



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ทางชีวภาพและการผลิตไมโครแคปซูล
ของสารสกัดจากใบย่านาง

**Bioactivity and Microencapsulation
of Yanang Leaves extract**

โดย จิตรา สิงห์ทอง และคณะ

พฤษภาคม 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ทางชีวภาพและการผลิตไมโครแคปซูลของสารสกัดจากใบย่านาง

Bioactivity and Microencapsulation of Yanang Leaves extract

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. จิตรา สิงห์ทอง

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

2. สุเวทย์ นิงสานนท์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. รัชฎาพร อุ่นศิริไธย์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgments)

รายงานการวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยพื้นฐานเชิงยุทธศาสตร์ “การผลิต การเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยว และการแปรรูปอาหาร เพื่อการบริโภคภายในประเทศ และเพื่อเป็นสินค้าออกมูลค่าสูง” ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ที่กรุณาให้ความร่วมมือและสนับสนุนในงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2556

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากสมุนไพรเป็นที่นิยมมากขึ้น โดยมีการใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร และอาหารเสริม รวมทั้งเป็นยารักษาโรค ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากสมุนไพรในตลาดโลกมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วจากมูลค่า 200 พันล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2008 เป็น 5 ล้านล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2010 (Chan et al., 2010) สำหรับประเทศไทยในช่วงปี 2550-2554 มูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์สมุนไพรของประเทศไทยมีอัตราเพิ่มขึ้นจาก 85 ล้านบาท ในปี 2550 เป็น 144 ล้านบาท ในปี 2554 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากสมุนไพรส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพของผู้บริโภค เช่น การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การนำมาเป็นอาหารเสริม รวมทั้งคุณสมบัติในการรักษาโรคต่างๆ สำหรับประเทศไทยคนไทยได้เปรียบกว่าชาติอื่นเพราะเป็นแหล่งของสมุนไพรพื้นบ้านที่สำคัญหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นการนำสมุนไพรมาผลิตเพื่อบริโภคน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ รวมทั้งลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ

ย่านาง (Yanang) จัดเป็นผักพื้นบ้านและสมุนไพร พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อีสาน) ของประเทศไทย ชาวอีสานใช้เถาใบอ่อน ใบแก่ตำคั้นเอาน้ำสีเขียวซึ่งมีลักษณะเหนียวและนำไปต้มกับหน่อไม้ปรุงเป็นแกงหน่อไม้ หรือซุปรน่อไม้ บางแห่งนำไปแกงกับขี้เหล็ก นำน้ำคั้นย่านางไปใส่แกงขนุน อ่อม และหมก ซึ่งเป็นอาหารอีสานอีกด้วย จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบย่านางพบว่า ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด เมื่อศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดที่รวมทั้งสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณวิตามินสูง และสารสกัดใบย่านางจัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีความพิษต่ำต่อ Caco-2 cell lines รวมทั้งสารสกัดย่านางด้วยน้ำไม่มีฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์

จากการสูญเสียได้ง่ายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชในธรรมชาติการกักเก็บหรือป้องกันสารสำคัญนั้นไว้จึงเป็นสิ่งจำเป็น และจากกระบวนการเอนแคปซูลที่สามารถกักเก็บหรือป้องกันสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไว้ได้ รวมทั้งสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของสารสำคัญและปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Chan et al., 2010) จากการศึกษาสภาวะการผลิตไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากใบย่านางที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นของกัมอาระบิกร้อยละ 10 อัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall ที่ 1:4 และอุณหภูมิเข้าของเครื่องพ่นฝอยที่ 160 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากใบย่านางมีร้อยละผลผลิตสูง ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ความชื้นต่ำ และมีลักษณะโครงสร้างที่สามารถกักเก็บสารสำคัญไว้ได้ ดังนั้นไมโครแคปซูลของสารสกัดจากใบย่านาง สามารถช่วยในการป้องกันและลดการสูญเสียของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในใบย่านาง เหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

บทคัดย่อ

ย่านางมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Tiliacora triandra* จัดเป็นพืชผักและสมุนไพรที่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบย่านางด้วยน้ำ เอทานอล และอะซิโตน จากการศึกษาพบว่าปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดน้ำมีปริมาณสูงสุด และเมื่อศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด สำหรับการศึกษาคือความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี MTT assay พบว่า สารสกัดจากใบย่านางมีความสามารถในการเป็นสารต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ใน Caco-2 cell lines โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 100 μg ของสารสกัด/ml ดังนั้นสารสกัดใบย่านางจึงจัดอยู่ในประเภทของสารที่มีความเป็นพิษต่ำ รวมทั้งสารสกัดย่านางด้วยน้ำไม่มีฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษากระบวนการผลิตไมโครแคปซูลสารสกัดจากใบย่านางที่เหมาะสม โดยมีปัจจัยในการศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของกัมอะราบิก อัตราส่วน core : wall และอุณหภูมิขาเข้าของเครื่องพ่นฝอย ต่อความคงตัวของไมโครแคปซูลสารสกัดจากใบย่านาง จากการศึกษาพบว่าสภาวะการผลิตไมโครแคปซูลสารสกัดจากใบย่านางที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของกัมอะราบิกร้อยละ 10 อัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall ที่ 1:4 และอุณหภูมิขาเข้าของเครื่องพ่นฝอยที่ 160 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ไมโครแคปซูลสารสกัดจากใบย่านางมีร้อยละผลผลิตสูง ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ความชื้นต่ำ และมีลักษณะโครงสร้างที่สามารถกักเก็บสารสำคัญไว้ได้

คำสำคัญ: ย่านาง, ไมโครแคปซูลเลชัน, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, ความเป็นพิษต่อเซลล์, สารต้านการก่อกลายพันธุ์

Abstract

Yanang (*Tiliacora triandra*) is known as vegetable and herbal in the northeast of Thailand. This work investigated bioactive compounds of Yanang extracts which were prepared by infusion with water, ethanol and acetone. The study of bioactivity of Yanang extracts found that the extraction with water is appropriate application. Antioxidant activities and total phenolic content of all three extracts were evaluated using DPPH, ABTS, FRAP assays and the Folin-Ciocalteu method. It was found that Yanang water crude extract showed the highest total phenolic content. In addition, Yanang water crude extract displayed the highest antioxidant activities determined by DPPH assay, ABTS assay and FRAP assay. All crude extracts were subsequently investigated for their cytotoxicity in Caco-2 cell lines. The low toxicity was indicated at concentrations higher than 100 µg/ml for all crude extracts, which would be the index for further recommended concentration use. Yanang water crude extract exhibited antimutagenic activity. Furthermore, this paper reports a designed of experimental for optimizing Yanang encapsulation using three independent variables: the ratio of core material (Yanang) to wall material (gum arabic), gum arabic concentration and inlet temperature of spray drying on bioactive compounds stability. The stability of bioactive compounds was evaluated by phenolic compounds, total antioxidant, carotenoids and chlorophyll. The study demonstrated that gum arabic, as coating agents, protected bioactive compounds of Yanang. Optimized condition for the encapsulation was at the ratio of core to wall 1:4 in gum arabic concentration 10% (w/v) and inlet temperature at 160°C. The results show that the bioactive compounds were mainly affected by the ratio of core to wall material. Besides, moisture content and particle size of encapsulation depend on inlet temperature of spray drying and gum arabic concentration, respectively. This optimization reveals that encapsulation process did not lose the bioactive compounds.

Keywords: Yanang, *Tiliacora triandra*, Microncapsulation, Bioactive compounds, Cytotoxicity, Antimutagenicity

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	26
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	
4.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากไผ่ย่านาง	34
4.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากไผ่ย่านางต่อเซลล์	38
4.3 การศึกษาการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์	39
4.4 กระบวนการผลิตไมโครเอนแคปซูลของสารสกัดไผ่ย่านาง	41
บทที่ 5 บทสรุป	52
ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัย	53
บรรณานุกรม	54
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์	61
ภาคผนวก ข สมการ Regression กระบวนการไมโครเอนแคปซูลของสารสกัดไผ่ย่านาง	66
ภาคผนวก ค Manuscript	69

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1	คุณค่าทางโภชนาการของไอย่านาง
ตารางที่ 3.1	แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ของการผลิตไมโครแคปซูลสารสกัดไอย่านางโดยวิธีพ่นฝอย
ตารางที่ 4.1	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดไอย่านางที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน
ตารางที่ 4.2	แสดงปริมาณวิตามินซี แคโรทีนอยด์ทั้งหมด และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ของสารสกัดไอย่านางที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน
ตารางที่ 4.3	แสดงค่า IC ₅₀ (μl/ml) ของสารสกัดไอย่านางต่อ Caco-2 cell lines
ตารางที่ 4.4	ผลของการผลิตไมโครแคปซูลสารสกัดจากไอย่านางต่อ ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
ตารางที่ 4.5	ผลของการผลิตไมโครแคปซูลสารสกัดจากไอย่านางต่อ ร้อยละผลผลิต ความชื้น สีและขนาดของไมโครแคปซูล

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1	ลักษณะใบย่านาง
ภาพที่ 2.2	ปฏิกิริยาออกซิเดชัน
ภาพที่ 2.3	การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ
ภาพที่ 2.4	โครงสร้างของ diphenylpicrylhydrazyl ; DPPH ในลักษณะของอนุมูลอิสระ
ภาพที่ 2.5	โครงสร้างของ diphenylpicrylhydrazyl: DPPH ในลักษณะที่ไม่มีอนุมูลอิสระ
ภาพที่ 2.6	โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มฟลาโวนอยด์
ภาพที่ 2.7	โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มที่ไม่ใช่ฟลาโวนอยด์
ภาพที่ 2.8	โครงสร้างของ L-ascorbic acid, dehydro-L-ascorbic acid และ diketogulonic acid
ภาพที่ 2.9	โครงสร้างทางเคมีของอัลฟา-แคโรทีนและเบต้า-แคโรทีน
ภาพที่ 2.10	โมเลกุลของคลอโรฟิลล์
ภาพที่ 2.11	โครงสร้างของแคปซูล
ภาพที่ 2.12	แคปซูลแบบ single core
ภาพที่ 2.13	แคปซูลแบบ multi-core หรือ matrix encapsulation
ภาพที่ 2.14	แคปซูลแบบ matrix encapsulation ที่มีการเคลือบผิว 2 ชั้น
ภาพที่ 4.1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Conc. 2-AA กับ <i>Salmonella typhimurium</i> สายพันธุ์ TA98 (colonies/plate)
ภาพที่ 4.2	แสดงการก่อกลายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย <i>Salmonella typhimurium</i> สายพันธุ์ TA98 ด้วยสารสกัดย่านางที่สกัดด้วยน้ำ
ภาพที่ 4.3	กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูล สารสกัดจากใบย่านางต่อปริมาณผลผลิต
ภาพที่ 4.4	กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูล สารสกัดจากใบย่านางต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด
ภาพที่ 4.5	กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูล สารสกัดจากใบย่านางต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.6 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูล สารสกัดจากไบยานางต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด	47
ภาพที่ 4.7 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูล สารสกัดจากไบยานางต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด	47
ภาพที่ 4.8 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูล สารสกัดจากไบยานางต่อปริมาณความชื้น	48
ภาพที่ 4.9 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูล สารสกัดจากไบยานางต่อค่าความสว่าง (L^*)	49
ภาพที่ 4.10 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูล สารสกัดจากไบยานางต่อค่าสีเหลือง (b^*)	49
ภาพที่ 4.11 ลักษณะโครงสร้างภายนอกของไมโครเอนแคปซูล สารสกัดจากไบยานาง	51

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากสมุนไพรเป็นที่นิยมมากขึ้น โดยมีการใช้เป็น ส่วนประกอบในอาหาร และอาหารเสริม รวมทั้งเป็นยารักษาโรค ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากสมุนไพรในตลาดโลกมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วจากมูลค่า 200 พันล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2008 เป็น 5 ล้านล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2010 (Chan et al., 2010) สำหรับประเทศไทยในช่วงปี 2550-2554 มูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์สมุนไพรของประเทศไทยมีอัตราเพิ่มขึ้นจาก 85 ล้านบาท ในปี 2550 เป็น 144 ล้านบาท ในปี 2554 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากสมุนไพรส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพของผู้บริโภค เช่น การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การนำมาเป็นอาหารเสริม รวมทั้งคุณสมบัติในการรักษาโรคต่างๆ สำหรับประเทศไทยคนไทยได้เปรียบกว่าชาติอื่นเพราะเป็นแหล่งของสมุนไพรพื้นบ้านที่สำคัญหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นการนำสมุนไพรมาผลิตเพื่อบริโภคน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ รวมทั้งลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ

ย่านาง (Yanang) จัดเป็นผักพื้นบ้านและสมุนไพร พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อีสาน) ของประเทศไทย ชาวอีสานใช้เถาใบอ่อน ใบแก่ตำคั้นเอาน้ำสีเขียวซึ่งมีลักษณะเหนียวและนำไปต้มกับหน่อไม้ปรุงเป็นแกงหน่อไม้ หรือซุปรนหน่อไม้ บางแห่งนำไปแกงกับซี่เหล็ก หรือนำน้ำคั้นย่านางไปใส่แกงขนุน อ่อม และหมก ซึ่งเป็นอาหารอีสานอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าใบย่านางมีคุณค่าทางสารอาหาร โดยเฉพาะสารเบต้าแคโรทีน แคลเซียม และธาตุเหล็ก ในปริมาณสูง ส่วนรากย่านาง มีสารอัลคาลอยด์หลายชนิด เช่น ทิเรียโครีน (Tiliacoline) ทิเรียโคลินิน (Tiliacolinine) นอร์ทิเรียโครีน (Nor-tiliacolinine) เป็นต้น ชาวบ้านมักใช้รากย่านางมาต้มดื่มเพื่อใช้เป็นยาแก้พิษและแก้ไข้เกือบทุกชนิด เช่น ไข้หวัด ไข้สวกอัส เป็นต้น (Mahidol, Sahakitpichan, & Ruchirawat, 1994 และ Wiriyaichita & Phuriyakorn, 1981)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant) สารประกอบฟีนอลิก (total phenolic) วิตามินซี (vitamin C) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) เป็นสารที่พบในพืชผักหรือแม้กระทั่งในผลไม้หลายชนิด ซึ่งย่านางก็เป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นองค์ประกอบ โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีสมบัติในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (Bae & Suh, 2007) ได้มีการศึกษาสารสกัดจากผลไม้ชนิด *Cinnamomum zeylanicum* โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารสกัดด้วยน้ำ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง ส่งผลทำให้มีปริมาณกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน โดยจะวัดในรูปของเบต้า-แคโรทีน และ 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) (Jayaprakasha et al., 2007) นอกจากนี้มีการศึกษาของ Ozgen et al. (2009) เกี่ยวกับลักษณะพิษเคมีและปริมาณสารออกฤทธิ์

ทางชีวภาพในผลหมอนสายพันธุ์มัลเบอร์รี่สีดำ (*Morus nigra*) และ มัลเบอร์รี่สีแดง (*Morus rubra*) ที่อุดมไปด้วยสารแอนโทไซยานิน (antocyanins) โดยวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพคือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารแอนโทไซยานิน และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด พบว่า ในมัลเบอร์รี่สีดำจะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่ามัลเบอร์รี่สีแดง เนื่องจากปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ปริมาณน้ำตาล ความเป็นกรด และความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของแต่ละสายพันธุ์ รวมทั้งได้มีการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากข้าวโพด (corn tassel) ที่เป็นผลพลอยได้ (by-product) ของข้าวโพด พบว่าสารที่สกัดด้วยเอทานอล (ethanol) และเมทานอล (methanol) จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและมีปริมาณกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (Mohsen & Ammar, 2009) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจาก Guarana seed พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยอะซิโตน (acetone) ความเข้มข้นร้อยละ 35 ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด (Majhenic et al., 2007) สารสกัดสมุนไพรสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเป็นสารเสริมฟังก์ชัน แต่ยังคงต้องมีการป้องกันการสูญเสียของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากอายุการเก็บรักษาสั้น การใช้กระบวนการเอนแคปซูล (encapsulation) เป็นวิธีที่สามารถป้องกันการสูญเสียของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งเป็นการยืดอายุการเก็บรักษา และสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเป็นส่วนประกอบเสริมหน้าที่ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้

กระบวนการเอนแคปซูล เป็นกระบวนการที่ใช้สารเคลือบสารที่สำคัญไว้ โดยมีทั้งการป้องกันการสารและการควบคุมการปลดปล่อยสารที่ต้องการป้องกันหรือกักเก็บไว้ รวมทั้งสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของสารสำคัญและปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Chan et al., 2010) สำหรับการผลิตเอนแคปซูล สารที่ต้องการกักเก็บจะอยู่ในสถานะที่เป็นของเหลวหรือก๊าซ โดยสารที่นิยมทำเอนแคปซูลในระดับอุตสาหกรรมคือ วิตามิน แร่ธาตุ สารต้านอนุมูลอิสระ สารให้สี เอนไซม์ และสารให้ความหวาน (Deladino et al., 2008) สำหรับสารที่ใช้เคลือบมีความเฉพาะต่อสารที่ต้องการป้องกัน และมีผลต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภค เช่น ต้องการให้ย่อยที่กระเพาะอาหาร หรือต้องการให้ดูดซึมที่ลำไส้เล็ก เนื่องจากสภาวะในการย่อยมีความแตกต่างกัน (Hu et al., 1998) สารเคลือบที่นิยมใช้ในการทำเอนแคปซูลส่วนใหญ่จะเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) วิธีการในการผลิตเอนแคปซูลสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์ยา และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยวิธีการทำเอนแคปซูลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) เป็นการนำสารที่ใช้เคลือบมาละลายน้ำ จากนั้นนำสารที่กักเก็บมาผสมกับสารละลายที่ใช้ในการเคลือบ สำหรับวิธีเอ็กซ์ทรูชัน (extrusion) เป็นการกระจายตัวของสารที่ต้องการทำเอนแคปซูลในมวลของคาร์โบไฮเดรตที่หลอมเหลว โดยส่วนผสมจะถูกบังคับให้เคลื่อนผ่านหัวไดล์ (die) ไปยังช่องเหลวซึ่งใช้ในการดึงน้ำออก (dehydrating liquid) จะทำให้สารเคลือบเกิดการแข็งตัวและจับสารแกนกลางไว้ภายในของเหลวที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นมีความแข็ง (harden material) ต้องนำไปผ่านขั้นตอน

การทำให้แตกเป็นชั้นเล็กๆ และทำให้แห้ง ส่วนวิธีทางเคมี (coacervation) เป็นการปรับสภาพของคอลลอยด์ที่ละลายน้ำได้ (hydrophilic colloids) 2 ชนิด ที่มีประจุต่างกันให้อยู่ในสภาวะที่ประจุเป็นกลางและเคลือบอยู่บนผิวของสารแกนกลาง (Beristain et al., 1996)

จากการสูญเสียได้ง่ายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชในธรรมชาติการกักเก็บหรือป้องกันสารสำคัญนั้นไว้จึงเป็นสิ่งจำเป็น และจากกระบวนการเอนแคปซูลที่สามารถกักเก็บหรือป้องกันสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไว้ได้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากรรมวิธีการเตรียมสารสกัด ฤทธิ์ทางชีวภาพ และกระบวนการผลิตไมโครแคปซูลของสารสกัดจากไບยานางที่เหมาะสม เพื่อช่วยในการป้องกันและลดการสูญเสียของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในไບยานาง

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ย่านาง

ย่านางมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Tiliacora triandra Diels* อยู่ในวงศ์ Menispermaceae ย่านางมีถิ่นกำเนิดในตอนกลางของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นไม้เลื้อยในป่าเขตร้อนและในป่าไม้ผลัดใบในทวีปเอเชียและอเมริกาเหนือ ย่านางพบขึ้นตามป่าผลัดใบ ป่าดงดิบ และป่าโปร่งในทุกภาคของประเทศไทย ชื่ออื่นที่ใช้เรียกจะเรียกตามท้องถิ่นนั้นๆ คือ ภาคกลางเรียก เก่าย่านาง เกาหญ้านาง เกาวัลย์เขียว หญ้าภคินี ภาคเหนือเรียก จ้อยนาง จอยนาง ผักจอยนาง ภาคใต้เรียก ย่านาง ยานนาง ขันยอ ยาดนาง วันยอ และภาคอีสานเรียก ย่านาง (กรณิกาญจน์, 2553; Smitinand & Larsen, 1991)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของย่านาง คือ เป็นไม้เลื้อย มีลักษณะเป็นเถากลมขนาดเล็ก เหนียว มีสีเขียว เถาอ่อนมีขนอ่อนปกคลุม เถาแก่ผิวเรียบมีสีเข้ม มีข้อห่างๆ รากมีขนาดใหญ่ มีหัวใต้ดิน เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวติดกับลำต้นแบบสลับ ใบคล้ายรูปไข่ หรือรูปไข่ขอบขนาน ปลายใบเรียวฐานใบมน ขนาดใบยาว 5-10 เซนติเมตร กว้าง 2-4 เซนติเมตร ขอบใบเรียบ ผิวใบเป็นคลื่นเล็กน้อย ก้านใบยาว 1-1.5 เซนติเมตร ใบสีเขียวเข้ม หน้าและหลังใบเป็นมัน ลักษณะของใบย่านางแสดงดังภาพที่ 2.1 ดอกของย่านางแยกเพศคนละต้น ย่านางเป็นพืชที่ขึ้นในดินทุกชนิด และปลูกได้ทุกฤดู ขยายพันธุ์โดยใช้หัวใต้ดิน สามารถปลูกหรือขยายพันธุ์ง่าย (กรณิกาญจน์, 2553; Smitinand & Larsen, 1991)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะใบย่านาง

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของไບย่านาง

คุณค่าทางโภชนาการ	ปริมาณต่อ 100 กรัมตัวอย่าง	
พลังงาน	95	กิโลแคลอรี
เส้นใย	7.9	กรัม
แคลเซียม	155	มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	11	มิลลิกรัม
เหล็ก	7	มิลลิกรัม
วิตามินบี1	0.3	มิลลิกรัม
วิตามินบี 2	3.6	มิลลิกรัม
ไนอาซิน	14	มิลลิกรัม
วิตามินซี	141	มิลลิกรัม
โปรตีน	15.5	กรัม
คาร์โบไฮเดรต	16.6	มิลลิกรัม
เบต้า-แคโรทีน	0.64	มิลลิกรัม
โพแทสเซียม	1.29	กรัม
acid detergent fiber (ADF)	33.7	กรัม
neutral detergent fiber (NDF)	46.8	กรัม
digestible dry matter (DMD)	62.0	กรัม
แทนนิน	210	มิลลิกรัม

ที่มา: ดัดแปลงจาก กรณีกาญจน์ (2553) ณรงค์ (2553) และ วัลภา (2553)

คุณประโยชน์เฉพาะของย่านาง ไບย่านางมีสรรพคุณทางยา คือ มีรสชาติค่อนข้างจืดมาก และออกรสขม เมื่อรับประทานเชื่อว่าจะมีฤทธิ์ในการถอนพิษไข้ แก้ไข้ตัวร้อน ไບย่านางประกอบไปด้วยเส้นใย นอกจากนี้ยังมีแคลเซียมและวิตามินซีค่อนข้างสูง ส่วนในรากย่านางมีสรรพคุณทางยา คือ มีรสจืดและขม สามารถใช้ต้มเป็นยาเพื่อแก้ไข้ ในรากไບย่านางประกอบไปด้วยสารอัลคาลอยด์หลายชนิดซึ่งเป็นสารที่ให้ประโยชน์ต่อร่างกายประกอบไปด้วย ทิเรียโครินิน ทิเรียโคริน และนอร์ทิเรียโครินิน นอกจากนี้ในด้านคุณค่าทางอาหารและโภชนาการของย่านาง ซึ่งย่านางสามารถนำทุกส่วนมาใช้ประโยชน์ได้ ไม่ว่าจะเป็นใบ เถา ผล หรือยอดอ่อน แต่คนโบราณนิยมนำส่วนไບย่านางมาคั้นเอาน้ำเพื่อปรุงอาหารประเภทต่างๆ เช่น แกงหน่อไม้ หรือซุบหน่อไม้ เป็นต้น รวมทั้งคุณค่าทางโภชนาการของไບย่านางพบว่า ปริมาณของสารที่สำคัญและเป็นสารที่โดดเด่นในไບย่านาง คือ เส้นใย แคลเซียม เหล็ก เบต้า-แคโรทีน และวิตามินเอ แสดงดังตารางที่ 2.1 (วัลภา, 2553)

ย่านางมีคุณค่าทางโภชนาการที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย รวมทั้งมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์ของย่านางอีกด้วย Nanasombat และ Teckchuen (2009) ได้ศึกษาสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) สารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านกิจกรรมการเกิดมะเร็ง (anticancer activities) ในสมุนไพรท้องถิ่นของไทย พบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรากย่านางเป็นสารอัลคาลอยด์และได้แยกสารสกัดอัลคาลอยด์เพื่อทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography และ crystallization techniques รวมทั้งศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR (nuclear magnetic resonance) พบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรากย่านางคือ ทีเรียโครินิน และทีเรียโคริน (Saiin & Markmee, 2003) รวมทั้งมีการศึกษาสารต้านไข้มาลาเรีย (antimalarial activity) ในสารสกัดจากรากย่านางที่มีผลต่อ *Plasmodium falciparum* พบว่า เมื่อใช้น้ำในการสกัด สารสกัดจากรากย่านางมีความสามารถในการต่อต้าน *Plasmodium falciparum* ได้ (Pavanand et al., 1989) และยังมีการศึกษาของ Sireeratawong et al. (2008) เกี่ยวกับความเป็นพิษของสารสกัดจากรากย่านางที่สกัดด้วยน้ำพบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 5000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูทดลองไม่พบความเป็นพิษต่อหนู

สมุนไพรในวงศ์เดียวกันกับย่านางมีอยู่อีกหลายชนิด แต่ละชนิดนั้นมีสรรพคุณทางยาทั้งมีฤทธิ์ถอนพิษไข้ เป็นยาบำรุงร่างกาย หรือแม้กระทั่งเป็นยาระงับอาการปวด อาทิเช่น บอระเพ็ด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Tinospora crispa* Miers. จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae มีลักษณะเป็นเถาเลื้อยเกลี้ยง เถาขรุขระ เปลือกเถาบางสามารถลอกออกได้ ใบรูปไข่ค่อนข้างยาว ฐานใบเป็นรูปหัวใจ ดอกมีขนาดเล็กสีเขียวอมเหลือง เถาของบอระเพ็ดมีสารรสขมชื่อ picroetin นอกจากนั้นยังมีสารจำพวก diterpenoid ชื่อ tinosporan ยังพบว่ามีสารประเภท amine 2 ชนิด คือ N-transferuloyl tyramine และ N-cis-feruloyl tyramine และสารประกอบฟีนอลิก โดยมีสรรพคุณทางยาคือ ไข้บับัดอาการอ่อนเพลีย ถอนพิษไข้ โรคเกี่ยวกับทางเดินปัสสาวะ และแก้อาการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีชิงช้าชาลีที่เป็นสมุนไพรในวงศ์ Menispermaceae โดยมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers. มีลักษณะเป็นเถาแข็ง มีรากอากาศงอกตามเถา เปลือกสีน้ำตาลปนเทา ใบเป็นรูปหัวใจ ที่ฐานใบมีปุ่มเล็กๆ ดอกออกกระหว่างใบและลำต้น พบว่า เถาของชิงช้าชาลีมีสารอัลคาลอยด์ที่มีสรรพคุณทางยา ที่ใบของชิงช้าชาลีพบว่า มีปริมาณโปรตีนสูง และยังมีแคลเซียมและฟอสฟอรัสด้วย มีสรรพคุณทางยาคือ ไข้บับัดอาการอ่อนเพลีย ถอนพิษไข้ โรคเกี่ยวกับทางเดินปัสสาวะ แก้ไข้มาลาเรีย ลดอาการอักเสบ และเป็นยาระงับอาการเจ็บปวดได้ สมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่อยู่ในวงศ์ Menispermaceae คือ ขมิ้นเครือ โดยมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Arcangelisia flava* (Linn.) Merr. มีลักษณะเป็นเถาที่มีเนื้อแข็ง เนื้อไม้มีสีเหลือง ในเถาของขมิ้นเครือมีสารอัลคาลอยด์ชนิด berberine ซึ่งมีสรรพคุณทางยาคือ ถอนพิษไข้ แก้อาการท้องเสีย อาการท้องอืด และแก้โรคดีซ่านได้ นอกจากนี้ยังมีเครือหมาน้อยหรือกรุงเขมา ที่จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cissampelos pareira* Linn. มีลักษณะเป็นไม้เถาเลื้อย ใบเดี่ยว รูปรีฐานใบเป็นรูปหัวใจ โคนใบแบบก้นปัด ใบกว้าง 5.6-6.6 เซนติเมตร ยาว 6.9-7.6 เซนติเมตร หน้าใบและหลังใบมีขนสี

น้ำตาลยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ปกคลุมหนาแน่น หลังใบมีขนปกคลุมหนาแน่นมากกว่าหน้าใบ ก้านใบมีขนยาว 1.7-2.5 เซนติเมตร ดอกตัวผู้และตัวเมียเป็นกระจุกสีขาวยาวประมาณ 0.2-0.5 มิลลิเมตร ขอบใบเรียบ ยอดอ่อนสีน้ำตาลแดง ใบแก่สีเขียวเข้ม ก้านใบยาว 0.4-0.6 เซนติเมตร ออกดอกที่ยอดหรือปลายกิ่ง ช่อดอกมี 4-5 ดอก ยาว 6.0-6.5 เซนติเมตร ดอกย่อยแยกจากกัน มีขนาดเล็กสีเขียว เมล็ดโค้ง (เหมือนพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว) ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดหรือหน่อ พบว่า ในเครือหมาน้อยมีสารสำคัญหลายอย่างเช่น cissampareine, curine, cycleanine, daijioson, β -cycalanoline, dehydrodicentrine, hayatidine, hayatire, insularine และ isochonodendrine สรรพคุณทางยาในรากเครือหมาน้อยคือ ใช้ขับปัสสาวะ แก้ไข้ และเป็นยาถ่าย ส่วนในใบ เป็นยาเย็นดับพิษไข้ ใช้ภายนอกรักษาแผลหรือฝี (จินดาพร, 2539)

ยังมีสมุนไพรในวงศ์อื่นอีกหลากหลายชนิดที่ใช้ประโยชน์จากใบเช่นเดียวกับใบย่านาง สามารถพบได้ทั่วไปในทุกภูมิภาคประเทศไทย ยกตัวอย่างเช่น สาบเสือ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Chromolaena odoratum* (L.) จัดอยู่ในวงศ์ Compositae มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก มีอายุเพียง 1 ปี ลำต้นตั้งตรง แตกกิ่งก้าน สูงได้ถึง 1.5 เมตร ทุกส่วนของต้นในขณะที่ยังอ่อนมีขน ใบเป็นรูปไข่ที่ผิวใบมีขน ดอกช่อสีขาวแกมม่วง ใบสาบเสือนี้ออกสาร tetramethoxyflavone และแคลเซียม ซึ่งทำให้ใบสาบเสือนี้ออกฤทธิ์ในการสมานแผลและห้ามเลือด สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและอะซิโตนที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดหนอง นอกจากนี้ยังมีใบบัวบกที่มีสรรพคุณทางยา ซึ่งในปัจจุบันนิยมบริโภคกันมาก ใบบัวบกมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Centella asiatica* (L.) Urb. อยู่ในวงศ์ Umbelliferae เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุหลายปี เลื้อยแผ่ไปตามพื้นดิน เป็นใบเลี้ยงเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่ ดอกเป็นช่อ ออกดอกที่ซอกใบ ขนาดเล็ก 2-3 ดอก กลีบดอกสีม่วง ใบสดของสามารถรักษาโรคปากเปื่อย เจ็บคอ ร้อนใน กระจายน้ำ ลดไข้ ขับปัสสาวะ และแก้ท้องเสีย ยังมีสมุนไพรที่ใช้ประโยชน์จากใบอีกคือ ลูกใต้ใบ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Phyllanthus amarus* Schum. จัดอยู่ในวงศ์ Phyllanthaceae เป็นไม้ล้มลุก ใบเดี่ยวเรียงสลับในระนาบเดียวกัน รูปรีหรือรูปขอบขนาน ดอกเป็นช่อสีนวล มีสรรพคุณทางยา คือ ถอนพิษไข้ รักษาโรคผิวหนัง ปวดท้อง ดีซ่าน ท้องเสีย บิด และแก้ไอได้ (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร, 2547)

2.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในพืช

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารที่พบมากในพืชผักและผลไม้ ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในธรรมชาติ ประกอบไปด้วยสารหลายชนิดเช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ และวิตามินซี เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ล้วนมีประโยชน์ต่อร่างกาย และไม่เป็นพิษ

2.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระ

คือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสารที่สามารถจับอนุมูลอิสระออกจากร่างกายได้ สารต้านออกซิเดชันที่พบในพืชได้แก่ วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี นอกจากนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นกลุ่มของสารต้าน

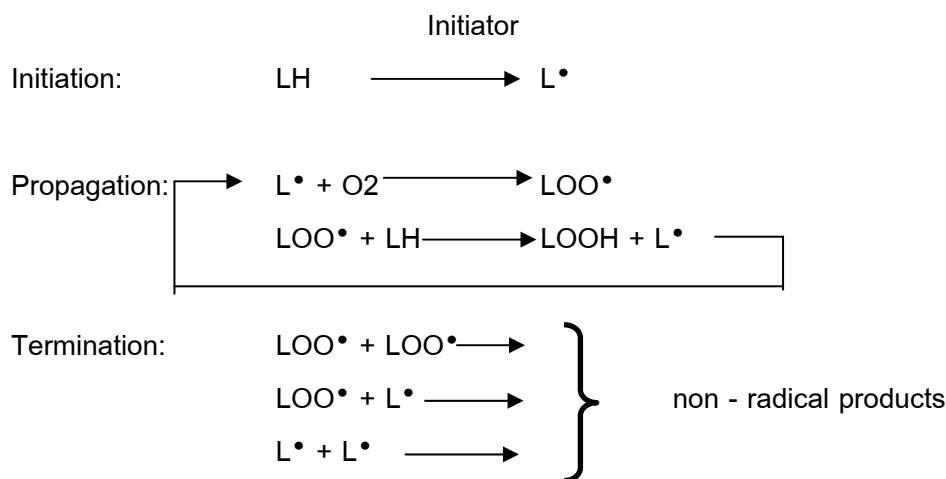
อนุมูลอิสระที่น่าสนใจ (จิติกานต์, 2551; Bae & Suh, 2007) สิ่งที่ทำให้สารต้านออกซิเดชันมีความน่าสนใจคือสมบัติในการลดอันตรายจากอนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์และยังป้องกันอันตรายจากไขมันที่มนุษย์ได้รับจากอาหาร ซึ่งทั้งสองกรณีนี้เกิดจากการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งธรรมชาติ (Molyneux, 2004)

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งโมเลกุล การที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวส่งผลให้อนุมูลอิสระสามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ เนื่องจากอนุมูลอิสระพยายามทำให้อิเล็กตรอนเดี่ยวที่มีอยู่เกิดความสมดุลโดยใช้โมเลกุลอื่น เมื่ออนุมูลอิสระจับกับโมเลกุลอื่นจะเกิดการสร้างโครงสร้างเชื่อมกัน ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น (Wildman, 2007) อนุมูลอิสระเกิดจากการเสียอิเล็กตรอนซึ่งมีออกซิเจนเป็นตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agents) โดยออกซิเจนต้องอยู่ในสภาวะเร่ง (singlet oxygen ; $^1\text{O}_2$) ซึ่งออกซิเจนปกติ (ground state ; O_2) อยู่ในอากาศทั่วไป แต่เมื่อมีแสงอาทิตย์จะทำให้ออกซิเจนปกติกลายเป็นออกซิเจนในสภาวะเร่ง โดยแสงอาทิตย์จะทำให้อิเล็กตรอนที่อยู่นอกสุดของออกซิเจนเกิดการหมุน ทำให้ออกซิเจนในสภาวะเร่งสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ง่าย เนื่องจากโมเลกุลอื่นมีอิเล็กตรอนที่สามารถจับคู่กับอิเล็กตรอนที่หมุนของออกซิเจนได้โดยไม่มีข้อจำกัด จึงทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น

การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งถือได้ว่าเป็นสารที่ป้องกันความเสียหายของโมเลกุลจากปฏิกิริยาออกซิเดชันคือ ป้องกันการเกิดขึ้นของออกซิเจนในสภาวะเร่ง กำจัดออกซิเจนในสภาวะเร่งก่อนที่จะจับกับโมเลกุลทางชีวภาพ โดยลดความแข็งแรงของออกซิเจนในสภาวะเร่งหรือเสริมความแข็งแรงของโมเลกุลทางชีวภาพ นอกจากนั้นยังสามารถทำให้ออกซิเจนในสภาวะเร่งไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปในสภาวะอื่นอีกได้ สามารถซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากออกซิเจนในสภาวะเร่ง และสามารถปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสำหรับการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพ โดยทำให้สารต้านอนุมูลอิสระสามารถจับกับไอออนของโลหะที่มีความสามารถในการสร้างอนุมูลอิสระ เช่น Fe^{2+} ได้ (Wildman, 2007) นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ในการยับยั้งปฏิกิริยาขั้นแรกของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยจับกับอนุมูลอิสระ เช่น ไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) จับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันขั้นแรก (primary product) และทำลายพันธะไฮโดรเจนของสารตั้งต้นที่จะสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Shahidi, 1997)

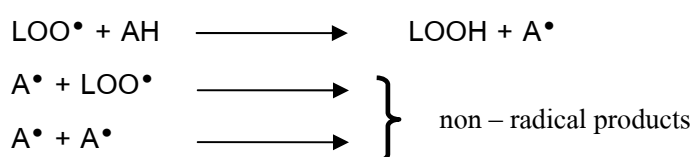
กลไกในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันประกอบไปด้วย ขั้นแรกอินิทิเอชัน (initiation) ขั้นที่สองโพรพาเกชัน (propagation) และขั้นที่สามเทอร์มิเนชัน (termination) ในขณะที่อนุมูลอิสระเกิดขึ้นในขั้นอินิทิเอชัน ($\text{L}^\bullet$) ก็จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างออกซิเจนกับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ซึ่งจะทำให้เกิดโมเลกุลของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) ($\text{LOO}^\bullet$) ในขั้นโพรพาเกชัน หลังจากนั้นในขั้นโพรพาเกชันจะทำให้เกิดสายของอนุมูลที่เกิดขึ้นและจะทำ

ปฏิกิริยากันเองจนเกิดเป็นสารประกอบใหม่ที่มาเป็นอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาจะหยุดลงในขั้นเทอร์มิเนชัน (Shahidi, 1997) แสดงดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Shahidi, 1997)

สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระในชั้นโพรพาเกชัน โดยกำจัดออกซิเจนในสภาวะเร่งหรือจับกับไอออนของโลหะที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอม ($\text{H}^\bullet$) หรือให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระที่เกิดจากกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ซึ่งสามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ แสดงดังภาพที่ 2.3 ส่วนในร่างกายของมนุษย์อนุมูลอิสระอาจจะเกี่ยวข้องกับโรคภัยหรือการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ เช่น ปอด หัวใจ หลอดเลือดหัวใจ ไต ตับ ระบบทางเดินอาหาร ระบบเลือด สายตา ผิวหนัง กล้ามเนื้อ ระบบประสาท และระบบขับถ่าย เป็นต้น ปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดความผิดปกติโดยเกิดจากออกซิเจนน้ำ และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวภายในร่างกาย (Shahidi, 1997)



ภาพที่ 2.3 การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ (Shahidi, 1997)

สารต้านอนุมูลอิสระมีหลายประเภท ซึ่งจะใช้กันอย่างกว้างขวางในอาหารประเภทไขมันหรือน้ำมัน ยกตัวอย่างเช่น สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ซึ่งสารสังเคราะห์ที่นิยมใช้คือ สารประกอบ ฟีนอลิก เช่น butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary butylhydroquinone (TBHQ) และกรดกาแลก (gallic acid) เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์สามารถปรับปรุงความคงตัวของไขมันและน้ำมันได้ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาการเติม

สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ร้อยละ 0.02 ในผลิตภัณฑ์ที่เป็นไขมันหรือน้ำมันส่งผลทำให้ความคงตัวของผลิตภัณฑ์ดีขึ้น นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์น้ำมันที่ได้จากพืชที่มีการใช้ TBHQ, BHA และ BHT สามารถช่วยให้น้ำมันพืชมีความคงตัวมากขึ้นเมื่อถูกความร้อน สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์จึงมีการใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้น

นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังพบอยู่ในธรรมชาติมานานแล้ว โดยได้จากวิธีในครัวเรือนเช่น การรมควันและการใช้สมุนไพรในการเก็บรักษาเนื้อ ปลา ซีส และอาหารที่มีไขมันสูง สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติพบในพืชทุกชนิด ในจุลินทรีย์ เชื้อรา และเนื้อเยื่อสัตว์ สารประกอบที่มีมากในกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระคือสารประกอบฟีนอลิก นอกจากนี้ยังเป็นกลุ่ม โทโคฟีรอล (tocopherols) ฟลาโวนอยด์ และกรดฟีนอลิก (phenolic acid) (Pokorny et al., 2000)

การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น คุณสมบัติของโครงสร้าง สารต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาเคมี รวมถึงชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ อุณหภูมิ แสง ชนิดของอนุมูลอิสระ รวมถึงลักษณะทางกายภาพของระบบปฏิกิริยา ปัจจัยที่มีความสำคัญสามารถแบ่งออกได้ดังนี้ (Pokorny et al., 2000)

(1) ปัจจัยทางกายภาพ เช่น ออกซิเจนที่มีความดันสูง พื้นที่ผิวที่สามารถสัมผัสกับออกซิเจนได้ รวมทั้งความร้อนหรือรังสีความร้อนที่เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในขั้นแรกและขั้นที่สอง มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของแสงอาทิตย์ที่มีต่อลักษณะของน้ำมันดอกทานตะวันพบว่าเมื่อเก็บรักษาน้ำมันดอกทานตะวันที่สภาวะอุณหภูมิห้องและมีแสงแดด มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันใกล้เคียงกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นเหตุผลที่ว่า การเก็บรักษาอาหารควรเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ที่สามารถป้องกันแสงแดดและออกซิเจนได้ รวมถึงการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร

(2) ปัจจัยเกี่ยวกับสารตั้งต้น ในระบบอาหารสารต้านอนุมูลอิสระจะสามารถทำปฏิกิริยากับอาหารทั้งที่เป็นไขมันและที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ ปัญหาหลักจะมีความเกี่ยวข้องกับความคงตัวของสารที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบไขมัน ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาตามลักษณะของสารตั้งต้น เช่น ความแตกต่างของโครงสร้างของสารตั้งต้น นอกจากนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขั้นแรกและขั้นที่สองยังสามารถบอกถึงชนิดและความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร ตั้งต้นได้ และมีการศึกษาเกี่ยวกับความคงตัวของกรดไขมัน (fatty acid) ในน้ำมันที่ผ่านการใช้แล้วซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดขึ้นได้เร็วกว่าน้ำมันปกติหลายเท่า

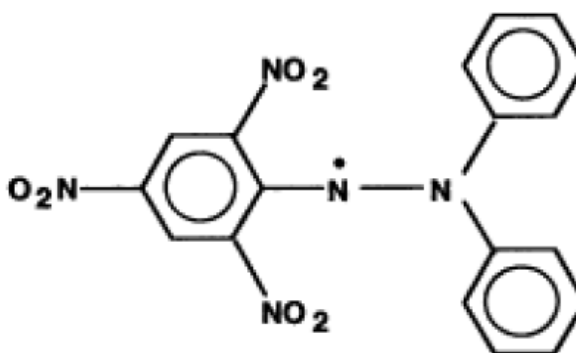
(3) ลักษณะทางเคมีกายภาพ ในระบบอาหารและระบบชีวภาพจะมีลักษณะการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันเช่น ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกกับอนุมูลอิสระจะขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่างปริมาณส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (lipophilic) มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของโท

โคฟีรอลต่อระบบอิมัลชัน (emulsion) พบว่ามีผลตรงกันข้ามกับสารต้านอนุมูลอิสระประเภทโทรลอค (trolox) เนื่องจากว่าส่วนที่ชอบน้ำของโทโคฟีรอลมีปริมาณมากกว่า นอกจากนี้ลักษณะการมีขั้วของสารต้านอนุมูลอิสระยังมีผลต่อการทำงานของสารด้วย

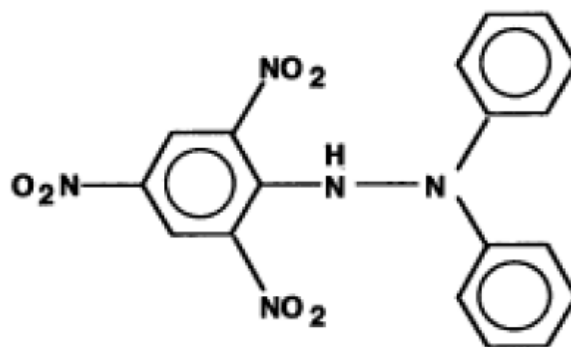
สารต้านอนุมูลอิสระสามารถวิเคราะห์ได้จากการใช้ diphenylpicrylhydrazyl หรือ DPPH ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานที่มีการนำมาใช้ในการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ โดยโมเลกุลของ 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl ; DPPH) มีลักษณะสำคัญคือ เป็นอนุมูลอิสระที่คงตัวโดยมีอิเล็กตรอนมากพอที่จะทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ แสดงดังภาพที่ 2.4 สารละลาย DPPH โดยปกติจะมีสีม่วง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ สีม่วงจะหายไป (Molyneux, 2004) ซึ่งจะต้องทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515-520 นาโนเมตร (Molyneux, 2004 ; Pokorny et al., 2000) เมื่อสารละลาย DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนอะตอม ส่งผลให้สารละลาย DPPH อยู่ในรูปที่ไม่มีอนุมูลอิสระ แสดงดังภาพที่ 2.5 สามารถแสดงการเกิดปฏิกิริยาได้อย่างง่ายตามสมการที่ 1



เมื่อ $Z^{\bullet}$ คือ อนุมูลอิสระจากสารละลาย DPPH ส่วน AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อ $Z^{\bullet}$ และ AH ทำปฏิกิริยากัน เกิดโมเลกุล ZH เป็นโมเลกุลของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีอนุมูลอิสระ และ $A^{\bullet}$ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอนุมูลอิสระในขั้นแรก หลังจากนั้นอนุมูลอิสระจะถูกควบคุมจำนวนจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ซึ่งจำนวนที่สามารถควบคุมอนุมูลอิสระคือ โมเลกุลจาก DPPH หรือสีม่วงที่หายไป (Molyneux, 2004)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของ diphenylpicrylhydrazyl ; DPPH ในลักษณะของอนุมูลอิสระ (Molyneux, 2004)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของ diphenylpicrylhydrazyl: DPPH ในลักษณะที่ไม่มีอนุมูลอิสระ (Molyneux, 2004)

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสมการที่ 1 ส่งผลให้เกิดการเชื่อมโยงถึงปฏิกิริยาที่จะมาแทนที่ปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากไขมันหรือเกิดจากไขมันชนิดไม่อิ่มตัวโมเลกุลจาก DPPH ($Z^{\bullet}$) จะสามารถทำให้อนุมูลอิสระเปลี่ยนรูปโดยมีสารตั้งต้นคือ AH ในการวัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สามารถเป็นข้อมูลในการคำนวณค่า IC_{50} (inhibition concentration DPPH 50%) หมายถึงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ลดลงร้อยละ 50 ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ (Molyneux, 2004) IC_{50} ถือว่าเป็นค่าที่สามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสำคัญ หากมีค่า IC_{50} ต่ำบ่งถึงสารสำคัญนั้นมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง ใช้สารสำคัญนั้นเพียงปริมาณเล็กน้อยก็สามารถลดความเข้มข้นของ DPPH ได้ถึงร้อยละ 50 (Kosar et al., 2007) มีการศึกษาของ Jayaprakash et al. (2007) เกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านการกลายพันธุ์ในสารสกัดจาก Cinnamomum โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบว่าในสารสกัดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงเมื่อนำไปเป็นตัวแทนทำละลาย ส่งผลทำให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน ซึ่งวัดจากปริมาณ β -carotene linoleate และ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

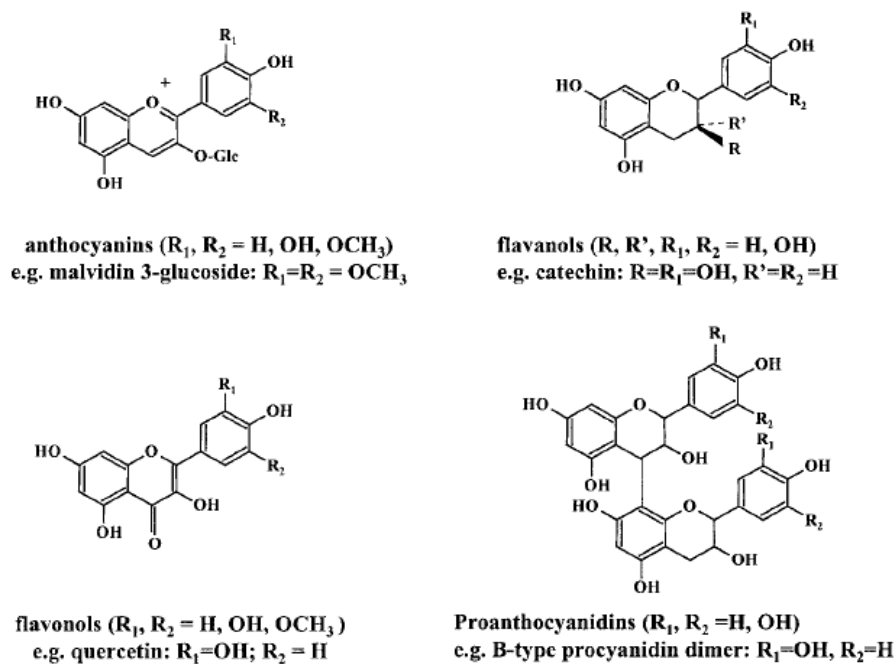
2.2.2 สารประกอบฟีนอลิก

เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในธรรมชาติ ซึ่งมีการศึกษาอย่างกว้างขวางว่ามีประโยชน์ต่อร่างกาย โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลจะเกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไปรวมกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) โดยน้ำตาลดังกล่าวอาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ก็ได้ แต่น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลคือ กลูโคส (glucose) นอกจากนี้ยังพบว่าจะมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยตัวเอง หรือสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) กรดอินทรีย์ (organic acid)

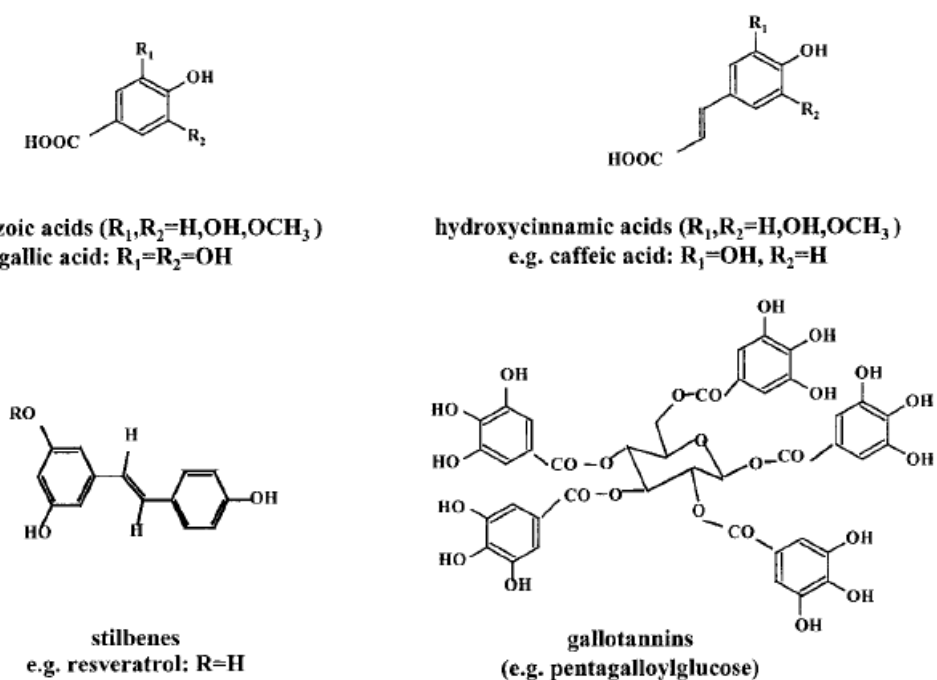
อะมีน (amine) และไขมันอีกด้วย (ระวีวรรณ และ ทรงพร, 2549) สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป ในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพลาโวนอยด์ รวมทั้งยังพบว่ามีการประกอบที่มีกลุ่มฟีนอลรวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) (ฐิติกานต์, 2551)

สารประกอบฟีนอลิกประกอบไปด้วยกลุ่มพลาโวนอยด์และไม่ใช้กลุ่มพลาโวนอยด์ (nonflavonoids) ในภาพที่ 2.6 แสดงกลุ่มพลาโวนอยด์ที่ประกอบไปด้วยวงแหวนของฟีนอลิก (phenolic ring) 2 วงแหวนและมีองค์ประกอบของหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่า 1 หมู่ เช่น พลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน ส่วนภาพที่ 2.7 แสดงกลุ่มที่ไม่ใช่พลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มกรดฟีนอลิก ได้แก่ กรดเบนโซอิก และกรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acid) (Cheynier, 2005) โดยมากเป็นสารที่มีขี้ผึ้ง ละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดี กลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคือ เมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไปแต่ในโครงสร้างของฟีนอลมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป (ระวีวรรณ และ ทรงพร, 2549)

มีการศึกษาของ Majhenic et al. (2007) เกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ด guarana (*Paullinia cupana*) โดยทำการศึกษาผลของตัวทำละลายและอุณหภูมิในการสกัดพบว่า ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำและสกัดที่อุณหภูมิห้องจะให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงมากกว่าการสกัดด้วยเมทานอลที่ 62 องศาเซลเซียส และยังมีค่าสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลที่ 75 องศาเซลเซียส



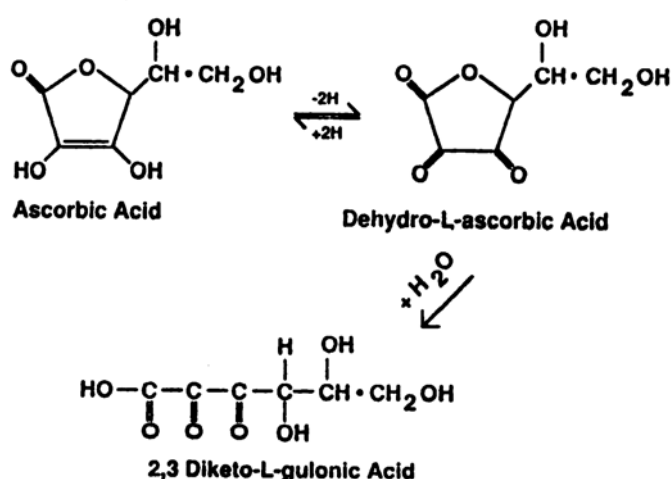
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มฟลาโวนอยด์
(Cheynier, 2005)



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มที่ไม่ใช่ฟลาโวนอยด์
(Cheynier, 2005)

2.2.3 วิตามินซี หรือ *L*-ascorbic acid

เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในผักผลไม้ทั่วไป ถือได้ว่าวิตามินซีเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อร่างกาย แต่วิตามินซีเกิดการสูญเสียได้ง่ายจากความร้อนในระหว่างการทำสุก วิตามินซีเป็นสารประกอบที่มีขั้วสูงจึงทำให้มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี วิตามินซีสามารถเปลี่ยนแปลงกลับไปมาเป็น dehydro-L-ascorbic acid โดยการออกซิไดซ์ แสดงโครงสร้างดังภาพที่ 2.8 กลไกในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซีคือ กำจัดสารประกอบออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาหรือ reactive oxygen species (ROS) เช่นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (สุรเชษฐ, 2011) และ superoxide radical (O_2^-) โดย superoxide dismutase จะ catalyze O_2^- ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาให้เปลี่ยนแปลงเป็น H_2O_2 และ O_2 หลังจากนั้น H_2O_2 จะถูกกำจัดโดยการเข้าจับกับวิตามินซี แล้วถูกเปลี่ยนเป็นน้ำ ส่วนวิตามินซีจะถูกเปลี่ยนไปเป็น dehydro-L-ascorbic acid และจะถูก hydrolyzed เปลี่ยนแปลงไปเป็น diketo-L-gulonic acid (Ushimaru et al., 2006)

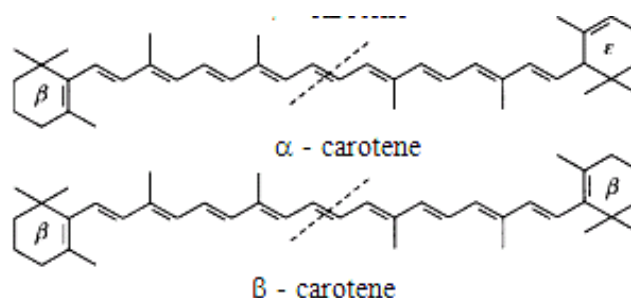


ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของ *L*-ascorbic acid, dehydro-L-ascorbic acid และ diketogulonic acid (Bode et al., 1990)

2.2.4 แคโรทีนอยด์

เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในคลอโรพลาสต์ของพืช และพบมากในผักและผลไม้สุก โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยมก็ได้ ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 2.9 แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามองค์ประกอบของโครงสร้างในโมเลกุลคือ แคโรทีน (carotene) ออกโซแคโรทีนอยด์ (oxocarotenoid) หรือ แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) โดยแคโรทีนเป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้า-แคโรทีน

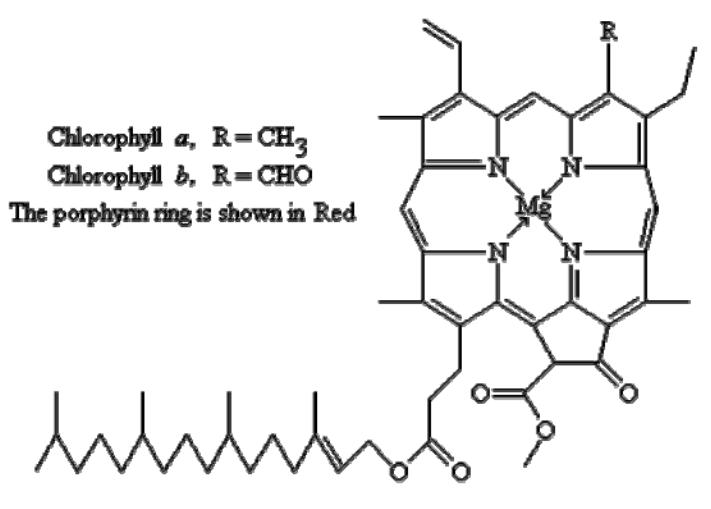
อัลฟา-แคโรทีน แกมมา-แคโรทีน ไลโคปีน เป็นต้น โดยเบต้า-แคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ การเปลี่ยนรูปจากเบต้า-แคโรทีนไปเป็นวิตามินเอ โดยการแตกพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุล โดยเอนไซม์ carotene deoxygenase เมื่อเบต้า-แคโรทีนสามารถดักจับอนุมูลอิสระเข้าไปในโมเลกุลแล้ว โมเลกุลของเบต้า-แคโรทีนจะอยู่ในลักษณะที่มีความเสถียร ส่วน ออกโซแคโรทีนอยด์ หรือ แซนโทฟิล เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้า-คริปโทแซนทิน (β -cryptoxanthin) และลูทีน (lutein) (จิตติกานต์, 2551)



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของอัลฟา-แคโรทีนและเบต้า-แคโรทีน
(Kwiatkowski, 2010)

2.2.5 คลอโรฟิลล์

เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นกลุ่มของรงควัตถุที่มีสีเขียวที่พบในพืชทั่วไป มีหน้าที่จับพลังงานแสง (primary light-accepting pigments) เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงซึ่งเกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์ คลอโรฟิลล์แบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์เอ มีสีเขียวแกมน้ำเงิน พบในพืชชั้นสูงทุกชนิดที่สังเคราะห์แสงได้ ส่วนคลอโรฟิลล์บี มีสีเขียวแกมเหลือง พบในพืชชั้นสูงทุกชนิดและสาหร่ายสีเขียว (green algae) คลอโรฟิลล์ซี พบในสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) และสาหร่ายสีทอง (golden algae) แต่ไม่พบในพืชชั้นสูง และคลอโรฟิลล์ดี พบในสาหร่ายสีแดง (red algae) แต่ไม่พบในพืชชั้นสูง โดยทั่วไปจะพบทั้ง คลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี อยู่ด้วยกันในพืชชั้นสูง โดยมีสัดส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บีประมาณ 2.5-3.5 ต่อ 1 (จิตติกานต์, 2551)



ภาพที่ 2.10 โมเลกุลของคลอโรฟิลล์ (จิติกานต์, 2551)

โมเลกุลของคลอโรฟิลล์ประกอบด้วยส่วนหัวของ porphyrin ring ซึ่งมี Mg อยู่ตรงกลาง และส่วนหางซึ่งเป็น long chain hydrocarbon เรียกว่า phytol ส่วนคลอโรฟิลล์มีแตกต่างจาก คลอโรฟิลล์เอที่ aldehyde group ($-\text{CHO}$) ซึ่งจะแทนที่ methyl group (CH_3) ที่ตำแหน่งที่ 3 เท่านั้น แสดงดังภาพที่ 2.10 คลอโรฟิลล์มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจึงไม่ละลายในน้ำ คลอโรฟิลล์เป็น สารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ไม่ละลายในน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ คลอโรฟิลล์เป็นสารสีเขียวที่พบในพืชทั่วไป ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่พบในสาหร่ายโดยทั่วไปปกติมี ประมาณร้อยละ 0.5-1.5 ของน้ำหนักแห้ง และสามารถเพิ่มสูงได้ถึงร้อยละ 6 ในสาหร่ายที่เลี้ยงไว้ใน ที่มีแสงอ่อนๆ คลอโรฟิลล์มีในโตรเจนเป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง จากสูตรโมเลกุลของ คลอโรฟิลล์เอคำนวณได้ว่า คลอโรฟิลล์เอมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณร้อยละ 8.22 ของน้ำหนักโมเลกุล คลอโรฟิลล์ที่นำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารวางขายกันทั่วไปในตอนี้ ความจริงก็เป็นส่วนผสมอาหารชนิดหนึ่งที่ทำให้สีเขียวนั่นเอง มีชื่อว่า โซเดียมคอปเปอร์คลอโรฟิลลิน (sodium copper chlorophyllin) เป็นการดัดแปลงโครงสร้างคลอโรฟิลล์ตามธรรมชาติ ทำให้ได้สาร คลอโรฟิลล์ที่ยังคงมีสีเขียวอยู่ แต่มีความคงตัวและสามารถละลายน้ำได้ดี จึงนำมาใช้เป็นส่วนผสม อาหารสำหรับผสมในเครื่องดื่ม ซึ่งองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US FDA) รับรองความปลอดภัยเฉพาะคลอโรฟิลล์ชนิดที่ละลายน้ำเท่านั้น (จิติกานต์, 2551) อย่างไรก็ตามพบว่าในใบ ยานางมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูง จึงเป็นไปได้ว่าในสารสกัดใบยานางก็มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงเช่นกัน

คลอโรฟิลลินเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ที่มีประสิทธิภาพดีพอๆกับ เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี และวิตามินอี คลอโรฟิลลินมีฤทธิ์ต้านทานสารก่อกลายพันธุ์ แต่กลไกต้านทานการกลายพันธุ์ของคลอโรฟิลลินยังไม่กระจ่างชัด อาจเป็นผลมาจากคลอโรฟิลลินเป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ active group ของสารก่อกลายพันธุ์หรือป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสารก่อกลายพันธุ์เพื่อไปอยู่ในรูปที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยทางอ้อม

สำหรับแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์เป็นสารให้สีตามธรรมชาติ ซึ่งจะพบมากในพวกพืชที่มีสีเขียว เช่น ในบร็อคคอลลีมีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 42 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่างสด และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมี 52 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่างสด เป็นต้น อุณหภูมิและพีเอชจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ (Ferruzzi et al., 2007) สารจำพวกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะมีการเปลี่ยนแปลงและมีการสูญเสียจากอุณหภูมิและสภาวะการเก็บรักษา ทำให้มีอายุการเก็บรักษาสั้นลง จึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการป้องกันหรือปกป้องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ไว้ (บรรจง, 2002) นอกจากนี้ สารกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระที่ประกอบไปด้วยสารกลุ่มฟีนอลิกจะมีความไวต่อการดูดซับออกซิเจนและอนุมูลอิสระได้ดี จึงทำให้เกิดการสูญเสียสภาพได้ง่าย จึงต้องมีการเก็บรักษาสารกลุ่มนี้ไว้ในรูปแบบต่าง ๆ (Javanmardi et al., 2003)

2.3 การทดสอบความเป็นพิษ

2.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ หมายถึง การรักษาสภาพมีชีวิต การเจริญเติบโต และพัฒนาการของเซลล์สัตว์ ภายใต้สภาวะนอกร่างกาย (ในอาหารเลี้ยงเซลล์) ที่เหมาะสม ติดต่อกันเป็นเวลานาน เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เกิดขึ้นจากความต้องการศึกษาพฤติกรรมและกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ที่ปลดจากการรบกวนของปัจจัยต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากตัวสัตว์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ สายพันธุ์ (cell lines) หรือเซลล์จากอวัยวะสิ่งมีชีวิต (primary cell culture) หรือการใช้ subcellular preparations (ส่วนประกอบระดับเซลล์) โดยเฉพาะเพื่อใช้ในการวิจัยทางด้านเภสัชวิทยา และพิษวิทยา ซึ่งก่อนหน้านี้อาศัยเฉพาะสัตว์ทดลองเท่านั้น การทดลองโดยวิธีการที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ดังกล่าวจัดเป็นการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (in vitro test) ซึ่งเป็นการศึกษาถึง ข้อมูลเบื้องต้นหรือข้อมูลขั้นพื้นฐานในระดับเซลล์เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาขั้นสูงในสัตว์ทดลอง (in vivo test) ต่อไปตลอดจนการนำผลที่ได้มาใช้ทดลองทางคลินิกในคนในที่สุด อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในเซลล์สายพันธุ์ (cell lines) อาจเป็นเพียงข้อมูลขั้นพื้นฐานซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อในเซลล์จากอวัยวะของสิ่งมีชีวิต (primary cell culture) ทั้งนี้ขึ้นกับการนำไปใช้ว่าต้องการความเฉพาะเจาะจงถึงขั้นไหน ตัวอย่างเช่น งานวิจัยทางด้านเภสัชวิทยาที่เน้นไปในแง่พิษวิทยานั้นเป็นการศึกษาถึงขบวนการเมตาบอลิซึมซึ่งรวมไปถึงการกำจัดยาหรือสารเคมีที่เข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากขบวนการดังกล่าวเป็นหน้าที่ของอวัยวะตับและไต ดังนั้นการทดสอบในหลอดทดลองจึงจำเป็นต้องใช้เซลล์ที่ได้มาจากอวัยวะนั้น ๆ โดยอาศัยกระบวนการแยกเซลล์จากอวัยวะดังกล่าวเพื่อนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองและทำการทดสอบต่อไป

จะเห็นว่า primary cell culture มีประโยชน์ต่อการศึกษาด้านเภสัชวิทยาและพิษวิทยา โดยเฉพาะการทดสอบในแง่การตรวจกรอง (screening) หรือการศึกษาเชิงเปรียบเทียบก่อนที่จะตัดสินใจเลือกใช้โมเดลสัตว์ทดลองที่เหมาะสม เพราะวิธีดังกล่าวเป็นการช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองเนื่องจากจำนวนเซลล์ตับหรือไตที่ได้จากหนูทดลอง 1 ตัว สามารถนำมาเตรียมเป็น

เซลล์ได้จำนวนมากสำหรับใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้ยังเป็นการลดต้นทุนในการทดลองอีกด้วยข้อได้เปรียบของการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (in vitro test) คือ ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือสูงระดับหนึ่งเพราะเป็นการทดสอบในเซลล์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยที่สุดของสิ่งมีชีวิตชั้นตอนและวิธีการทาง่ายไม่ซับซ้อนเมื่อเทียบกับการทดสอบในสัตว์ทดลอง ไม่มีผลรบกวนจากระบบไหลเวียนโลหิต และระบบฮอร์โมนทำให้ยากต่อการแปรผล ปริมาณสารที่ใช้ทดสอบใช้ในปริมาณน้อย สามารถทดสอบจำนวนตัวอย่างหลายตัวอย่างในการเตรียมเซลล์แต่ละครั้ง

ดังนั้นเห็นได้ว่า เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นทางเลือกหนึ่ง เพื่อทดแทนการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองในอนาคต จากการศึกษาของ National Research Council ของสหรัฐฯ สรุปผลว่า การทดสอบสารเคมีในสัตว์ทดลองเพื่อวัดความเป็นพิษในมนุษย์นั้นควรจะลดลงและยกเลิกในที่สุด และเสนอว่าควรมีการทดลองในเซลล์ เซลล์ไลน์ (cell line) หรือส่วนประกอบของเซลล์ (cellular compound) ทดแทน ทั้งนี้เนื่อง จากวิทยาศาสตร์มีความก้าวหน้าในด้านระบบชีววิทยา และมีการค้นพบวิธีต่างๆในการทดสอบเซลล์และเนื้อเยื่อซึ่งเป็นพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงที่สามารถนำไปใช้ในการตัดสินใจถึงความเสี่ยงของสารเคมี (risk chemical) ที่มีต่อมนุษย์ ช่วยให้ นักวิทยาศาสตร์พิจารณาถึงผลของการสัมผัสสารเคมีว่าอยู่ในระดับใดจึงจะมีผลทำให้การทำงานของเซลล์และระบบชีวเคมีของร่างกายได้รับผลกระทบจนก่อให้เกิดโรค (Oonsivilai et al., 2007, 2008)

2.3.2 การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์

เป็นการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ขึ้นในเซลล์สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจลดการตายของเซลล์เนื่องจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) และเซลล์ที่ตาย (dead cell) หรือทดสอบจากการทำงานของไมโทคอนเดรีย และคำนวณเซลล์ที่มีชีวิต เป็นร้อยละของความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability)

2.3.2.1 วิธี MTT reduction assay

หลักการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT reduction assay คือการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยวัดจาก 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 เป็นตัวที่ทำให้ปฏิกิริยา reduction สมบูรณ์โดยผ่าน $FADH_2$ และ $FADH_2$ สามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ไปเป็น formazan ที่มีสีน้ำเงินและตกตะกอนใน mitochondria โดยการทดสอบนี้ต้องการ disodium succinate เป็นตัวตั้งต้นเมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์มีผลทำให้มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำเงิน และระดับของการเปลี่ยนสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ enzymatic reduction ของ

tetrazolium salt ผลึกของ MTT formazen สามารถละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ก่อนที่จะนำไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าที่อ่านได้จะบอก mitochondrial activity และเซลล์ที่มีชีวิต

โดย สามารถคำนวณ %cell viability จากสมการ

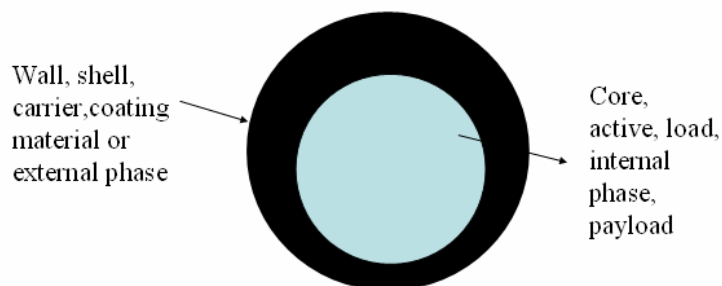
$$\% \text{cell viability} = (\text{Absorbance of treated cell} / \text{Absorbance of control cell}) \times 100$$

2.3.2.2 Caco-2 human intestinal cells

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

2.4 กระบวนการเอนแคปซูล (เบญจา, 2553)

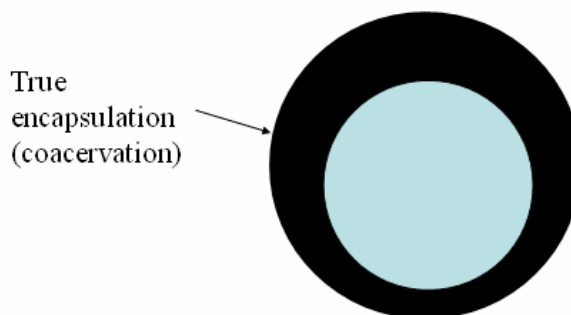
กระบวนการเอนแคปซูลเป็นกระบวนการที่สารหรือส่วนผสมของสารถูกเคลือบด้วยสารชนิดอื่น สารที่ถูกเคลือบหรือถูกยึดจับไว้ส่วนใหญ่จะเป็นของเหลว แต่บางครั้งอาจเป็นอนุภาคของแข็งหรือก๊าซซึ่งจะเรียกชื่อแตกต่างกันไปเช่น core material หรือ internal phase สารที่นำมาเคลือบจะเรียกว่า wall material, carrier, membrane, shell หรือ coating โดยมีลักษณะโครงสร้างทั่วไปดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 โครงสร้างของแคปซูล (เบญจา, 2553)

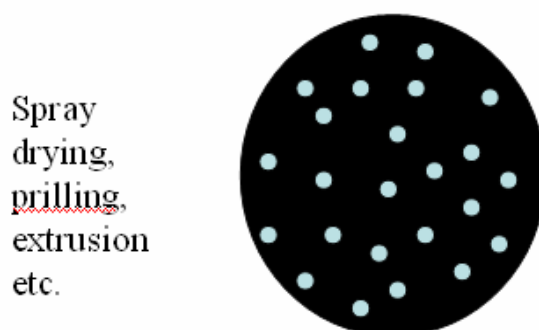
2.4.1 ชนิดของแคปซูลที่ผลิตโดยใช้เทคนิคเอนแคปซูเลชัน

2.4.1.1 Single core (True encapsulation) เป็นรูปแบบของแคปซูลที่ได้จากการเอนแคปซูเลทโดยใช้เทคนิค coacervation โดยมีลักษณะโครงสร้างทั่วไปดังภาพที่ 2.12



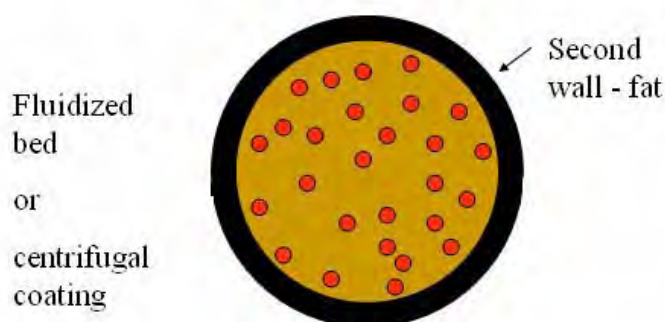
ภาพที่ 2.12 แคปซูลแบบ single core (เบญจา, 2553)

2.4.1.2 Multi-core หรือ matrix encapsulation เป็นรูปแบบของแคปซูลของสารให้กลิ่นรสส่วนใหญ่ที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย สเปรย์ซิลลิง สเปรย์คูลลิง เอ็กซ์ทรูชันในการเอนแคปซูเลท โดยมีลักษณะโครงสร้างทั่วไปดังภาพที่ 2.13



ภาพที่ 2.13 แคปซูลแบบ multi-core หรือ matrix encapsulation (เบญจา, 2553)

2.4.1.3 Multi-wall หรือ control release เป็นรูปแบบของแคปซูลของสารให้กลิ่นรสที่มีการเคลือบผิวครั้งที่สองโดยใช้ เทคนิค fluidized bed หรือ centrifugal coating ทำให้สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารให้กลิ่นรสในสภาวะที่ต้องการได้ โดยมีลักษณะโครงสร้างทั่วไปดังภาพที่ 2.14



ภาพที่ 2.14 แคปซูลแบบ matrix encapsulation ที่มีการเคลือบผิว 2 ชั้น (เบญจา, 2553)

การเอนแคปซูลสารให้กลิ่นรสสามารถปกป้องสารให้กลิ่นรสที่อาจทำปฏิกิริยากับส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร ลดการเกิดกลิ่นแปลกปลอมที่เกิดจากสารให้กลิ่นรสทำปฏิกิริยากัน ปกป้องสารให้กลิ่นรสจากแสงและ/หรือปฏิกิริยาออกซิเดชัน ยืดอายุการเก็บ รักษาสารให้กลิ่นรส หรือควบคุมการปลดปล่อยสารให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหาร

2.4.2 เทคนิคที่นิยมใช้ในการเอนแคปซูล (encapsulation techniques)

2.4.2.1 การเอนแคปซูลโดยใช้วิธีทางเคมีด้วยวิธี coacervation การเอนแคปซูลโดยใช้เทคนิคนี้ใช้ปรากฏการณ์การเกิดคอลลอยด์ซึ่งประกอบไปด้วย เฟส 3 เฟสซึ่งไม่ละลายซึ่งกันและกัน ได้แก่ เฟสต่อเนื่อง (continuous phase) เฟสของสารที่จะนำมาเอนแคปซูลและเฟสของสารเคลือบ การทำให้เกิดการเคลือบผิวในกรณีนี้จะเกี่ยวข้องกับการปรับสภาพของคอลลอยด์ที่ชอบน้ำ 2 ชนิด ซึ่งมีประจุต่างกันให้อยู่ในสภาวะที่ประจุเป็นกลางและเคลือบอยู่บนผิวของสารแกนกลาง ซึ่งมีขั้นตอนการเอนแคปซูลโดยใช้เทคนิค coacervation ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน คือ การเกิดอนุภาคหรือหยดของเหลวที่มีขนาดเล็ก หลังจากนั้นจะมีการเกิด coacervative wall และสุดท้ายจะเป็นการแยกแคปซูลที่ได้ออกจากสารละลาย

การเอนแคปซูลโดยใช้เทคนิคนี้จะต้องทำการควบคุมการผสมเพื่อให้สารเคลือบเคลือบบนผิวของสารแกนกลางอย่างสม่ำเสมอ สารเคลือบที่ใช้ได้แก่ เจลาติน การเคลือบผิวรอบๆ สารแกนกลางเกิดจากการดูดซับส่วนที่ชอบน้ำที่บริเวณผิวของสารแกนกลาง การเติม electrolyte เข้าไปในระบบจะทำให้เกิดการตกตะกอนของคอลลอยด์ โดย electrolyte จะไปทำให้ประจุเป็นกลาง ซึ่งจะช่วยให้เกิดการเคลือบที่บริเวณผิวของสารแกนกลาง จากนั้นทำให้แคปซูลที่ได้อยู่ในรูป solid microcapsule โดย desolvation หรือ thermal cross-linking

2.4.2.2 การเอนแคปซูลโดยใช้เครื่องมือ (Mechanical processes) โดยเทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย การอบแห้งแบบพ่นฝอยเป็นเทคนิคการเอนแคปซูลที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิตสารให้กลิ่นรส เนื่องจากเครื่องมือหาได้ง่าย และต้นทุนการผลิตโดยวิธีการนี้จะต่ำกว่าวิธีอื่น ขั้นตอนการเอนแคปซูลโดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย

ประกอบไปด้วย การนำตัวกลางที่ใช้ในการเคลือบ เช่น มอลโตเดกซ์ทริน (maltodextrin) แป้งดัดแปร (modified starch) หรือ กัม (gum) มาละลายน้ำ จากนั้นนำสารให้กลีนิรสที่ต้องการนำมาเอนแคปซูลเหลวมาผสมกับสารละลายของตัวกลางที่ใช้ในการเคลือบ โดยทั่วไปอัตราส่วนของสารเคลือบและสารแกนกลางจะอยู่ในช่วง 4 ต่อ 1 นำส่วนผสมที่ได้ไปผ่านกระบวนการโฮโมจีไนซ์ (homogenize) เพื่อให้เกิดหยดของสารให้กลีนิรส ซึ่งการใช้การอบแห้งแบบพ่นฝอยจะมีข้อดีคือต้นทุนการผลิตต่ำ เครื่องมือที่ใช้สามารถหาได้ง่าย สามารถปกป้องสารแกนกลางได้เป็นอย่างดี และสามารถเลือกใช้ตัวกลางในการเคลือบได้หลายชนิด แต่การใช้การอบแห้งแบบพ่นฝอยก็ยังมีข้อด้อยอยู่ เช่นอาจเกิดการสูญเสียสารให้กลีนิรสที่มีจุดเดือดต่ำระหว่างกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย หรืออาจมีสารแกนกลางติดที่ผิวของแคปซูลซึ่งอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์ที่ได้

การเอนแคปซูลเหลวโดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นผงที่ละเอียดมาก โดยทั่วไปขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคอยู่ในช่วง 10-100 ไมครอน ซึ่งอาจจะต้องนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปผ่านกระบวนการ agglomeration โดยใช้ fluidized bed process เพื่อทำให้อนุภาคที่ผ่านการเอนแคปซูลเหลวสามารถละลายได้ทันที หรือละลายได้ง่ายขึ้นเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่อยู่ในรูปของเหลว (เบญจา, 2553)

2.4.3 ไมโครเอนแคปซูลเลชัน (Microencapsulation)

ไมโครเอนแคปซูลเลชัน หมายถึง กระบวนการที่ของเหลวหรืออนุภาคถูกห่อหุ้มให้อยู่ในรูปของแคปซูลด้วยพอลิเมอร์เป็นชั้นบาง ๆ เกิดเป็นแคปซูลขนาดเล็กซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 1 ไมครอน จนถึง 1,000 ไมครอน มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์มากมาย ที่มาของเทคโนโลยีดังกล่าว เริ่มต้นจากกระดาษที่ใช้ในการถ่ายเอกสาร (Carbonless copy paper) ซึ่งถือเป็นจุดกำเนิดของการใช้เทคโนโลยีไมโครเอนแคปซูลเลชัน โดยมีการเคลือบแคปซูลของหมึกพิมพ์ลงบนกระดาษแผ่นที่อยู่ด้านบนและใส่กระดาษที่ต้องการใช้เป็นส่วนล่างไว้ด้านล่าง เมื่อมีแรงกดจากการเขียนหรือพิมพ์ แคปซูลของหมึกพิมพ์ที่อยู่บนกระดาษที่อยู่ด้านบนจะแตกออกทำให้เกิดเป็นข้อความหรือรูปภาพต่าง ๆ บนกระดาษที่เป็นส่วนล่าง (เอกลักษณ์, 2552)

สาเหตุที่ต้องมีการใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูลเลชัน ได้แก่

- เนื่องจากสารบางชนิดมีความไวต่อสภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น แสงแดด ออกซิเจน น้ำ เป็นต้น ทำให้มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป
- เนื่องจากสารบางชนิดระเหยได้ง่าย หากไม่มีแคปซูลมาป้องกันอาจจะเหือดหมด
- ช่วยให้การนำไปใช้งานเช่น การเปลี่ยนสารที่เป็นของเหลวให้อยู่ในรูปแคปซูลที่เป็นของแข็ง ง่ายแก่การนำไปผสมกับสารอื่น และไม่จับตัวเป็นก้อน

- สามารถควบคุมการทำงานของสารให้มีการปลดปล่อยสารในบริเวณที่เหมาะสม และยังคงความสิ้นเปลืองในการใช้สาร

ไมโครเอนแคปซูเลชัน เป็นกระบวนการเคลือบหรือกักเก็บสารที่มีสถานะของเหลวหรือก๊าซให้อยู่ภายในวัสดุห่อหุ้มให้สารสามารถคงตัวอยู่ได้ (Mathiowitz, 1999) ต้องมีการควบคุมส่วนผสมของพอลิเมอร์ที่เคลือบอยู่ด้านนอก ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง ที่มีการทำขนาดให้เล็กประมาณ 10-500 micron ทำให้ง่ายต่อการซึมซับส่วนผสมเข้าไปในร่างกาย เพียงพอต่อการนำไปใช้ การเลือกพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการเป็นตัวเคลือบ ในขมั้นมีการใช้ Ethylcellulose เป็นพอลิเมอร์ที่ใช้เคลือบ ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและไม่ชอบน้ำ นิยมใช้ในการเคลือบยา (Hu et al., 1998) ซึ่งทำให้การดูดซึมเป็นไปอย่างช้า ๆ และไม่ละลายง่าย จึงทำให้ร่างกายนำไปใช้ได้ช้าเมื่อบริโภคเข้าทางปาก (Ravidranath & Chandrasekhara, 1980) ในโอเมก้า-3 มีการใช้ sugar-beet pectin ซึ่งเป็นทางเลือกแทนโปรตีนหางนมและ gum arabic นิยมนำมาใช้ในพวกส่วนผสมของอาหาร เพื่อป้องกันการเกิด oxidation ของโอเมก้า-3 ซึ่งเป็นไขมันไม่อิ่มตัว จึงมีการนำเอาเทคนิค Spray-drying มาใช้ในการทำ microencapsulation โดยให้มีความเข้มข้นของ Sugar-beet pectin ประมาณ 1.1 หรือ 2.2% ใน glucose syrup ซึ่งพบว่าใน 2.2% สามารถกักเก็บโอเมก้า-3 ได้ถึง 50% ในวิตามินซี มีการใช้พอลิเมอร์ Tripolyphosphate (TPP) ทำให้เกิดพันธะกับ chitosan (CS-TPP) โดยใช้เทคนิค Spray-drying ในสภาวะที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยการผลิต เช่น อุณหภูมิขาเข้า อัตราการไหลของเหลว ความเข้มข้นและปริมาณของ 1% TPP solution (Drusch, 2006) และ Liposomal encapsulation nano technology (LET) เป็นการทำให้ส่วนที่เป็น hydrophilic จับกับด้านที่เป็น hydrophilic และ hydrophobic จับกับด้าน hydrophobic ทำให้เกิดเป็น Bubble หรือที่เรียกว่า liposome จึงมีการบรรจุวิตามินซีเข้าไปข้างใน โดยทำที่ความดันมากกว่า 1700 psi โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารจะพวก binder, fillers, gelatin, capsule materials, dyes, sweeteners, flavorings ทำให้มีการดูดซึมได้อย่างรวดเร็ว ง่ายต่อการนำไปซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ (Livon Laboratory, Inc., 2006) ใน Catechin ในชาเขียว มีการใช้พอลิเมอร์ Tripolyphosphate (TPP) ทำให้เกิดพันธะกับ Chitosan (CS-TPP) มีการผสมระหว่าง Chitosan กับ Catechins ประมาณ 30 นาที ก่อนที่จะเติม TPP ทำให้ได้โมเลกุลระหว่าง 30-150 KDa ซึ่งทำให้ได้ขนาดเล็กเป็นหน่วย nano (Hu et al., 2008) ในวิตามิน D2 ใช้โปรตีนเคซีนในการทำ nano encapsulation (Daniell, 2006) ในวิตามิน B12 ใช้ Double emulsion (water in oil in water, w/o/w) เป็นกระบวนการที่น้ำเป็น Disperse phase อยู่ในเม็ดไขมัน ซึ่งเม็ดไขมันนี้จะเป็นเฟสกระจายของน้ำอีกที เทคนิคนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากความไม่คงตัวของน้ำภายใน ซึ่งปัญหา

ดังกล่าวแก้ไขโดยใช้ protein polysaccharide conjugate และนอกเหนือจากนี้ส่วนที่นำมาทำตัวเคลือบนั้นยังมี Maltodextrin รวมกับ whey protein isolate จะมีการสร้างพันธะ Covalent bond ตัวนี้จึงเป็นทางเลือกแทนการใช้ gum Arabic โดยมีคุณสมบัติคือ สามารถทนสภาวะที่มีความร้อนสูง และมีความเสถียรในกรด (citrus oil, orange oil) (Daniell, 2006)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

เตรียมตัวอย่างใบย่านางอบแห้ง ตามวิธีของ Singthong et al. (2009) โดยนำใบย่านางจากเกษตรกรท้องถิ่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดอุบลราชธานี) ล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นบดให้ละเอียด ทำการบรรจุใส่ถุงพร้อมปิดผนึกแบบสุญญากาศสำหรับการทดลองต่อไป

3.2 การเตรียมสารสกัดใบย่านาง

การเตรียมสารสกัดจากใบย่านาง โดยดัดแปลงจากวิธีของ Oonsivilai et al. (2007) โดยชั่งตัวอย่างย่านางอบแห้ง 100 มิลลิกรัม เติมน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส / เอทานอล / อะซิโตน 12 ml นำไปเขย่าด้วย shaking water bath ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 3000 x g นาน 3 นาที เก็บส่วนใสโดยการกรองด้วยวิธีสุญญากาศ (vacuum) แล้วนำตะกอนที่เหลือไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ปริมาตรส่วนใสให้ครบ 50 มิลลิลิตร จากนั้นบีบตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง แล้วนำไปทำให้แห้งด้วย Freeze dryer สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

3.3 การศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบย่านาง

3.3.1 ปริมาณ Total phenolic

ศึกษาปริมาณ Total phenolic content โดยวิธี Folin-caicalteu method ดัดแปลงจากวิธีของ Oonsivilai et al. (2007) โดยทำการละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลาย น้ำ หรือ อะซิโตน หรือ เอทานอล แล้วบีบอัดสารละลายตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำ 1.58 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ทิ้งไว้ 5 นาที เติมน้ำโซเดียมคาร์บอเนต (20% w/v) 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วจึงเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และหา Total phenolic compound โดยใช้ gallic acid เป็นมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นของ gallic acid ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานคือ 0 , 50 , 100 , 150 และ 200 ppm ใน 95% เอทานอล ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปสมมูลของมิลลิกรัม gallic acid (GAE) ต่อ 100 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง

จากนั้นทำการศึกษา Phenolic profile ตามวิธีของ Oonsivilai et al. (2007) ด้วยเครื่อง HPLC (Water model 2695 HPLC system) และตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดแบบ PDA (model 2996 photodiode array detector) โดยใช้คอลัมน์แบบ reverse phase (NovaPak C18: 3.8 mm

i.d. x 150 mm) สารประกอบฟีนอลิกแยกด้วย binary mobile phase (2% acetic acid และ acetonitrile) แบบ gradient ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3.3.2 ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ

3.3.2.1 วิธี DPPH radical scavenging activity

โดยนำสารสกัดใบย่านางที่ได้มาศึกษาปริมาณ Total antioxidant capacity โดยใช้วิธี DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) method โดยใช้ Spectrophotometer ทำได้โดยตั้งค่า Spectrophotometer ที่ช่วงแสง 515 nm ดัดแปลงจากวิธีของ Brand-Williams et al. (1995) ซึ่งจัดเตรียมสาร DPPH โดยละลาย DPPH 12 มิลลิกรัม ใน Methanol 100% 50 มิลลิลิตร (Stock solution) เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส (เก็บไว้ไม่เกิน 5 วันต่อการเตรียมหนึ่งครั้ง) หลังจากนั้นนำ Stock solution มา dilute 1:5 ใน Methanol 100% เพื่อทำเป็น Daily solution สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ในแต่ละวัน อันดับแรกทำการเติม 950 ไมโครลิตร ของ Daily solution ใน cuvette วัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) เริ่มต้นที่ 515 นาโนเมตร บันทึกค่า หลังจากนั้น เติม 50 ไมโครลิตร สารสกัดใส (supernatant) หรือ สารมาตรฐาน (ascorbic acid standard และ BHT) ความเข้มข้นต่างๆสำหรับทำ standard curve (0-100 มิลลิกรัม) ผสมทั้ง 2 ส่วนให้เข้ากันโดยใช้ Parafilm ปิดขนาดพอเหมาะกับ cuvette ปิดที่ปากแล้วพลิก cuvette เบาๆกลับไปมา 2-3 ครั้ง เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ก่อนที่จะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 nm ครึ่งสุดท้ายนำค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นและค่าดูดกลืนแสงครั้งสุดท้ายมาลบกัน แล้วให้ค่าความแตกต่างไปทำ standard curve เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า Total antioxidant activity ในตัวอย่างต่อไป คำนวณหาค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเทียบกับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิก และ BHT

3.3.2.2 วิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)

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

ในการทดสอบด้วยวิธีนี้ ดัดแปลงจากวิธีของ Bae & Suh (2007) โดยใช้สารสกัดปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลาเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร โดยทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย ferric sulfate ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100-2000 μM โดยทำการทดลองจำนวนสามซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

3.3.2.3 วิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

เตรียมสารละลาย ABTS⁺ cation radical โดยการผสมสารละลาย ABTS 14 mM 5 ml และ 4.9 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈) 5 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนใช้น้ำสารละลาย ABTS⁺ มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.700 ± 0.020 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นปิเปตสารละลาย ABTS⁺ 950 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 50 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอร์บิก และ BHT เป็นชุดควบคุม (Bae & Suh, 2007)

3.3.3 ปริมาณวิตามินซี (Ascorbic acid)

การวิเคราะห์วิตามินซี ตามวิธีของ AOAC (1995) โดยนำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร เติม HPO₃-HOAc 2 มิลลิลิตร ไตเตรททันทีกับ indophenols standard solution ขณะเดียวกันก็ต้องไตเตรท blank เพื่อเปรียบเทียบโดยใช้ HPO₃-HOAc แทนสารละลายตัวอย่าง คำนวณได้ดังนี้

$$\text{mg ascorbic acid / ml sample} = (X-B) * (F/10)$$

เมื่อ X คือ ปริมาณ indophenol standard ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง

B คือ ปริมาณ indophenol standard ที่ใช้ในการไตเตรท blank

F คือ จำนวน mg ascorbic acid ที่สมมูลกับ indophenol standard 1 ml

3.3.4 ปริมาณแคโรทีนอยด์ (Total Carotenoid)

การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด จัดแปลงจากวิธีของ Wongsas et al. (2010) และ Oliveira et al. (2010) โดยนำตัวอย่างมาสกัดโดยใช้ acetone:ethanol (1:1 v/v) จากนั้นนำตัวอย่างมา centrifuged ที่ 1500 x g นาน 15 นาที ที่ 4-5 องศาเซลเซียส นำส่วนใสปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่สกัดได้ ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 450 nm คำนวณค่าจากสมการ

$$\text{Total Carotenoids (mg g}^{-1}\text{)} = \frac{Ab \times V \times 10^6}{A^{1\%} \times 100G}$$

เมื่อ Ab = ค่าที่ได้จากการดูดกลืนแสงที่ 470 nm

V = ปริมาณสารที่สกัดได้

A^{1%} = สัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสงเฉพาะของแคโรทีนอยด์ที่ความยาวคลื่น 450 nm

โดยใช้ acetone เป็นสารสกัด มีค่าเท่ากับ 2500

G = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

3.3.5 ปริมาณคลอโรฟิลล์ (Total Chlorophyll)

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ดัดแปลงจากวิธีของ Ramesh & Devasenapathy (2006) โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วย acetone ความเข้มข้น 80 % ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำส่วนใสมาปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตรโดย acetone ความเข้มข้น 80 % หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 652 nm คำนวณค่าจากสมการ

$$\text{Total Chlorophyll (mg g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{OD at 652 nm} \times V}{34.5 \times \text{WE}}$$

เมื่อ WE = น้ำหนักของสารสกัดใบย่นาง

V = ปริมาตรของส่วนใสที่สกัดได้

34.5 = สัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสงเฉพาะของคลอโรฟิลล์ที่ความยาวคลื่น 652 nm

3.4 ศึกษาความเป็นพิษ

3.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cell) ได้รับจากมหาวิทยาลัยนครสวรรค์ จังหวัดพิษณุโลก โดยใช้ passage ที่ 29-32 ทำการเลี้ยงเซลล์ใน 75-T flask (ขนาด 75 cm²) โดยเซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงเริ่มต้น เท่ากับ 4x10⁵ cells/cm² และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ คือ complete medium ที่มีกลูโคสในปริมาณสูง (DMEM) ใช้ 10.0 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) กรดอะมิโนไม่จำเป็น (non-essential amino acid) 10 มิลลิลิตร/ลิตร แอล-กลูตามีน (L-glutamine) 2.0 มิลลิโมล/ลิตร แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เจนตาไมซิน (gentamicin) 50 มิลลิกรัม/ลิตร HEPES 15 มิลลิโมล/ลิตร และ โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) 44 มิลลิโมล/ลิตร

3.4.2 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

เลี้ยง Caco-2 cell line ใน 96-well plate โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 500 เซลล์/ช่อง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดวางจืดที่เตรียมได้เจือจางด้วยแอทานอล และละลายสารสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ ซึ่งอยู่ในช่วง 2 µg/ml ถึง 600 µg/ml โดยใช้ DMSO 0.1% เป็นตัวอย่างควบคุม ทำการบ่มสารสกัดใน Caco-2 cell line เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าว เปิดสารสกัดออกจากเซลล์ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใหม่ บ่มต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบด้วย MTT โดยเติม MTT ที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml ใน PBS ปริมาตร 50 µl ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์และ MTT ออก แล้วล้างด้วย DMSO ปริมาตร 200 µl และ Sorensen's Glycine Buffer, pH 10.5 ปริมาตร 25 µl นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร นำไปหาพล็อตกราฟ dose-response โดยพิจารณาที่ความเข้มข้นของสารสกัดจำนวน 8 ระดับ ใช้ค่าเฉลี่ยของแต่ละความ

ระดับเข้มข้น จาก 96-well plate จำนวน 4 ช่อง แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถทำลายเซลล์ได้ 50% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด (Muangnoi, 2007)

3.5 ศึกษาการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ (Antimutagenicity)

นำสารสกัดย่านางที่สกัดด้วยน้ำมาทดสอบสมบัติทางชีวภาพในการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ (Antimutagenicity) โดยวิธี Salmonella test (Ames test) ดัดแปลงจากวิธีการของ Oonsivilai และคณะ (2007) โดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 (Moltox; Boone, NC, USA) ซึ่งเป็นการทดสอบการกลายพันธุ์จากการเลื่อนของเบส (Frameshift mutation) ในจานหลุม 6 หลุม ที่มีอาหารวุ้น Vogel-Bonner minimal glucose agar (5ml) ต่อหลุมและอาหารวุ้น top agar (2%) ซึ่งได้มาจาก Moltox (Boone, NC, USA) นำเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างที่เพาะไว้ไปใส่ลงในอาหารเหลว Oxoid#2 nutrient broth ปริมาณ 12 ml แล้วบ่มในอ่างน้ำพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด เจือจางเชื้อลง 8 เท่า ด้วย 0.9% sodium chloride (NaCl) เพื่อวัดค่า OD อ่านค่าที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร จะได้ประมาณ 0.3-0.4 แล้วทำการเตรียมสารกระตุ้นด้วยเอนไซม์แบบ Mammalian microsomal activation system (S-9 mix), สารละลาย 2-amino-anthracene (2-AA) stock solution (1,000 µg/ml) เตรียมในสาร dimethyl sulfoxide (DMSO) ในสภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นนำสารสกัดย่านางมาละลายในสาร DMSO แล้วกรองแบบปลอดเชื้อ ทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 ถึง 0.80 mgGAE/ml แล้วทำการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity assay)

ทำการทดสอบการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ โดยนำ eppendorf tube ขนาด 1.5 ml เติม 25 µl ของสารสกัดย่านางที่แต่ละความเข้มข้น หรือ DMSO หรือ 2-AA เติม 50 µl ของเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA 98 และเติม 0.1 ml ของ S-9 mix จากนั้นผสมด้วย vortex ให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วเติม 0.5 ml molten top agar ก่อนเทใส่ในเพลทที่มี minimal medium agar อยู่ โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่เจริญเทียบกับ control

การทดสอบการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์แบบ Microscreen ทำได้โดยนำสาร 2-AA (0.3 µg) หรือสาร DMSO ปริมาตร 25 µl, สาร S-9 mix ปริมาตร 0.1 ml, ปริมาตรเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA 98 ที่เพาะไว้ 50 µL ลงใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 20 นาที แล้วนำมาผสมกับอาหารวุ้น molten top agar ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเทบนเพลทอาหาร จากนั้นนำมาเพาะไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ในส่วนของสารสกัดย่านาง ทำการผสมสาร 2-AA (0.3 µg) และสารสกัดย่านาง ปริมาตรอย่างละ 25 µl เข้าด้วยกัน, เติมสาร S-9 mix ปริมาตร 0.1 ml และเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA 98 ปริมาตร 25 µl ลงใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 20 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ผ่านการบ่ม มาผสมกับอาหารวุ้น molten top agar ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเทบนเพลทอาหาร จากนั้น

ปมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่สังเคราะห์ฮิสติดีน (his^+) ขึ้น และใช้ตัวควบคุมคือ DMSO โดยมีการเปลี่ยนแปลงไปตามธรรมชาติ แล้วแสดงผลเป็นค่าร้อยละของการยับยั้ง (% Inhibition, PI หรือ % antimutagenicity) ซึ่งมีสูตรคำนวณดังนี้

$$PI = (A-B) / (A-C) \times 100$$

เมื่อ A คือ จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในหลอดทดลองที่มีแต่สารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน

B คือ จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในหลอดทดลองที่มีสารสกัดโหระพาที่สกัดด้วยสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน

C คือ จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติ (จำนวนโคโลนีควบคุม)

3.6 ศึกษากระบวนการผลิตไมโครแคปซูลสารสกัดจากใบย่านาง

โดยวางแผนการทดลองแบบ CCD มีปัจจัยในการศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ gum arabic ซึ่งกำหนดความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 10 – 20 (X_1), อัตราส่วน core : wall 1:6 ถึง 1:4 (X_2) และ อุณหภูมิเข้าของเครื่องพ่นฝอย 140 – 160 องศาเซลเซียส (X_3) แสดงดังตารางที่ 3.1 จากนั้นทำการผสมสารสกัดย่านางและสารละลาย gum arabic แต่ละความเข้มข้นเข้าด้วยกันตามอัตราส่วนที่กำหนด แล้วนำไปทำการเอนแคปซูเลทโดยใช้เครื่อง spray dryer (EYELA spray-dryer SD-100, Japan) โดยควบคุมอุณหภูมิขาออกประมาณ 90 องศาเซลเซียส ความเร็วลม $9.9\text{m}^2/\text{min}$ และความดัน (atomization pressure) $9.0 \times 10^5 \text{ KPa}$ เก็บผงตัวอย่างที่ได้ใส่ถุงและปิดผนึกแบบสุญญากาศ และเก็บไว้ในโถดูดความชื้นสำหรับวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณภาพทางกายภาพ และลักษณะทางโครงสร้างต่อไป

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert 6.0.10 (Version 6.0.10, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไมโครแคปซูลสารสกัดจากใบย่านาง

3.7 ศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไมโครแคปซูลสารสกัดจากใบย่านาง

3.7.1 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic)

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสามารถหาได้ด้วยวิธี Folin-caicalteu method ดัดแปลงจากวิธีของ Oonsivilai et al. (2007)

3.7.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (Total antioxidant)

ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (Total antioxidant) ด้วยวิธี DPPH assay ดัดแปลงจากวิธีของ Brand-Williams et al. (1995)

3.7.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์ (Total Chlorophyll)

ปริมาณคลอโรฟิลล์ (Total Chlorophyll) ตัดแปลงจากวิธีของ Ramesh & Devasenapathy (2006)

3.7.4 ปริมาณแคโรทีนอยด์ (Total Carotenoid)

ปริมาณแคโรทีนอยด์ (Total Carotenoid) ตัดแปลงจากวิธีของ Wongs et al. (2010) และ Oliveira et al. (2010)

3.7.5 ปริมาณวิตามินซี (Ascorbic acid)

ปริมาณวิตามินซี (Ascorbic acid) ตามวิธีของ AOAC (1995)

3.8 ศึกษาคุณภาพทางกายภาพ

3.8.1 สี (Color)

ค่าสีของไมโครแคปซูลสารสกัดจากไບยานาง วิเคราะห์ด้วยระบบ CIE LAB โดยใช้เครื่อง Hunter Lab (Color Flex Model 45/0, USA)

3.8.2 ปริมาณความชื้น (Moisture content)

ปริมาณความชื้น (Moisture content) ในสารสกัดยานางที่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูลชั้นที่สภาวะต่างๆ วิเคราะห์ด้วยวิธี AOAC (1995)

3.9 ศึกษาลักษณะโครงสร้างด้วยวิธี Scanning Electron Microscopy (SEM)

ลักษณะโครงสร้างภายนอกของไมโครเอนแคปซูลสารสกัดไບยานาง วิเคราะห์ด้วย Scanning Electron Microscopy หรือ SEM รุ่น JEOL JSM 5410-LV ตัดแปลงจากวิธีของ Ko et al. (2008) และ Saenz et al. (2009) โดยนำตัวอย่างมาผ่านการฉาบทองคำก่อนการศึกษาโดยใช้เวลาประมาณ 4 นาที หลังจากนั้นทำการสังเกตโครงสร้างที่กำลังกระแสไฟฟ้า (Voltage) 15 kV. และทำการถ่ายภาพตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ของการผลิตไมโครแคปซูล สารสกัดไยย่านางโดยวิธีพ่นฝอย

Treatment	Coded variable ^a			Process variable ^b		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1	10	1:6	140
2	-1	-1	+1	10	1:6	160
3	-1	+1	-1	10	1:4	140
4	-1	+1	+1	10	1:4	160
5	+1	-1	-1	20	1:6	140
6	+1	-1	+1	20	1:6	160
7	+1	+1	-1	20	1:4	140
8	+1	+1	+1	20	1:4	160
9	0	0	0	15	1:5	150
10	0	0	0	15	1:5	150
11	0	0	0	15	1:5	150
12	0	0	0	15	1:5	150
13	-2	0	0	5	1:5	150
14	+2	0	0	25	1:5	150
15	0	-2	0	15	1:7	150
16	0	+2	0	15	1:3	150
17	0	0	-2	15	1:5	130
18	0	0	+2	15	1:5	170

^a Coded level of variables: + = upper level, - = lower level and 0 = center points

^b X₁, X₂, X₃ คือ ความเข้มข้นของกัมมะธราบิก อัตราส่วน core:wall และอุณหภูมิเข้าเครื่องพ่นฝอย ตามลำดับ

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบย่านาง

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของใบย่านางที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และอะซิโตน แสดงผลดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 พบว่าสารสกัดใบย่านางด้วยน้ำให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด สารต้านอนุมูลอิสระ และวิตามินซีสูงกว่าสารสกัดใบย่านางด้วยเอทานอล และอะซิโตน โดยสารสกัดใบย่านางด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 97.899 mg GAE/g ในขณะที่สารสกัดใบย่านางด้วยเอทานอลและอะซิโตน มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 26.703 และ 16.456 mg GAE/g ตามลำดับ เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Cai และคณะ (2004) ที่พบว่าสารสกัดน้ำของ *P. oleraceae* ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากพันธะไกลโคซิดิกและเอสเทอร์ของสารประกอบฟีนอลิกจะถูกไฮโดรไลซ์ที่อุณหภูมิใกล้เคียงเดือด (Obob, 2005) สารประกอบฟีนอลิกพบมากในพืช มีประโยชน์ต่อสุขภาพโดยเฉพาะการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Dapkevicius et al., 2002; Jabri-Karoui et al., 2012) โดยสารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่ในการขับไล่อนุมูลอิสระโดยเฉพาะอนุมูล peroxy รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในขั้นตอน Propagation ซึ่งอนุมูลอิสระจะถูกทำให้เสถียรโดยอิเล็กตรอนจากสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (Packer et al., 1999) และจากการศึกษา Phenolic profile ด้วย HPLC พบว่าสารสกัดจากใบย่านางมีองค์ประกอบหลักคือ gallic acid และ syringic acid องค์ประกอบรองคือ protocatechuic acid และ chlorogenic acid นอกจากนั้นยังพบ caffeic acid, vanillic acid, ferulic acid และ apigenin ในสารสกัดอีกด้วย

สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการทำงานแตกต่างกันคือ ป้องกันการเกิดขึ้นของออกซิเจนในสภาวะเร่ง กำจัดออกซิเจนในสภาวะเร่งก่อนที่จะจับกับโมเลกุลทางชีวภาพ โดยลดความแข็งแรงของออกซิเจนในสภาวะเร่ง หรือเสริมความแข็งแรงของโมเลกุลทางชีวภาพ นอกจากนั้นยังสามารถทำให้ออกซิเจนในสภาวะเร่งไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปในสภาวะอื่นอีกได้ สามารถซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากออกซิเจนในสภาวะเร่ง และสามารถปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสำหรับการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพ โดยทำให้สารต้านอนุมูลอิสระสามารถจับกับไอออนของโลหะที่มีความสามารถในการสร้างอนุมูลอิสระ เช่น Fe^{2+} ได้ (Wildman, 2007; Mao et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ในการยับยั้งปฏิกิริยาขั้นแรกของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยจับกับอนุมูลอิสระ เช่น ไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) จับกับไอออนของเหล็ก ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันขั้นแรก (primary product) และทำลายพันธะไฮโดรเจนของสารตั้งต้นที่จะสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Shahidi, 1997) ปริมาณกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถของสาร

ทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยใช้ไฮโดรเจนอะตอมจากสารทดสอบแก่อนุมูล DPPH• ซึ่งเป็นอนุมูลอยู่แล้ว โดย DPPH radical ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (scavenging activity) สารละลายของ DPPH• มีสีม่วงในเอทานอล และเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง (Brand-Williams et al., 1995) จากการศึกษาพบว่าปริมาณการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางด้วยน้ำ (IC₅₀ 0.197 mg/g) มีค่าสูงกว่าสารสกัดใบย่านางด้วยเอทานอล (IC₅₀ 0.333 mg/g) และอะซิโตน (IC₅₀ 0.419 mg/g) ตามลำดับ โดยสารสกัดใบย่านางด้วยน้ำส่งผลต่อปริมาณกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และ BHT (IC₅₀ 0.36 และ 0.34 mg/g ตามลำดับ) สำหรับการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดซึ่งเกิดจากการรีดิวซ์โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์ริก Fe³⁺ กับ TPTZ (ferric tripyridyl triazine) ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe²⁺ กับ TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (Joshi et al., 2010) ในการศึกษาพบว่าสารสกัดใบย่านางด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดด้วย เอทานอลและอะซิโตน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ส่วนการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติมโซเดียมเปอร์ซัลเฟต (K₂S₂O₈) และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (Bae and Suh, 2007) ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดโดยใช้กรดแอสคอร์บิกและ BHT เป็นตัวควบคุมแสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าสารสกัดใบย่านางด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (IC₅₀ 0.077 mg/g) จากการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่าสารสกัดใบย่านางด้วยน้ำมีสมบัติในการต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุดซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีในตัวอย่าง โดยสารสกัดใดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากเช่นกัน

สำหรับปริมาณวิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถละลายน้ำได้จะสลายตัวได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนหรือถูกความร้อน วิตามินซีเป็นแหล่งของอิเล็กตรอนที่สามารถเข้าจับกับอนุมูลอิสระ เช่น Hydroxyl และ Superoxide ทำให้เกิดการเสถียรได้ (Iqbal et al., 2004) การวัดค่าวิตามินซีสามารถบ่งบอกความสามารถของกรดแอสคอร์บิกในสารตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบ 2,6-dichlorophenolindophenol (DCP) ซึ่งจะเปลี่ยนจากสีชมพูในสภาวะเป็นกรดหรือสีน้ำเงินในสภาวะเป็นด่างเป็นไม่มีสี ซึ่งจะทำให้กรดแอสคอร์บิกอยู่ในรูปออกซิไดส์ จะเห็นว่าสารสกัดใบย่านางที่สกัดด้วยน้ำ จะมีปริมาณวิตามินซีสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลและอะซิโตน ตามลำดับ

ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (Total Chlorophyll) เป็นกลุ่มรงควัตถุที่พบในพืชทั่วไป ไม่ละลายน้ำ ในโครงสร้างของคลอโรฟิลล์จะประกอบไปด้วย Mg^{2+} ซึ่งเป็นโมเลกุลอิสระสามารถไปจับกับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยทั่วไปแล้วคลอโรฟิลล์จะมีความไวต่อ pH อุณหภูมิ และจะสูญเสียได้ง่ายระหว่างกระบวนการผลิต โดยปกติคลอโรฟิลล์จะอยู่ในรูปที่ประกอบด้วย Mg^{2+} เมื่อสูญเสียสภาพไป โมเลกุล Mg^{2+} จะหลุดออกจากระบบและทำให้กลายเป็นฟีโอไฟติน (Pheophytin) (Ferruzzi & Blaeslee, 2007) ในการวิเคราะห์ค่าคลอโรฟิลล์จะสามารถวิเคราะห์ทางอ้อมได้ หรือ By Chlorophyll ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสารกลุ่มคลอโรฟิลล์ จะประกอบไปด้วยสารอื่นๆอีก คือวิตามินดี (Vitamin D) ที่มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ เป็นส่วนหนึ่งในกลุ่มของคลอโรฟิลล์ เนื่องจากเกิดมาจากการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์ที่อยู่ในใบพืช จากการศึกษาพบว่าสารสกัดใบย่านางที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกันแสดงฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระเป็นกลุ่มของวิตามินดี (ตารางที่ 4.2) โดยสารสกัดใบย่านางด้วยเอทานอลมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่าสารสกัดด้วยอะซิโตน ส่วนสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณต่ำที่สุด

นอกจากนี้ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (Total carotenoid) ซึ่งเป็นรงควัตถุเช่นกันกับคลอโรฟิลล์ โครงสร้างของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เป็นวงแหวน สามารถเปลี่ยนรูปจาก β -Carotene ไปเป็นวิตามินเอ (Vitamin A) ได้โดยการแตกพันธะคู่ของตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุล ซึ่งสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ โดยจะจับกับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น จึงทำให้มีความเสถียรมากขึ้น (Packer et al., 1999) ในการทดลองครั้งนี้ การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์จะวิเคราะห์ในรูปของ Pro-vitamin A carotenoid (Oliveira et al., 2010) พบว่าสารสกัดใบย่านางที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกันแสดงฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระเป็นกลุ่มของวิตามินเอ (ตารางที่ 4.2) โดยสารสกัดใบย่านางด้วยเอทานอลและอะซิโตนมีปริมาณแคโรทีนอยด์ไม่แตกต่างกัน และสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ

จะเห็นได้ว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารต้านอนุมูลอิสระ และวิตามินซี ในตัวอย่างใบย่านางที่สกัดด้วยน้ำมีค่ามากที่สุด เนื่องจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารต้านอนุมูลอิสระ และวิตามินซี สามารถละลายในน้ำได้ (Bae & Suh 2007) ตรงข้ามกับปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดที่สกัดด้วยน้ำมีค่าน้อยที่สุดเนื่องจากไม่สามารถละลายในน้ำได้ (Ferruzzi & Blaeslee, 2007) นอกจากนั้นผลของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารต้านอนุมูลอิสระ และวิตามินซี มีความสัมพันธ์กันและมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน เนื่องจากเป็นสารกลุ่มที่ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในขั้นตอน Propagation และละลายน้ำ (Bae & Suh. 2007) ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของ Majhenic และคณะ (2007) ที่พบว่าปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ด guarana ที่สกัดด้วยน้ำมีค่ามากที่สุด นอกจากนี้พบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดและคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมีความสัมพันธ์กัน เนื่องจากเป็นสารในกลุ่มรงควัตถุที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในสารอินทรีย์ เช่น กลุ่มแอลกอฮอล์ และมีแนวโน้มในทางเดียวกัน ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Pigment ที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Total Carotenoid และ Total Chlorophyll) พบว่า เมื่อปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นด้วย

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระสารสกัดไปย้านางที่สกัด ด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน

Yanang extracts	TPC (mgGAE/g)	DPPH (IC ₅₀ , mg/g)	ABTS (IC ₅₀ , mg/g)	FRAP (mmol Fe ²⁺ /g)
Water	97.899±1.735	0.197±0.018	0.077±0.011	0.054±0.0015
Ethanol	26.703±1.642	0.333±0.024	0.191±0.059	0.034±0.0012
Acetone	16.456±2.968	0.419±0.091	0.312±0.056	0.014±0.0006
Standard				
Ascorbic acid		0.36±0.01	0.041±0.026	0.059±0.028
BHT		0.34±0.04	0.090±0.010	0.254±0.143

*Values are given as mean ± SD (n=3).

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณวิตามินซี แคโรทีนอยด์ทั้งหมด และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ของสารสกัดไปย้านางที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน

Yanang extracts	Vitamin C (mg/100g)	Total Carotenoid (mg/g)	Total Chlorophyll (mg/g)
Water	39.20±0.39	15.76±0.02	3.17±0.14
Ethanol	28.93±0.28	59.97±0.26	844.87±0.209
Acetone	25.20±0.25	58.41±0.73	528.40±0.35

*Values are given as mean ± SD (n=3).

4.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากไບยานางต่อเซลล์

การทดสอบในห้องทดลอง (In vitro) โดยใช้เซลล์ไลน์ และส่วนประกอบของเซลล์ ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นั้น ให้ผลที่เชื่อถือได้และเป็นที่ยอมรับ ในขณะที่ผลการทดสอบในสัตว์ทดลองมักจะทดสอบที่ปริมาณสารเคมีสูงเกินความเป็นจริงหลายเท่า ซึ่งอาจไม่สอดคล้องกับปริมาณที่มนุษย์ได้รับจริง นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ ยังประหยัด ทั่วเวลา งบประมาณ สามารถที่จะทดลองซ้ำได้มากกว่า และที่สำคัญไม่ต้องเผชิญกับองค์กรเอกชน ที่ต่อต้านการใช้สัตว์ทดลองอีกด้วย (Cetin et al., 2005) การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดไບยานางใน Caco-2 cell lines โดยวิธี MTT assay พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดไບยานางมีค่ามากกว่า 100 $\mu g/ml$ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และตัวอย่างควบคุมคือ 0.1 % DMSO ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น ดังนั้นจึงถือว่าสารสกัดจากไບยานาง จัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีความพิษต่ำต่อ Caco-2 cell lines สอดคล้องกับงานวิจัยของ Okonogi และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันและความเป็นพิษของเปลือกผลไม้บางชนิดต่อ Caco-2 cell lines และ peripheral blood mononuclear cells พบว่า สารสกัดจากเปลือกเงาะมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันจากธรรมชาติและเหมาะสำหรับการนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์อาหารหรือผลิตภัณฑ์ยา เนื่องจากมีปริมาณของสารต้านออกซิเดชันค่อนข้างสูงและมีความเป็นพิษต่ำ ($IC_{50} > 100 \mu g/ml$) เช่นเดียวกับ Boivin และคณะ (2009) ได้รายงานว่สารสกัดจากผักตระกูลกะหล่ำ มีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์นี้จะแตกต่างกันในเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด และยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการเป็นตัวต้านการเกิดออกซิเดชันของพืชแต่ละชนิดอีกด้วย และสอดคล้องกับการศึกษาของ Oonsivilai และคณะ (2008) โดยได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดรางจืดต่อเซลล์ชนิดต่างๆ รวมทั้ง Caco-2 cell line พบว่า การสกัดด้วย petroleum ether มีพิษกับเซลล์มากกว่าสารสกัดอื่นๆ และสารสกัดน้ำจะมีค่า IC_{50} เท่ากับ $147 \pm 15 \mu g/ml$ รวมทั้งยังพบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจะแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของเซลล์

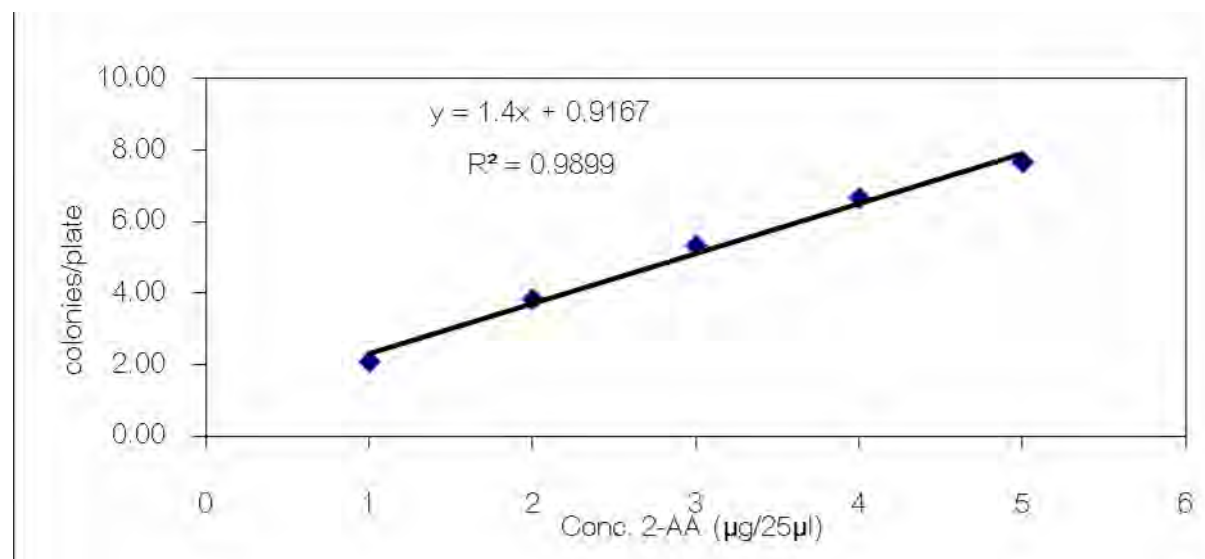
ตารางที่ 4.3 แสดงค่า IC₅₀ (µl/ml) ของสารสกัดย่านางต่อ Caco-2 cell lines

Yanang extracts	IC ₅₀ (µg/ml)
Water	>200
Ethanol	>350
Acetone	>200

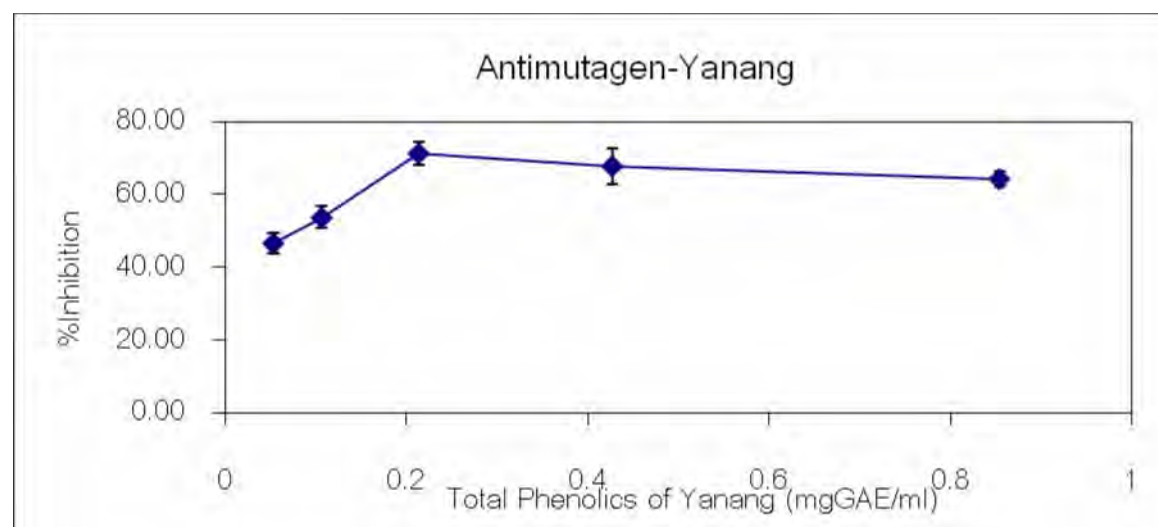
*Values are given as mean ± SD (n=3).

4.3 การศึกษาการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ (Antimutagenicity)

จากการทดสอบสมบัติทางชีวภาพในการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ (Antimutagenicity) โดยวิธี Salmonella test (Ames test) จากภาพที่ 4.1 พบว่าสาร 2-aminoanthracene (2-AA) สามารถทำปฏิกิริยากับ S-9 mix ซึ่งมีเอนไซม์ cytochrome P450 แล้วสามารถกระตุ้นให้เชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 กลับมาสร้างฮิสติดีนได้จึงทำให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2-AA ปริมาณของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 จึงเจริญได้มากขึ้น จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดย่านาง พบว่าการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของสาร 2-AA ของสารสกัดย่านางที่สกัดด้วยน้ำ ตามวิธี Salmonella test (Ames test) โดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ดังแสดงในภาพที่ 4.2 สารสกัดย่านางที่สกัดด้วยน้ำที่ปริมาณความเข้มข้นของฟีนอลิกเท่ากับ 0.854 mgGAE/ml สามารถยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ได้สูงสุดที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการก่อกลายพันธุ์เท่ากับ 64.21% นอกจากนี้การยับยั้งการก่อกลายพันธุ์มีความแปรผันโดยตรงกับระดับความเข้มข้นของสารสกัดย่านางบนพื้นฐานของปริมาณฟีนอลิกรวมโดยเมื่อระดับฟีนอลิกรวมของสารสกัดเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการก่อกลายพันธุ์สูงขึ้น กล่าวโดยสรุปสารสกัดย่านางมีแนวโน้มเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ และควรมีงานวิจัยเพิ่มเติมในด้านการทดสอบการเป็นสารต้านมะเร็ง ทั้งการทดลองในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลอง เพื่อยืนยันคุณสมบัติดังกล่าว ก่อนนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป



ภาพที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Conc. 2-AA (µg/25µl) กับ จำนวนของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 (colonies/plate)



ภาพที่ 4.2 แสดงการก่อกลายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ด้วยสารสกัดย่านางที่สกัดด้วยน้ำ (ปริมาณฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ 0.854 mgGAE/ml)

4.4 กระบวนการผลิตไมโครเอนแคปซูลของสารสกัดใบย่านาง

การผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นส่วนผสมในอาหารด้วยวิธีไมโครเอนแคปซูลเป็นวิธีที่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของสารสำคัญและรักษารสชาติประกอบในผลิตภัณฑ์ไว้ได้ นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารสำคัญ โดยมีส่วนประกอบที่เป็นสารเคลือบ (wall) และส่วนที่เป็นสารสำคัญ (core) นอกจากนี้ต้องทำให้สารเคลือบและสารสำคัญเป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุดเพื่อให้ได้ขนาดเม็ดไมโครเอนแคปซูลตามที่ต้องการ (Gharsallaoui et al., 2007) จากผลการศึกษาการผลิตไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากใบย่านางด้วยวิธีพ่นฝอย (spray-drying) จากตารางที่ 4.4 พบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถเก็บรักษาในรูปแบบไมโครเอนแคปซูลได้ นอกจากนี้เมื่อปริมาณของสารสกัดจากใบย่านางเพิ่มมากขึ้นพร้อมกับปริมาณกัมอะราบิกลดลง ส่งผลให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ Nori และคณะ (2011) ที่ทำการศึกษการผลิตไมโครเอนแคปซูลจากสารสกัด propolis หรือ bee glue ด้วยวิธีพ่นฝอย โดยใช้เพคตินและ soy protein isolate เป็นสารเคลือบ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจาก propolis มากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (สารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟลาโวนอยด์) ในไมโครเอนแคปซูลมีค่าสูงมากขึ้น เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดตั้งต้นมีปริมาณมากขึ้น

นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาผลของการผลิตไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากใบย่านางต่อปริมาณความชื้น สี และขนาดของไมโครเอนแคปซูล จากตารางที่ 4.5 พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเข้าของเครื่องพ่นฝอยสูงขึ้นปริมาณความชื้นในผลิตภัณฑ์จะมีค่าลดลง เนื่องจากความร้อนช่วยในการไล่ความชื้นในระบบ ส่วนค่าสีจะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกัมอะราบิกค่าความสว่าง (L^*) มีค่าลดลงแต่ค่าความเป็นสีเหลือง (b^*) มีค่าเพิ่มมากขึ้น เกิดจากสีของกัมอะราบิก นอกจากนี้ขนาดของไมโครเอนแคปซูลขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกัมอะราบิกและอัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall

ตารางที่ 4.4 ผลของการผลิตไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากใบย่านางต่อปริมาณสารออกฤทธิ์

ทางชีวภาพ

Treatment	Total Carotenoids (mg/g sample)	Total Chlorophyll (mg/g sample)	Total Phenolic (mg GAE/g sample)	Total Antioxidant (mg AEAC/g sample)
1	4.24±0.06 ^{d*}	0.35±0.01 ^{ef}	4.67±0.35 ^j	15.10±0.90 ^e
2	4.46±0.06 ^d	0.37±0.01 ^{ef}	8.36±0.69 ⁱ	22.48±0.74 ^c
3	5.28±0.10 ^c	0.39±0.01 ^{de}	16.23±0.70 ^{fg}	25.40±0.14 ^b
4	8.07±0.93 ^a	0.84±0.05 ^a	20.71±0.89 ^e	30.42±0.25 ^a
5	2.49±0.31 ^f	0.35±0.04 ^{ef}	11.31±0.69 ^h	13.84±0.00 ^f
6	4.44±0.21 ^d	0.31±0.00 ^{fg}	16.72±1.39 ^{fg}	20.59±0.26 ^d
7	5.32±0.25 ^c	0.44±0.01 ^{cd}	22.13±0.70 ^{de}	20.35±0.44 ^d
8	6.35±0.34 ^b	0.37±0.02 ^{ef}	23.11±0.69 ^d	26.47±0.92 ^b
9	3.50±0.09 ^e	0.48±0.04 ^c	10.57±0.35 ^h	14.76±0.26 ^e
10	3.46±0.11 ^e	0.44±0.02 ^{cd}	10.93±0.82 ^h	14.03±0.26 ^e
11	3.44±0.06 ^e	0.45±0.02 ^{cd}	11.10±0.48 ^h	14.76±0.26 ^e
12	3.41±0.01 ^e	0.46±0.04 ^{cd}	10.70±0.20 ^h	14.39±0.25 ^e
13	2.24±0.25 ^f	0.46±0.01 ^{cd}	21.14±0.69 ^e	10.38±0.25 ^f
14	4.99±0.52 ^{cd}	0.43±0.01 ^{cd}	30.98±0.70 ^b	15.37±0.74 ^e
15	3.54±0.23 ^e	0.54±0.01 ^b	15.24±0.69 ^g	12.74±0.01 ^f
16	7.45±0.45 ^a	0.86±0.06 ^a	17.45±1.74 ^f	31.88±0.26 ^a
17	2.11±0.09 ^f	0.27±0.00 ^g	26.06±0.69 ^c	14.47±0.41 ^e
18	3.33±0.33 ^e	0.36±0.01 ^{ef}	36.22±0.75 ^a	16.34±0.29 ^e

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.5 ผลของการผลิตไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไผ่ย่านางต่อร้อยละผลผลิต ความชื้น และขนาดของไมโครเอนแคปซูล

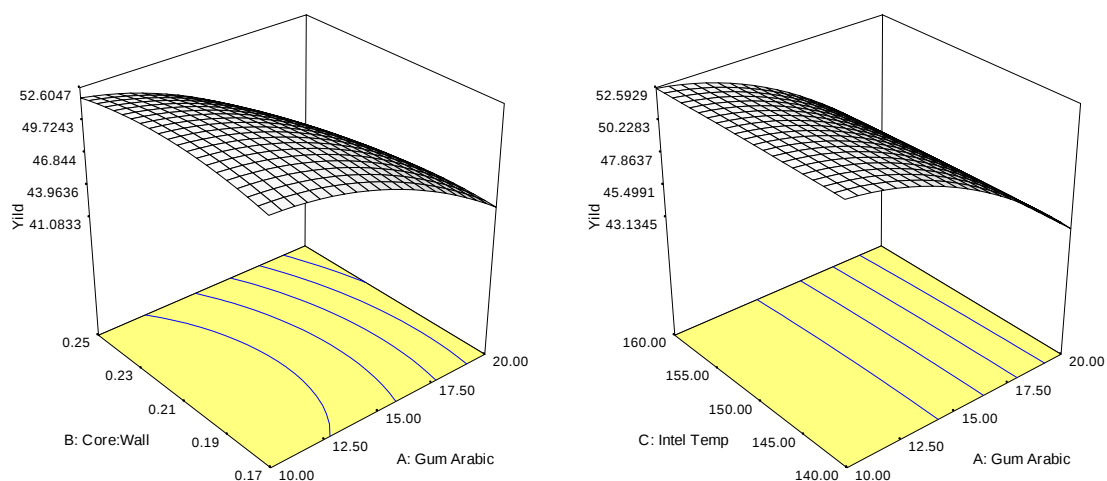
Treatment	Moisture (%)	Color (L*)	Color (b*)	Size	
				microencapsule (μm)	Yield (%)
1	6.07 $\pm$ 0.37 ^{defgh*}	88.78 $\pm$ 0.05 ^b	8.23 $\pm$ 0.04 ^h	5.80 $\pm$ 0.84 ^{de}	50.18 $\pm$ 0.43 ^h
2	5.74 $\pm$ 0.22 ^{fgh}	89.10 $\pm$ 0.03 ^a	8.10 $\pm$ 0.15 ^h	5.80 $\pm$ 1.10 ^{de}	50.43 $\pm$ 0.14 ^g
3	6.07 $\pm$ 0.38 ^{defgh}	86.95 $\pm$ 0.05 ^g	9.18 $\pm$ 0.09 ^d	4.40 $\pm$ 0.55 ^e	50.08 $\pm$ 0.23 ⁱ
4	5.49 $\pm$ 0.18 ^h	87.32 $\pm$ 0.06 ^e	9.51 $\pm$ 0.16 ^c	4.60 $\pm$ 0.89 ^e	50.03 $\pm$ 0.15 ^k
5	7.18 $\pm$ 0.80 ^{ab}	88.56 $\pm$ 0.03 ^c	8.24 $\pm$ 0.05 ^h	9.00 $\pm$ 1.58 ^{abc}	43.41 $\pm$ 0.50 ⁿ
6	5.92 $\pm$ 0.37 ^{efgh}	88.81 $\pm$ 0.14 ^b	8.15 $\pm$ 0.03 ^h	8.00 $\pm$ 1.87 ^{abc}	41.49 $\pm$ 0.46 ^o
7	7.29 $\pm$ 0.45 ^a	87.93 $\pm$ 0.24 ^d	8.83 $\pm$ 0.14 ^e	7.80 $\pm$ 1.48 ^{abc}	38.65 $\pm$ 0.33 ^q
8	5.51 $\pm$ 0.38 ^h	87.40 $\pm$ 0.15 ^e	8.65 $\pm$ 0.16 ^f	5.80 $\pm$ 0.45 ^{de}	39.81 $\pm$ 0.23 ^p
9	6.40 $\pm$ 0.25 ^{bcdefg}	86.78 $\pm$ 0.17 ^h	9.23 $\pm$ 0.16 ^d	9.00 $\pm$ 1.58 ^{abc}	50.68 $\pm$ 0.48 ^d
10	6.37 $\pm$ 0.43 ^{cdefg}	86.41 $\pm$ 0.01 ⁱ	9.43 $\pm$ 0.02 ^c	9.60 $\pm$ 2.19 ^a	50.05 $\pm$ 0.15 ^j
11	6.56 $\pm$ 0.14 ^{abcde}	87.23 $\pm$ 0.01 ^{ef}	8.52 $\pm$ 0.03 ^{fg}	9.00 $\pm$ 1.22 ^{abc}	50.48 $\pm$ 0.36 ^f
12	6.86 $\pm$ 0.38 ^{abcd}	86.92 $\pm$ 0.23 ^{fg}	8.96 $\pm$ 0.22 ^e	8.40 $\pm$ 1.14 ^{abc}	50.74 $\pm$ 0.15 ^c
13	6.66 $\pm$ 0.72 ^{abcde}	86.46 $\pm$ 0.01 ⁱ	10.25 $\pm$ 0.02 ^a	4.60 $\pm$ 0.55 ^e	52.95 $\pm$ 0.38 ^a
14	6.34 $\pm$ 0.20 ^{cdefg}	85.98 $\pm$ 0.14 ^k	9.54 $\pm$ 0.09 ^c	7.60 $\pm$ 1.52 ^{bc}	34.98 $\pm$ 0.16 ^r
15	6.48 $\pm$ 0.34 ^{bcde}	88.35 $\pm$ 0.10 ^c	7.88 $\pm$ 0.05 ⁱ	9.40 $\pm$ 1.14 ^{ab}	47.14 $\pm$ 0.42 ^l
16	6.96 $\pm$ 0.71 ^{abc}	86.23 $\pm$ 0.23 ^j	9.79 $\pm$ 0.09 ^b	7.40 $\pm$ 0.55 ^{cd}	46.48 $\pm$ 0.39 ^m
17	6.17 $\pm$ 0.06 ^{cdefgh}	86.89 $\pm$ 0.25 ^{fg}	8.90 $\pm$ 0.23 ^e	8.20 $\pm$ 0.84 ^{abc}	51.24 $\pm$ 0.50 ^b
18	6.29 $\pm$ 0.07 ^{cdefgh}	87.91 $\pm$ 0.05 ^d	8.43 $\pm$ 0.01 ^g	8.20 $\pm$ 0.84 ^{abc}	50.60 $\pm$ 0.42 ^e

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Design-Expert 6.0.10 เพื่อหาความเข้มข้นของกัมอาร์ะบิก อัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไบบานาง โดยจะพิจารณาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ความชื้น สี ร้อยละผลผลิต และขนาดของไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไบบานาง จากการวิเคราะห์ได้ผลดังนี้

4.3.1 ร้อยละผลผลิต (%Yield)

จากผลการศึกษาร้อยละผลผลิต พบว่าปริมาตรสารสกัดใบย่านาง (core material) เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยการเอนแคปซูลสารสกัดด้วยกัมอะราบิก (wall material) ที่เหมาะสมทำให้ระบบมีการควบคุมและกักเก็บสารสกัดใบย่านางไว้ส่งผลให้ป้องกันการสูญเสียสารสำคัญไว้ได้ (Mehrnoush et al., 2011; Gharallaoui et al., 2007) ภาพที่ 4.3 แสดงกราฟ 3 มิติ ผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากใบย่านางต่อปริมาณผลผลิต โดยความเข้มข้นของกัมอะราบิก อัตราส่วนของ core ต่อ wall material และอุณหภูมิเข้าของเครื่องพ่นฝอย ส่งผลต่อปริมาณผลผลิต โดยกัมอะราบิกที่ความเข้มข้นต่ำส่งผลต่อปริมาณผลผลิตสูง โดยอัตราส่วน core ต่อ wall material และอุณหภูมิเข้าของเครื่องพ่นฝอยอยู่ในช่วงกว้าง กระบวนการผลิตไมโครเอนแคปซูลของสารสกัดใบย่านางที่เหมาะสมและส่งผลให้มีร้อยละผลผลิตสูง ($R^2 = 0.93$) คือ ความเข้มข้นของกัมอะราบิกร้อยละ 10 อัตราส่วนของ core ต่อ wall material 1:4 และอุณหภูมิเข้าของเครื่องพ่นฝอย 160 องศาเซลเซียส

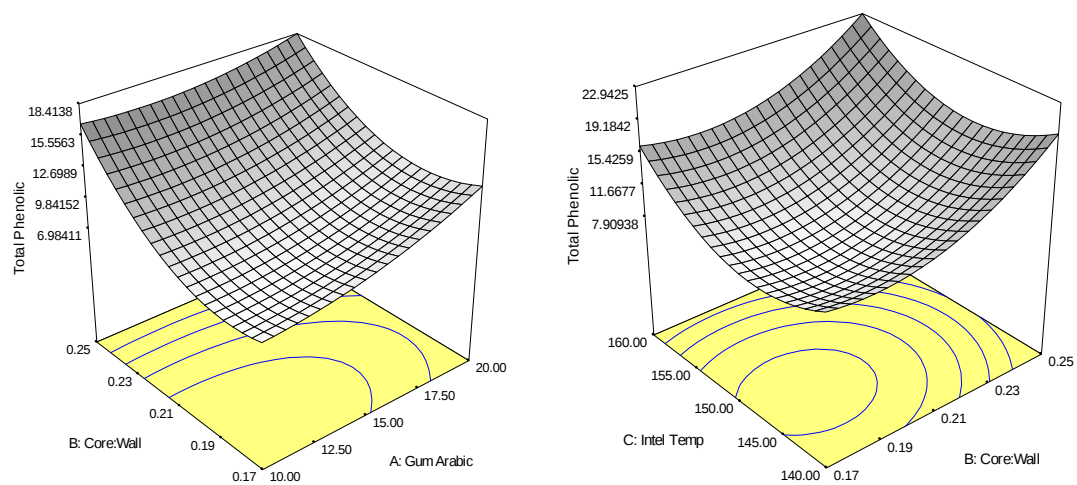


ภาพที่ 4.3 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากใบย่านางต่อปริมาณผลผลิต

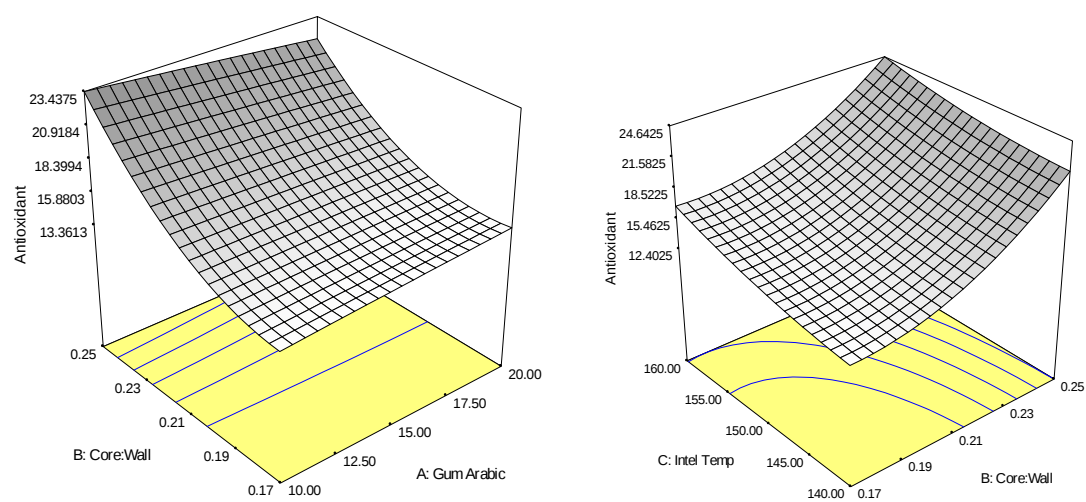
4.3.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในการศึกษาการผลิตไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไยย่านาง จะศึกษาโดยกำหนดความเข้มข้นสารสกัดจากไยย่านางเป็นร้อยละ 5 (w/v) และอัตราส่วนระหว่าง core:wall จะขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของกัมอาระบิก จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกัมอาระบิกและอัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall แสดงดังภาพที่ 4.4 ($R^2=0.83$) ซึ่งเมื่อลดเข้มข้นของกัมอาระบิกลง พร้อมกับเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากไยย่านางมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นไปด้วย เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารสกัดตั้งต้น นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด แสดงดังภาพที่ 4.5 สอดคล้องกับการศึกษาของ Berczak และ Kolodziejczyk (2010) ได้ทำการศึกษาการผลิตไมโครเอนแคปซูลด้วยวิธีพ่นฝอยจากสารสกัด black currant พบว่าการเพิ่มขึ้นของสารเคลือบและอัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall มากขึ้น ส่งผลให้สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล รวมทั้งสารกลุ่มแอนโทไซยานิน มีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ahmed และคณะ (2010) และ Jabri-Karoui และคณะ (2012) ที่พบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นส่งผลให้การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

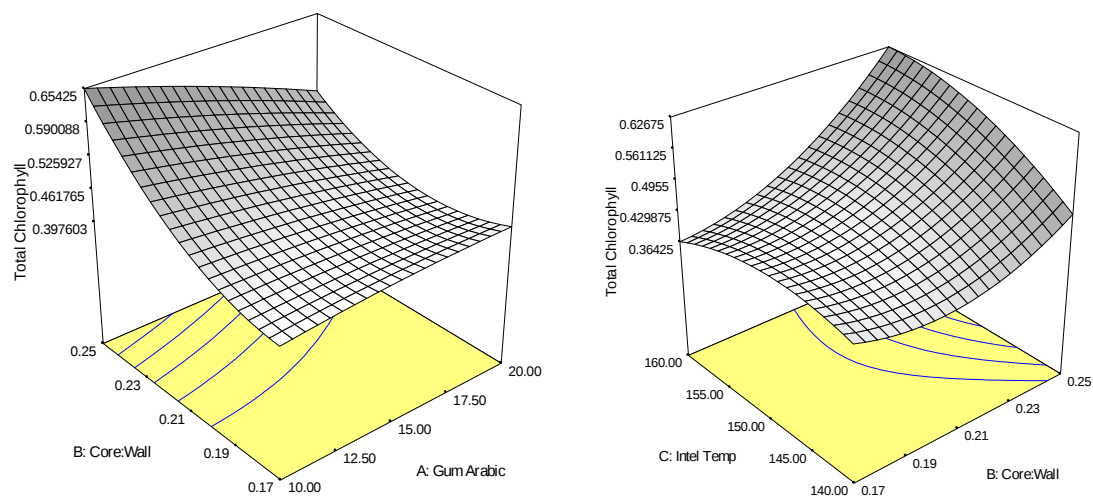
นอกจากสารต้านอนุมูลอิสระแล้วในสารสกัดจากไยย่านางยังพบว่ามียิ่งค์ประกอบของรงควัตถุคือ แคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ จากการศึกษาพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดและปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกัมอาระบิกและอัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall แสดงดังภาพที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อลดความเข้มข้นของกัมอาระบิกลง พร้อมกับเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากไยย่านางมากขึ้น ส่งผลทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดและปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ Ersus และ Yurdagel (2007) ได้ทำการศึกษาการผลิตไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจาก black carrot โดยวิธีพ่นฝอย พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall และความเข้มข้นของสารเคลือบ (Maltodextrin) ส่งผลทำให้แอนโทไซยานินซึ่งเป็นรงควัตถุชนิดหนึ่งมีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วย ดังนั้นกระบวนการผลิตไมโครเอนแคปซูลของสารสกัดไยย่านางที่เหมาะสมและส่งผลให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง คือ ความเข้มข้นของกัมอะราบิกร้อยละ 10 อัตราส่วนของ core ต่อ wall material 1:4 และอุณหภูมิเข้าของเครื่องพ่นฝอย 160 องศาเซลเซียส



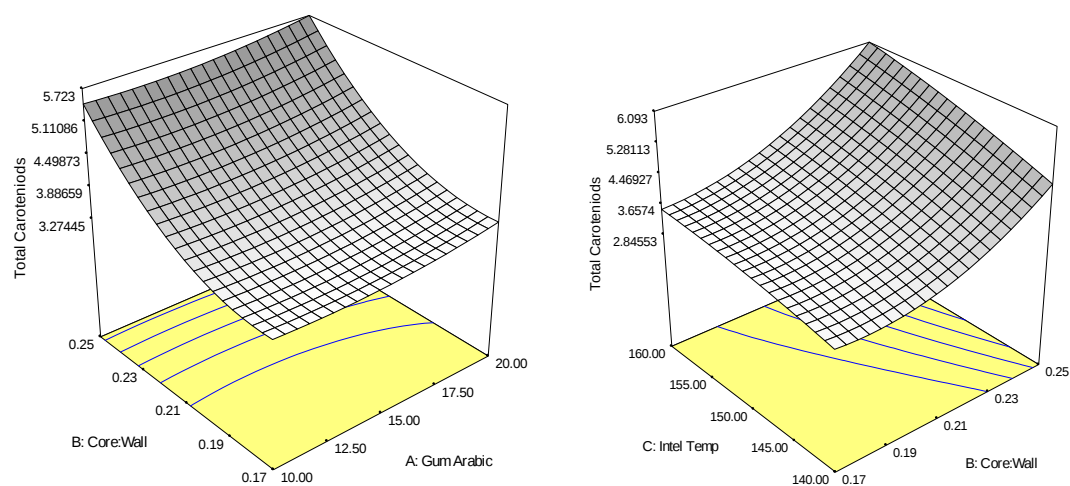
ภาพที่ 4.4 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไพล์นางต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด



ภาพที่ 4.5 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไพล์นางต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด



ภาพที่ 4.6 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไอย่านางต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

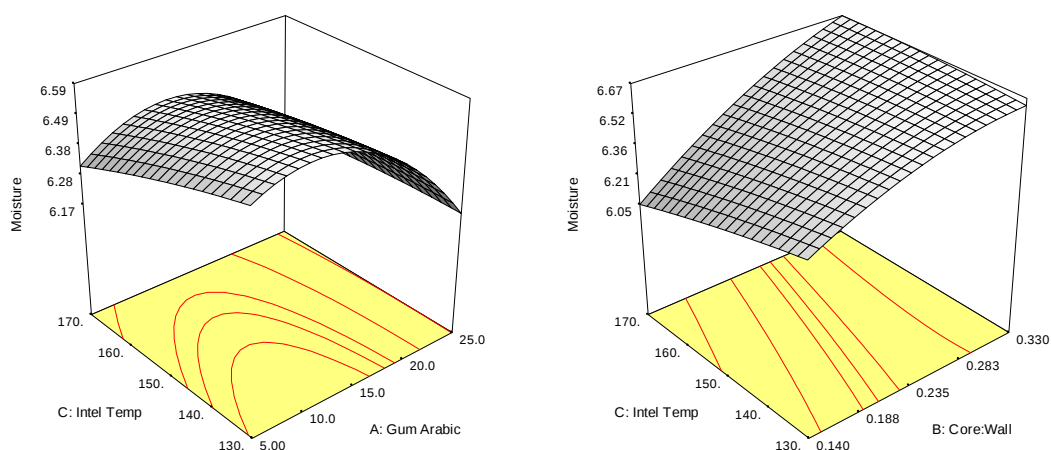


ภาพที่ 4.7 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไอย่านางต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

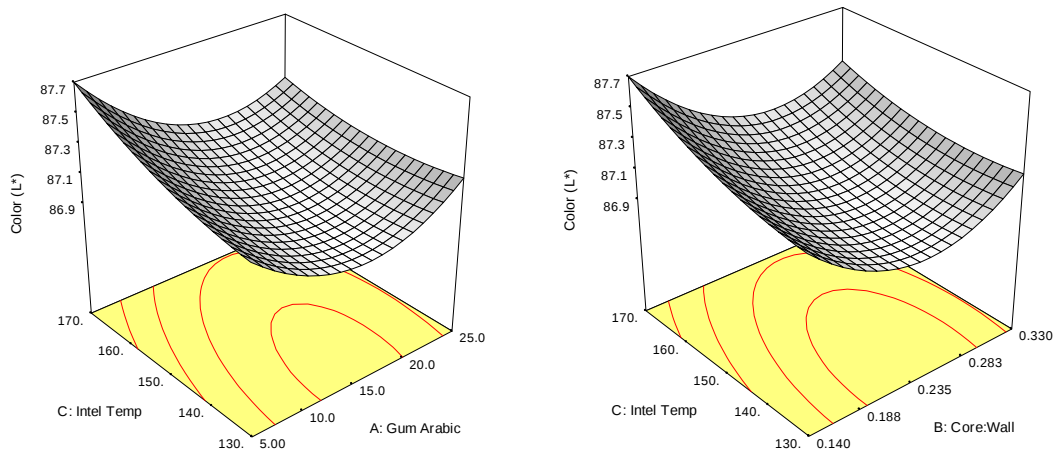
4.3.3 ความชื้น สี และขนาดของไมโครเอนแคปซูล

จากภาพที่ 4.8 และตารางที่ 4.5 แสดงผลของอัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall ความเข้มข้นของกัมอาระบิก และอุณหภูมิขาเข้าของเครื่องพ่นฝอย ต่อความชื้นของไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไบบานางซึ่งลักษณะของไมโครเอนแคปซูลที่ต้องการคือมีความชื้นต่ำ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของไมโครเอนแคปซูล (Gharsallaoui et al., 2007) ซึ่งจะเห็นว่าอัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall และความเข้มข้นของกัมอาระบิกไม่มีผลต่อความชื้นของไมโครเอนแคปซูล แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขาเข้าของเครื่องพ่นฝอยมากขึ้นส่งผลทำให้ความชื้นของไมโครเอนแคปซูลลดลง เนื่องจากความร้อนที่เพิ่มขึ้นสามารถไล่ความชื้นในระบบได้มากขึ้นด้วย โดยอุณหภูมิขาเข้าของเครื่องพ่นฝอยที่เหมาะสมคือ 160 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ไมโครแคปซูลสารสกัดไบบานางคงตัว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Berczak และ Kolodziejczyk (2010) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขาเข้ามากขึ้นจาก 150 องศาเซลเซียส เป็น 205 องศาเซลเซียส ความชื้นของไมโครเอนแคปซูลมีค่าลดลง

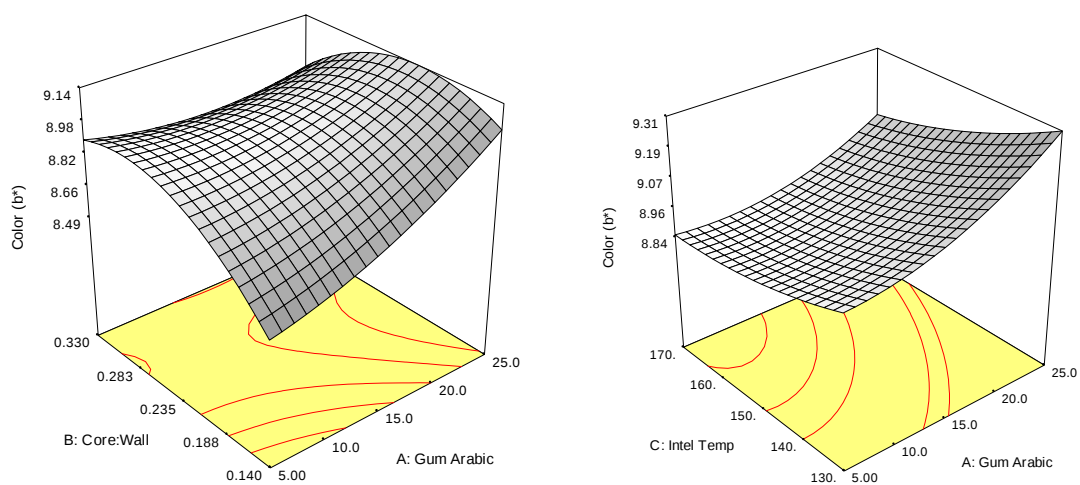
นอกจากนี้จากภาพที่ 4.9, 4.10 และตารางที่ 4.5 แสดงผลของอัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall ความเข้มข้นของกัมอาระบิก และอุณหภูมิขาเข้าของเครื่องพ่นฝอย ต่อค่าความสว่าง (L^*) และค่าสีเหลือง (b^*) ของไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไบบานาง ซึ่งทั้งสามปัจจัยมีผลต่อค่าสีของไมโครเอนแคปซูล คือเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall และอุณหภูมิขาเข้ามากขึ้น ส่งผลทำให้ค่าความสว่างเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ส่วนเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกัมอาระบิก จะส่งผลให้ค่าสีเหลืองของ ไมโครเอนแคปซูลเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากสีของกัมอาระบิก



ภาพที่ 4.8 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไบบานางต่อปริมาณความชื้น



ภาพที่ 4.9 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไบบานางต่อค่าความสว่าง (L^*)

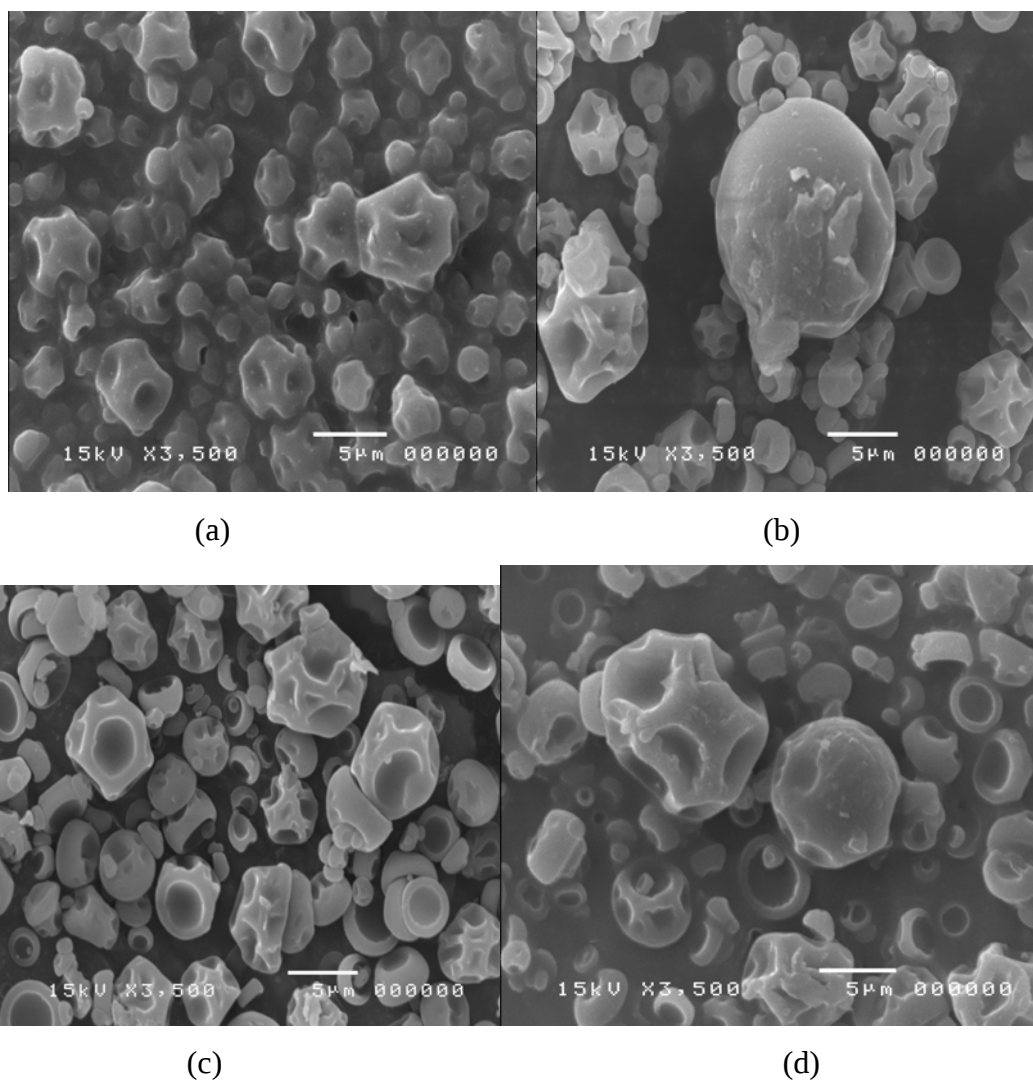


ภาพที่ 4.10 กราฟ 3 มิติ แสดงผลของกระบวนการไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไบบานางต่อค่าความสีเหลือง (b^*)

นอกจากนั้นได้มีการศึกษาโครงสร้างภายนอกของไมโครเอนแคปซูลด้วยวิธี Scanning Electron Microscopy (SEM) ดังภาพที่ 4.11 และตารางที่ 4.5 โดยจะเห็นว่าปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อโครงสร้างและขนาดของไมโครเอนแคปซูลคือ ความเข้มข้นของกัมอะราบิก ลักษณะโครงสร้างภายนอกของไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไบยานางมีลักษณะเป็นทรงกลม โดยกัมอะราบิกซึ่งทำหน้าที่เป็น wall จะห่อหุ้มสารสกัดไบยานาง (core) เพื่อป้องกันการสูญเสียของสารสำคัญในสารสกัดไว้ (Gharsallaoui et al., 2007) จะเห็นว่าการใช้ความเข้มข้นของกัมอะราบิกมากหรือน้อยเกินไปส่งผลทำให้ลักษณะไมโครเอนแคปซูลเสียหายมาก แต่การใช้อัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall สูงส่งผลดีต่อโครงสร้างไมโครเอนแคปซูล นอกจากนี้การใช้อุณหภูมิเข้ามากหรือน้อยเกินไปยังส่งผลเสียต่อโครงสร้างของไมโครเอนแคปซูลอีกด้วย โดยที่ความเข้มข้นของกัมอะราบิกที่ระดับต่ำร้อยละ 10 อัตราส่วน core:wall สูง 1:4 และอุณหภูมิเข้าเครื่องฟ่นฝอยสูง 160 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้ลักษณะของไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไบยานางจะมีผิวเรียบ แต่อาจมีรอยย่นจากกระบวนการทำแห้งบ้างเล็กน้อย (Saénz, 2009) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Shaikh และคณะ (2006) ซึ่งทำการเปรียบเทียบโครงสร้างภายนอกของไมโครเอนแคปซูลที่ผลิตด้วยกัมอะราบิกและ modified starch ซึ่งจะเห็นว่าการใช้กัมอะราบิกมีผิวหน้าที่เรียบมากกว่า

4.3.4 กระบวนการผลิตไมโครแคปซูลสารสกัดไบยานางที่เหมาะสม

จากการพิจารณาร้อยละผลผลิต ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ความชื้น สี และโครงสร้างภายนอกของไมโครเอนแคปซูลสารสกัดไบยานาง พบว่าสภาวะการผลิตไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไบยานางที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นของกัมอะราบิกร้อยละ 10 อัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall ที่ 1:4 และอุณหภูมิเข้าของเครื่องฟ่นฝอยที่ 160 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไบยานางมีร้อยละผลผลิตสูง ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ความชื้นต่ำ และมีลักษณะโครงสร้างที่สามารถกักเก็บสารสำคัญไว้ได้



ภาพที่ 4.11 ลักษณะโครงสร้างภายนอกของไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไอย่านาง

- (a) ความเข้มข้นของกัมอาระบิกร้อยละ 5
- (b) ความเข้มข้นของกัมอาระบิกร้อยละ 10
- (c) ความเข้มข้นของกัมอาระบิกร้อยละ 20
- (d) ความเข้มข้นของกัมอาระบิกร้อยละ 25

บทที่ 5

บทสรุป

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไอย่านาง ในด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและการเป็นสารต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยเตรียมสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำ เอทานอล และอะซีโตน จากการศึกษาพบว่าปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด (97.899 mg GAE/g) เมื่อศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดที่ ค่า IC_{50} 0.197 mg/g, 0.077 mg/g และ 0.054 mmol Fe^{2+} /g ตามลำดับ รวมทั้งสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณวิตามินสูง ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ทั้งหมด พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณต่ำสุด

สำหรับการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดไอย่านางใน Caco-2 cell lines โดยวิธี MTT assay พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดทุกชนิดมีค่ามากกว่า 100 μ g/ml และตัวอย่างควบคุมคือ 0.1 % DMSO ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น ดังนั้นจึงถือว่า สารสกัดไอย่านางจัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีความพิษต่ำต่อ Caco-2 cell lines รวมทั้งสารสกัดไอย่านางด้วยน้ำไม่มีฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์ จากการทดสอบสมบัติทางชีวภาพในการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ (Antimutagenicity) โดยวิธี Salmonella test (Ames test)

ดังนั้นการสกัดด้วยน้ำจึงจัดเป็นสารสกัดที่เหมาะสมในการนำไปศึกษากระบวนการผลิตเอนแคปซูลต่อไป เนื่องจากมีปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าสารสกัดอื่นๆ และความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากขึ้นด้วยเช่นกัน นอกจากนี้สารสกัดไอย่านางจัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีความพิษต่ำต่อ Caco-2 cell lines เหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

สภาวะการผลิตไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไอย่านางที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นของกัมอาระบิกร้อยละ 10 อัตราส่วนระหว่าง core ต่อ wall ที่ 1:4 และอุณหภูมิขาเข้าของเครื่องพ่นฝอยที่ 160 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ไมโครเอนแคปซูลสารสกัดจากไอย่านางมีร้อยละผลผลิตสูง ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ความชื้นต่ำ และมีลักษณะโครงสร้างที่สามารถกักเก็บสารสำคัญไว้ได้

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

(ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า)

Singthong, J., Oonsivilai, R., Oonmetta-aree, J., & Ningsanond, S. (2013). Bioactive compounds and encapsulation of Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. Food Bioscience. (Submitted)

2. นำเสนอผลงานภาคบรรยาย

Singthong, J., Oonsivilai, R., Oonmetta-aree, J., & Ningsanond, S. (2011). Phytochemical profile, antioxidant activity and cytotoxicity of *Tiliacora triandra* (Yanang) extract on Caco-2 cells. Oral presentation in 5th Thailand Congress of Nutrition: Food Security and Nutrition and Health, September 5-7, 2011, BITEC, Bangkok, Thailand.

บรรณานุกรม

- กรณีกาญจน์ ภมรประวัติดนะ. (2553). มหัศจรรย์ย่านางจากซุพหน่อไม่ถึงเครื่องดื่ม.
สมุนไพรไทย. <http://health-pmk.org/370-010.pdf>. ตุลาคม, 2553.
- จินดาพร ภูมิพัฒนางษ์. (2539). เกษีเวชตำรายาแผนโบราณ. ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัช
พฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ฐิติกานต์ ปัญญาใหญ่. (2551). กิจกรรมต้านออกซิเดชันของสาหร่ายเตา *Spirogyra neglecta*
(Hassall). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วัลภา ประเสริฐศิลา. (2553). ย่านางคลังยารักษาสรรพโรค. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์
แบงคอกบุ๊ก.
- ณรงค์ คำมูล. (2553). ย่านาง สะเดา เพกา สมุนไพรพื้นบ้านต้านมะเร็ง. กรุงเทพมหานคร :
สำนักพิมพ์ feel good.
- บรรจง กิติรัตน์ตระการ. (2553). คลอโรฟิลล์. [www.pcccr.ac.th/para_nok/parpart_myweb/
chlorophyll.pdf](http://www.pcccr.ac.th/para_nok/parpart_myweb/chlorophyll.pdf). ธันวาคม, 2553.
- เบญจา ชุตินทราศรี. (2553). เอนแคปซูเลชันและการควบคุมการปลดปล่อยสารให้กลิ่นรส
(Encapsulation and Control Release of Food Flavoring). [http://e-book.ram.edu/
ebook/f/FY463\(50\)/FY463-4.pdf](http://e-book.ram.edu/ebook/f/FY463(50)/FY463-4.pdf). ธันวาคม, 2553.
- ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง. (2549).ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณ
สารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด (DPPH Free Radical
Scavenging Activity and Total Phenol Compounds Content of Some Thai
Medicinal Plant Extracts). วารสารวิชาการ ม.อบ. 8 (2): 76-88.
- สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และดวงกมล แม้นศิริ. (2011). “การใช้วิตามินซีในการส่งเสริมความทนต่อ
สภาวะเครียดเกลือในข้าว” ใน *The graduate research conference 12th*. น.544-533.
มหาวิทยาลัยขอนแก่น : ขอนแก่น.
- สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. (2547). มาตรฐานของสมุนไพรในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย.
วารสารสมุนไพร. 11(1): 21-32.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2553). รายงานเศรษฐกิจการเกษตรเพื่อเกษตรกร.
<http://www.oae.go.th/pdf.php>. กันยายน, 2553.
- เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล. (2552). Microencapsulation: เทคโนโลยีจีวแต่แจ้ว.
Technology Promotion Mag. 36(20): 39-42.
- Ahmed, M., Akter, S., Lee, J., & Eun, J. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive
components, physicochemical and morphological properties from purple sweet
potato. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 1307-1313.

- AOAC. (1995). *Official Methods of Association of Analytical Chemists*. (16th ed.). Washington, DC: Association of Analytical Chemists.
- Bae, S., & Suh, H. (2007). Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 955–962.
- Barczak, A.M.B., & Kolodziejczyk, P. (2010). Black currant polyphenols: Their storage stability and Microencapsulation. *Industrial Crops and Products*.
- Beristain, C.I. and et al. (1996). Encapsulation of orange peel oil by cocrystallization. *LWT-Food Science and Technology*. 29: 645–647.
- Bode, A.M., Cunnongham, L., & Rose, R.C. (1990). Spontaneous decay of oxidized ascorbic acid (Dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high-pressure liquid chromatography. *CLIN.CHEM*. 36: 1807-1809.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with cancer. *Life Sciences*, 74, 2157-2184.
- Cetin, Y. and Bullerman, L.B. (2005). Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food and Chemical Toxicology*. 43(5): 755 – 764.
- Chan, E.S., Yim, Z.H., Phan, S.H., Mansa, R.F., & Ravindra, P. (2010). Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. *Food and Bioproducts Processing*, 8, 195–201.
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am_J Clin Nutr*. 81: 223S–229S.
- Daniells S. (2006). Protein-sugar combo boost encapsulation stability. *Breaking News on Food & Beverage Development-Europe*, 19 December 2006.
- Daniells S. (2006). Casein offers natural nano-encapsulation potential. *Breaking News on Food & Beverage Development-Europe*, 8 November 2006.
- Daniells S. (2006). Maltodextrin, Whey protein complexes: cheap alternative to gum arabic. *Breaking News on Food & Beverage Development-Europe*, 24 October 2006.

- Dapkevicius, A., Van Beek, T.A., Lelyveld, G.P., Van Veldhuizen, A., De Groot, A.E., Linssen, J.P.H., & Venskutonis, R. (2002). Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *Journal of Natural Products*, 65, 892-896.
- Deladino, L., Anbinder, P., Navarro, A., & Martino, M. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71, 126–134.
- Drusch S. (2006). Sugar Beet pectin: the future of omega-3 microencapsulation. *Journal of food colloids*. 10: 1016.
- Ersus, S., & Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*. 80: 805–812.
- Ferruzzi, M., & Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*. 27: 1–12.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330-347.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voille, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107–1121.
- Hu, B. et al. (2008). Green tea catechins go nano. *Breaking News on Food & Beverage Development-Europe*, 28-January-2008.
- Hu, Z. et al. (1998). New preparation method of intestinal pressure-controlled delivery capsules by coating machine and evaluation in beagle dogs. *Journal Control Release*. 56(1): 293-302.
- Iqbal, K. and et al. (2004). Biological significance of ascorbic acid (Vitamin C) in human health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 3: 5-13.
- Jabri-Karoui, I., Bettaieb, I., Masada, K., Hammami, M., & Marzouk, B. (2012). Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *Journal of Functional Foods*, 4, 661-669.
- Javanmardi, J. and et al. (2003). Antioxidant acidity and total phenolic content of Iranian *Ocimum accssions*. *Food Chemistry*. 83: 547-550.
- Jayaprakasha, G. and et al. (2007). Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20: 330–336.

- Joshi, S.C., Verma, A.R., & Mathela, C.S. (2010). Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 37-40.
- Ko, J.A., Koo, S.Y., & Park, H.J. (2008). Effects of alginate microencapsulation on the fibrinolytic activity of fermented soybean paste (Cheonggukjang) extract. *Food Chemistry*. 111: 921–924.
- Kosar, M. and et al. (2007). Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (*Rhus coriaria* L.) extracts. *Food Chemistry*. 103: 952–959.
- Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C., & Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2083-2091.
- Kwiatkowski, M. (2010). *Isolation and identification of selected plant dyes*.
<http://www.kii3.ntf.uni-lj.si/analchemvoc2/file.php/1/HTML/support/poskus3.htm>.
 February, 2010.
- Lee, Y.H. and et al. (2011). Layered hydrogel of poly (γ -glutamic acid), sodium alginate, and chitosan: Fluorescence observation of structure and cytocompatibility. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 86: 409–413.
- Livon Laboratory, Inc. (2006). New Liposomal Encapsulation Technology Product: Lypo-Sheric Vitamin C. <http://www.livonlabs.com/liposomal-encapsulation.html>.
- Mao, L.C., Pan, X., Que, F., & Fang, X.H. (2006). Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze dried daylily flowers. *European Food Research and Technology*, 222, 236-241.
- Mahidol, C., Sahakitpichan, P., & Ruchirawat, S. (1994). Bioactive natural products from Thai plants. *Journal of Pure and Applied Chemistry*, 66, 2353-2356.
- Majhenic, L., Kerget, M., & Knez, Z. (2007). "Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*. 104: 1258–1268.
- Mathiowitz, E. (1999). Microencapsulation. *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. New York, John Wiley & Smith Inc. 2: 493-505.
- Mehnouch, A., Tan, C.P., Hamed, M., Azis, N., & Ling, T.C. (2011). Optimisation of freeze drying conditions for purified serine protease from mango (*Mangifera indica* Cv. Chokanan) peel. *Food Chemistry*, 128, 158-164.

- Mohsen, S., & Ammar, A. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chemistry*. 112: 595-598.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26: 211-219.
- Muangnoi, C. (2007). Bioaccessibility, Cellular uptake and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor activity of triterpenoids from *Centella asiatica* (Linn.) Urban. [M.Sc. thesis in Nutrition]. Bangkok. Faculty of graduate studies. Mahidol University.
- Myers, R.H. (1995). *Response surface methodology: Process and product in optimization using designed experiments*. New York: Wiley.
- Nanasombat, S., & Teckchuen, N. (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3: 443-449.
- Nori, M. and et al. (2011). Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT -Food Science and Technology*. 44: 429-435.
- Oboh, G. (2005). Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 513-517.
- Oliveira, R. G. and et al. (2010). Assessment and degradation study of total carotenoid and β -carotene in bitter yellow cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. *African Journal of Food Science*. 4: 148–155.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Bomser, J., Ferruzzi, M., & Ningsanond, S. (2007). Phytochemical profiling and phase II enzyme-inducing properties of *Thunbergia laurifolia* Lindl. (RC) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 114: 300-306.
- Oonsivilai, R., Ferruzzi, M., & Ningsanond, S. (2008). Antioxidant activity and cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) extracts. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. 1(2): 116-128.
- Osman, A.M. (2011). Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH[•] and the oxidized form of the polyphenol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 412: 473-478.
- Ozgen, M., Serce, S., & Kaya, C. (2009). Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Scientia Horticulturae*. 119: 275-279.

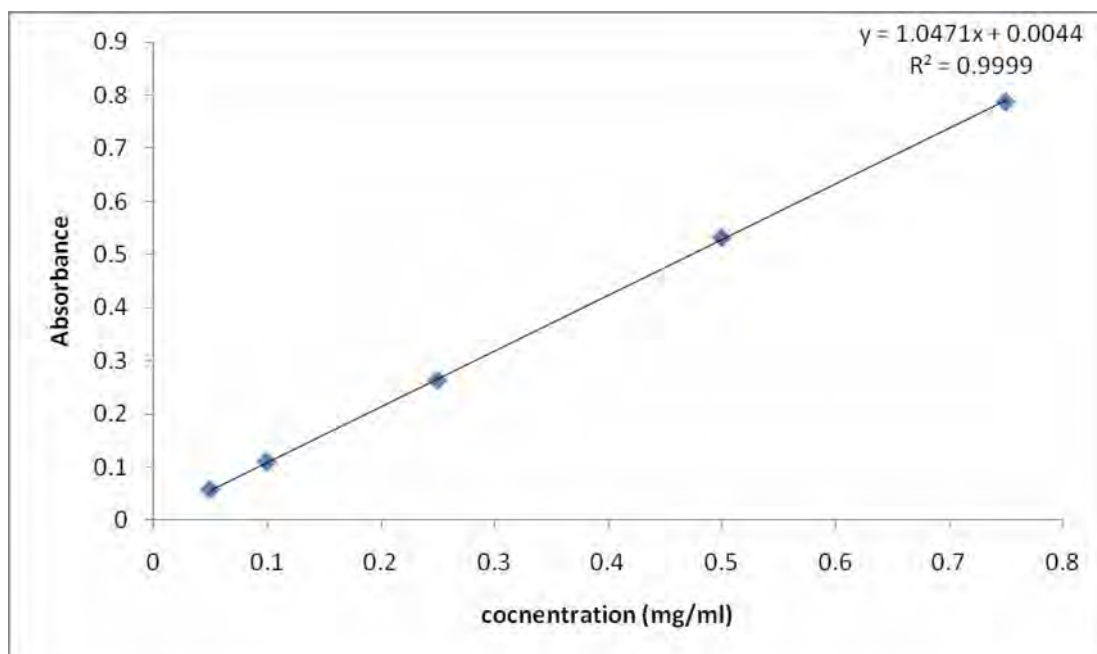
- Packer, L., Rimbach, G., & Virgili, F. (1999). Antioxidant activity and biologic properties of aprocyanidin-rich extract from pine (*Pinus Maritima*) bark pycnogenol. *Free Radical Biology & Medicine*. 27: 704–724.
- Pavanand. K., Webster, H., & Yomgvanchit, K. (1989). Antimalarial activity of *Tiliacora triandra* Diels against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Phytotherapy research*. 3: 215-217.
- Peanice, R. and et al. (2009). Bergamot: A source of natural antioxidant for functionalized fruit juices. *Food Chemistry*. 112: 545-550.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2000). *Antioxidants in food: Practical application*. United states of America : Woodhead Publishing Ltd.
- Ramesh, T., & Devasenapathy, P. (2006). Physiological response of cowpea in a rainfed alfisol ecosystem to the impulse of soil moisture conservation practices. *Gen.Appl.Plant Physiology*. 32, 181-190.
- Ravindranath, V. and Chandrasekhara, N. (1980). Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*. 16(3): 259-265.
- Saenz, C., Tapia, S., Chavez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114, 616–622.
- Saiin, C., & Markmee, S. (2003). Isolation of Anti-malarial Active Compound from Yanang (*Tiliacora triandra* Diels). *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 37: 47-51.
- Shahidi, F. (1997). *Natural antioxidants Chemistry, Health effects and Applications*. United states of America: AOCS Press.
- Singthong, J., Ningsanond, S., & Cui, S. (2009). Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. *Food Chemistry*, 114, 1301–1307.
- Sireeratawong, S. and et al. (2008). Acute and subchronic toxicity study of the water extract from *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels in rats. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 30: 611-619.
- Smitinand, T., & Larsen, K. (1991). *Flora of Thailand (Vol.5 Part 3)*. The Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.
- Steinbuechel, A. and Rhee, S.K. (2005). *Polysaccharide and Polyamides in the food Industry: Properties, Production and Patents*. Norway: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Ushimaru, T. and et al. (2006). Transgenic Arabidopsis plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *Journal of Plant Physiology*. 163: 1179—1184.
- Wildman, R.E.C.. (2007). *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. United States of America: CRC Press LLC.
- Wiriyachitra, P., & Phuriyakorn, B. (1981). Alkaloids of *Tiliacora triandra*. *Australian Journal of Chemistry*, 34, 2001-2004.
- Wongsa, P., Takeaw, R., & Deerod, O. (2010). Some phytochemical compounds and antioxidant activity of Thai pungency chili genotype during maturity stages. *In Proceedings of Food Innovation Asia Conference: Indigenous Food Research and Development to Global Market*, Bangkok, Thailand. (pp. 284-293).

ภาคผนวก ก
กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์

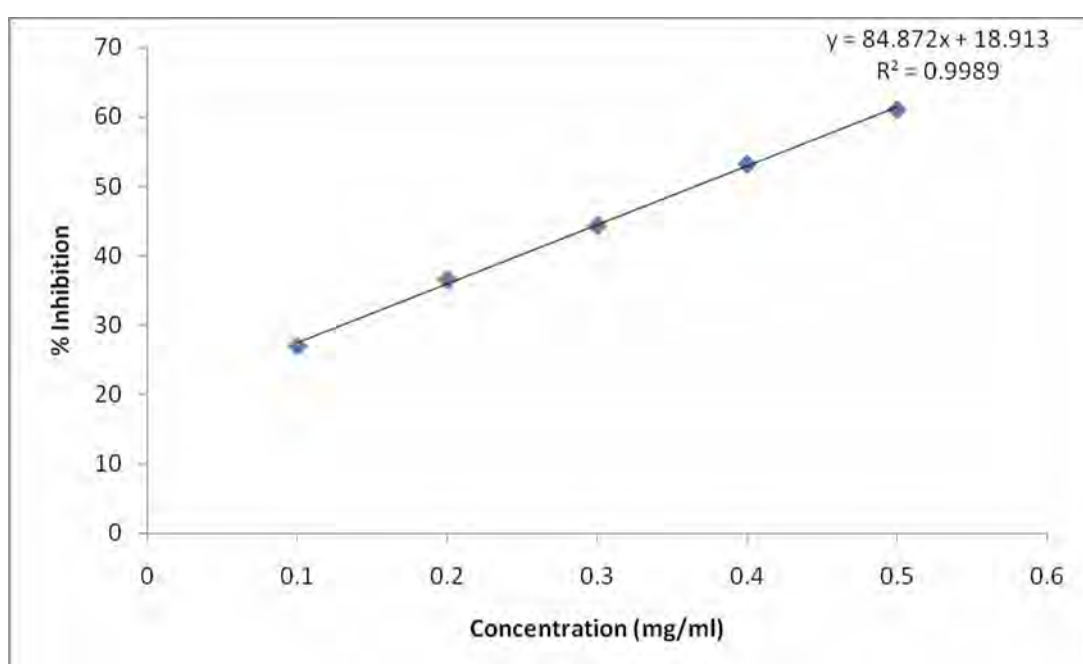
1. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Total Phenolics

1.1 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid

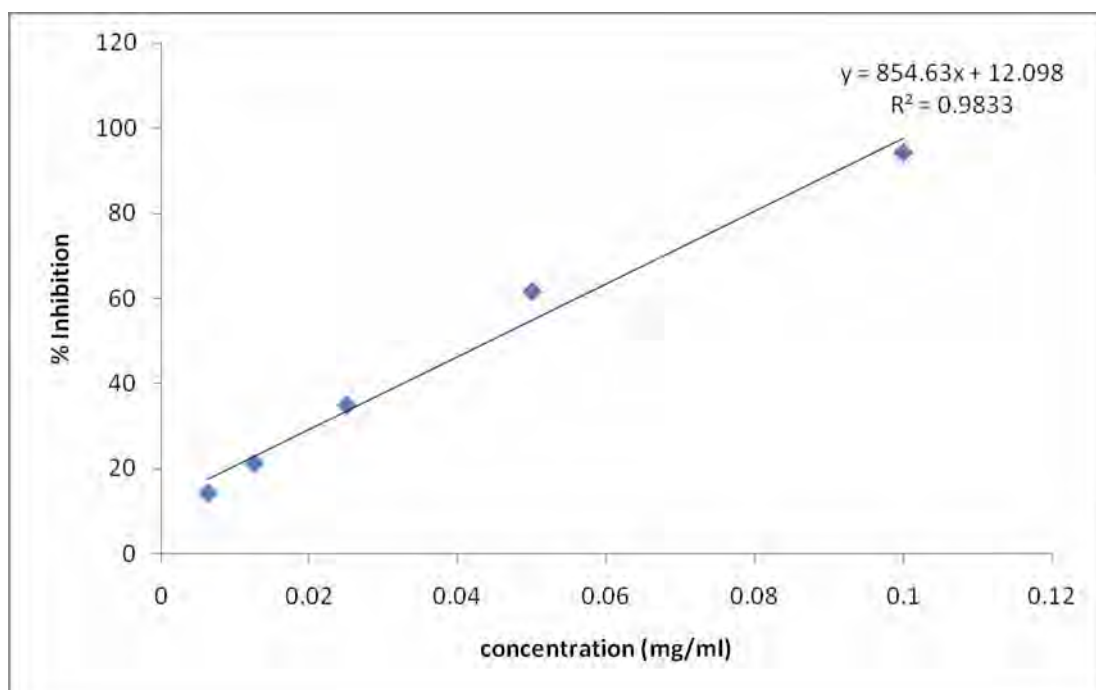


2. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Antioxidant ด้วย DPPH Assay

2.1 กราฟมาตรฐานของ BHT

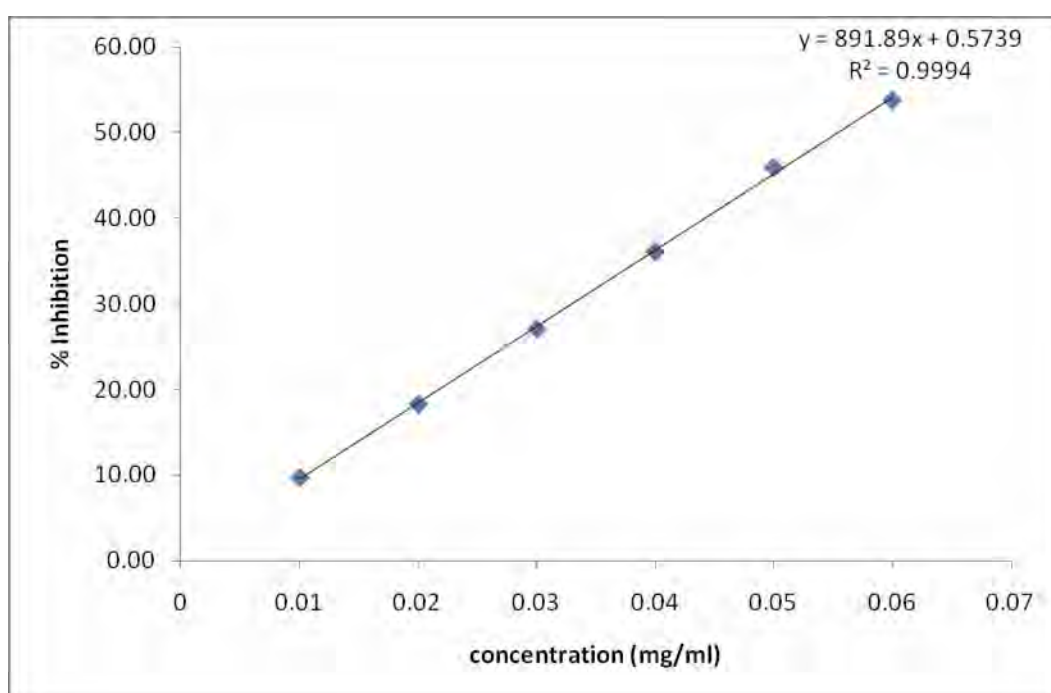


2.2 กราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid

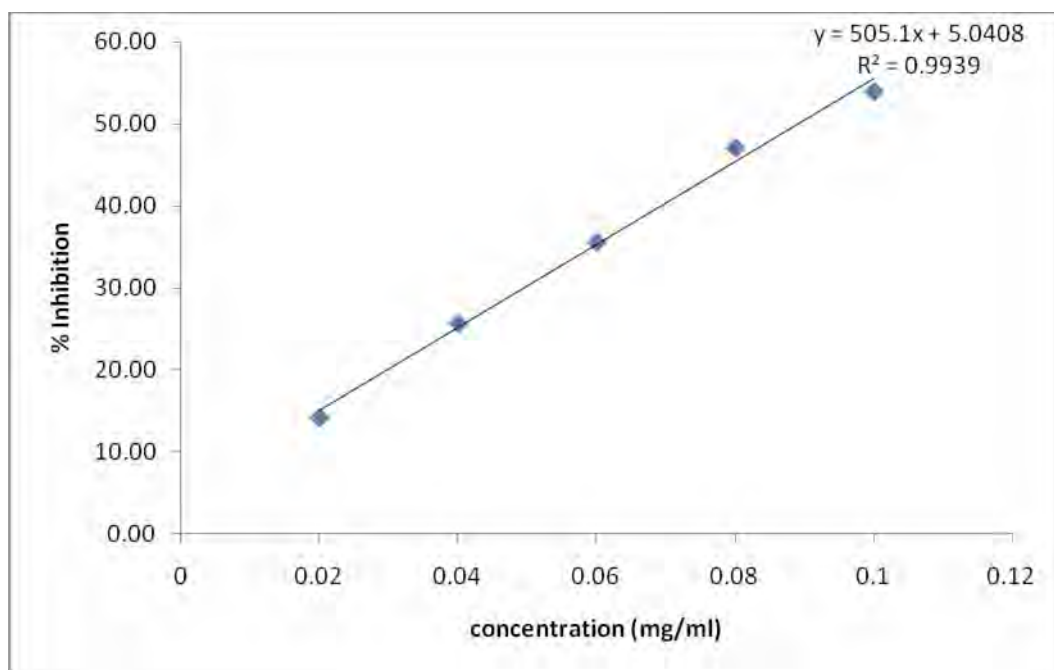


3. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Antioxidant ด้วย ABTS Assay

3.1 กราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid

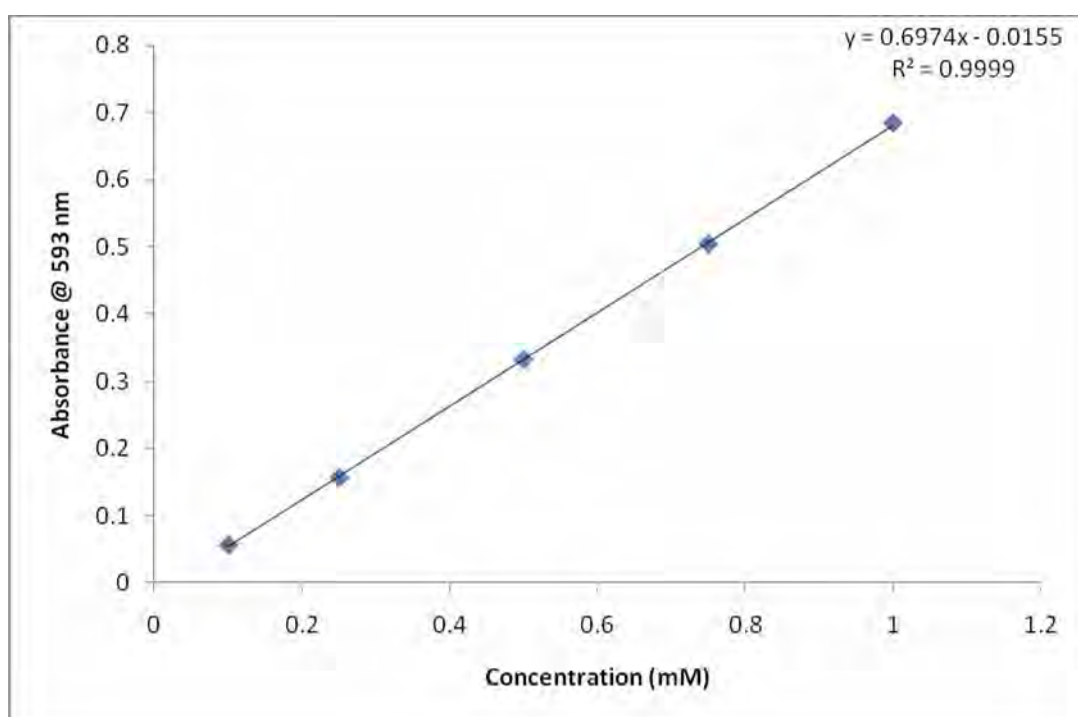


3.2 กราฟมาตรฐานของ BHT

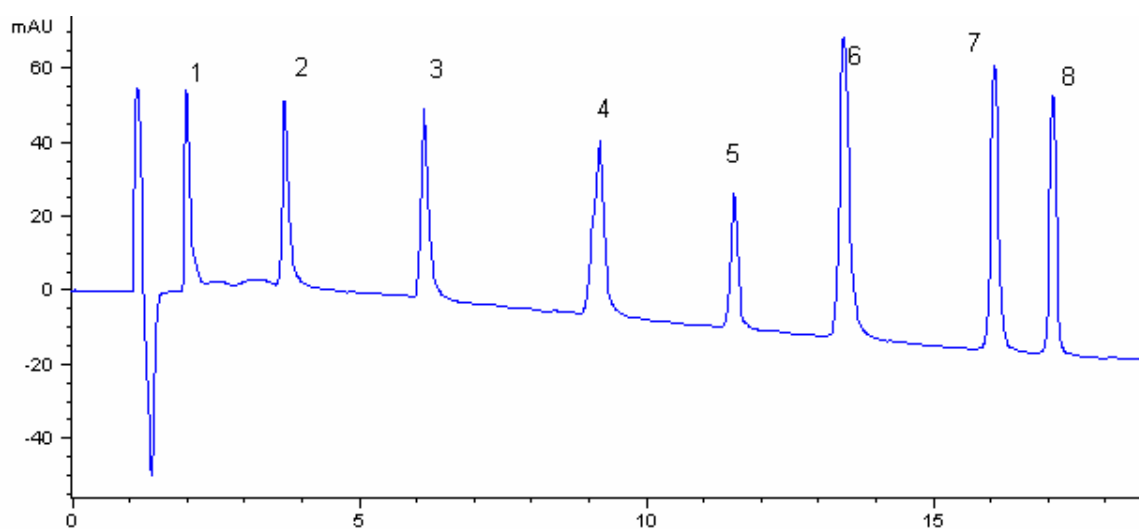


4. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Antioxidant ด้วย FRAP Assay

4.1 กราฟมาตรฐานของ Ferrous sulphate



5. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Phenolic profile ด้วย HPLC



1= gallic acid,

2= protocatechuic acid,

3=*p*-hydroxybenzoic acid,

4= chlorogenic acid,

5= vanillic acid,

6= syringic acid,

7= *p*-coumaric acid,

8= ferulic acid

ภาคผนวก ข

สมการ **Regression** กระบวนการไมโครแคปซูลสารสกัดจากไบยานาง

Yield (R-Squared 0.9327)

$$\text{Yild} = +20.09413 + 2.34943 * \text{GA} + 179.16555 * \text{C:W} + 0.032663 * \text{Temp} - 0.071987 * \text{GA}^2$$

$$\begin{aligned} & -631.97368 * C:W^2 -6.09167 \times 10^{-4} * Temp^2 -3.57831 * GA * C:W \\ & -2.40000 \times 10^{-3} * GA * Temp +0.83735 * C:W * Temp \end{aligned}$$

Total phenolic (R-Squared 0.8323)

$$\begin{aligned} \text{Total Phenolic} = & +1051.78588 +0.63854 * GA -517.05037 * C:W -13.62540 * Temp \\ & +0.040567 * GA^2 +1999.08066 * C:W^2 +0.047129 * Temp^2 \\ & -4.03614 * GA * C:W -4.45000 \times 10^{-3} * GA * Temp -1.09639 * C:W * Temp \end{aligned}$$

Antioxidant (R-Squared 0.7134)

$$\begin{aligned} \text{Antioxidant} = & +124.63765 +0.56940 * GA -271.71342 * C:W -1.45104 * Temp \\ & -1.26667 \times 10^{-3} * GA^2 +1351.18788 * C:W^2 +6.00833 \times 10^{-3} * Temp^2 \\ & -3.52410 * GA * C:W +1.17500 \times 10^{-3} * GA * Temp -0.90060 * C:W * Temp \end{aligned}$$

Total Chlorophyll (R-Squared 0.8783)

$$\begin{aligned} \text{Total Chlorophyll} = & -7.95225 +0.26387 * GA -26.70293 * C:W +0.11725 * Temp \\ & -2.63333 \times 10^{-4} * GA^2 +33.19301 * C:W^2 -3.90833 \times 10^{-4} * Temp^2 \\ & -0.21687 * GA * C:W -1.45000 \times 10^{-3} * GA * Temp \\ & +0.12048 * C:W * Temp \end{aligned}$$

Total Carotenoids (R-Squared 0.7002)

$$\begin{aligned} \text{Total Carotenoids} = & -0.52021 -0.12403 * GA -193.42651 * C:W +0.24744 * Temp \\ & +4.98667 \times 10^{-3} * GA^2 +345.28475 * C:W^2 -9.90833 \times 10^{-4} * Temp^2 \\ & +0.054217 * GA * C:W -7.50000 \times 10^{-5} * GA * Temp \\ & +0.49699 * C:W * Temp \end{aligned}$$

Moisture content (R-Squared 0.7368)

$$\begin{aligned} \text{Moisture} = & -46.97619 +0.25585 * GA +27.46585 * C:W +0.65860 * Temp \\ & -1.19667 \times 10^{-3} * GA^2 +14.56428 * C:W^2 -2.22417 \times 10^{-3} * Temp^2 \\ & -1.57229 * GA * C:W +3.25000 \times 10^{-4} * GA * Temp -0.033133 * C:W * Temp \end{aligned}$$

Size of microencapsulation (R-Squared 0.7677)

$$\begin{aligned}
 \text{Size} = & -95.64749 + 2.48448 * \text{GA} + 87.63391 * \text{C:W} + 1.03774 * \text{Temp} - 0.032800 * \text{GA}^2 \\
 & - 142.25577 * \text{C:W}^2 - 2.95000 \times 10^{-3} * \text{Temp}^2 - 0.48193 * \text{GA} * \text{C:W} \\
 & - 8.00000 \times 10^{-3} * \text{GA} * \text{Temp} - 0.24096 * \text{C:W} * \text{Temp}
 \end{aligned}$$

หมายเหตุ:

GA = gum arabic

C:W = core : wall material

Temp = Inlet temperature ($^{\circ}\text{C}$)

ภาคผนวก ค

Manuscript

Bioactive compounds and encapsulation of Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves

Jittra Singthong^{1*}, Ratchadaporn Oonsivilai², Jirawan Oonmetta-aree³ and
Suwayd Ningsanond²

¹*Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University,
Warinchamrap, Ubon Ratchathani, 34190 THAILAND*

²*School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University
of Technology, Muang, Nakhon Ratchasima, 30000 THAILAND*

³*Food Science and Technology Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon
Ratchasima Rajabhat University, Muang, Nakhon Ratchasima, 30000 THAILAND*

* corresponding author.

Tel 66-45-353-500

Fax 66-45-288-373

E-mail: jittrawara@agri.ubu.ac.th, jittrawara@gmail.com

Highlights

► Yanang (*Tiliacora triandra*) is a well-known herb, growing mostly in northeastern Thailand. ► Extracts from Yanang leaves contain high amounts of polyphenol constituents possessing antioxidant activity. ► Spray drying process gives high yield encapsulation efficiency and stabilizes bioactive compounds.

Abstract

Yanang (*Tiliacora triandra*) is known as vegetable and herbal in the northeast of Thailand and Lao People's Democratic Republic. This work investigated bioactive compounds of Yanang extracts which were prepared by infusion with water, ethanol and acetone. The study of bioactivity of Yanang extracts found that the extraction with water is appropriate application. Furthermore, this paper reports a designed of experimental for optimizing Yanang encapsulation using three independent variables: the ratio of core material (Yanang) to wall material (gum arabic), gum arabic concentration and inlet temperature of spray drying on bioactive compounds stability. The stability of bioactive compounds was evaluated by phenolic compounds, total antioxidant, carotenoids and chlorophyll. The study demonstrated that gum arabic, as coating agents, protected bioactive compounds of Yanang. Optimized condition for the encapsulation was at the ratio of core to wall 1:4 in gum arabic concentration 10%(w/v) and inlet temperature at 160°C. The results show that the bioactive compounds were mainly affected by the ratio of core to wall material. Besides, moisture content and particle size of encapsulation depend on inlet temperature of spray drying and gum arabic concentration, respectively. This optimization reveals that encapsulation process did not lose the bioactive compounds. In conclusion, this study demonstrates the potential of using spray drying process and optimization for encapsulation of herbal products.

Keywords: Yanang, *Tiliacora triandra*, Encapsulation, Spray drying,
Bioactive compounds

1. Introduction

Yanang, *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels, is in the family of *Menispermaceae*. It is a species of flowering plant native to mainland Southeast Asia, and is widespread in northeast Thailand. Yanang is common in deciduous and dry evergreen forests (Smitinand and Larson, 1991). It is a climbing plant with deep green leaves and yellowish flowers. It is used particularly in the cuisines of northeast Thailand and Lao PDR, especially in bamboo shoot soup. The extract from Yanang root is used as herbal medicine for treatment of fever and malaria, and is also an antipyretic (Wiriyaichita and Phuriyakorn, 1981). A number of alkaloids, especially bisbenzylisoquinoline alkaloids have been identified in Yanang, which include tiliacorinine, tiliacrine and nortiliacorinine (Mahidol, et al., 1994; Wiriyaichita and Phuriyakorn, 1981).

Since consumers are more aware of the relationships between diet and health, the demand for functional foods, or foods that promote health beyond providing basic nutrition, is increasing constantly. Increased vegetable consumption has been associated with the prevention of the risk of human diseases, intensifying interest in plant food phytochemicals as potential physiologically active agents. Considering the growing use of vegetables or herbs in medicinal applications, it is perhaps the potential role of these active agents in the prevention of human diseases that has drawn more attention to them. The world Bank has projected the global market for herbal products to grow from USD 200 billion in 2008 to USD 5 trillion in 2050 (Chan, et al., 2010). A key factor for the rapid growth of the market is the consumer's growing knowledge and confidence in natural products or medicines. In addition, bioactive compounds of herbal plants such as antioxidant, phenolic compounds, carotenoids and chlorophyll have been shown to have multiple functional and remedial properties (Bae and Suh, 2007). However, the stability of bioactive compounds was unstable, depending on pH, light, oxygen, temperature and enzymatic activities (Saénz, et al., 2009). It is possible that the stabilization of bioactive compounds could be improved using encapsulation technologies.

Encapsulation is a process in which thin films, generally of polymeric materials applied to little solid particles, liquid or gases droplets. This method is used to trap bioactive compounds and release them under controlled conditions. Several materials have been encapsulated in the food industry such as amino acids, vitamins, minerals, antioxidants, colorants, enzymes and sweeteners (Deladino, et al., 2008). In addition, encapsulation may promote better product stability by isolating bioactive compound from

the detrimental effects of oxygen or moisture (Chan et al., 2010). Spray drying encapsulation has been used in the food industry to provide active ingredient with removal water and to convert liquids to powders. By decreasing water content and water activity, spray-drying is generally used in food industry to ensure a microbiological stability of products, avoid the risk of chemical and/or biological degradation, reduce the storage and transport costs, and finally obtain a product with specific properties like instantaneous solubility for example (Gouin, 2004; Gharsallaoui, et al., 2007). However, there is no information available in the literature on any encapsulation of Yanang extract. Therefore, the aim of this research was to investigate bioactive compounds and to optimize the encapsulation process of Yanang leaves extract and to characterize its bioactive compounds stability.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Yanang leaves, procured from a local market in the northeast of Thailand (Ubon Ratchathani Province) were cleaned with water to remove dust and infected leaves were separated. The prepared leaves were then dried at 60°C for 3 h. The dried leaves were ground leaves and stored at room temperature in a vacuum-packed container before use (Singthong, et al., 2009).

2.2 Preparation of Yanang leaves extracts

Approximately 100 mg Yanang leaves powder was extracted with three 12 mL portion of boiling water, ethanol, or acetone in a shaking water bath at 25°C for 15 min. Samples were centrifuged at 3000 x g for 3 min after which solvent layers were collected and filtered by vacuum. Filtrates were combined and final volume was adjusted volumetrically (with representative extraction solvent) to 50 ml. Aliquots of 2 ml were dried under vacuum and stored frozen at -20°C until use (Oonsivilai, et al., 2007).

2.3 Encapsulation optimization

The experimental design of encapsulation was carried out under various conditions, according to a central composite design (CCD). The effect of three independent variables; gum arabic concentration, X_1 (10-20%w/v), the ratio of core material (5% (w/v) Yanang leaves extract) to wall material (gum arabic), X_2 (1:6-1:4) and Inlet temperature of spray drying, X_3 (140-160°C) was determined, using the detailed

experimental design shown in Table 1. The independent variables were coded to three levels of -1, 0 and +1. The optimization condition for encapsulation Yanang leaves extract was determined using response surface methodology. All experimental data were statistically analysed with Design-Expert® software (Version 6.0.10, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN).

Encapsulation was prepared as follows: dried Yanang leaves were mixed with water and gum arabic with constant stirring and heated to 60°C for 1 h. The mixture was filtered through a vacuum filter. The supernatant was fed to spray-dryer (EYELA spray-dryer SD-100, Japan). The spray-dryer was operated at inlet temperature ranging from 140-160°C and outlet temperature was ~90°C. The blower, flow, rate and atomization pressure was 9.9m²/min, 1.9ml/h and 9.0x10KPa, respectively. The powders obtain were stored in vacuum container at room temperature for further analysis

2.4 Analytical methods

2.4.1 Total phenolic content (TPC)

Total soluble phenolic constituents of the Yanang extracts and encapsulation using the Folin-Ciocalteu reagent with gallic acid as standard. Twenty µl of solution sample was added into a 1.5 ml cuvette, to which 1.58 ml of water and 100 µl Folin-Ciocalteu reagent was added. The sample was thoroughly mixed and incubated for 5 min at room temperature. Following incubation 300 µl of the Na₂CO₃ (2% w/v) solution was added and the mixture was allowed to stand at room temperature for 2 h. Absorbance was measured at 765 nm. Results were expressed as gallic acid equivalents (GAE) (Oonsivilai et al., 2007).

2.4.2 The DPPH method

Antioxidant activity was evaluated in accordance with the DPPH method. Free radical scavenging activity was determined using the stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical according to the procedure described by Brand-Williams, et al. (1995) with slightly modification. Briefly, 50 µl of samples and/or standard were added to 1.9 µl DPPH methanolic solution. The reaction mixture was covered and left in the dark at room temperature. After 15 min, the absorption was measured at 515 nm. Ascorbic acid and BHT were used as standard control.

IC₅₀ value is the concentration of sample required to scavenge 50% DPPH free radical and was calculated from a calibration curve by a linear regression.

2.4.3 The FRAP method

This method was proposed by Bae and Suh (2007) which involves the presence of antioxidants in extract to reduce the ferricyanide complex to the ferrous form. The FRAP solution (1.5 ml) was added to 50 μ l of samples and/or standard. The reaction mixture was covered and left in the dark at room temperature for 4 min. The absorption was measured at 593 nm. Trolox and BHT were used as standard control. IC₅₀ value was estimated and calculated.

2.4.4 The ABTS method

The antioxidant activity was evaluated using ABTS⁺ method (Bae and Suh, 2007). Fifty μ l of and/or standard were added to 950 μ l ABTS⁺ solution. The reaction mixture was covered and left in the dark at room temperature. After 6 min, the absorption was measured at 734 nm. Trolox and BHT were used as standard control. IC₅₀ value was estimated and calculated.

2.4.5 Total carotenoids

Total carotenoids was carried out using the method of Wongsu, et al. (2010) with slightly modification. Sample solution 10 ml was extracted with 10 ml of acetone:ethanol (1:1 v/v). It was centrifuged at 1500 $\times g$ for 15 min at 4 - 5°C. The supernatant final volume was adjusted to 100 ml. The absorbance was measured at 450 nm and calculated.

2.4.6 Total chlorophyll

Total chlorophyll was carried out using the method of Ramesh and Devasenapathy (2006) with slightly modification. Ten ml of sample solution was extracted with acetone 10 ml. The supernatant final volume was adjusted to 50 ml. The absorbance was measured at 652 nm and calculated.

2.4.7 Moisture content

Moisture determination was performed according to AOAC method (1995).

2.4.8 Color measurement

The color of the capsule powder was determined using a Hunter Lab (Color Flex Model 45/0, USA).

2.4.9 Scanning electron microscopy (SEM)

The outer structures of the capsules obtained by optimal conditions were studied by SEM. The samples were coated with gold using a sputter coater, model SPI-MODULETM Sputter Coat, and examined by a JEOL, JSM-5410LV scanning microscope.

2.5 Statistical analysis

All measurements were carried out in at least three replicate experiments, and the results are reported as the means with standard deviation. Means of each parameter were analyzed by analysis of variance (ANOVA). Differences between treatments at the 5% ($p \leq 0.05$) level were considered significant.

RSM was focused on determining the regression coefficients and statistical significance of model terms. RSM helps in fitting the regression models to the experimental data to achieve an overall optimal region for all response variables studied. The generalized response surface model is given below:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_{ij}$$

Where, Y is the response, which is calculated by the model; β_0 is a constant; β_i , β_{ii} and β_{ij} are linear, squared and interaction coefficients, respectively. According to Myer (1995), R^2 should be at least 0.80 for a good fit of a model. Larger values of absolute t-value and smaller values of p -value show that the variables would be more significant ($p \leq 0.05$). The terms found to be statistically non-significant ($p > 0.05$) were removed and the experimental data was refitted to only the significant ($p \leq 0.05$) factors to obtain the final reduced model. The experimental design, data analysis and optimization procedure were carried out using the Design-Expert[®] software (Version 6.0.10, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN).

3. Results and discussion

3.1 Bioactive compounds of Yanang extracts

Water, ethanol and acetone extracts of Yanang were examined to determine the best extraction solvent to be used in this study. Among the three solvents, the water extract yielded the highest TPC (97.899 mg GAE/g). The TPC values of the ethanol and acetone extracts were lower, being 26.703 and 16.456 mg GAE/g, respectively (Table 2). Water is the most suitable solvent in the extraction of polyphenolic compounds from this plant. These results seem similar to a study made by Cai, et al. (2004), whereby water extraction of a powder sample of *P. oleracea* at 80°C for 20 min yielded the highest total phenol content. The reason could be due to the hydrolysis of the glycosidic and ester bonds of the condensed phenolic compounds at near boiling temperature (Obboh, 2005). Phenolic phytochemicals are thought to promote optimum health partly via their

antioxidant and free scavenging effects which protecting cellular components against free radical induced damage (Dapkevicius, et al., 2002; Jabri-Karoui, et al., 2012).

The antioxidant activity may be due to different mechanisms, such as prevention of chain initiation, decomposition of peroxides and prevention of continued hydrogen abstraction, free radical scavenging, reducing capacity and binding of transition-metal ion catalysts (Mao, et al., 2006; Jabri-Karoui et al., 2012). Thus, for improving antioxidant effectiveness, several analytical methods are used. The results of antioxidant activity determined by three complementary test system via DPPH, ABTS and FRAP assay are shown in Table 2. DPPH is a free radical and accepts an electron or hydrogen radical to become a stable diamagnetic molecule (Brand-Williams et al., 1995). The reduction capability of DPPH radical was determined by the decrease in absorbance by reduced DPPH to by plant antioxidants (Ksouri, et al., 2009). Free radical scavenging property of water extract was characterized by a higher free radical scavenging property (IC_{50} of 0.197 mg/ml) with comparison to that of ethanol and acetone extracts (IC_{50} = 0.333 and 0.419 mg/ml, respectively). This antiradical activity could be due to the phenolic compounds. The water extract of Yanang displayed the most favorable activity against DPPH and was significantly more active than the reference compound, ascorbic acid and BHT (IC_{50} = 0.36 and 0.34 mg/ml, respectively).

The reducing power (FRAP assay) serves as a significant indicator of its antioxidant activity. The reducing power of Yanang extracts ranged from 0.014 to 0.054 mmol Fe^{2+} /g. The reduction of the Fe^{3+} /ferricyanide complex to the ferrous form (Fe^{2+}) due to antioxidants was monitored (Joshi, et al., 2010). The water extract showed the highest reducing power, which also indicated their potential as electron donors to scavenge free radicals. However, Yanang extracts showed weak antioxidant activity as compared to standards (ascorbic acid and BHT). Free radical scavenging activity for ABTS radical expressed as IC_{50} ranged from 0.077 to 0.312 mg/ml. The water extract was observed as the most powerful ABTS radical scavenger as compared to the other extracts as evidenced by low IC_{50} (0.077 mg/ml) followed by ethanol and acetone extracts with IC_{50} values of 0.191 and 0.312 mg/ml, respectively. ABTS radical scavenging activity for Yanang extracts were comparable with ascorbic acid and BHT (IC_{50} = 0.041 and 0.090 mg/ml, respectively). The water extract is the most suitable activity against antioxidant activity. Yanang extracts with high phenolic content had the most promising antioxidant

activity. The higher TPC value corresponded with higher FRAP values and lower IC₅₀ of DPPH and ABTS values.

3.2 Yanang encapsulation

3.2.1 Yield

The main effects of gum arabic concentration and the quadratic effects of gum arabic and core to wall material ratio, significantly ($p < 0.05$) affected the yield value of Yanang encapsulated using spray dryer. Thus, an increase of the core material lead to increased yield. In the present study, encapsulation of Yanang in gum arabic provided an example of a swelling-controlled system for the controlled release of bioactive compounds (Mehrnoush, et al., 2011). When the core material increased in the optimum wall material (gum arabic) concentration, the core material that is protected against oxidation by a wall material (Gharallaoui et al., 2007). Fig. 1 shows how significant ($p < 0.05$) interaction effects of independent variables influenced the yield of Yanang encapsulation. The quadratic effects of independent variables could be explained by the curvature in three-dimensional response surface plots. The interaction between gum arabic concentration, the ratio of core to wall material and inlet temperature gave rise to a higher yield at low gum arabic concentration and a wide range of the ratio and inlet temperature. The individual optimum region led to a maximum yield value ($R^2 = 0.93$) that was predicted to be achieved in the spray drying system by a combined level of 10% gum arabic, the ratio of core to wall material 1:4 and inlet temperature of spray dryer 160°C.

3.2.2 Bioactive compounds

Bioactive compounds in many plants and fruits were the important such as phenolic compounds, chlorophyll, etc. The ratio of core material to wall material, gum arabic concentrate and inlet temperature were have effected to bioactive compounds in Yanang encapsulation as shown in Fig. 2-5.

The result (Table 3) indicated that the main effect of the ratio of core to wall material, the quadratic effects of the ratio of core to wall material and inlet temperature of spray dryer, significantly ($p < 0.05$) affected the total phenolic compounds of Yanang encapsulation using spray drying. Fig. 2 showed the response surface plots illustrating the effects of the ratio of core to wall material, gum arabic concentration and inlet temperature of spray dryer on total phenolic compounds. All high the ratio of core to wall material gave a rise to the high total phenolic compounds. The individual optimum region

led to a high total phenolic value ($R^2=0.83$) that was predicted to be achieved in the spray drying system by a combined level of 10% gum arabic, the ratio of core to wall material 1:4 and inlet temperature of spray dryer 160°C. Total antioxidant value showed the result similar as total phenolic compounds as shown in Fig. 3. Increasing the ratio of core to wall material effected in increased bioactive compounds of encapsulation system. Spray drying of Yanang encapsulation showed that the main effects of the ratio of core to wall material indicated the significant ($p<0.05$) effect on the total antioxidant of Yanang encapsulation. Total phenolic increased with increase in the ratio of core to wall material. The increased total phenolic content might be due to interference of core material (Yanang extract) with the phenolic compounds during analysis. It is well known that the amounts of phenolic contents may affect the antioxidant activity of food (Ahmed, et al., 2010). Similar results were report by Ahmed et al. (2010), and Jabri-Karoui et al. (2012) that the total antioxidant activity was highly correlated with total phenolic content.

The results (Table 3) indicated that the main effect of the ratio of core to wall material, in addition the quadratic effects of the ratio of core to wall material and the interaction effects of gum arabic concentration and inlet temperature of spray dryer significantly ($p<0.05$) influenced the chlorophyll content of Yanang encapsulation using spray drying (Fig.4). The highest total chlorophyll value ($R^2=0.88$) was predicted to be a combined level of 10% gum arabic concentration, the ratio of core to wall material 1:4 and 160°C inlet temperature of spray dryer. Fig. 5 displayed response surface plots of the effects of gum arabic concentration, the ratio of core to wall material and inlet temperature of spray dryer on total carotenoids, the maximum total carotenoids content was at high the ratio of core to wall material and a wide range of gum arabic concentration and inlet temperature. In addition, total chlorophyll value showed the result similar as total carotenoids (Fig. 4).

3.2.3 Moisture content

Air inlet temperature is directly proportional to the microcapsule drying rate and the final water content (Gharsallaoui et al., 2007). Spray drying of Yanang encapsulation showed that the main effects of inlet temperature and the quadratic effects of inlet temperature indicated the significant ($p<0.05$) effects on moisture content of Yanang encapsulation (Table 4). The optimum inlet temperature is 160°C which can safely be used without damaging the product.

3.2.4 Color values

The Hunter color parameter of Yanang encapsulation with different encapsulation conditions (Table 4). There were no significant difference in L^* and b^* values. However, L^* value decreased with increase the ratio of core to wall material. On the other hand, b^* value increased with increase the ratio of core to wall material. The changes of color values were attributed to concentration of Yanang extract.

3.2.5 Microstructure

Under an electron microscope, the Yanang encapsulation using spray dryer was observed (Fig. 6). The results (Table 4) indicated that main effect of gum arabic and the quadratic effects of gum arabic showed the significant ($p < 0.05$) effects on size of Yanang encapsulation. The external morphology of particles showed a spherical shape and various sizes with no apparent cracks or fissures, which is an advantage, since it implies that capsules have lower permeability to gases, increasing protection and retention of the active material. Moreover, the variety in size is a typical characteristic of particles produced by spray drying (Gharsallaoui et al., 2007). The mixer of different encapsulation conditions influenced on microparticles morphology. This is more evident when comparing the images from the combination of low gum arabic, high ratio of core to wall material and high inlet temperature with the others, since this condition resulted in microspheres with smoother surface and fewer teeth or roughness. The formation of the dented surfaces of the spray-dried particles was attributed to the shrinkage of the particles during the drying process (Saénz, et al., 2009).

3.2.6 Optimized encapsulation

The statistical analysis indicated that the proposed model was adequate, processing insignificant lack of fit and with statistically R^2 values for yield and bioactive compounds of 0.9 and 0.8, respectively. The optimized condition of Yanang encapsulation was 10%, 1:4 and 160°C for gum arabic concentration, the ratio of core to wall material and inlet temperature of spray drying, respectively.

4. Conclusion

In conclusion, it is found that Yanang extract with water was the main phenolic compound and high antioxidant activities. Antioxidant activity of Yanang was high enough for the plant to be a new and natural source of antioxidant substances for use as natural additives in food. Optimized Yanang encapsulation was identified as 1:4 ratio of

core material to wall material, 10% gum arabic concentration and 160°C inlet temperature of spray dryer. From all 3 parameters chosen, the parameter found to effect encapsulation of Yanang most was the ratio of core material to wall material. Spray drying method can give the high yield encapsulation efficiency and stabilize bioactive compounds. Encapsulation of Yanang is an interesting food addition for incorporation into functional foods.

Acknowledgements

The authors would like to thank Thailand Research Fund (TRF) and Ubon Ratchathani University, Thailand for financial supports.

References

- Ahmed, M., Akter, S., Lee, J., & Eun, J. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 1307-1313.
- AOAC. (1995). *Official Methods of Association of Analytical Chemists*. (16th ed.). Washington, DC: Association of Analytical Chemists.
- Bae, S., & Suh, H. (2007). Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT -Food Science and Technology*, 40, 955–962.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT -Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with cancer. *Life Sciences*, 74, 2157-2184.
- Chan, E.S., Yim, Z.H., Phan, S.H., Mansa, R.F., & Ravindra, P. (2010). Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. *Food and Bioproducts Processing*, 8, 195–201.
- Dapkevicius, A., Van Beek, T.A., Lelyveld, G.P., Van Veldhuizen, A., De Groot, A.E., Linssen, J.P.H., & Venskutonis, R. (2002). Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *Journal of Natural Products*, 65, 892-896.

- Deladino, L., Anbinder, P., Navarro, A., & Martino, M. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71, 126–134.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330-347.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107–1121.
- Joshi, S.C., Verma, A.R., & Mathela, C.S. (2010). Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 37-40.
- Jabri-Karoui, I., Bettaieb, I., Masada, K., Hammami, M., & Marzouk, B. (2012). Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *Journal of Functional Foods*, 4, 661-669.
- Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C., & Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2083-2091.
- Mao, L.C., Pan, X., Que, F., & Fang, X.H. (2006). Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze dried daylily flowers. *European Food Research and Technology*, 222, 236-241.
- Mahidol, C., Sahakitpichan, P., & Ruchirawat, S. (1994). Bioactive natural products from Thai plants. *Journal of Pure and Applied Chemistry*, 66, 2353-2356.
- Myers, R.H. (1995). *Response surface methodology: Process and product in optimization using designed experiments*. New York: Wiley.
- Mehnouch, A., Tan, C.P., Hamed, M., Azis, N., & Ling, T.C. (2011). Optimisation of freeze drying conditions for purified serine protease from mango (*Mangifera indica* Cv. Chokanan) peel. *Food Chemistry*, 128, 158-164.
- Oboh, G. (2005). Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 513-517.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Bomser, J., Ferruzzi, M., & Ningsanond, S. (2007). Phytochemical profiling and phase II enzyme-inducing properties of *Thunbergia laurifolia* Lindl. (RC) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 300-306.

- Ramesh, T., & Devasenapathy, P. (2006). Physiological response of cowpea in a rainfed alfisol ecosystem to the impulse of soil moisture conservation practices. *Gen.Appl.Plant Physiology*, 32, 181-190.
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114, 616–622.
- Singthong, J., Ningsanond, S., & Cui, S. (2009). Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. *Food Chemistry*, 114, 1301–1307.
- Smitinand, T., & Larsen, K. (1991). *Flora of Thailand (Vol.5 Part 3)*. The Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.
- Wiriyachitra, P., & Phuriyakorn, B. (1981). Alkaloids of *Tiliacora triandra*. *Australian Journal of Chemistry*, 34, 2001-2004.
- Wongsa, P., Takeaw, R., & Deerod, O. (2010). Some phytochemical compounds and antioxidant activity of Thai pungency chili genotype during maturity stages. *In Proceedings of Food Innovation Asia Conference: Indigenous Food Research and Development to Global Market*, Bangkok, Thailand. (pp. 284-293).

Table 1. Central composite design (CCD) for the optimization of Yanang encapsulation

Treatment	Coded variable ^a			Process variable ^b		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1	10	1:6	140
2	-1	-1	+1	10	1:6	160
3	-1	+1	-1	10	1:4	140
4	-1	+1	+1	10	1:4	160
5	+1	-1	-1	20	1:6	140
6	+1	-1	+1	20	1:6	160
7	+1	+1	-1	20	1:4	140
8	+1	+1	+1	20	1:4	160
9	0	0	0	15	1:5	150
10	0	0	0	15	1:5	150
11	0	0	0	15	1:5	150
12	0	0	0	15	1:5	150
13	-2	0	0	5	1:5	150
14	+2	0	0	25	1:5	150
15	0	-2	0	15	1:7	150
16	0	+2	0	15	1:3	150
17	0	0	-2	15	1:5	130
18	0	0	+2	15	1:5	170

^a Coded level of variables: + = upper level, - = lower level and 0 = center points

^b X₁, X₂ and X₃ were gum arabic concentration (%), the ratio of core material to wall material (w/w), and outlet temperature (°C), respectively.

Table 2 Biological activities of Yanang extracts.

Yanang extracts	TPC (mgGAE/g)	DPPH (IC ₅₀ , mg/g)	ABTS (IC ₅₀ , mg/g)	FRAP (mmol Fe ²⁺ /g)
Water	97.899±1.735	0.197±0.018	0.077±0.011	0.054±0.0015
Ethanol	26.703±1.642	0.333±0.024	0.191±0.059	0.034±0.0012
Acetone	16.456±2.968	0.419±0.091	0.312±0.056	0.014±0.0006
Standard				
Ascorbic acid		0.36±0.01	0.041±0.026	0.059±0.028
BHT		0.34±0.04	0.090±0.010	0.254±0.143

*Values are given as mean ± SD (n=3).

Table 3 Bioactive compounds of Yanang encapsulation using combinations of various levels of the ratio of core to wall material, gum arabic concentration and inlet temperature.

Treatment	Total Carotenoids (mg/g sample)	Total Chlorophyll (mg/g sample)	Total Phenolic (mg GAE/g sample)	Total Antioxidant (mg AEAC/g sample)
1	4.24±0.06 ^{d*}	0.35±0.01 ^{ef}	4.67±0.35 ^j	15.10±0.90 ^e
2	4.46±0.06 ^d	0.37±0.01 ^{ef}	8.36±0.69 ⁱ	22.48±0.74 ^c
3	5.28±0.10 ^c	0.39±0.01 ^{de}	16.23±0.70 ^{fg}	25.40±0.14 ^b
4	8.07±0.93 ^a	0.84±0.05 ^a	20.71±0.89 ^e	30.42±0.25 ^a
5	2.49±0.31 ^f	0.35±0.04 ^{ef}	11.31±0.69 ^h	13.84±0.00 ^f
6	4.44±0.21 ^d	0.31±0.00 ^{fg}	16.72±1.39 ^{fg}	20.59±0.26 ^d
7	5.32±0.25 ^c	0.44±0.01 ^{cd}	22.13±0.70 ^{de}	20.35±0.44 ^d
8	6.35±0.34 ^b	0.37±0.02 ^{ef}	23.11±0.69 ^d	26.47±0.92 ^b
9	3.50±0.09 ^e	0.48±0.04 ^c	10.57±0.35 ^h	14.76±0.26 ^e
10	3.46±0.11 ^e	0.44±0.02 ^{cd}	10.93±0.82 ^h	14.03±0.26 ^e
11	3.44±0.06 ^e	0.45±0.02 ^{cd}	11.10±0.48 ^h	14.76±0.26 ^e
12	3.41±0.01 ^e	0.46±0.04 ^{cd}	10.70±0.20 ^h	14.39±0.25 ^e
13	2.24±0.25 ^f	0.46±0.01 ^{cd}	21.14±0.69 ^e	10.38±0.25 ^f
14	4.99±0.52 ^{cd}	0.43±0.01 ^{cd}	30.98±0.70 ^b	15.37±0.74 ^e
15	3.54±0.23 ^e	0.54±0.01 ^b	15.24±0.69 ^g	12.74±0.01 ^f
16	7.45±0.45 ^a	0.86±0.06 ^a	17.45±1.74 ^f	31.88±0.26 ^a
17	2.11±0.09 ^f	0.27±0.00 ^g	26.06±0.69 ^c	14.47±0.41 ^e
18	3.33±0.33 ^e	0.36±0.01 ^{ef}	36.22±0.75 ^a	16.34±0.29 ^e

*Mean values (n=3) with the superscript alphabets in each column are significantly different ($p<0.05$).

Table 4 Moisture, color, size and yield of Yanang encapsulation using combinations of various levels of the ratio of core to wall material, gum arabic concentration and inlet temperature.

Treatment	Moisture (%)	Color (L*)	Color (b*)	Size microencapsule (μm)	Yield (%)
1	6.07 $\pm$ 0.37 ^{defgh*}	88.78 $\pm$ 0.05 ^b	8.23 $\pm$ 0.04 ^h	5.80 $\pm$ 0.84 ^{de}	50.18 $\pm$ 0.43 ^h
2	5.74 $\pm$ 0.22 ^{fgh}	89.10 $\pm$ 0.03 ^a	8.10 $\pm$ 0.15 ^h	5.80 $\pm$ 1.10 ^{de}	50.43 $\pm$ 0.14 ^g
3	6.07 $\pm$ 0.38 ^{defgh}	86.95 $\pm$ 0.05 ^g	9.18 $\pm$ 0.09 ^d	4.40 $\pm$ 0.55 ^e	50.08 $\pm$ 0.23 ⁱ
4	5.49 $\pm$ 0.18 ^h	87.32 $\pm$ 0.06 ^e	9.51 $\pm$ 0.16 ^c	4.60 $\pm$ 0.89 ^e	50.03 $\pm$ 0.15 ^k
5	7.18 $\pm$ 0.80 ^{ab}	88.56 $\pm$ 0.03 ^c	8.24 $\pm$ 0.05 ^h	9.00 $\pm$ 1.58 ^{abc}	43.41 $\pm$ 0.50 ⁿ
6	5.92 $\pm$ 0.37 ^{efgh}	88.81 $\pm$ 0.14 ^b	8.15 $\pm$ 0.03 ^h	8.00 $\pm$ 1.87 ^{abc}	41.49 $\pm$ 0.46 ^o
7	7.29 $\pm$ 0.45 ^a	87.93 $\pm$ 0.24 ^d	8.83 $\pm$ 0.14 ^e	7.80 $\pm$ 1.48 ^{abc}	38.65 $\pm$ 0.33 ^q
8	5.51 $\pm$ 0.38 ^h	87.40 $\pm$ 0.15 ^e	8.65 $\pm$ 0.16 ^f	5.80 $\pm$ 0.45 ^{de}	39.81 $\pm$ 0.23 ^p
9	6.40 $\pm$ 0.25 ^{bcdefg}	86.78 $\pm$ 0.17 ^h	9.23 $\pm$ 0.16 ^d	9.00 $\pm$ 1.58 ^{abc}	50.68 $\pm$ 0.48 ^d
10	6.37 $\pm$ 0.43 ^{cdefg}	86.41 $\pm$ 0.01 ⁱ	9.43 $\pm$ 0.02 ^c	9.60 $\pm$ 2.19 ^a	50.05 $\pm$ 0.15 ^j
11	6.56 $\pm$ 0.14 ^{abcde}	87.23 $\pm$ 0.01 ^{ef}	8.52 $\pm$ 0.03 ^{fg}	9.00 $\pm$ 1.22 ^{abc}	50.48 $\pm$ 0.36 ^f
12	6.86 $\pm$ 0.38 ^{abcd}	86.92 $\pm$ 0.23 ^{fg}	8.96 $\pm$ 0.22 ^e	8.40 $\pm$ 1.14 ^{abc}	50.74 $\pm$ 0.15 ^c
13	6.66 $\pm$ 0.72 ^{abcde}	86.46 $\pm$ 0.01 ⁱ	10.25 $\pm$ 0.02 ^a	4.60 $\pm$ 0.55 ^e	52.95 $\pm$ 0.38 ^a
14	6.34 $\pm$ 0.20 ^{cdefg}	85.98 $\pm$ 0.14 ^k	9.54 $\pm$ 0.09 ^c	7.60 $\pm$ 1.52 ^{bc}	34.98 $\pm$ 0.16 ^r
15	6.48 $\pm$ 0.34 ^{bcde}	88.35 $\pm$ 0.10 ^c	7.88 $\pm$ 0.05 ⁱ	9.40 $\pm$ 1.14 ^{ab}	47.14 $\pm$ 0.42 ^l
16	6.96 $\pm$ 0.71 ^{abc}	86.23 $\pm$ 0.23 ^j	9.79 $\pm$ 0.09 ^b	7.40 $\pm$ 0.55 ^{cd}	46.48 $\pm$ 0.39 ^m
17	6.17 $\pm$ 0.06 ^{cdefgh}	86.89 $\pm$ 0.25 ^{fg}	8.90 $\pm$ 0.23 ^e	8.20 $\pm$ 0.84 ^{abc}	51.24 $\pm$ 0.50 ^b
18	6.29 $\pm$ 0.07 ^{cdefgh}	87.91 $\pm$ 0.05 ^d	8.43 $\pm$ 0.01 ^g	8.20 $\pm$ 0.84 ^{abc}	50.60 $\pm$ 0.42 ^e

*Mean values (n=3, n=5 for color and size) with the superscript alphabets in each column are significantly different ($p < 0.05$).

Figures

- Fig. 1 Response surface plots indicating the interaction effect of encapsulation conditions on yields (%).
- Fig. 2 Response surface plots indicating the interaction effect of encapsulation conditions on total phenolic content (mg GAE/g sample).
- Fig. 3 Response surface plots indicating the interaction effect of encapsulation conditions on antioxidant activity (mg AEAC/g sample).
- Fig. 4 Response surface plots indicating the interaction effect of encapsulation conditions on total chlorophyll content (mg/g sample).
- Fig. 5 Response surface plots indicating the interaction effect of encapsulation conditions on total carotenoid content (mg/g sample).
- Fig. 6 Scanning electron microstructure of spray-dried Yanang encapsulation produced from different wall material (gum arabic) concentration.
- | | |
|-------------------|-------------------|
| (a) 5%gum arabic | (b) 10%gum arabic |
| (c) 20%gum arabic | (d) 25%gum arabic |

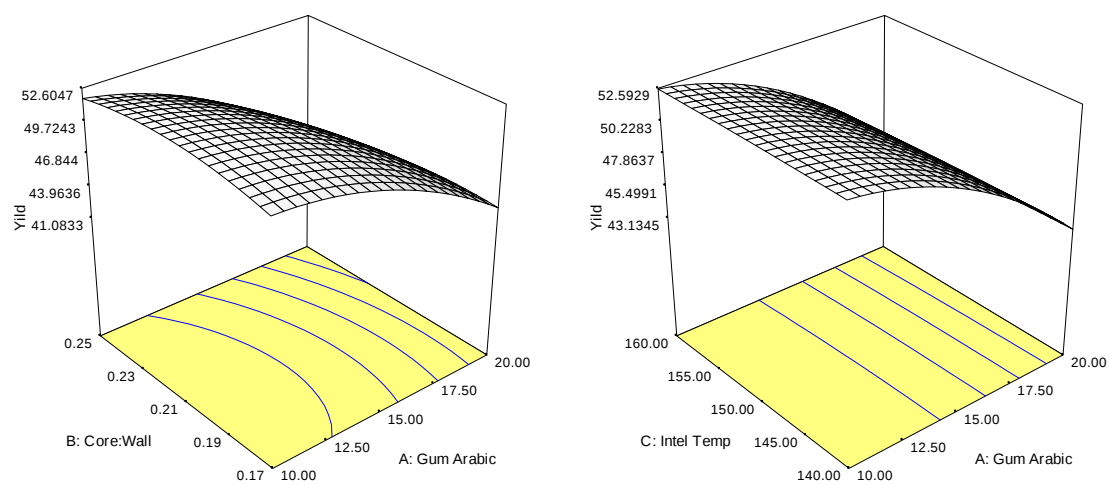


Fig. 1

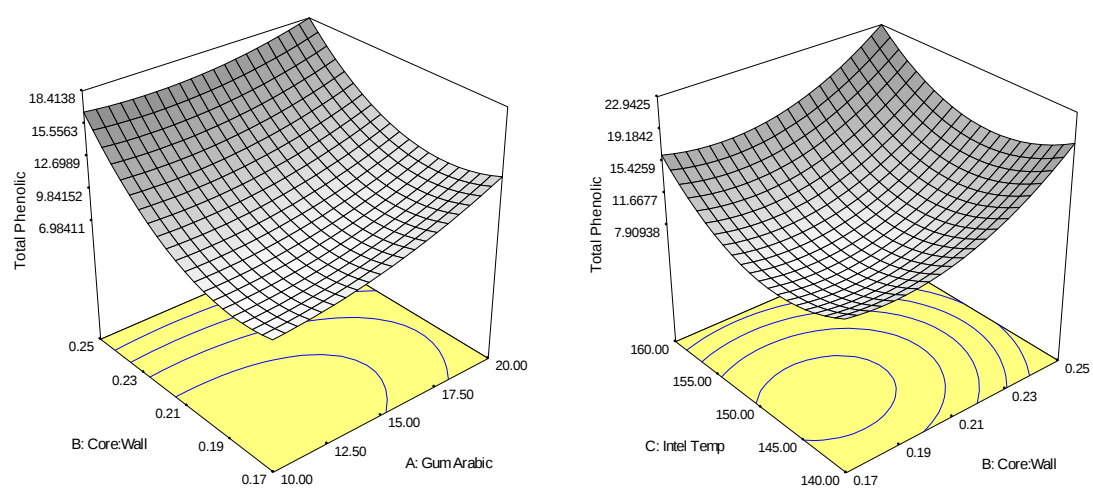


Fig. 2

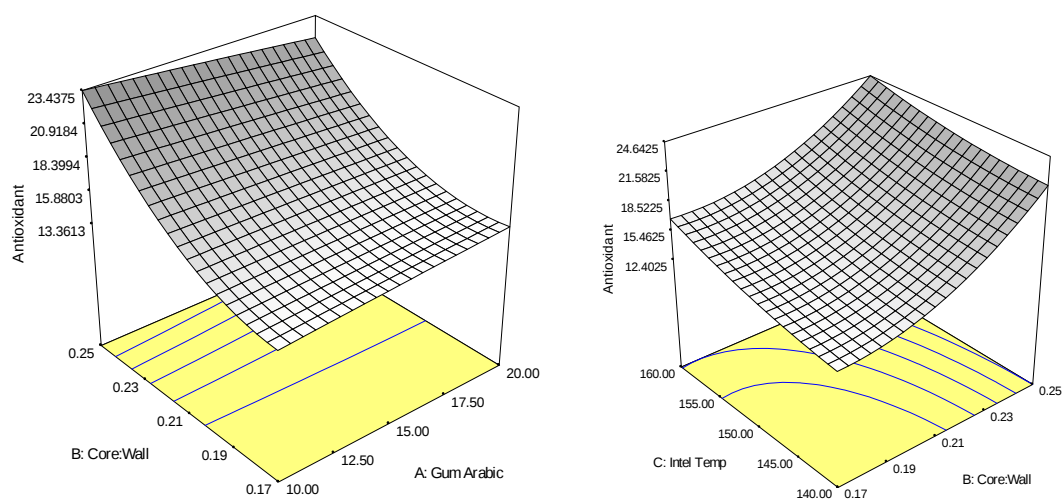


Fig. 3

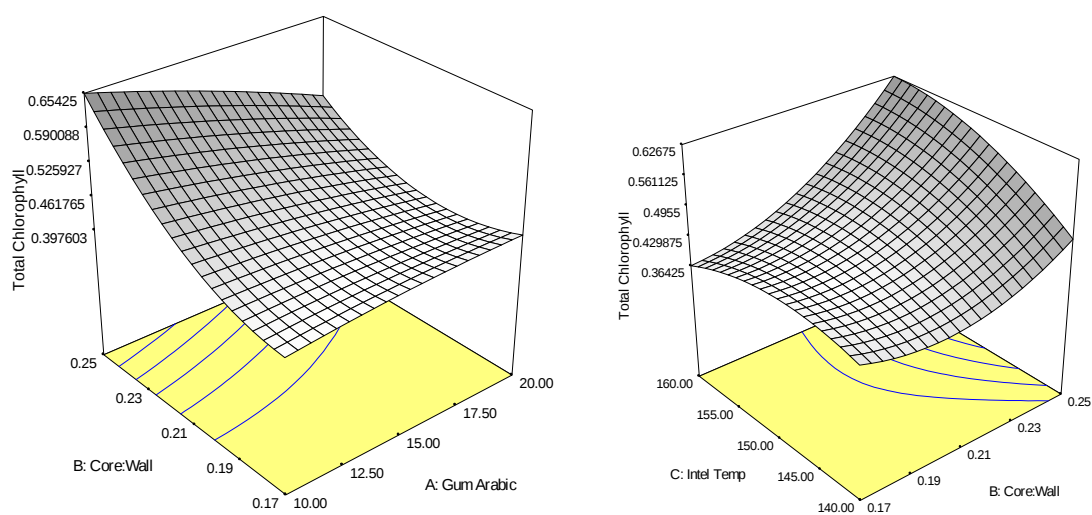


Fig. 4

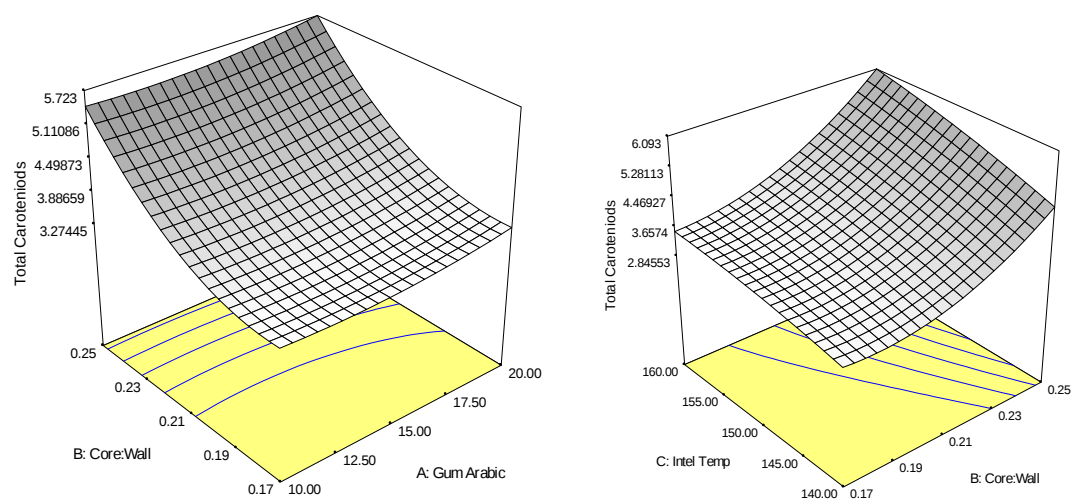
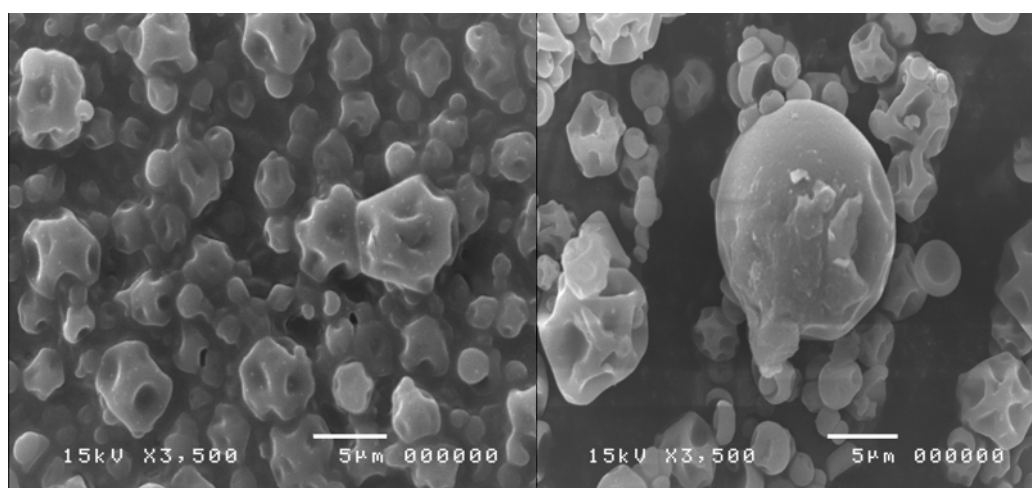
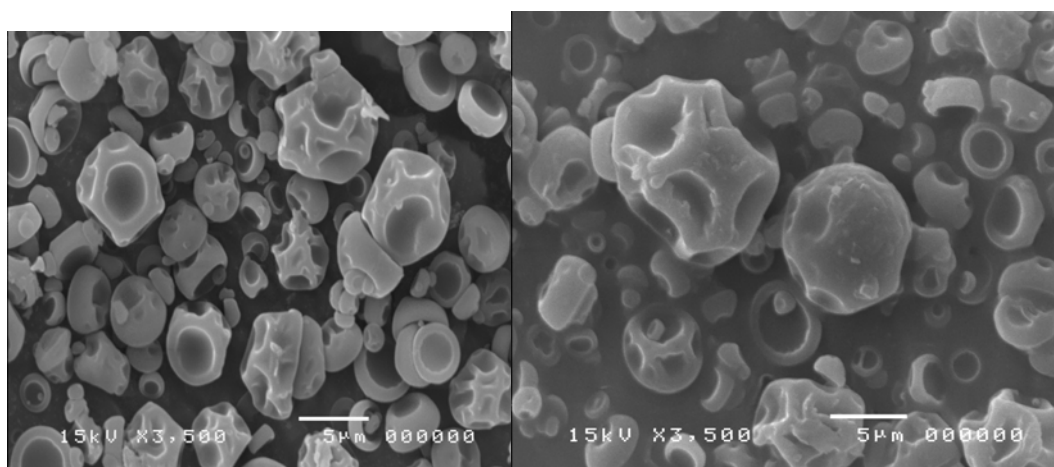


Fig. 5



(a)

(b)



(c)

(d)

Fig. 6