมและกระบวนการต่างๆของเซลล์ที่ปลอดจากการรบกวนของปัจจัยต่างๆที่เกิดขึ้นจากตัวสัตว์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ สายพันธุ์ (cell lines) หรือเซลล์จากอวัยวะสิ่งที่มีชีวิต (primary cell culture) หรือการใช้ subcellular preparations (ส่วนประกอบระดับเซลล์) โดยเฉพาะเพื่อใช้ในงานวิจัยทางด้านเภสัชวิทยา และพิษวิทยา ซึ่งก่อนหน้านี้อาศัยเฉพาะสัตว์ทดลองเท่านั้น การทดลองโดยวิธีการที่เกี่ยวกับเซลล์ดังกล่าวจัดเป็นการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (in vitro test) ซึ่งเป็นการศึกษาถึง ข้อมูลเบื้องต้นหรือข้อมูลขั้นพื้นฐานในระดับเซลล์เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาขั้นสูงในสัตว์ทดลอง (in vivo test) ต่อไปตลอดจนการนาผลที่ได้มาใช้ทดลองทางคลินิกในคนในที่สุด อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในเซลล์สายพันธุ์ (cell lines) อาจเป็นเพียงข้อมูลขั้นพื้นฐานซึ่งจาเป็นต้องมีการศึกษาต่อในเซลล์จากอวัยวะของสิ่งมีชีวิต (primary cell culture) ทั้งนี้ขึ้นกับการ

นาผลไปใช้ว่าต้องการความเฉพาะเจาะจงถึงขั้นไหน ตัวอย่างเช่น งานวิจัยทางด้านเภสัชวิทยาที่เน้นไปในแง่พิษวิทยานั้นเป็นการศึกษาถึงขบวนการเมตาบอลิซึมซึ่งรวมไปถึงการกาจัดยาหรือสารเคมีที่เข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากขบวนการดังกล่าวเป็นหน้าที่ของอวัยวะตับและไต ดังนั้นการทดสอบในหลอดทดลองจึงจาเป็นต้องใช้เซลล์ที่ได้มาจากอวัยวะนั้น ๆ โดยอาศัยกระบวนการแยกเซลล์จากอวัยวะดังกล่าวเพื่อนามาเลี้ยงในหลอดทดลองและทำการทดสอบต่อไป

จะเห็นว่า primary cell culture มีประโยชน์ต่อการศึกษาทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยา โดยเฉพาะการทดสอบในแง่การตรวจกรอง (screening) หรือการศึกษาเชิงเปรียบเทียบก่อนที่จะตัดสินใจเลือกใช้โมเดลสัตว์ทดลองที่เหมาะสม เพราะวิธีดังกล่าวเป็นการช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองเนื่องจากจานวนเซลล์ตับหรือไตที่ได้จากหนูทดลอง 1 ตัว สามารถนำมาเตรียมเป็นเซลล์ได้จานวนมากสาหรับใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้ยังเป็นการลดต้นทุนในการทดลองอีกด้วยข้อได้เปรียบของการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (in vitro test) คือ ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือสูงระดับหนึ่งเพราะเป็นการทดสอบในเซลล์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยที่สุดของสิ่งมีชีวิตขั้นตอนและวิธีการทาง่ายไม่ซับซ้อนเมื่อเทียบกับการทดสอบในสัตว์ทดลอง ไม่มีผลรบกวนจากระบบไหลเวียนโลหิต และระบบฮอร์โมนทาให้ง่ายต่อการแปรผล ปริมาณสารที่ใช้ทดสอบใช้ในปริมาณน้อย สามารถทดสอบจานวนตัวอย่างหลายตัวอย่างในการเตรียมเซลล์แต่ละครั้ง

ดังนั้นเห็นได้ว่า เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นทางเลือกหนึ่ง เพื่อทดแทนการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองในอนาคต จากการศึกษาของ National Research Council ของสหรัฐฯ สรุปผลว่า การทดสอบสารเคมีในสัตว์ทดลองเพื่อวัดความเป็นพิษในมนุษย์นั้นควรจะลดลงและยกเลิกในที่สุด และเสนอว่าควรมีการทดลองในเซลล์ เซลล์ไลน์ (cell line) หรือส่วนประกอบของเซลล์ (cellular compound) ทดแทน ทั้งนี้เนื่อง จากวิทยาศาสตร์มีความก้าวหน้าในด้านระบบชีววิทยา และมีการค้นพบวิธีต่างๆในการทดสอบเซลล์และเนื้อเยื่อซึ่งเป็นพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงที่สามารถนาไปใช้ในการตัดสินถึงความเสี่ยงของสารเคมี (risk chemical) ที่มีต่อมนุษย์ ช่วยให้นักวิทยาศาสตร์พิจารณาถึงผลของการสัมผัสสารเคมีว่าอยู่ในระดับใดจึงจะมีผลทำให้การทางานของเซลล์และระบบชีวเคมีของร่างกายได้รับผลกระทบจนก่อ ให้เกิดโรค

3. การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์

เป็นการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์หลังจากเหนี่ยวนาให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ขึ้นในเซลล์สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจลดการตายของเซลล์เนื่องจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยนับจานวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) และเซลล์ที่ตาย (dead cell) หรือทดสอบจากการทางานของไมโทคอนเดรีย และคำนวณเซลล์ที่มีชีวิต เป็นร้อยละของความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) วิธีที่นิยมทดสอบ คือ MTT reduction assay

วิธี MTT reduction assay

หลักการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT reduction assay (3-(4,5-dimethylyhiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) คือการวัดจานวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยวัดจาก mitochondrial succinic dehydrogenase activity ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมี mitochondrial function ในเซลล์ Krebs cycle ที่เกิดใน mitochondria เป็น metabolic pathway ที่สำคัญในการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน

หลักการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT reduction assay (3-(4,5-dimethylyhiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) คือการวัดจานวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยวัดจาก mitochondrial succinic dehydrogenase activity ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมี mitochondrial function ในเซลล์ Krebs cycle ที่เกิดใน mitochondria เป็น metabolic pathway ที่สำคัญในการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยขั้นตอนต้น คือ การเปลี่ยนจาก succinate ไปเป็น fumarate โดย succinic dehydrogenase (SDH) ส่วน FAD เป็นตัวที่ทาให้ปฏิกิริยา reduction สมบูรณ์โดยผ่าน $FADH_2$ และ $FADH_2$ สามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ไปเป็น formazen ที่มีสีน้ำเงินและตกตะกอนใน mitochondria โดยการทดสอบนี้ต้องการ disodium succinate เป็นตัวตั้งต้นเมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์มีผลทาให้มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีน้าเงิน และระดับของการเปลี่ยนสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ enzymatic reduction ของ tetrazolium salt ผลึกของ MTT formazen สามารถละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ก่อน ที่จะนาไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าที่อ่านได้จะบอก mitochondrial activity และเซลล์ที่มีชีวิต

โดย สามารถคำนวณ %cell viability จากสมการ

$$\%\text{cell viability} = \frac{\text{Absorbance of treated cell}}{\text{Absorbance of control cell}} x100$$

Caco-2 human intestinal cells

Caco-2 เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ที่มีการแสดงออกและลักษณะคล้ายคลึงกับเซลล์ epithelial ปกติ ซึ่งลักษณะต่างๆ ของ Caco-2 แสดงในตารางที่ 2 เซลล์เหล่านี้จะมีความแตกต่างเมื่อ monolayer มาบรรจบกัน ซึ่งวิธีการดูแลเซลล์เหล่านี้จะใช้สภาวะแบบเดียวกันกับการเลี้ยงเซลล์ทั่วไป ในระหว่างช่วง phase แรกของเซลล์จะปล่อย colonocyte และ enterocyte-specific protein การ expression ของ colonocyte ทำให้ลักษณะทางชีวเคมีของ enterocyte เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งลักษณะของ monolayer จะมีลักษณะของเซลล์ที่เกิดการจัดเรียงกันโดยมี tight junction และบริเวณยึดขึงของเซลล์ ซึ่งจะแยกระหว่าง apical microvillar และ basolateral membrane (Muangnoi, 2007)

การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ย่านาง (Yanang) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels จัดอยู่ใน วงศ์ Menispermaceae มีชื่อพื้นเมืองว่า เถาย่านาง จ้อยนาง เถาเขียว เถาวัลย์เขียว หย้าภคินี เครือเขางาม ย่านนาง ยานนาง วันยอ ย่านางเป็นไม้เลื้อยตระกูลเดียวกับเถาวัลย์ มีลักษณะเป็นเถา ใบเดี่ยวยาวรี รูปไข่ ใบหนาผิวเรียบเป็นมันมีสีเขียวเข้ม เมื่ออ่อนจะมีขนสีเทาขึ้นตามเถา เถาแก่จะมีผิวเกลี้ยงเหนียว ขนาดของใบยาว 5-10 เซ็นติเมตร กว้าง 2-4 เซ็นติเมตร ขอบใบเรียว ก้านใบยาวประมาณ 1 เซ็นติเมตร ออกดอกสีเหลืองมีขนาดเล็ก ออกเป็นช่อสั้นๆ ตามง่ามใบ ผลกลมใหญ่ เมื่อแก่จัดมีสีเข้ม เมล็ดในมีสีดำ ย่านางเป็นพืชที่พบในแหล่งธรรมชาติบริเวณป่าผสมผลัดใบ ป่าดงดิบ และป่าโปร่งใน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งภาคอื่นก็มีกระจายทั่วไป ย่านางเป็นพืชที่ขึ้นในดินทุกชนิด และปลูกได้ทุกฤดู ขยายพันธุ์โดยการใช้หัวและการเพาะเมล็ด (Smitinand & Larson, 1991)

ชาวอีสานใช้เถาใบอ่อน ใบแก่ตำคั้นเอาน้ำสีเขียวซึ่งมีลักษณะเหนียวและนำไปต้มกับหน่อไม้ปรุงเป็นแกงหน่อไม้ หรือซุปหน่อไม้ บางแห่งนำไปแกงกับขี้เหล็ก นำน้ำคั้นย่านางไปใส่แกงขนุน อ่อม และหมก ซึ่งเป็นอาหารอีสานอีกด้วย นอกจากนั้นยังพบว่าใบย่านางมีคุณค่าทางสารอาหาร โดยเฉพาะสารเบต้าแคโรทีน แคลเซียม และธาตุเหล็ก ในปริมาณสูง ส่วนรากย่านาง มีสารอัลคาลอยด์หลายชนิด เช่น ทิเรียโครีน (Tiliacorine) ทิเรียโคลินิน (Tiliacorinine) นอร์ทิเรียโครินิน (Nor-tiliacorinine) เป็นต้น ชาวบ้านมักใช้รากย่านางมาต้มดื่มเพื่อใช้เป็นยาแก้พิษและแก้ไข้เกือบทุกชนิด เช่น ไข้หวัด ไข้อีสุกอีใส เป็นต้น (Mahidol, Sahakitpichan, & Ruchirawat, 1994 และ Wiriyachita & Phuriyakorn, 1981)

เครือหมาน้อย (Krueo Ma Noy) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Cissampelos pareira* จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae มีชื่ออื่นๆว่า กรุงเขมา ขงเขมา พระพาย หมอน้อย หมาน้อย ก้นปิด และสีฟัน เครือหมาน้อยเป็นเถาเนื้อแข็งขนาดกลาง ใบเดี่ยว รูปหัวใจ มีขนปกคลุมทั่วไปทั้งบนใบและท้องของใบ ก้นใบปิด ดอกตัวผู้และตัวเมียแยกจากกัน มีขนาดเล็ก เมล็ดโค้งงอเหมือนพระจันทร์ครึ่งซีก เครือหมาน้อยเป็นพืชที่พบในแหล่งธรรมชาติ เกิดอยู่ตามที่รกร้างว่างเปล่าในป่าเขาทั่วไปในเขตร้อน (Smitinand & Larson, 1991) นอกจากนี้รากของเครือหมาน้อยจะมีสารประกอบส่วนใหญ่เป็นพวกแอลคาลอยด์ มีสรรพคุณทางยาช่วยลดไข้ แก้ปวด ขับปัสสาวะ แก้ทางเดินหรือกระเพาะปัสสาวะอักเสบ คลายกล้ามเนื้อและลดความดันโลหิต เป็นต้น (Caceres, Giron, & Martinez, 1978; Dwuma-badu et al., 1975; Manske & Holmes, 1954)

ชาวอีสานใช้ใบมาขยำกับน้ำ กรองเอากากออก ผสมด้วยข่าหั่นฝอย ต้นหอมซอย ตะไคร้หั่นฝอย พริกป่น เกลือป่น คนให้เข้ากัน ทิ้งไว้จะแข็งตัวเหมือนวุ้น เรียกว่าวุ้นหมาน้อย จัดเป็นอาหารคาวหรือจะทำเป็นขนมหวานก็ได้ โดยผสมกับน้ำเชื่อมหรือน้ำหวานแทน Singthong และคณะ (2004,

2005) ได้มีการศึกษาสารสกัดประเภทกัมจากใบเครือหมาน้อยที่ทำให้เกิดเจล พบว่าคือเพคตินโดยมีโครงสร้างหลักคือ กรดกาแลคทูโรนิค ที่ต่อกันด้วยพันธะ α (1,4) และจัดเป็น low methoxyl pectin

รางจืด (*Thunbergia Laurifolia* Lindl.)พืชในวงศ์ Acanthaceae เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่รู้จักกันดีและใช้แพร่หลายในวงการแพทย์แผนโบราณ จากตำรายาสมุนไพร (ชะลอ 2519, เสงี่ยม 2535, วุฒิ 2540, พนิดา 2542, วิทย์ 2539) กล่าวว่ารางจืดมีรสเย็นใช้ปรุงเป็นยาเขียวถอนพิษไข้ แก้เบื่อเมา แก้ร้อนใน กระหายน้ำ และใช้รักษาผู้ป่วยที่ถูกพิษต่าง ๆ เช่น พิษจากสุรา เห็ดเมา พิษเนื่องจากอาการแพ้ หรือรับประทานสัตว์ที่มีพิษ รวมทั้งใช้รักษาผู้ที่ได้รับสารเคมีที่มีพิษร้ายแรง เช่น สารหนู สตริ๊กนิน และสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ (พาณี และ ชัชวดี 2523) จากการศึกษาของ Oonsivilai et al., (2007) พบว่าสารสกัดอะซีโตน สารสกัดเอทานอล และสารสกัดน้ำของรางจืดมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ phase II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบ detoxification ของร่างกายและยังพบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ในการเป็นสารต่อต้านการก่อกลายพันธ์ใน Samonella typhimurium TA 98 และ TA 100 ซึ่งผลการศึกษาสามารถอธิบายการใช้รางจืดในการแก้พิษ เบื่อเมา ในการใช้สมุนไพรชนิดนี้ได้

มีรายงานการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและเภสัชวิทยาของรางจืดดังนี้ สารเคมีที่พบในรางจืดส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม flavonoids ได้แก่ apigenin, cosmodin และ delphinidin-3,5-di-O-β-D-glucoside วีรยุทธ(2522) วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำสกัดใบรางจืดพบว่ามี amino acids 4 ชนิดคือ methionine, serine, glycine, และ unidentified amino acid แต่ถ้าสกัดด้วย petroleum ether พบ steroids 8 ชนิด และ carotenoid หนึ่งชนิด รัชฎาพรและคณะ (2007) ได้ศึกษา phytochemical profiling ของสารสกัดรางจืดน้ำ อะซีโตน และเอทานอลโดยวิธี High Pperformance Liquid Chromatography พบว่า caffeic acid และ apigenin เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัดน้ำ ขณะที่สารประกอบ chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, pheophorbide *a*, pheophytin *a*, และ lutein เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัดอะซีโตนและสารสกัดเอทานอล

ศิริวรรณ (2522) พบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย Aerobacter aerogens ได้ในขณะที่ Kongyingyos และคณะ(1990) ใช้น้ำสกัดใบรางจืดยับยั้งการเจริญของไวรัส herpes simplex type 1 และ Chanawirat (2000) ใช้สารสกัดจากใบรางจืดลดพิษต่อตับของแอลกอฮอร์ในหนูขาวได้ ส่วนสุพรและคณะ (2541) ได้พัฒนาสารสกัดใบรางจืดเป็นยาทาภายนอกสำหรับต้านการอักเสบ เพราะสามารถต้านการอักเสบในหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้มีการทดสอบยืนยันว่าน้ำสกัดใบรางจืดสามารถลดอัตราการตายของหนูขาวเนื่องจากพิษของสารกำจัดแมลงได้ (พาณี และ ชัชวดี, 2523, วีรวรรณ, 2523) และยังสามารถลดอุณหภูมิในหนูขาวได้ด้วย (บุษบง, 2521)

เร็ว ๆ นี้ รัชฎาพรและคณะ (2007) ได้ทดสอบคุณสมบัติในด้านการแก้พิษของสารสกัดรางจืดโดยวัดค่าการเพิ่มการออกตามฤทธิ์ของเอนไซม์ NAD(P)H: quinine oxidoreductase (NQO1)ในเซลล์ตับชนิด Hepa 1c1c7 พบว่า สารสกัดอะซีโตนมีฤทธิ์ในการเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ NQO1 สูงสุด 2.8 เท่าเมื่อเทียบกับตัวควบคุม รองลงมาคือสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำซึ่งมีฤทธิ์ในการเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ 1.35 และ 1.56 เท่าตามลำดับและทำการทดสอบฤทธิ์การเป็นสารก่อกลายพันธุ์และการต่อต้านฤทธิ์ของสารก่อกลายพันธุ์ พบว่าสารสกัดรางจืดทุกชนิดมีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของ 2 Amino-anthracene สูงสุดที่ สายพันธุ์ TA 98 และ TA100.

สารสกัดน้ำแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการตรวจสอบด้วยวิธี DPPH assay ที่ค่า EC_{50} สูงสุดที่ 0.13 มิลลิกรัมกรดกาลิคต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดเอทานอลและอะซีโตนแสดงค่า EC_{50} ที่ 0.26 และ 0.61 มิลลิกรัมกรดกาลิคต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้การแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการตรวจสอบด้วยวิธี FRAP assay สูงสุดที่ 0.93 มิลลิโมลต่อกรัมในสารสกัดน้ำ รองลงมาเป็นสารสกัดเอทานอลและอะซีโตนที่ค่า 0.18 และ 0.04 มิลลิโมลต่อกรัม ตามลำดับ