รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสกัดและแยกบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร ไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง

Extraction and Purification of Biological Compounds, Isoflavones, from Soybeans

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร. จารุวรรณ ธนวิรุฬห์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2. ผศ.ดร. ระวิวรรณ แก้วอมตะวงศ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2548

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการสกัดและแยกบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง ภายใต้ชุดโครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสารสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลือง ได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประสบความสำเร็จลงได้ด้วยความอนุเคราะห์จากทางคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้การสนับสนุนทั้งด้านสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณ ผศ.ดร. วันดี รังสีวิจิตประภา ที่กรุณาให้ข้อมูล ช่วยประสานงาน และให้คำแนะนำเกี่ยวกับข้อมูลของโครงการวิจัย และขอขอบคุณคณะนักวิจัยและผู้วิจัยที่ร่วมกันทำงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ ขอขอบคุณอาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านจากมหาวิทยาลัยต่างๆ ที่ร่วมให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการวิจัยนี้

คณะผู้วิจัย
ตุลาคม 2549

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง การสกัดและแยกบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง

ผู้วิจัย ผศ.ดร. จารุวรรณ ธนวิรุฬห์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก
เงินรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีเพื่อการพัฒนาและสนับสนุนงานวิจัย
งานส่งเสริมการวิจัย สำนักอธิการบดี ปีงบประมาณ 2548
จำนวนเงิน 402,000 บาท

ระยะเวลาทำวิจัย 12 เดือน

ศัพท์สำคัญ ไอโซฟลาโวน เจนิสเตอีน เจนิสติน ถั่วเหลือง

……

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารเจนิสตินและสารเจนิสเตอีนในถั่วเหลือง ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่มีความความจำเพาะเจาะจง มีความแม่นและความเที่ยง และสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารเจนิสเตอีนและเจนิสตินได้โดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่นๆในตัวอย่าง งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญอะกลัยโคนในถั่วเหลืองทั้งก่อนการบดและหลังการบดถั่วเหลือง และทำการตรวจหาปริมาณอะกลัยโคนและอนุพันธ์กลัยโคไซด์ในถั่วเหลืองเมื่อผ่านกระบวนการต่างๆทางกายภาพและทางเคมี โดยมุ่งเน้นถึงการประยุกต์และปรับใช้ปัจจัยดังกล่าวในระหว่างขั้นตอนการสกัดเพื่อปรับเปลี่ยนสารประกอบกลัยโคไซด์และอนุพันธ์ให้เป็นอยู่ในรูปอนุพันธ์อะกลัยโคนในปริมาณสูง ทั้งนี้เพื่อลดความหลากหลายของอนุพันธ์ไอโซฟลาโวน และทำให้สารสำคัญไอโซฟลาโวนอยู่ในรูปที่พร้อมดูดซึมและออกฤทธิ์ ตลอดจนง่ายต่อการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง จะเน้นสารสำคัญ 2 ชนิด คือ สารเจนิสติน และสารเจนิสเตอีน จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญไอโซฟลาโวนก่อนการบดถั่วเหลือง โดยทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการแช่น้ำกับปริมาณสารสำคัญ และความสัมพันธ์ของอุณหภูมิในการแช่น้ำและระยะเวลาของการแช่กับปริมาณสารสำคัญ พบว่าการแช่น้ำที่ 60°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เป็นสภาวะเบื้องต้นที่เหมาะสมในการปรับเปลี่ยนสัดส่วนปริมาณสารสำคัญในถั่วเหลืองก่อนการบดให้อยู่ในรูปอะกลัยโคนมากที่สุด สำหรับการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญไอโซฟลาโวนหลังการบดถั่วเหลืองนั้น เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการแช่ถั่วเหลืองในสารละลายกรดกับปริมาณสารสำคัญ ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดกับปริมาณสารสำคัญ และ ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิใน

สภาวะกรดกับปริมาณสารสำคัญ พบว่าการแช่ถั่วเหลืองในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ที่ความร้อน 80°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เป็นสภาวะเบื้องต้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สารสำคัญในถั่วเหลืองหลังการบดเพื่อให้สารสำคัญอยู่ในรูปอะกลัยโคนมากที่สุด

ABSTRACT

Research title Extraction and Purification of Biological Compounds, Isoflavones, from Soybeans

Researcher Assist.Prof.Dr. Charuwan Thanawiroon

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubonratchathani University

This research was financially supported by

Ubonratchathani University

Fiscal year 2005

402,000 Baht

Research duration 12 months

Key words Isoflavone, Genisteine, Genistin, Soy

……

This study has developed a reliable HPLC method for quantification of genistin and genistein in soybeans. This HPLC method indicated the specificity, accuracy and precision as standard methods without any interference. The aim of this study was to focus on the parameters that affected to aglycone contents in soybeans before and after the milling process. The aglycone and glycoside contents were quantified and the parameters those most affected the aglycone contents will be reported in order to apply to the extraction process to increase the aglycone contents in the extraction. Therefore, the soy isoflavones will be easily absorbed and quantified. In this study, we focus on only two main isoflavones in soybeans: genistin and genistein. For the studied parameters before the milling process, the relation between the soaking time and isoflavone contents, and the relationship between the soaking temperature and isoflavone contents were observed. The result showed that soaking soybean at the 60°C for 8 hours prior to the milling process is the best condition to gain the most aglycone in the extraction. For the studied parameters after the milling process, the relation between the soaking time in acid solution (1.0 N HCl) and isoflavone contents, the relationship between the acid concentration and isoflavone contents, and the relationship between soaking temperature under acid conditions (1.0 N HCl) and isoflavone contents were observed. The result showed that soaking soybean in 1.0 N HCl solution at the 80°C for 3 hours after the milling process is the best condition to gain the most aglycone in the extraction.

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	iii
กิตติกรรมประกาศ	v
สารบัญ	vi
สารบัญตาราง	vii
สารบัญภาพ	x
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	29
บทที่ 3 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	39
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย	73
เอกสารอ้างอิง	77

เอกสารแนบ

- ประวัตินักวิจัย
- บทความวิชาการเรื่อง “ผลของระยะเวลาการแช่น้ำและอุณหภูมิการแช่น้ำต่อปริมาณสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง” ของ **จารุวรรณ ธนวิรุฬห์** ตีพิมพ์ใน วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน Volume 3 (2), 81-90, 2007.

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณร้อยละของสารสำคัญในถั่วเหลือง 2
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือดและไลโปโปรตีนระหว่างกลุ่มที่บริโภคถั่วเหลืองและกลุ่มที่ไม่ได้บริโภคถั่วเหลือง 9
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณเจนิสเตอีนและเดดเซอีนในเลือด (nm/L) 13
ตารางที่ 4 แสดงพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารเจนิสเตอีน 41
ตารางที่ 5 แสดงพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารเจนิสติน 42
ตารางที่ 6 แสดงค่าสมการและค่า correlation coefficient (R^2) ของกราฟมาตรฐาน 43
ตารางที่ 7 แสดงค่าความแม่นและค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์สารเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 1 μg/ml 46
ตารางที่ 8 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 8 ug/ml 47
ตารางที่ 9 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 32 ug/ml 48
ตารางที่ 10 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 130 ug/ml 48
ตารางที่ 11 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 240 ug/ml 48
ตารางที่ 12 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 16 ug/ml 49
ตารางที่ 13 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 128 ug/ml 49
ตารางที่ 14 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 160 ug/ml 49
ตารางที่ 15 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 256 ug/ml 50
ตารางที่ 16 ตารางสรุปค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนและสารเจนิสติน แสดงเป็นค่าร้อยละการคืนกลับทั้ง 4 ความเข้มข้น 50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 17 แสดงค่าความแม่นระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณสารเจนิสเตอีน 50

ตารางที่ 18 แสดงค่าความแม่นระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสติน 51

ตารางที่ 19 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีน ที่ความเข้มข้น 8 ug/ml 51

ตารางที่ 20 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีน ที่ความเข้มข้น 32 ug/ml 52

ตารางที่ 21 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีน ที่ความเข้มข้น 130 ug/ml 52

ตารางที่ 22 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีน ที่ความเข้มข้น 240 ug/ml 52

ตารางที่ 23 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสติน ที่ความเข้มข้น 16 ug/ml 53

ตารางที่ 24 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสติน ที่ความเข้มข้น 128 ug/ml 53

ตารางที่ 25 แสดงค่าความแม่นยำภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสติน ที่ความเข้มข้น 160 ug/ml 53

ตารางที่ 26 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสติน ที่ความเข้มข้น 256 ug/ml 54

ตารางที่ 27 แสดงค่าความเที่ยงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณสารเจนิสเตอีน 54

ตารางที่ 28 แสดงค่าความเที่ยงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณสารเจนิสติน 54

ตารางที่ 29 ตารางสรุปค่าการตรวจสอบความแม่นและน่าเชื่อถือของวิธีการ วิเคราะห์หาปริมาณเจนิสเตอีนและเจนิสติน 55

ตารางที่ 30 แสดงปริมาณสารเจนิสเตอีน และเจนิสตินในสารสกัดถั่วเหลือง (n =3) เมื่อผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องตามเวลาต่างๆ 58

ตารางที่ 31 แสดงปริมาณสารเจนิสเตอีน และเจนิสตินในสารสกัดถั่วเหลือง (n =3) เมื่อผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60° C ตามเวลาต่างๆ 61

ตารางที่ 32 แสดงปริมาณสารเจนิสเตอีน และเจนิสตินในสารสกัดถั่วเหลือง (n =3) เมื่อผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N เป็นเวลาต่างๆกัน 64

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 33 แสดงปริมาณสารเจนิสเตอีน และเจนิสตินในสารสกัดถั่วเหลือง (n =3) เมื่อผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 67

ตารางที่ 34 แสดงปริมาณสารเจนิสเตอีน และเจนิสตินในสารสกัดถั่วเหลือง (n =3) เมื่อผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ที่อุณหภูมิต่างๆกันเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 70

ตารางที่ 35 ตารางสรุปค่าการตรวจสอบความแม่นและน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเจนิสเตอีนและเจนิสติน 73

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของสารไอโซฟลาโวนกลุ่มอะกลัยโคน (เจนิสเตอีน เดดเซอีน และไกลซิเตอีน) และกลุ่มกลูโคไซด์ (เจนิสติน เดดซิน และ ไกลซิติน) 3

รูปที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบโครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนและไอโซฟลาโวน 5

รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของสารไอโซฟลาโวน (ชนิดอะกลัยโคนและกลัยโคไซด์) ในถั่วเหลือง 5

รูปที่ 4 แสดงรายละเอียดโครงสร้างของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง (รูปจาก Jackson C. et al, 2002) 6

รูปที่ 5 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง (รูปจาก Griffith and Collison 2001) 6

รูปที่ 6 เปรียบเทียบโครงสร้างของเอสโตรเจนชนิด estradiol กับไอโซฟลาโวน 7

รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราการตายจากโรคมะเร็งเต้านมและการบริโภคถั่วเหลือง (รูปจาก www.fujicco.co.jp/english/) 12

รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง (รูปจาก Griffith and Collison, 2001) 16

รูปที่ 9 แสดงการสลายตัว (decomposition) ของ (A) เจนิสเตอีน และ (B) เดดเซอีน ตรวจวัดโดยเทคนิค DSC (รูปจาก Ungar, Osundahunsi, and Shimoni 2003) 18

รูปที่ 10 แสดงปริมาณสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆกัน (รูปจาก Park et al., 2001) 20

รูปที่ 11 แสดงการลดลงของปริมาณเจนิสติน (G) และการเพิ่มขึ้นของเจนิสเตอีน (Ge) ในถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิต่างๆกัน (■ : 30°C; ♦ : 50°C; ▲ : 60°C; ●: 85°C) (รูปจาก Wardhani DH et al., 2008) 22

รูปที่ 12 แสดงการลดลงของปริมาณเดดซิน (D) และการเพิ่มขึ้นของเดดเซอีน (De) ในถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิต่างๆกัน (■ : 30°C; ♦ : 50°C; ▲ : 60°C; ●: 85°C) (รูปจาก Wardhani DH et al., 2008) 22

รูปที่ 13 แสดงกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากเดดซินเป็นเดดเซอีนในถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนจากการแช่น้ำ (รูปจาก Wardhani DH et al., 2008) 23

รูปที่ 14 แสดงปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสภาวะที่มีเอนไซม์ β-glucosidase (a) และในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ β -glycosidase (A) (1 = daiazin; 2 = glycitin; 24

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

3 = genistin ; 4 =malonyl daiazin; 5 = malonyl glycitin; 6 = malonyl genistin;7 = daidzein; 8 = glycitein; 9 = genistein; 10 = acetyl genistin) (รูปจาก Park KY et al., 2001)

รูปที่ 15 แสดงปริมาณสารไอโซฟลาโวนที่ผ่านการ incubate 120 องศาเซลเซียสในสภาวะความด่างและกลางเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Ungar, Y. *et al*, 2003) 24

รูปที่ 16 แสดงความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของรังสีให้กับถั่วเหลือง (รูปจาก Prasad *et al*, 2004) 25

รูปที่ 17 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มไอโซฟลาโวน : A: genistein (Rt = 36.86 นาที), B: Daidzein (Rt = 29.21 นาที), C: genistin (Rt = 20.68 นาที), D: daidzin (Rt = 15.37 นาที), E: Daidzein และ Daidzin 41

รูปที่ 18 แสดงกราฟมาตรฐานของสารเจนิสเตอีน 42

รูปที่ 19 แสดงกราฟมาตรฐานของสารเจนิสติน 43

รูปที่ 20 แสดงโครมาโตแกรมของสารผสมของเจนิสเตอีน เจนิสติน เดดเซอีน และเดดซีน 44

รูปที่ 21 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเจนิสเตอีน (Rt = 36.86 นาที) 44

รูปที่ 22 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานฟลูออเรสซีน (Rt = 43.42 นาที) 44

รูปที่ 23 แสดงโครมาโตแกรมของสารผสมระหว่างเจนิสเตอีน และฟลูออเรสซีน 45

รูปที่ 24 แสดงโครมาโตแกรมของสารเจนิสเตอีน ที่ความเข้มข้น 0.5 μg/ml 46

รูปที่ 25 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเจนิสเตอีนและสารมาตรฐานเจนิสติน 47

รูปที่ 26 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดถั่วเหลือง A ถั่วเหลืองที่ผ่านการล้างขจัดสิ่งสกปรกออกแต่ไม่ได้แช่น้ำ, B ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง, C ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง, D ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง, E ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง 57

รูปที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองกับระยะเวลาการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง 58

รูปที่ 28 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดถั่วเหลือง A ถั่วเหลืองที่ผ่านการล้างด้วยน้ำอุณหภูมิ 60° C แต่ไม่ได้แช่น้ำ, B ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, C ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง, D ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง, E ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

รูปที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองกับระยะเวลาการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60° C 62

รูปที่ 30 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดถั่วเหลือง A ถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการแช่ในกรด, B ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง, C ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง 64

รูปที่ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองกับระยะเวลาการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ที่อุณหภูมิห้อง 65

รูปที่ 32 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดถั่วเหลือง: A ถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการแช่ในกรด, B ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง, C ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.9 N ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง, ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.6 N ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 66

รูปที่ 33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองกับความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 67

รูปที่ 34 แสดงส่วนขยายของกราฟในรูป 33 เพื่อให้เห็นการเพิ่มขึ้นของสารเจนิสเตอีนในสารสกัดถั่วเหลืองกับเมื่อความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเพิ่มขึ้น 67

รูปที่ 35 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดถั่วเหลืองที่ผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N : A เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง, B เขย่าที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, C เขย่าที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, D เขย่าที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, E เขย่าที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, F เขย่าที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 70

รูปที่ 36 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองกับอุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 71

บทที่ 1

บทนำ

(Introduction)

การวิจัยและพัฒนาสารจากธรรมชาติที่มีประโยชน์ในการป้องกันและสร้างเสริมสุขภาพเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน นอกเหนือจากพืชสมุนไพรแล้ว พืชซึ่งนิยมใช้รับประทานเป็นอาหารหลายชนิดก็มีคุณประโยชน์ทางการแพทย์น่าสนใจเช่นกัน พืชตระกูลถั่วโดยเฉพาะถั่วเหลืองจัดเป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูงประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 30-50 พบว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ และยังป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นของ LDL โคเลสเตอรอล ที่เป็นสาเหตุของการทำให้ผนังเส้นเลือดแดงเป็นแผ่นหนา ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 เป็นต้นมา คณะกรรมการอาหารและยา (Food Drug and Administration) ของสหรัฐอเมริกา ได้อนุญาตให้เขียนบนฉลากอาหารซึ่งมีโปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบว่า “โปรตีนจากถั่วเหลืองสามารถลดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจโคโรนารีได้” ถั่วเหลืองถูกนำมาใช้เป็นอาหารและยาโดยคนเอเชียมาเป็นเวลานานแล้ว ส่วนชาวตะวันตกเองใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นอาหารอย่างแพร่หลายเช่นเดียวกัน ปัจจุบันชาวตะวันตกหันมาบริโภคถั่วเหลืองมากขึ้น จากการสำรวจในปี 2000 พบว่า 76% ของคนอเมริกันรับประทานที่แปรรูปจากถั่วเหลืองอย่างน้อยอาทิตย์ละ 1 ครั้ง ซึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากผลการสำรวจเมื่อปี 1998 ถึง 17% ในปี 2005 ตลาดอาหารแปรรูปจากถั่วเหลืองของสหรัฐอเมริกาคิดเป็น 6 พันล้านบาท คิดเป็น 3 เท่าเมื่อเทียบกับปี 1999 (Messina MJ and Loprinzi CL, 2006) ถั่วเหลืองถูกนำมาเป็นส่วนประกอบของอาหารหลายรูปแบบเช่น มิโซ เต้าหู้ เต้าเจี้ยว นมถั่วเหลือง โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง และแป้งถั่วเหลือง นอกจากนี้น้ำมันซึ่งสกัดจากถั่วเหลืองสามารถถูกนำมาใช้ในการปรุงอาหาร ทำมาการีนและน้ำสลัดด้วย

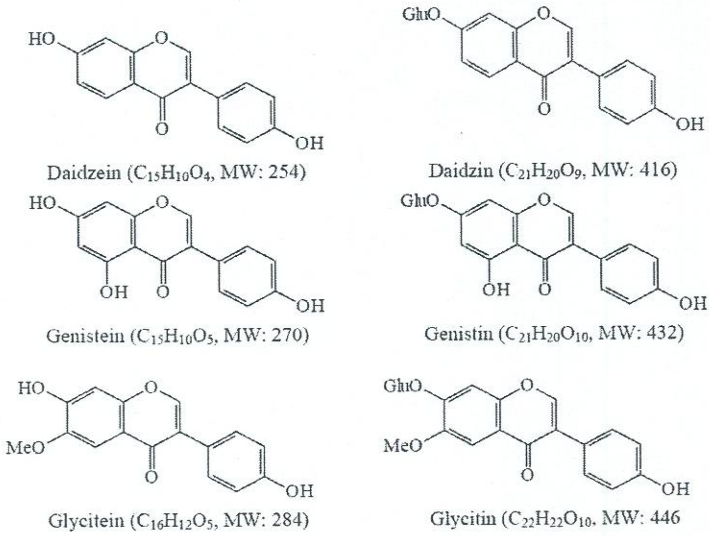
นอกจากโปรตีนแล้ว ถั่วเหลืองยังประกอบด้วยสารประกอบต่างๆ คือ ไอโซฟลาโวน (isoflavone) กรดไฟติค (phytic acid) ซาโปนิน (saponins) โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) และทริบซินอินฮิบิเตอร์ (tripsin inhibitors) โดยไอโซฟลาโวน (ได้แก่ เจนิสติน เดดซีน เจนิสเตอีน และเดดเซอีน) จัดเป็นกลุ่มสารที่นักวิจัยให้ความสนใจศึกษาการนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพมากที่สุด เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ผลิตขึ้นได้ในร่างกายและมีฤทธิ์ทางชีวภาพคล้ายกับฮอร์โมนเพศหญิง จึงเรียกสารที่มีคุณสมบัตินี้ว่า ไฟโตเอสโตรเจน จากข้อมูลการศึกษาวิจัยจำนวนมากพบว่า ไฟโตเอสโตรเจนอาจสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการใช้ทดแทนการขาดฮอร์โมนเพศและป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดในสตรีวัยทองได้ นอกจากนี้ไฟโตเอสโตรเจนยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส เป็นต้น

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณร้อยละของสารสำคัญในถั่วเหลือง

สารสำคัญ	**ร้อยละ**
1.คาร์โบไฮเดรต	26
2.ไขมัน	17
3.โปรตีน	37
4.อื่นๆ 4.1 แร่ธาตุ ต่างๆ เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก 4.2 วิตามินต่างๆ(บี 1, บี 2, บี 6, บี 12, ซี, ดี และอี) 4.3 กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว เช่น กรดไลโนเลอิก 4.4 เลซิติน 4.5 ไอโซฟลาโวน	20

สารกลุ่มไอโซฟลาโวนที่พบมากในเมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วยสารกลุ่มที่มีน้ำตาลในโมเลกุลที่เรียกว่า สารกลุ่มกลัยโคไซด์ (glycoside) เนื่องจากน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบคือน้ำตาลกลูโคส จึงเรียกโมเลกุลกลัยโคไซด์ดังกล่าวว่ากลูโคไซด์ (glucoside) ด้วยเช่นกัน กลัยโคไซด์ที่พบในถั่วเหลือง ได้แก่ เจนิสติน เดดซีน และ ไกลซิติน อย่างไรก็ตาม สารในกลุ่มกลัยโคไซด์นี้ละลายในน้ำได้ดี ดังนั้นจะสูญเสียไปในระหว่างการแปรรูปถั่วเหลืองได้ โดยมีการคาดประมาณว่า สารในกลุ่มนี้จะสูญเสียไปถึงร้อยละ 50 ในระหว่างการทำเต้าหู้ พบว่าถั่วเหลืองในธรรมชาติที่ยังไม่ผ่านขั้นตอนการแปรรูป สารกลุ่มไอโซฟลาโวนจะอยู่ในรูปกลัยโคไซด์เป็นหลัก สารในกลุ่มกลัยโคไซด์นี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทาน จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยกรดในกระเพาะอาหารและแบคทีเรียในลำไส้ได้เป็นสารประกอบที่ปราศจากน้ำตาลในโมเลกุล ที่เรียกว่าสารกลุ่มอะกลัยโคน (aglycone) ได้แก่ เจนิสเตอีน เดดเซอีน และไกลซิเตอีน โดยมีสัดส่วนของเจนิสเตอีน (เปลี่ยนแปลงมาจากสารตั้งต้น คือเจนิสติน) เป็นปริมาณสูงสุด พบว่าถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม จะมีปริมาณเจนิสตินประมาณ 330 ถึง 2000 มิลลิกรัม (Wang and Murphy, 1994) ปริมาณของเจนิสเตอีนในอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักและไม่ผ่านกระบวนการหมักจะมีไม่เท่ากัน โดยมีรายงานว่าถั่วเหลืองในธรรมชาติที่ไม่ผ่านการหมักจะมีปริมาณสารไอโซฟลาโวนในกลุ่มกลัยโคไซด์ (เจนิสติน เดดซีน และ ไกลซิติน) ในปริมาณที่มากกว่า ในทางตรงกันข้ามเมื่อถั่วเหลืองผ่านขบวนการหมัก จะทำให้ได้สารไอโซฟลาโวนในกลุ่มอะกลัยโคน (เจนิสเตอีน เดดเซอีน และไกลซิเตอีน) ในปริมาณที่มากกว่า (Zheng et al., 1997) มีรายงานว่าสารในกลุ่มอะกลัยโคนจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าสารในกลุ่มกลัยโคไซด์ เนื่องจากสารประกอบในกลุ่มอะกลัยโคนสามารถถูกดูดซึมได้ดีกว่า และสามารถจับกับ binding site ของเอนไซม์และรีเซปเตอร์ได้ดีกว่า โดยเจนิสเตอีนจัดเป็นสารไอโซฟลาโวนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งในการเจริญของเซลล์มะเร็งดีที่สุด มีรายงานว่าเจนิสเตอีนเป็นสารที่มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเจนิสติน

ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก และยังพบอีกว่าเจนิสเตอีนนั้นมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเจนิสตินและเดดซีนอีกด้วย



Daidzein ($C_{15}H_{10}O_4$, MW: 254)
Daidzin ($C_{21}H_{20}O_9$, MW: 416)
Genistein ($C_{15}H_{10}O_5$, MW: 270)
Genistin ($C_{21}H_{20}O_{10}$, MW: 432)
Glycitein ($C_{16}H_{12}O_5$, MW: 284)
Glycitin ($C_{22}H_{22}O_{10}$, MW: 446

รูปที่ 1. แสดงโครงสร้างของไอโซฟลาโวนกลุ่มอะกลัยโคน (เจนิสเตอีน เดดเซอีน และไกลซิเตอีน) และกลุ่มกลูโคไซด์ (เจนิสติน เดดซีน และ ไกลซิติน)

การศึกษาและวิจัยส่วนใหญ่ในปัจจุบันนี้มุ่งเน้นไปที่ประโยชน์ของเจนิสเตอีนมากกว่าประโยชน์ของอะกลัยโคนชนิดอื่น จากการทดลองศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไลปิดเปอร์ออกซิเดชั่น (lipid peroxidation inhibition) ในตับหนู พบว่าเจนิสเตอีนจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยสามารถเรียงลำดับได้ดังนี้ เจนิสเตอีนจะมีฤทธิ์ที่ดีกว่าเดดเซอีน เจนิสติน และเดดซีน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงฤทธิ์ของเจนิสเตอีนในการยับยั้งกระบวนการแบ่งตัวระยะไมโตเจเนซิสของเซลล์ (mitogenesis) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) กระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cell transformation) และยังยับยั้งขบวนการ angiogenesis ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่ทำให้เกิดมะเร็งได้ (Aldercreutz et al., 1995; Barnes, 1995; Birt et al., 2001; Chien et al., 2005; Messina and Barnes, 1991; Messina et al., 1994; Zava and Duwe, 1997)

ประโยชน์ของถั่วเหลืองในการลดอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งนับว่าเป็นหัวข้อที่ได้รับความสนใจมากที่สุดหัวข้อหนึ่ง สารสำคัญในถั่วเหลืองที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งได้แก่ ไอโซฟลาโวน ซาโปนิน และ อิโนซิทอลเฮกซะฟอสเฟส (inositol hexaphosphate) แต่เนื่องจากไอโซฟลาโวนเป็นส่วนประกอบที่พบมากที่สุดในถั่วเหลืองเมื่อเทียบกับสารอีกสองชนิดที่กล่าวมา คุณสมบัติของสารกลุ่มนี้จึงมีการทำวิจัยศึกษามากที่สุดถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดยมีรายงานเป็นครั้งแรกในช่วงปี 1980 ว่าสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองสามารถช่วยป้องกันโรคมะเร็งได้ (Setchell and Adlercreutz, 1988) ซึ่งเป็น

การก่อให้เกิดความตื่นตัวในการศึกษาในเรื่องนี้โดยนักวิจัยอื่นๆ อีกมากมายในเวลาต่อมา นอกจากนี้ยังพบรายงานว่า ผู้ที่บริโภคอาหารที่ประกอบด้วยถั่วเหลือง จะลดอัตราเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านม ต่อมลูกหมาก และกระเพาะอาหารได้ (Normura et. al., 1978) และยังมีรายงานว่าชาวญี่ปุ่นและประชาชนในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีอัตราในการเป็นมะเร็งลำไส้ มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งเต้านมต่ำกว่าชาวอเมริกันซึ่งบริโภคถั่วเหลืองน้อยกว่า (Adlercreutz, 1990; Rose et al., 1986) กลไกในการที่สารไอโซฟลาโวนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้นั้น ได้มีการอธิบายอย่างละเอียดโดย Nedeljikovic (2001) กล่าวโดยสรุป กลไกของถั่วเหลืองที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็งอาจเนื่องมาจากการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization) และการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โปรตีนจากถั่วเหลืองและเจนิสเตอีนมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase และ topoisomerase I,II ซึ่งจำเป็นสำหรับการแบ่งเซลล์และมีการศึกษาผลของโปรตีนจากถั่วเหลืองต่อการทำงานของฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญเติบโตในคนด้วย นอกจากนี้ไอโซฟลาโวนยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์ตับหนู เช่น cytochrome P450 ชนิด 3A, quinone reductase และ glutathione-s-transferase เป็นต้น ถั่วเหลืองทำให้ผนังเซลล์มีความคงตัว และลดการเกิด lipid peroxidation ของเซลล์ตับ ผลเหล่านี้อาจเป็นกลไกที่ทำให้ถั่วเหลืองมีผลยับยั้งการเกิดมะเร็งตับ (Nedeljikovic et al., 2001)

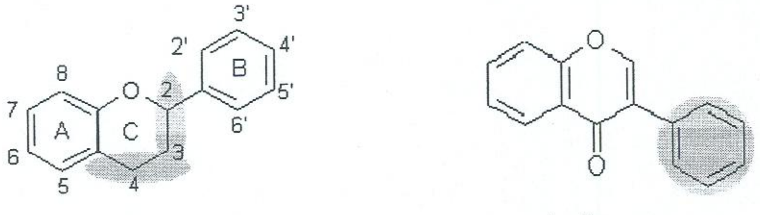
ปัจจุบันมีการนำสารสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองมาใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมความงามเพื่อชะลอการแก่ของเซลล์ เนื่องจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ tyrosine kinase ของสารประกอบกลุ่มดังกล่าว (Schmid and Zulli, 2003)

ไอโซฟลาโวน (Isoflavone) ในถั่วเหลือง

ไอโซฟลาโวนหรือมีอีกชื่อว่า ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) คือสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานคล้ายคลึงกับของฟลาโวน (flavone) คือ ประกอบด้วย 3 วงแหวน (A, C และ B) เหมือนกัน หากแต่วงแหวน B ของไอโซฟลาโวนจะต่อกับตำแหน่งที่ 3 ของวงแหวน C แทนที่จะเป็นตำแหน่งที่ 2 เหมือนในฟลาโวน ไอโซฟลาโวนจึงจัดเป็นไอโซเมอร์ของฟลาโวน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2

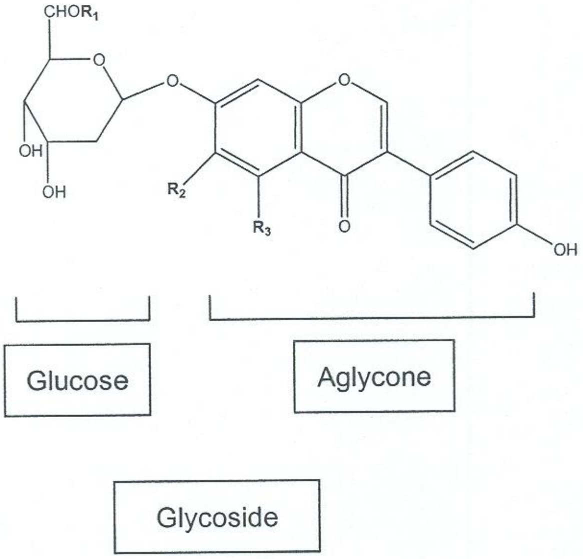
สารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองสามารถแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ กลัยโคไซด์ และอะกลัยโคนโดยกลัยโคไซด์คือสารในรูปอะกลัยโคนที่มีหมู่น้ำตาล กลูโคสมาเกาะอยู่นั่นเอง โครงสร้างทางเคมีของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิดและแต่ละชนิดนั้นจะประกอบด้วอนุพันธ์ 4 แบบ คือ อะกลัยโคน (aglycone) ได้แก่ เจนิสเตอีน (genistein), เดดเซอีน (daidzein) และไกลซิเตอีน (glycitein) อนุพันธ์กลูโคไซด์ ได้แก่ เจนิสติน (genistin), เดดซีน (daidzin) และ ไกลซิติน (glycitin) อนุพันธ์มาโลนิล ได้แก่ 6”-O-malonyldaidzin, 6”-O-malonylgenistin, 6”-O-malonylglycitin และอนุพันธ์อะเซทิล ได้แก่ 6”-O-acetyldaidzin, 6”-O-acetylgenistin และ 6”-O-acetylglycitin โดยพบว่าพันธะที่ทำการเชื่อมต่อระหว่างส่วนอะกลัยโคนกับน้ำตาลคือพันธะกลัยโคซิดิค (glycosidic linkage) ไอ

โซฟลา-โวนในธรรมชาติจะอยู่ในรูปกลัยโคไซด์ในสัดส่วนที่มากกว่าอะกลัยโคน โดยอยู่ในรูปอนุพันธ์มาโลนิลมากที่สุด (Griffith and Collison, 2001) เนื่องจากโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของไอโซฟลาโวนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน สารเหล่านี้จึงสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) (รูปที่ 5)

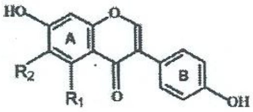

3'
2'
4'
B
8
O
2
5'
7
A
C
6'
6
3
5
4
O
O

Flavone Isoflavone

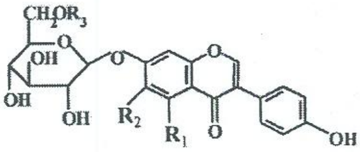
รูปที่ 2. แสดงการเปรียบเทียบโครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนและไอโซฟลาโวน


CHOR1
O
O
O
OH
OH
R2
R3
O
OH
Glucose
Aglycone
Glycoside

รูปที่ 3. แสดงโครงสร้างพื้นฐานของสารไอโซฟลาโวน (ชนิดอะกลัยโคนและกลัยโคไซด์) ในถั่วเหลือง

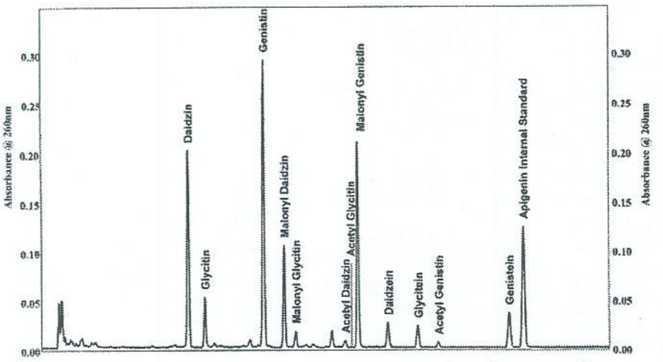


R1	R2	Aglycone
H	H	Daidzein
OH	H	Genistein
H	OCH3	Glycitein



R1	R2	R3	Glucosides
H	H	H	Daidzin
OH	H	H	Genistin
H	OCH_3	H	Glycitin
H	H	$COCH_3$	6"-O-Acetyldaidzin
OH	H	$COCH_3$	6"-O-Acetylgenistin
H	OCH_3	$COCH_3$	6"-O-Acetylglycitin
H	H	$COCH_2COOH$	6"-O-Malonyldaidzin
OH	H	$COCH_2COOH$	6"-O-Malonylgenistin
H	OCH_3	$COCH_2COOH$	6"-O-Malonylglycitin

รูปที่ 4. แสดงรายละเอียดโครงสร้างของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง (รูปจาก Jackson C. et al, 2002)



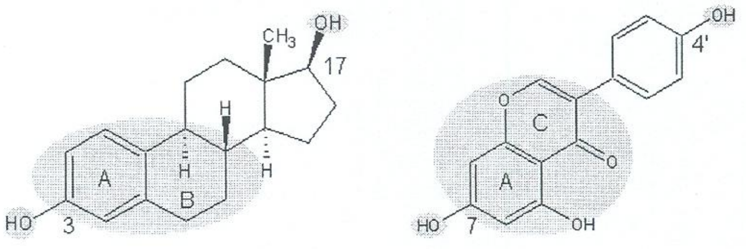
รูปที่ 5. แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง (รูปจาก Griffith and Collison 2001)

พบว่าในถั่วเหลืองมีไอโซฟลาโวนทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.1 - 5 mg/g ของน้ำหนักแห้ง(Daniel et al., 1999, Aidercreutz et al.,1995, Conrard et al., 1993) โดยจะพบสารดังกล่าวมีปริมาณต่างๆ ดังนี้ เจนิสตินประมาณ 330-2000 mg kg^{-1}, เดดซีนประมาณ 150-800 mg kg^{-1}, ไกลซิตินประมาณ 50-100

mg kg^{-1}, เจนิสเตอีน, เดดเซอีนและไกลซิเตอีนรวมกันประมาณ 10-40 mg kg^{-1} ซึ่งปริมาณของสารต่างๆเหล่านี้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็นชนิดของพันธุ์พืช พื้นที่เพาะปลูก ฤดูกาล ช่วงระยะเวลาการเก็บผลผลิต รวมถึงกรรมวิธีในการแปรรูปด้วย

ไอโซฟลาโวนกับฤทธิ์ของการเป็นไฟโตเอสโตรเจน

ไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogens) เป็นสารจากธรรมชาติที่พบในพืช มีคุณสมบัติทางเคมีเป็นสารชนิดฟีนอล ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ไอโซฟลาโวนและลิกแนน (Lignan) พบในพืชทั่วไป เช่น ถั่วเหลือง กระหล่ำ ธัญพืช ชะเอม ถั่ว เป็นต้น มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (estrogenic activity) แต่มีฤทธิ์อ่อนกว่าเอสโตรเจนมาก ทำงานอิสระต่อกันและกันและมีฤทธิ์ต่อต้านหรือยับยั้งการทำงานของเอสโตรเจน ป้องกันการขยายตัวของเซลล์เต้านม นอกจากนี้ไฟโตเอสโตรเจนลดความเสี่ยงจากโรคกระดูกพรุน โรคระบบหลอดเลือดหัวใจและ ลดความเสี่ยงของโรคมะเร็งเต้านมและมะเร็งต่อมลูกหมากได้ พบว่าไฟโตเอสโตรเจนจะมีโครงสร้างคล้ายกับเอสโตรเจนในร่างกายมนุษย์หรือ Estradiol แต่เป็น Nonsteroidal estrogen ซึ่งสร้างได้ในพืชเท่านั้น



Estradiol Isoflavone

รูปที่ 6. เปรียบเทียบโครงสร้างของเอสโตรเจนชนิด estradiol กับไอโซฟลาโวน

จากการเปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีระหว่างไอโซฟลาโวนกับเอสโตรเจนชนิด estradiol พบว่ามีการคล้ายคลึงกันดังต่อไปนี้

1. วงแหวน A และ C ของไอโซฟลาโวนมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันกับวงแหวน A และ B ใน estradiol

2. ระยะทางระหว่างหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ จะอยู่ใกล้เคียงกันมาก หมู่ไฮดรอกซีทั้ง 2 นี้เองมีความจำเพาะที่จะจับกับ estrogen receptor

3. โมเลกุลทั้งสองแสดงคุณสมบัติความเป็นขั้ว และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก

จากการศึกษาถึงการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (estrogenic activity) พบว่าเจนิสเตอีนจะมีความแรงในด้านฤทธิ์ estrogenic activity มากที่สุด โดยมีฤทธิ์แรงกว่าไกลซิเตอีนและเดดเซอีนถึง 1 และ 4 เท่า ตามลำดับ

ไฟโตเอสโตรเจนซึ่งออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนชนิดอ่อน สามารถบรรเทาอาการช่องคลอดแห้งและโรคกระดูกพรุนได้ นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังเป็นแหล่งของโปรตีนและสารอาหารที่จำเป็นสำหรับสตรีวัยทอง อาทิเช่น แคลเซียม แมกนีเซียม โปแตสเซียม วิตามินบีคอมเพล็กซ์ สังกะสี และเหล็ก ซึ่งสามารถช่วยบรรเทาอาการที่ประจำเดือนมามากผิดปกติได้ เมล็ดธัญพืชทั้งเปลือก มีไฟโตเอสโตรเจนประเภทลิกแนนซึ่งมีฤทธิ์เอสโตรเจนอย่างอ่อน และมีเส้นใยสูง จะช่วยควบคุมระดับโคเลสเตอรอล และเอสโตรเจนในร่างกาย

มีหลักฐานบ่งชี้ว่าไฟโตเอสโตรเจนในอาหารมีส่วนสัมพันธ์กับอาการต่าง ๆ ของสตรีวัยสูงอายุอย่างมาก โดยพบว่าอาหารที่สามารถช่วยบรรเทาอาการของสตรีวัยทอง ได้แก่ อาหารประเภทถั่ว ข้าวซ้อมมือ ปลา ผักและผลไม้สด ซึ่งอาหารเหล่านี้มักเป็นองค์ประกอบอยู่ในอาหารของชาวเอเชีย จึงอาจเป็นเหตุผลในการอธิบายถึงสาเหตุที่ผู้หญิงญี่ปุ่นจำนวนเพียง 10-15% ที่แสดงอาการของสตรีวัยทอง ขณะที่พบอาการเหล่านี้ในสตรีอเมริกันถึง 80-85% พบว่าประชากรในทวีปเอเชียได้รับไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองโดยเฉลี่ยสูงถึง 40-80 มิลลิกรัมต่อวัน (Barnes et al., 1990, Aldercreutz et al., 1995)

ประโยชน์ของถั่วเหลืองต่อสุขภาพ

1. ถั่วเหลืองกับภาวะหมดประจำเดือน

ผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนมักมีอาการร้อนวูบวาบ หงุดหงิด มีอาการทางผิวหนังและเยื่อบุบริเวณช่องคลอด (เช่น อักเสบ แห้ง) รวมทั้งมีอัตราการเป็นโรคกระดูกพรุน (osteoporosis) และอัตราเสี่ยงต่อโรคหัวใจขาดเลือดสูงขึ้น การใช้ฮอร์โมนทดแทนแม้จะช่วยลดอาการไม่สุขสบายที่เกิดขึ้นแต่ก็มีความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งเต้านม การรับประทานอาหารที่ทำจากถั่วเหลืองซึ่งมีสารไอโซฟลาโวนเป็นส่วนประกอบอย่างสม่ำเสมอ จึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้หญิงที่ไม่ต้องการใช้ฮอร์โมนทดแทน นอกจากช่วยลดอาการร้อนวูบวาบแล้ว ยังช่วยป้องกันโรคมะเร็งเต้านมและมะเร็งที่พึ่งฮอร์โมน รวมทั้งลดระดับไขมันในเลือดได้ มีการศึกษาจำนวนมากที่บ่งชี้ว่าการบริโภคถั่วเหลืองที่มีไอโซฟลาโวนหรือการรับประทานอาหารเสริมไอโซฟลาโวนสามารถเพิ่มความหนาแน่นของกระดูกและลดอาการวูบวาบที่เกิดจากภาวะหมดประจำเดือน

การศึกษาในประเทศญี่ปุ่นพบว่า ผู้หญิงญี่ปุ่นที่รับประทานถั่วเหลืองมากทั้งในแง่ปริมาณรวมของถั่วเหลืองและไอโซฟลาโวนจะมีความถี่ของอาการร้อนวูบวาบน้อยกว่า มีรายงานว่าผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนในยุโรปมีอาการร้อนวูบวาบร้อยละ 70-80 ขณะที่ผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนในมาเลเซีย จีน และสิงคโปร์มีอาการร้อนวูบวาบร้อยละ 57,18 และ 14 ตามลำดับ (Nagata, C. et al., 2001)

จากการวิเคราะห์ผลงานวิจัยทางคลินิก 10 งานวิจัยถึงประโยชน์ของการใช้ถั่วเหลืองและไอโซฟลาโวน พบว่า ผลการศึกษายังมีข้อขัดแย้งกันคือ มี 4 การศึกษาที่แสดงถึงประโยชน์ของการบริโภคไอโซฟลาโวนตั้งแต่ 34 ถึง 134 มิลลิกรัมต่อวันทั้งในรูปแป้งถั่วเหลือง โปรตีนถั่วเหลืองหรือสารสกัดบรรจุแคปซูลในการช่วยลดกลุ่มอาการที่เกิดจากภาวะหมดประจำเดือน ขณะเดียวกันอีก 6 การศึกษาไม่

สามารถบอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมได้ (Huntley AL, et al., 2004) อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยทางคลินิกที่เสนอให้มีการใช้อาหารจากถั่วเหลืองเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการเป็นฮอร์โมนทดแทนในหญิงวัยหมดประจำเดือน (Cassidy et al., 1994)

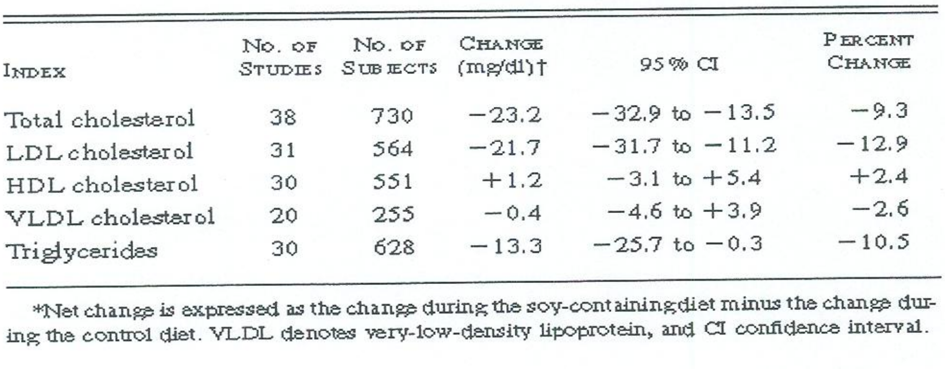
จากการศึกษาพบว่าถั่วเหลืองไม่ได้ช่วยแค่ลดอาการที่เกิดจากภาวะหมดประจำเดือนเท่านั้น แต่ยังช่วยลดไขมันในร่างกาย และความดันโลหิตอีกด้วย

2. ถั่วเหลืองกับโรคหัวใจขาดเลือด

การศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าประชากรที่กินอาหารที่มีโปรตีนจากพืชจะมีอัตราการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดและภาวะของโคเลสเตอรอลในเลือดสูงต่ำกว่าประชากรที่กินอาหารที่มีโปรตีนจากสัตว์ จากการวิเคราะห์รายงานการวิจัยทางคลินิกแบบ meta-analysis ทั้งหมด 38 เรื่อง ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า การกินโปรตีนถั่วเหลืองเฉลี่ย 47 กรัมต่อวันจะทำให้ระดับ total cholesterol ลดลงร้อยละ 9, LDL ลดลงร้อยละ 13 และ triglycerides ลดลงร้อยละ 10 (Anderson, Ambrose, and Garner 1995; Potter, 1998) องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) และสมาคมแพทย์โรคหัวใจในอเมริกา (American Heart Association, AHA) ได้แนะนำให้กินโปรตีนจากถั่วเหลือง 25 กรัมต่อวัน และให้โปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นส่วนหนึ่งของอาหารที่มีไขมันอิ่มตัวและโคเลสเตอรอลต่ำ ซึ่งอาจช่วยลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ (Food and Drug Administration, http://fda.gov.)

จากการวิเคราะห์งานวิจัยทางคลินิกแบบ meta-analysis จำนวน 23 เรื่อง ที่ตีพิมพ์ระหว่างปี ค.ศ.1995 – 2002 ผลการวิเคราะห์ยืนยันว่าการกินโปรตีนถั่วเหลืองที่มีไอโซฟลาโวนร่วมอยู่ด้วย สัมพันธ์กับการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับ total cholesterol, LDL และ triglycerides และสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ HDL ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือดและไลโปโปรตีนระหว่างกลุ่มที่บริโภคถั่วเหลืองและกลุ่มที่ไม่ได้บริโภคถั่วเหลือง



INDEX	NO. OF STUDIES	NO. OF SUBJECTS	CHANGE (mg/dl)†	95% CI	PERCENT CHANGE
Total cholesterol	38	730	−23.2	−32.9 to −13.5	−9.3
LDL cholesterol	31	564	−21.7	−31.7 to −11.2	−12.9
HDL cholesterol	30	551	+1.2	−3.1 to +5.4	+2.4
VLDL cholesterol	20	255	−0.4	−4.6 to +3.9	−2.6
Triglycerides	30	628	−13.3	−25.7 to −0.3	−10.5

*Net change is expressed as the change during the soy-containing diet minus the change during the control diet. VLDL denotes very-low-density lipoprotein, and CI confidence interval.

3. ถั่วเหลืองกับโรคกระดูกพรุน

โรคกระดูกพรุน (osteoporosis) เป็นภาวะที่มีความผิดปกติของมวลกระดูกทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ทำให้ความแข็งแรงของกระดูกลดลง เกิดกระดูกหักได้ง่ายแม้ได้รับการกระทบกระแทกเพียงเล็กน้อย สาเหตุที่พบได้บ่อยและสำคัญมากที่สุดคือ การขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนจากการขาดประจำเดือน แคลเซียมมีผลต่อมวลกระดูกตั้งแต่วัยเด็กจนถึงวัยสูงอายุ การเสริมแคลเซียมสามารถทำให้มวลกระดูกสูงขึ้นแม้จะได้รับแคลเซียมจากอาหารเพียงพอตามข้อกำหนดของสารอาหารที่ควรได้รับประจำวัน (Recommended Dietary Allowance, RDA) แล้ว ผู้หญิงหลังหมดประจำเดือนจะมีการสูญเสียเนื้อกระดูกประมาณร้อยละ 3 – 5 ต่อปี ในเวลา 3 – 5 ปีแรกของการหมดประจำเดือนทำให้มวลกระดูกลดลงประมาณ 15 % หลังจากนั้นอัตราการสูญเสียเนื้อกระดูกจะลดลงสู่ระดับเดิมคือ ร้อยละ 0.5 – 1 ต่อปี จนเข้าสู่วัยสูงอายุ

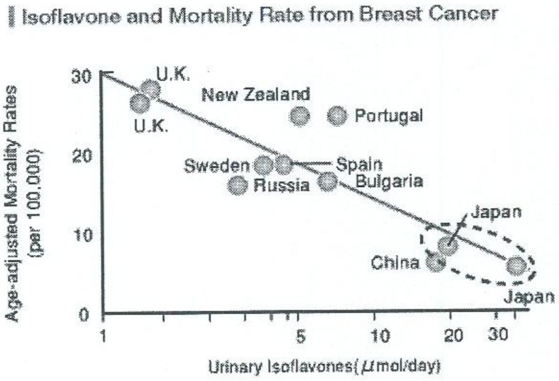
การเสริมแคลเซียมในช่วงวัยทองไม่สามารถขจัดผลของการขาดเอสโตรเจนได้ แต่ช่วยลดผลที่เกิดจากการขาดแคลเซียมได้ ทั้งนี้ผู้หญิงควรได้รับแคลเซียมจากอาหารวันละ 800 –1200 มิลลิกรัม อาหารที่มีแคลเซียมสูงได้แก่ นม ปลาทอดกรอบ กุ้งแห้ง เต้าหู้ เป็นต้น การศึกษาการบริโภคแคลเซียมในผู้ใหญ่ชาวไทยเฉลี่ยเท่ากับ 361 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำกว่าที่ควรได้รับประจำวันมาก การศึกษาทางระบาดวิทยาได้แสดงให้เห็นว่า การบริโภคแคลเซียมที่น้อยกว่า 500 มิลลิกรัมต่อวัน มีความสัมพันธ์กับอัตราเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นต่อการเกิดกระดูกสะโพกหักในชาวยุโรป และการเสริมแคลเซียมมีผลป้องกันการเกิดกระดูกหักจากภาวะกระดูกพรุนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรที่ได้รับแคลเซียมจากอาหารไม่เพียงพอ ในกรณีที่อาหารอย่างเดียวไม่สามารถให้แคลเซียมเพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย อาจต้องรับประทานยาเม็ดเสริมแคลเซียม เช่น calcium carbonate และ calcium citrate เป็นต้น

การทดลองในหนูพบว่า เจนิสเตอีนซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนชนิดหนึ่ง ให้ผลคล้ายยาประเภทเอสโตรเจนที่ชื่อ พรีมาริน (Premarin) โดยสามารถลดการสูญเสียมวลกระดูกได้ โปรตีนถั่วเหลืองสามารถป้องกันการสูญเสียเนื้อกระดูกที่เกิดจากการขาดฮอร์โมนในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทิ้ง (Anderson, Ambrose, and Garner, 1995) การศึกษาทางระบาดวิทยารายงานว่าการบริโภคอาหารจากถั่วเหลืองในปริมาณที่มากเพียงพอ จะลดในอัตราการเกิดภาวะกระดูกพรุนในเพศหญิงได้ (Messina et al., 1994) สำหรับการศึกษาในมนุษย์นั้นขณะนี้ยังเร็วเกินไปที่จะสรุปผลว่าไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองป้องกันภาวะกระดูกพรุนได้ เนื่องจากแม้จะมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่ามีการสูญเสียของมวลกระดูกน้อยกว่าหรือเพิ่มมวลกระดูกมากกว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับไอโซฟลาโวนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ก็มีการศึกษาที่ไม่เห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลือง (Setchell KD, et al., 2003) เช่นกัน

4. ถั่วเหลืองกับโรคมะเร็ง

มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งมดลูก มะเร็งรังไข่ ซึ่งเป็นมะเร็งชนิดที่สัมพันธ์กับฮอร์โมนในร่างกายและโรคหัวใจขาดเลือด มีอุบัติการณ์การเกิดโรคในเอเชียและยุโรปตะวันออกต่ำกว่าในประเทศตะวันตก (Messina and Barnes, 1991; Messina et al., 1994) มีรายงานว่าประเทศญี่ปุ่นมีอัตราเสี่ยงต่อโรคมะเร็งที่พึ่งฮอร์โมนต่ำสุด การศึกษาในประชากรชาวเอเชียซึ่งมีการบริโภคผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองมากกว่าชาวตะวันตกพบว่า หญิงเอเชียเป็นโรคมะเร็งเต้านมน้อยกว่าหญิงชาวตะวันตกถึง 5 เท่า ในทำนองเดียวกันพบว่า ชาวเอเชียเป็นมะเร็งในต่อมลูกหมากน้อยกว่าชาวตะวันตกถึง 20 เท่า ผู้อพยพชาวเอเชียที่อยู่ในประเทศตะวันตกที่ยังรับประทานอาหารตามประเพณีดั้งเดิมของตนมีอัตราเสี่ยงต่อโรคไม่สูงขึ้น แต่กลุ่มที่หันไปบริโภคแบบตะวันตกมีอัตราเสี่ยงต่อโรคสูงขึ้น มีข้อมูลบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟโตเอสโตรเจนที่ได้รับจากอาหารที่แตกต่างกันในกลุ่มคนแต่ละท้องถิ่น โดยพบว่าคนญี่ปุ่นรับประทานผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองเฉลี่ยวันละ 200 มิลลิกรัม คนเอเชียจะได้รับไอโซฟลาโวนจากอาหารโดยเฉลี่ยวันละ 40-80 มิลลิกรัม (Barnes et al., 1990; Aldercreutz, 1995; Wakai K et al., 1999) โดยได้ไอโซฟลาโวนส่วนใหญ่มาจากอาหารจำพวกถั่วเมล็ดแห้ง ปริมาณไอโซฟลาโวนที่ได้รับนี้สูงกว่าประชากรแถบประเทศตะวันตก ซึ่งได้รับไอโซฟลาโวนจากอาหารโดยเฉลี่ยน้อยกว่า 5 มิลลิกรัมต่อวัน มีรายงานว่าผู้หญิงที่รับประทานซุปเต้าเจี้ยวมากจะมีอัตราเสี่ยงต่อโรคมะเร็งต่ำ ผู้ชายญี่ปุ่นที่กินเต้าหู้มากกว่า 5 ครั้งต่อสัปดาห์จะมีอัตราเสี่ยงต่อมะเร็งต่อมลูกหมากคิดเป็นครึ่งหนึ่งของคนที่กินเต้าหู้น้อยกว่า 1 ครั้งต่อสัปดาห์ คนญี่ปุ่นที่กินเต้าหู้มากมีอัตราเสี่ยงต่ำต่อมะเร็งกระเพาะอาหาร คนจีนที่กินถั่วเหลืองมากกว่า 5 กิโลกรัมต่อปีมีอัตราเสี่ยงต่อมะเร็งกระเพาะอาหารลดลงร้อยละ 40 หญิงจีนที่กินอาหารที่ประกอบด้วยถั่วเหลืองน้อยกว่า 1 ครั้งต่อสัปดาห์มีอัตราเสี่ยงต่อมะเร็งปอดเป็น 3.5 เท่าและมะเร็งเต้านมเป็น 2 เท่าของหญิงจีนที่กินอาหารที่ประกอบด้วยถั่วเหลืองทุกวัน (ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์ 2544) จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเจนิสเตอีนในสัตว์ทดลอง พบว่าสารดังกล่าวแสดงฤทธิ์เป็น anti-estrogen ดังนั้นจึงสามารถลดอัตราเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งที่เกิดจากการกระตุ้นของฮอร์โมนได้ เช่น มะเร็งเต้านม เป็นต้น (Hendrich and Lee, 1993; Zava and Duwe, 1997) พบว่า 25% ของคนไข้มะเร็งเต้านมยังอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ ซึ่ง 70% ของคนกลุ่มนี้เมื่อได้รับการรักษาทางเคมีบำบัดแล้วจะเกิดอาการ premature menopause ดังนั้นจึงมีคนไข้กลุ่มนี้บางส่วนจึงเลือกใช้การรับประทานไอโซฟลาโวนเสริมเพื่อลดความเสี่ยงดังกล่าว (Col NF et al., 2001)

การศึกษาด้านระบาดวิทยาของประชากรชาวเอเชียที่บริโภคถั่วเหลืองเป็นปริมาณมากและติดต่อกันเป็นเวลานานเทียบกับชาวยุโรป พบว่าการบริโภคถั่วเหลืองสามารถลดปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งเต้านมได้ ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราการตายจากโรคมะเร็งเต้านมและการบริโภคถั่วเหลือง (รูปจาก www.fujicco.co.jp/english/)

เภสัชจลนศาสตร์ของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง

จากการศึกษาเกี่ยวกับการดูดซึมและเมตาโบลิสมสารไอโซฟลาโวนในร่างกาย พบว่าไอโซฟลาโวนจะถูกดูดซึมได้สมบูรณ์และรวดเร็วเมื่ออยู่ในรูปของอะกลัยโคน (ได้แก่ เดดเซอีน เจนิสเตอีน และไกลซิเตอีน) โดยการดูดซึมจะเกิดที่บริเวณ epithelial cell ของลำไส้เล็ก ทั้งนี้เนื่องจากหมู่น้ำตาลเป็นโมเลกุลหมู่ใหญ่ที่มีส่วนทำให้การดูดซึมช้าลง (Brown, 1988; Xu et al., 1995; Izumi T et al., 2000, Aldercreutz, 1999) และจากการศึกษาพบว่าเจนิสเตอีนจะถูกดูดซึมได้มากกว่าเดดเซอีนและไกลซิเตอีนด้วย พบว่าแม้กลัยโคไซด์จะถูกดูดซึมได้ช้า แต่ก็ยังสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย และจะถูกเมตาบอลิสมต่อไปเป็นอะกลัยโคน โดยพบว่าเจนิสตินบางส่วนจะถูกเปลี่ยนเป็นเจนิสเตอีนโดยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ในระบบทางเดินอาหาร และโดยเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส (β-glucosidase) ในลำไส้ใหญ่ (Friend and Chang, 1984) พบว่าเอนไซม์จาก Lactobacilli, Bacteroides และ Bifidolbacteria ที่พบในลำไส้ใหญ่และทางเดินอาหารของมนุษย์ก็มีฤทธิ์เหมือนเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส สามารถช่วยเปลี่ยนกลัยโคไซด์เป็นอะกลัยโคนได้เช่นกัน (Hawkswarth et al., 1971) จากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารไอโซฟลาโวน พบว่าระดับไอโซฟลาโวนในเลือดจะแตกต่างกันในอาสาสมัครแต่ละคนแม้จะมีการรับประทานสารในปริมาณเท่าเทียมกัน ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างในด้านปริมาณและความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อดังกล่าวที่พบในลำไส้ใหญ่และทางเดินอาหารนั่นเอง หลังจากการย่อยสลายกลัยโคไซด์เป็นอะกลัยโคนแล้ว เจนิสเตอีนจะถูกดูดซึมต่อที่บริเวณลำไส้ใหญ่ และถูกเมตาโบลิสมที่ตับต่อไป โดยอะกลัยโคนส่วนมากจะเกิดการคอนจูเกตกับ glucuronic acid โดยอาศัยเอนไซม์ UDP-glucoronosyl transferase คิดเป็น 97 เปอร์เซ็นต์ของอะกลัยโคนทั้งหมด และจำนวนน้อยจะเกิดการคอนจูเกตกับซัลเฟต โดยอาศัยเอนไซม์ sulfotransferase จากนั้นจะถูกขับออกทางปัสสาวะและน้ำดี อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเจนิสเตอีนสามารถถูกดูดซึมกลับอีกครั้งโดยอาศัย enterohepatic circulation

จากการศึกษาทางคลินิกเพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารไอโซฟลาโวน พบว่าอาสาสมัครที่รับประทานเจนิสติน ต้องใช้เวลาถึง 9.3 ชั่วโมงเพื่อให้ระดับเจนิสเตอีนในเลือดอยู่ในระดับที่สูงมากพอเพื่อการรักษา ในขณะที่อาสาสมัครที่รับประทานเจนิสเตอีน ใช้เวลาเพียง 5.2 ชั่วโมง (Setchell KD et al., 2001) อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Richelle และคณะไม่พบความแตกต่างของการดูดซึมไอโซฟลาโวนในรูปกลัยโคไซด์และอะกลัยโคนที่พบในเครื่องดื่มที่ทำจากถั่วเหลือง (Richelle M et al., 2002) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบอื่นๆ (food matrix) ที่พบในเครื่องดื่มดังกล่าว มีรายงานถึงผลกระทบของส่วนประกอบในอาหารต่อระดับของเจนิสเตอีนและระดับของเดดเซอีนในเลือด โดยพบว่าโปรตีนในถั่วเหลือง (soy protein) ส่งเสริมการดูดซึมเจนิสเตอีนโดยมีผลทำให้ระดับเจนิสเตอีนในเลือดสูงขึ้น ทั้งนี้มีผลกระทบต่อระดับเดดเซอีนในเลือดน้อยมาก (Setchell KD et al., 2001) มีหลายงานวิจัยรายงานถึงการดูดซึมของไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักดีกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (Hutchin AM et al., 1995: Slavin JL et al., 1998; Izumi T. 2000)

มีการรายงานถึงความหลากหลายในเภสัชจลนศาสตร์ของสารไอโซฟลาโวน ในการศึกษาระดับเจนิสเตอีนและเดดเซอีนในเลือดของประชากรกลุ่มต่างๆทั้งเพศหญิงและชายที่มีอายุ 40 ปีขึ้นไป พบว่าระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของเจนิสเตอีนในเลือดของประชากรแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกัน ทั้งยังพบความแตกต่างของปริมาณสารดังกล่าวในเลือดระหว่างเพศหญิงและเพศชายในประชากรกลุ่มเดียวกันด้วย (ตารางที่ 3) (Morton MS et al., 2002)

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณเจนิสเตอีนและเดดเซอีนในเลือด (nm/L)

เจนิสเตอีน		**เดดเซอีน**	
Japan	UK	Japan	UK
W 501.9 M 492.7	W 27.7 M 33.2	W 246.8 M 282.5	W 12.5 M 17.9

มีการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารไอโซฟลาโวนและเมตาบอไลท์อย่างละเอียดโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ LC/MS ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาเมตาบอไลท์ในปริมาณที่น้อยมากได้ โดยทำการศึกษาหาชนิดของเมตาบอไลท์นั้นทำการทดลองทั้งในมนุษย์และในสัตว์ทดลอง (Coward et al., 1998; Barnes, Kirk and Coward, 1994; Coward et al., 1996; Barnes et al., 1998a; Barnes et al., 1998b; Holder, Churchwell, and Doerge, 1999; Barnes et al., 1999) พบว่าไอโซฟลาโวนที่ถูกขับออกทางปัสสาวะและอุจจาระ โดย 50% ของเดดเซอีน และ 20% ของเจนิสเตอีนจะถูกขับออกในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลงภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากรับประทาน ทั้งนี้ตัวเลขเหล่านี้เปลี่ยนแปลงตามแต่ละบุคคล โดยมีรายงานถึงปริมาณของเดดเซอีนในช่วง 17.4-87.7% และเจนิสเตอีนในช่วง 8.5-69.6% (Zhang Y et al., 1999) โดยส่วนที่เหลือจะถูกขับออกในรูปเมตาบอไลท์ต่างๆ

อย่างไรก็ตาม การหาปริมาณไอโซฟลาโวนในรูปคอนจูเกชันเพื่อการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ยังคงเป็นเรื่องที่มีขั้นตอนยุ่งยากในการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ ทั้งในการศึกษาในพลาสมาและในปัสสาวะ เนื่องจากไม่สามารถหาสารมาตรฐานในรูปคอนจูเกชันได้ในท้องตลาด ต้องทำการสังเคราะห์สารมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ และสารมาตรฐานที่ได้ยังมีความคงตัวต่ำอีกด้วย ดังนั้นในปัจจุบันนักวิเคราะห์จะทำการย่อยสลายไอโซฟลาโวนที่อยู่ในรูปคอนจูเกชันด้วยเอนไซม์ให้อยู่ในรูปอะกลัยโคน จากนั้นทำการสกัดอะกลัยโคนที่ได้ออกมาวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป (Clarke et al., 2002) Jame และคณะ (2005) ทำการศึกษาหาชนิดและสายพันธุ์ของเอนไซม์ที่เหมาะสมเพื่อการย่อยสลายกลัยโคไซด์ให้เป็นอะกลัยโคน โดยทำการทดสอบหาเอนไซม์เบต้ากลูเคอโรซิเดสและเอนไซม์ซัลฟาเตสจากแหล่งต่างๆ รวมทั้งศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบไอโซฟลาโวนคอนจูเกชัน ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ สภาวะความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา (James, Philip, and Sheila, 2005) นอกจากนี้มีรายงานถึงเอนไซม์ในน้ำลายมนุษย์สามารถย่อยสลายกลัยโคไซด์ให้อยู่ในรูปอะกลัยโคนได้ (Allred et al., 2001) ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าไอโซฟลาโวนบางส่วนอาจถูกดูดซึมได้ทันทีที่กระเพาะอาหาร โดยไม่ต้องรอการย่อยสลายกลัยโคไซด์ที่ลำไส้เล็ก

ข้อมูลเบื้องต้นสามารถสรุปได้ว่า สารไอโซฟลาโวนสามารถถูกดูดซึมได้ดีในรูปอะกลัยโคน อย่างไรก็ตามไอโซฟลาโวนในธรรมชาติจะอยู่ในรูปกลัยโคไซด์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสารดังกล่าวมีข้อจำกัดในการดูดซึมเนื่องจากข้อจำกัดของโครงสร้างทางเคมี พบว่าสารไอโซฟลาโวนในรูปกลัยโคไซด์จะถูกดูดซึมได้ช้า และต้องอาศัยกระบวนการเมตาบอลิสมเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้อยู่ในรูปที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ต่อไป พบว่าหากต้องการเพิ่มอัตราการดูดซึมสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง อาจทำได้โดยการเปลี่ยนไอโซฟลาโวนให้อยู่ในรูปอะกลัยโคนก่อนนำเข้าสู่ร่างกาย เพื่อเป็นการเพิ่มการดูดซึมของสารและยังเป็นการลดขั้นตอนการเกิดไฮโดรไลซิสในร่างกายอีกด้วย

จากที่ทราบว่าไอโซฟลาโวนที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต้องอยู่ในรูปอะกลัยโคน (Izumi et al., 2000) ดังนั้นค่าชีวประสิทธิผล (Bioavailability, BA) ของไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองจึงขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวน และความคงตัวของไอโซฟลาโวนในระหว่างขั้นตอนการแปรรูป (Kao and chen, 2002; Wang et al., 1998) พบว่าสัดส่วนของปริมาณกลัยโคไซด์และอนุพันธ์มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อชีวประสิทธิผลและเภสัชจลนศาสตร์ของไอโซฟลาโวน (Coward et al., 1998) เนื่องจากสัดส่วนดังกล่าวมีผลต่อการดูดซึมสารและขั้นตอนการเมตาบอลิสม พบว่ามีปัจจัยมากมายที่สามารถส่งผลกระทบให้สัดส่วนของไอโซฟลาโวนแต่ละชนิดในถั่วเหลืองเกิดความเปลี่ยนแปลง ซึ่งส่งผลต่อไปยังความแตกต่างทางเภสัชจลนศาสตร์ จากเหตุผลดังกล่าวส่งผลให้เกิดข้อถกเถียงในการนำไอโซฟลาโวนมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทน เนื่องจากความแปรปรวนของปริมาณและสัดส่วนของสารสำคัญในถั่วเหลืองส่งผลให้เกิดความไม่เท่าเทียมกันทางชีวประสิทธิผลของถั่วเหลืองในแต่ละรอบการผลิต จึงทำให้ไม่

สามารถคำนวณหรืออธิบายเภสัชจลนศาสตร์ที่แน่นอนของสารสำคัญในถั่วเหลืองได้ ก่อให้เกิดความยุ่งยากในการกำหนดขนาดการใช้ที่แน่นอนต่อไป

ไฟโตเอสโตรเจนกับการประยุกต์ใช้เป็นสารเภสัชโภชนภัณฑ์

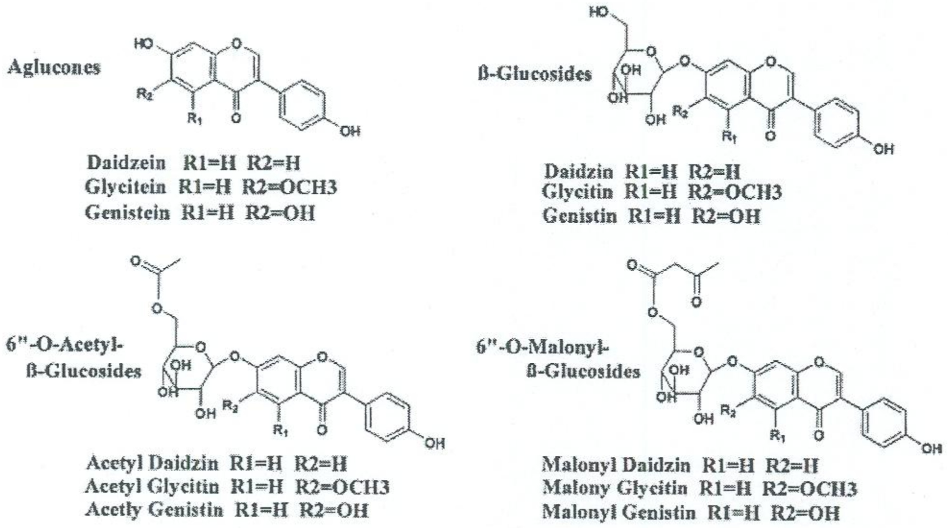
โดยทั่วไปแพทย์มักจะจ่ายเอสโตรเจนในการบำบัดอาการต่างๆ ของสตรีวัยทอง แต่เนื่องจากเอสโตรเจนสามารถกระตุ้นให้เกิด cell proliferation ของเนื้อเยื่อเต้านมปกติ และก่อให้เกิดมะเร็ง ได้ ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ของเอสโตรเจน ไฟโตเอสโตรเจนจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับสตรีวัยทองที่มีประวัติการเป็นมะเร็งเต้านม มีประวัติมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก มีอาการตับเสื่อมหน้าที่อย่างรุนแรง เป็นโรค porphyria ซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พร่องเอนไซม์ในการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน เลือดออกผิดปกติจากช่องคลอดที่ยังหาสาเหตุไม่ได้ และ สตรีที่ทนอาการข้างเคียงของยาฮอร์โมนไม่ได้

ในปัจจุบันนี้ มีสารสกัดไอโซฟลาโวนออกมาจำหน่ายในรูปของผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และโภชนเภสัชภัณฑ์มากมาย เพื่อใช้สรรพคุณเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสตรีหมดประจำเดือน และผู้ที่เสี่ยงต่อโรคมะเร็งเต้านม แม้ว่าจะมีรายงานถึงการทดลองในห้องปฏิบัติการอย่างมากมายถึงสรรพคุณของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง แต่งานวิจัยทางคลินิกยังมีไม่เพียงพอ ยังขาดข้อมูลในด้านต่าง ๆ เช่น ขนาดรับประทานที่เหมาะสมในการใช้เป็นฮอร์โมนทดแทน อัตราการดูดซึม ความเร็วของการเกิดเมตาบอลิสม ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ชัดเจน ผลทางคลินิก รวมทั้งฤทธิ์ข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ ดังนั้นการใช้สารสกัดไอโซฟลาโวนจึงยังขาดการยอมรับทางวิชาการและทางการแพทย์ถึงผลทางการรักษาที่แน่ชัด ในแง่การใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในหญิงวัยหมดประจำเดือน รวมทั้งการกำหนดขนาดการใช้ที่เหมาะสม ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องมีการวิจัยและการพัฒนาต่อไป โดยเฉพาะการแสดงผลทางคลินิกที่ชัดเจนในกลุ่มประชากรไทย

พบว่าการได้รับไอโซฟลาโวนในรูปแบบสารสกัด จะดีกว่าหรือมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากกว่าการได้รับสารไอโซฟลาโวนที่สกัดแยกบริสุทธิ์เป็นชนิดเดี่ยวๆ เนื่องจากไอโซฟลาโวนชนิดอื่นๆ ที่นอกเหนือจากเจนิสเตอีนก็ยังมีฤทธิ์ในทางเภสัชวิทยาเช่นเดียวกัน แม้จะมีรายงานถึงฤทธิ์ที่อ่อนกว่าเจนิสเตอีนก็ตาม ดังนั้นจึงไม่จำเป็นทำการแยกบริสุทธิ์สารเจนิสเตอีนออกจากสารไอโซฟลาโวนอื่นๆ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มขั้นตอนการทำงาน และอาจสูญเสียสารสำคัญไปบางส่วนในระหว่างขั้นตอนการสกัดที่ซับซ้อน ดังนั้นเราจึงยังพบผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพหลายชนิดที่ผลิตจากไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองในรูปสารสกัดที่ยังรวมเอาสารสำคัญอื่นๆอีกหลายชนิดไว้ด้วย ได้แก่การผลิต complete soy nutraceutical supplement จำหน่ายในรูปเม็ดและแคปซูล ซึ่งนำมาใช้ใน natural hormone replacement therapy

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและความคงตัวของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง

สารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองจะอยู่ใน 2 รูปแบบใหญ่ๆ คือ รูปกลัยโคไซด์และอะกลัยโคน โดยในธรรมชาติ สารจะอยู่ในรูปกลัยโคไซด์มากกว่า โดยอยู่ในรูปอนุพันธ์มาโลนิลเป็นหลัก สำหรับในรูปอนุพันธ์อื่นๆนั้นจะมีปริมาณที่น้อยกว่า แต่จะมีสัดส่วนที่เพิ่มขึ้นจากการสลายตัวของอนุพันธ์มาโลนิลในระหว่างขั้นตอนการผลิตหรือแปรรูปถั่วเหลือง


Aglucones
Daidzein R1=H R2=H
Glycitein R1=H R2=OCH3
Genistein R1=H R2=OH
ß-Glucosides
Daidzin R1=H R2=H
Glycitin R1=H R2=OCH3
Genistin R1=H R2=OH
6"-O-Acetyl-ß-Glucosides
Acetyl Daidzin R1=H R2=H
Acetyl Glycitin R1=H R2=OCH3
Acetly Genistin R1=H R2=OH
6"-O-Malonyl-ß-Glucosides
Malonyl Daidzin R1=H R2=H
Malony Glycitin R1=H R2=OCH3
Malonyl Genistin R1=H R2=OH

รูปที่ 8. แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง (รูปจาก Griffith and Collison, 2001)

จากการศึกษาพบว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง ได้แก่ ชนิดของพันธุ์พืช ฤดูการเพาะปลูก สภาพอากาศ สภาพพื้นที่การเพาะปลูก ช่วงระยะเวลาการเก็บเกี่ยวผลผลิต ระยะเวลาการเก็บ รวมไปถึงขั้นตอนการแปรสภาพถั่วเหลืองด้วย (Barnes, Kirk, and Coward 1994)

มีรายงานถึงผลกระทบจากขั้นตอนต่างๆในขบวนการแปรรูปอาหารจากถั่วเหลืองต่อปริมาณสารสำคัญ (Wang and Murphy, 1994; Wang and Murphy, 1996) โดยพบว่านอกจากปริมาณไอโซฟลาโวนเริ่มต้นในถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์พืชจะแตกต่างกันแล้วนั้น ยังพบความแตกต่างของปริมาณไอโซฟลาโวนในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่ต่างชนิดกันแม้จะใช้ถั่วเหลืองจากแหล่งเดียวกัน เนื่องจากการใช้ขั้นตอนการแปรรูปที่แตกต่างกันนั่นเอง (Jackson et al., 2002; Anderson, Ambrose, and Garner, 1995; Potter, 1998; Cassidy, Bringham, and Setchell, 1994; Wang and Murphy, 1994; Wang and Murphy, 1996; Jackson et al., 1999) โดยพบว่าการใช้ความร้อนในระหว่างการแปรรูป การไฮโดรไลซิสถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ และการหมัก ล้วนแต่ทำให้ปริมาณและสัดส่วนของสารไอโซฟลาโวน

ในถั่วเหลืองเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (Wang and Murphy 1994) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแต่ละขั้นตอนของการแปรรูปส่งผลกระทบต่อปริมาณสารสำคัญไม่เท่าเทียมกัน โดยพบว่าสำหรับการทำเต้าหู้นั้น ขั้นตอนการต้ม การบด และการตกตะกอนโปรตีนมีผลกระทบน้อยมากต่อสัดส่วนของไอโซฟลาโวน ในขณะที่สัดส่วนของอะกลัยโคน (เจนิสเตอีนและเดดเซอีน) จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในขั้นตอนการคั่วด้วยความร้อน (Franke et al., 1995)

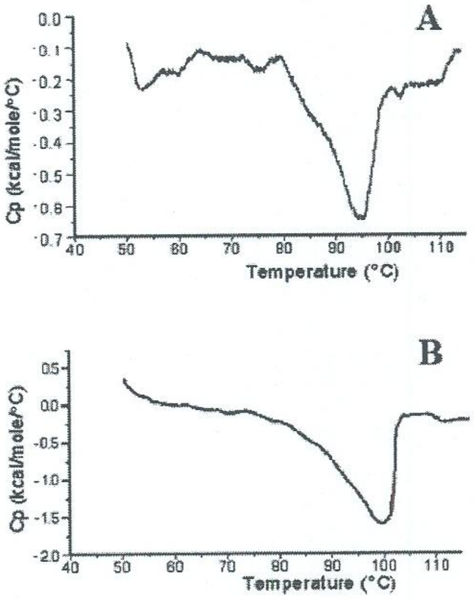
1. ปัจจัยด้านอุณหภูมิ

มีรายงานถึงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองอยู่มากมาย (Kudou et al., 1991; Liu, 1997; Mahungu, 1999) โดยพบว่าไอโซฟลาโวนในรูปอนุพันธ์มาโลนิลจะไม่คงตัวต่อความร้อน (Mahungu, 1999; Coward et al., 1998) เมื่อโดนความร้อนอนุพันธ์มาโลนิลสามารถสลายตัวไปเป็นอนุพันธ์อะเซทิล (Mahungu, 1999) และสลายตัวไปเป็นอะกลัยโคนตามลำดับ ปริมาณอนุพันธ์มาโลนิลลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อถั่วเหลืองได้รับความร้อนที่ 150 องศาเซลเซียส (Jackson et al., 2002) และอนุพันธ์ดังกล่าวจะสลายตัวไปจนหมดเมื่อได้รับความร้อนในระดับดังกล่าวอย่างต่อเนื่องนานกว่า 30 นาที (Chien et al., 2005) รายงานนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Murphy และคณะ (2002) ที่ให้ความร้อนกับผงถั่วเหลืองบดแห้ง ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อนำถั่วเหลืองดังกล่าวมาสกัดหาปริมาณไอโซฟลาโวน พบว่าอนุพันธ์มาโลนิลสลายตัวไปจนหมดสิ้น (Murphy et al., 2002) แม้จะมีรายงานว่าความร้อนทำให้เกิดการสลายตัวของอนุพันธ์มาโลนิล โดยส่งผลให้สัดส่วนของไอโซฟลาโวนเปลี่ยนไป อย่างไรก็ตาม Wang และคณะ (1996) พบว่าความร้อนไม่มีผลกระทบต่อปริมาณรวมทั้งหมดของไอโซฟลาโวน (Wang and Murphy, 1996)

ในการทำเครื่องดื่มจากถั่วเหลืองนั้น พบว่าการใช้ความร้อนในระหว่างการแปรรูปจะทำให้ปริมาณรวมของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองลดลง (Okubo, Kobayzshi, and Takahashi, 1983) โดยปริมาณไอโซฟลาโวนรวมในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป และเครื่องดื่มแปรรูปจะเหลือเพียงร้อยละ 36 และ 54 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณเริ่มต้นในถั่วเหลืองดิบ (Jackson et al., 2002) ทั้งนี้การลดลงของปริมาณรวมทั้งหมดของไอโซฟลาโวนอาจเกิดจากความร้อนทำลายสารไอโซฟลาโวนไปบางส่วน (heat damage) ร่วมกับการสูญเสียสารสำคัญไปในระหว่างขั้นตอนการแปรรูป (processing loss)

ยังมีรายงานอีกหลายฉบับที่กล่าวถึงความไม่คงตัวของเดดเซอีนและเจนิสเตอีนภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง จากการศึกษาพบว่าเมื่อให้ความร้อนแก่เต้าหู้ ปริมาณของเดดเซอีนและอนุพันธ์ของมันจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Ungar, Osundahunsi, and Shimoni, 2003) Mahungu และคณะ (Mahungu et al., 1999) ทำการศึกษาความคงตัวของสารประกอบไอโซฟลาโวนภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 110, 130 และ 150 องศาเซลเซียสตามลำดับ พบว่าปริมาณของเดดเซอีนและอนุพันธ์ของมันจะมีความคงตัวต่ำกว่าเจนิสเตอีนและอนุพันธ์ โดยปริมาณของเดดเซอีนจะลดลงถึง 44% ที่อุณหภูมิสูง ในขณะที่ปริมาณเจ

นิสเตอีนจะเสื่อมสลายไปเพียง 33% เท่านั้น โดยอนุพันธ์มาโลนิลจะมีความคงตัวน้อยที่สุดที่อุณหภูมิสูง จากการทดลองด้วยเทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC) รายงานว่าปฏิกิริยาการเสื่อมสลายของโครงสร้างเจนิสเตอีนจะเริ่มเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส และการเสื่อมสลายของเดดเซอีนจะเริ่มเกิดที่ 98 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราของการเสื่อมสลายของเดดเซอีนจะสูงกว่า (รูปที่ 9) โดยเมื่อทำการตรวจสอบหาปริมาณสารที่คงเหลือด้วยเทคนิค HPLC พบว่าที่อุณหภูมิดังกล่าวปริมาณเจนิสเตอีนจะลดลง 29% ในขณะที่ปริมาณเดดเซอีนจะลดลงถึง 58% จากการทดลองดังกล่าว สรุปได้ว่าความคงตัวของสารประกอบประเภท polyphenol จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนและตำแหน่งของกลุ่มไฮดรอกซี่ (Ungar, Osundahunsi, and Shimoni, 2003)

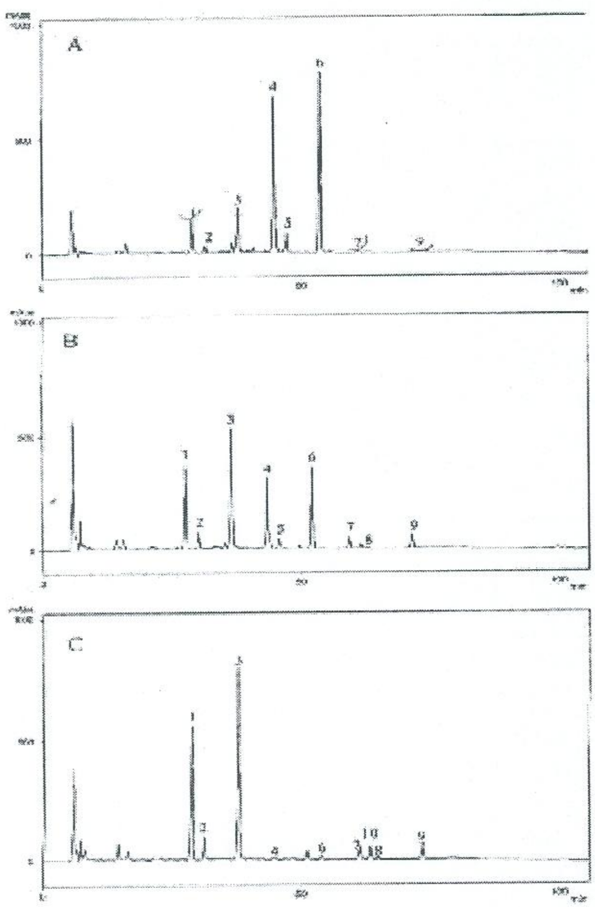


รูปที่ 9. แสดงการสลายตัว (decomposition) ของ (A) เจนิสเตอีน และ (B) เดดเซอีน ตรวจวัดโดยเทคนิค DSC (รูปจาก Ungar, Osundahunsi, and Shimoni 2003)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนในอาหารแปรรูปจากถั่วเหลืองที่ผ่านการแปรรูปด้วยความร้อน พบว่าความร้อนของแอลกอฮอล์ในขั้นตอนการสกัดสามารถทำให้เกิดการสลายตัวของอนุพันธ์มาโลนิลและอนุพันธ์อะเซทิลไปอยู่ในรูปอนุพันธ์กลูโคไซด์และอะกลัยโคน (Eldridge 1982, Nguyenle, Wang, and Cheung, 1995) ดังนั้นจึงมีการแนะนำให้สกัดไอโซฟลาโวนที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4 องศาเซลเซียสเพื่อยังคงสัดส่วนที่แท้จริงของไอโซฟลาโวนที่มีในธรรมชาติไว้ (Barnes, Kirk, and Coward, 1994; Wang and Murphy, 1994) เมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนของสารไอโซฟลาโวนที่ได้จากการสกัดถั่วเหลืองที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าสาร

สกัดที่ได้จากการสกัด ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีสัดส่วนของอนุพันธ์มาโลนิล ชนิด 6-O"-malonyl-genistin สูงสุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ได้จากอุณหภูมิอื่น ส่วนการสกัดสารที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จะทำให้สารสกัดมีสัดส่วนของอนุพันธ์มาโลนิลต่ำที่สุด และสัดส่วนของอะกลัยโคนเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Coward et al., 1998) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Park และคณะ (2001) ซึ่งรายงานถึงความแตกต่างของสัดส่วนไอโซฟลาโวนที่เกิดขึ้นเมื่อทำการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25, 100 และ 121 องศาเซลเซียส โดยพบว่าถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะมีส่วนประกอบของมาโลนิลเดดซีนและมาโลนิลเจนิสตินในปริมาณสูงสุด และมีปริมาณของเดดซินและเจนิสตินต่ำมาก สำหรับถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบปริมาณเดดซินและเจนิสตินในสัดส่วนที่สูงขึ้นและมีปริมาณที่มากกว่าอนุพันธ์มาโลนิลของมัน อนุพันธ์มาโลนิลมีปริมาณที่ลดลงคิดเป็น 56% โดยที่อุณหภูมิดังกล่าวมีผลกระทบน้อยมากต่อสัดส่วนของอนุพันธ์อะเซทิล สำหรับถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส พบปริมาณสารเดดซินและเจนิสตินสูงมาก โดยวิเคราะห์พบอนุพันธ์มาโลนิลและอนุพันธ์อะเซทิลในปริมาณที่น้อยมาก การลดลงของอนุพันธ์มาโลนิลคิดเป็น 93% สรุปได้ว่าอุณหภูมิที่สูงจะทำให้เกิดการสลายตัวของอนุพันธ์มาโลนิลและอนุพันธ์อะเซทิลไปเป็นอะกลัยโคน ทำให้สัดส่วนของอะกลัยโคนในสารสกัดเพิ่มสูงขึ้น ดังแสดงในโครมาโตแกรม (รูปที่ 10) (Park et al., 2001)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง พบว่าอุณหภูมิมีผลกระทบโดยตรงต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกลุ่มดังกล่าว โดยพบว่าสารสกัดไอโซฟลาโวนที่ผ่านอุณหภูมิสูง จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงเนื่องจากการเสื่อมสลายของสารเจนิสเตอีนและเดดเซอีน (Ungar et al., 2003) สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Park และคณะ (2001) ที่พบว่าปริมาณอะกลัยโคนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดที่มีปริมาณอะกลัยโคนสูงที่สุด จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดด้วย (Park et al., 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะเร่งต่างๆ ซึ่งยังผลให้ถั่วเหลืองเกิดความร้อนไม่ว่าจะเป็น การบีบอัด การปิ้งหรือย่าง การคั่วและการทอดจะมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองทั้งสิ้น เนื่องจากการสลายตัวของกลัยโคไซด์ไปเป็นสารอะกลัยโคน (Prasad et.al.2004)



รูปที่ 10 แสดงปริมาณสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆกัน (รูปจาก Park et al., 2001)

โดย A = ไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนที่ 25 องศาเซลเซียส

B = ไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส

C = ไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส

1 = daiazin; 2 = glycitin; 3 = genistin ; 4 =malonyl daiazin; 5 = malonyl glycitin; 6 = malonyl genistin;7 = daidzein; 8 = glycitein; 9 = genistein;10 = acetyl genistin

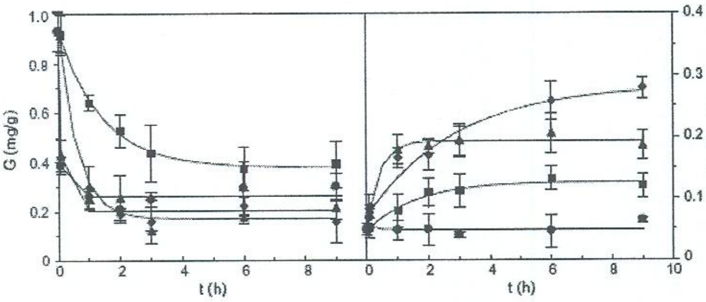
2. ปัจจัยด้านการแช่น้ำ

ขั้นตอนการแช่น้ำเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการเตรียมอาหารแปรรูปจากถั่วเหลือง (Toda et al., 2001) อย่างไรก็ตามไอโซฟลาโวนชนิดกลัยโคไซด์สามารถสูญเสียไปได้ง่ายในระหว่างขั้นตอนการแช่น้ำ เนื่องจากคุณสมบัติความสามารถในการละลายในน้ำได้ดีของสารกลุ่มกลัยโคไซด์ มีรายงานถึงปริมาณของไอโซฟลาโวนรวมที่ลดลงถึง 4% หลังจากการแช่น้ำ นอกจากนี้การบดถั่วเหลืองในน้ำขณะต้ม จะทำให้เกิดการสูญเสียไอโซฟลาโวนโดยทำให้ปริมาณไอโซฟลาโวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Jackson et al., 2002)

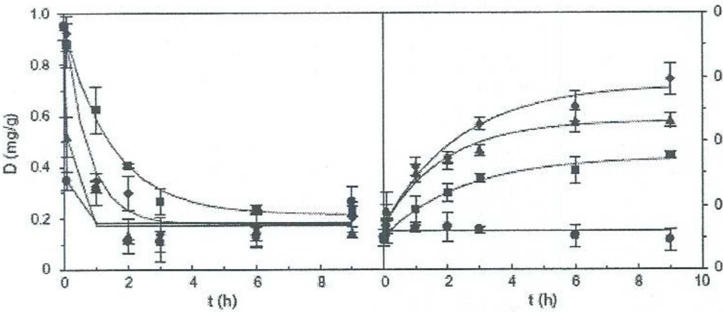
มีรายงานถึงปัจจัยด้านการแช่น้ำต่อสัดส่วนของไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง (Chiou RY and Cheng SL, 2001) โดยพบว่าสัดส่วนปริมาณของ เดดซีน เจนิสติน เดดเซอีน และเจนิสเตอีน จะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อถั่วเหลืองผ่านการแช่น้ำเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยปริมาณของเดดเซอีนจะเพิ่มจาก 0.059 ไปเป็น 0.118 มิลลิกรัมต่อกรัม และปริมาณของเจนิสเตอีนเพิ่มจาก 0.143 ไปเป็น 0.246 มิลลิกรัมต่อกรัม ในขณะที่ปริมาณสัดส่วนของของเดดซีนและเจนิสตินลดลง พบว่าภาวะการแช่น้ำจะมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ß-glucosidase ที่เปลือกของเมล็ดถั่วเหลือง ทำให้เอนไซม์สามารถไปทำลายพันธะกลัยโคไซด์ที่เชื่อมต่อโมเลกุลน้ำตาล ส่งผลให้สารประกอบกลัยโคไซด์ถูกแปรสภาพไปเป็นอะกลัยโคน ซึ่งสามารถยืนยันสมมติฐานนี้ได้จากการนำเมล็ดถั่วเหลืองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อทำลายเอนไซม์ดังกล่าว จากนั้นเมื่อนำเมล็ดถั่วเหลืองไปแช่น้ำเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนไอโซฟลาโวน ซึ่งสมมติฐานดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Matsuura และ Obata (1993) พบว่าเอนไซม์ ß-glucosidase ที่สกัดแยกจากเปลือกชั้นในของถั่วเหลืองจะเกิดการสลายตัว เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะความร้อน 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที Dyah Hesti Wardhari และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาอัตราการสลายของกลัยโคไซด์ไปเป็นอะกลัยโคนในถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 50, 60, และ 85 องศาเซลเซียส พบว่ากลัยโคไซด์ทั้งเจนิสตินและเดดซินจะมีปริมาณที่ลดลงตามระยะเวลาการแช่น้ำจนปริมาณคงที่ ขณะที่ปริมาณของอะกลัยโคนทั้งเจนิสเตอีนและเดดเซอีนจะเพิ่มขึ้นตามระยะการแช่น้ำจนปริมาณเกือบคงที่ (รูปที่ 11, 12) โดยพบว่าอุณหภูมิมีผลในการเร่งการลดลงของปริมาณสารประกอลกลัยโคไซด์ โดยที่อุณหภูมิ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่ทำให้การลดลงของสารดังกล่าวเกิดได้สูงสุด สำหรับการเพิ่มขึ้นของปริมาณอะกลัยโคนพบว่าเกิดได้สูงสุดที่การแช่น้ำที่ 50 องศาเซลเซียสเมื่อแช่น้ำเป็นเวลา 8 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในช่วง 3 ชั่วโมงแรกจะเร่งให้ปริมาณเจนิสเตอีนเพิ่มขึ้นได้สูงกว่า ทั้งนี้ปริมาณการเพิ่มขึ้นและลดลงของสารประกอบกลัยโคไซด์และอะกลัยโคนจะไม่สมดุลกัน เนื่องจากสารประกอบเหล่านี้สามารถเสื่อมสลาย (degradation) ไปเป็นสารอื่นๆ (unknown products) ในระหว่างขั้นตอนการแช่น้ำและขั้นตอนการสกัด ดังแสดงในสมการในรูปที่ 13 (Wardhani DH et al., 2008)

เมื่อผู้วิจัยกลุ่มดังกล่าวทำการศึกษาผลของอุณหภูมิในการแช่น้ำต่อการทำงานของเอนไซม์ ß-glucosidase ที่เปลือกถั่วเหลือง พบว่าเอนไซม์จะถูกกระตุ้นให้มีอัตราการทำงานได้สูงสุดเมื่อถั่วเหลืองผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 50 หรือ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง โดยต้องแช่ถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมงเพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ จากรายงานการวิจัยของ Matsuura และคณะในปี 1989 และ 1993 พบว่าที่ 45 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยพบว่าที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (Matsuura, 1989; Matsuura et al., 1993) อย่างไรก็ตามการทำงานที่ลดลงของเอนไซม์ที่อุณหภูมิดังกล่าวอาจเกิดจากการสูญเสียเอนไซม์ไปบางส่วนในระหว่างขั้นตอนการ

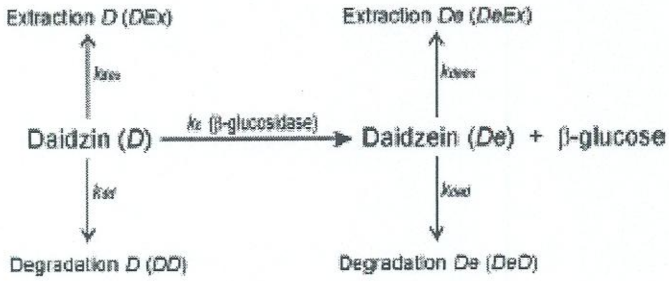
แช่น้ำ (Wardhani DH et al., 2008) Toda และคณะ (2000) รายงานถึงความสัมพันธ์ของการแช่น้ำกับปริมาณของสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองเช่นกัน โดยทำการแช่ถั่วเหลืองเป็นเวลา 15 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 20°C พบว่าปริมาณของอนุพันธ์กลัยโคไซด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และปริมาณของอะกลัยโคนเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ผู้วิจัยทำการยืนยันว่าการเพิ่มขึ้นของอะกลัยโคนเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ ß-glucosidase ในถั่วเหลืองโดยทำการทดลองเปรียบเทียบปริมาณอะกลัยโคนระหว่างถั่วเหลืองที่แช่น้ำโดยมีและไม่มีสาร gluconolactone ซึ่งเป็น enzyme inhibitor พบว่าปริมาณอะกลัยโคนในถั่วเหลืองจะไม่เพิ่มขึ้นหากแช่น้ำร่วมกับสาร gluconolactone (Toda et al., 2000)



รูปที่ 11 แสดงการลดลงของปริมาณเจนิสติน (G) และการเพิ่มขึ้นของเจนิสเตอีน (Ge) ในถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิต่างๆกัน (■ : 30°C; ♦ : 50°C; ▲ : 60°C; ●: 85°C) (รูปจาก Wardhani DH et al., 2008)



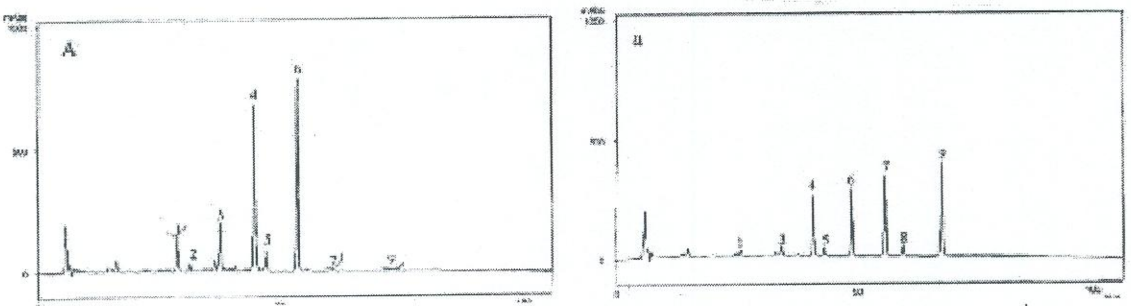
รูปที่ 12 แสดงการลดลงของปริมาณเดดซิน (D) และการเพิ่มขึ้นของเดดเซอีน (De) ในถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิต่างๆกัน (■ : 30°C; ♦ : 50°C; ▲ : 60°C; ●: 85°C) (รูปจาก Wardhani DH et al., 2008)



รูปที่ 13 แสดงกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากเดดซินเป็นเดดเซอีนในถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนจากการแช่น้ำ (รูปจาก Wardhani DH et al., 2008)

3. **ปัจจัยด้านการหมัก**

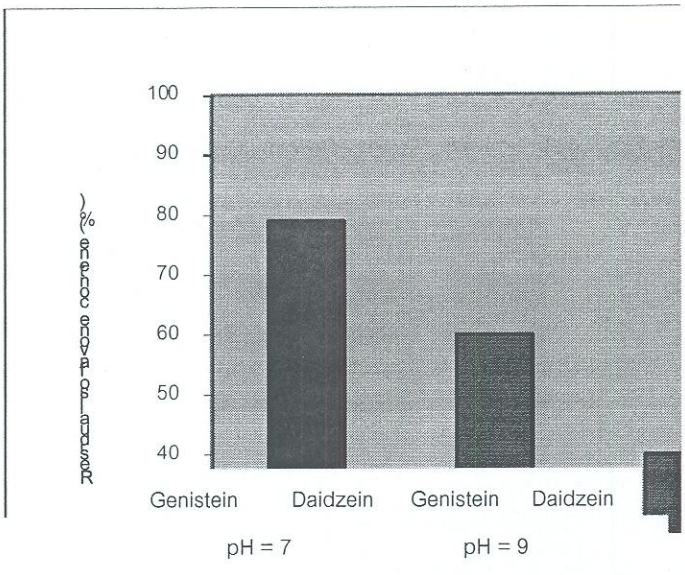
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่ผ่านขั้นตอนการหมัก ได้แก่ มิโซ เทมเป้ และนัตโต จะมีปริมาณอะกลัยโคนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Coward L et al., 1993; Fukutake M et al., 1996; Wang and Murphy, 1996) มีรายงานถึงสัดส่วนของเจนิสเตอีนที่เพิ่มขึ้นหลังจากกระบวนการหมัก (Barnes S et al., 1998; Nguyenle T et al., 1995; Chiou RY and Cheng SL, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Coward (Coward L et al., 1993) และ Wang (Wang HJ and Murphy PA, 1994) ซึ่งพบว่าเกิดจากเอนไซม์ในจุลชีพทำการไฮโดรไลซ์เจนิสตินให้เปลี่ยนเป็นเจนิสเตอีนในระหว่างการหมัก นอกจากเอนไซม์จากจุลชีพแล้ว การเติมเอนไซม์ ß-glucosidase ลงไปในระหว่างขั้นตอนการสกัด พบว่าปริมาณสัดส่วนของเจนิสเตอีนจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Pandjaitan N et al., 2000; Riou C et al., 1998; Taylor JI et al., 2005) เช่นกัน Park และคณะ (2001) รายงานว่าเอนไซม์ ß-glucosidase สามารถย่อยสลายอนุพันธ์กลูโคไซด์และอนุพันธ์มาโลนิลไปเป็นอะกลัยโคน โดยอัตราการย่อยสลายอนุพันธ์กลูโคไซด์จะเกิดได้เร็วกว่าการย่อยสลายอนุพันธ์มาโลนิล พบว่าภายในเวลา 30 นาที จะเกิดการย่อยสลาย 79% ของอนุพันธ์กลูโคไซด์ และย่อยสลาย 65% ของอนุพันธ์มาโลนิลไป ได้ปริมาณอะกลัยโคนรวม 871 ไมโครกรัมต่อกรัม (รูปที่ 14) (Park YK et al., 2001) จากคุณสมบัติของเอนไซม์ ß-glucosidase ในการย่อยสลายอนุพันธ์ต่างๆของไอโซฟลาโวนเป็นอะกลัยโคน จึงนำมาใช้ร่วมกับการวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนทั้งหมดในสารสกัดจากถั่วเหลือง โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองทั้งสิ้น 12 ชนิด ซึ่งมีความหลากหลายทางโครงสร้างเคมีและก่อให้เกิดความซับซ้อนและยุ่งยากในการวิเคราะห์หาปริมาณเพื่อให้ไอโซฟลาโวนอยู่ในรูปแบบอะกลัยโคนในระหว่างการสกัดให้มากที่สุด เพื่อความสะดวกและลดความซับซ้อนในการวิเคราะห์ (Liggins et al., 1998) รวมทั้งมีการแนะนำให้ใช้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ร่วมกับการย่อยสลายด้วยกรดในขั้นตอนการสกัด เพื่อความรวดเร็วในการย่อยสลายและปรับสัดส่วนไอโซฟลาโวนให้อยู่ในรูปอะกลัยโคนเพื่อการวิเคราะห์ (Mazur et al., 1996)



รูปที่ 14 แสดงปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสภาวะที่มีเอนไซม์ β-glucosidase (a) และในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ β -glycosidase (A) (1 = daiazin; 2 = glycitin; 3 = genistin ; 4 =malonyl daiazin; 5 = malonyl glycitin; 6 = malonyl genistin;7 = daidzein; 8 = glycitein; 9 = genistein;10 = acetyl genistin) (รูปจาก Park KY et al., 2001)

4. ปัจจัยด้านความเป็นกรด-ด่าง

จากการศึกษาพบว่าสภาวะความเป็นกรดด่างมีผลต่อปริมาณสารไอโซฟลาโวนและส่งผลไปยังฤทธิ์ทางชีวภาพ โดย Ungar และคณะ (2003) ทำการศึกษาผลของความร้อนร่วมกับสภาวะความเป็นด่างต่อความคงตัวของเจนิสเตอีนและเดดเซอีน พบว่า เมื่อ incubate สารไอโซฟลาโวนที่สภาวะด่าง (pH 9) ปริมาณของเจนิสเตอีนจะลดลง คิดเป็น 60% ในขณะที่เดดเซอีนจะมีผลกระทบน้อยกว่า โดยปริมาณจะลดลงเพียง 15% และเมื่อทำการ incubate สารไอโซฟลาโวนที่ pH 7 พบว่าเดดเซอีนจะมีความคงตัวน้อยกว่าเจนิสเตอีน โดยปริมาณเดดเซอีนจะลดลงคิดเป็น 40% ในขณะที่ปริมาณเจนสเตอีนจะลดลงเพียง 22% (รูปที่ 15) (Ungar, Y. *et al*, 2003)

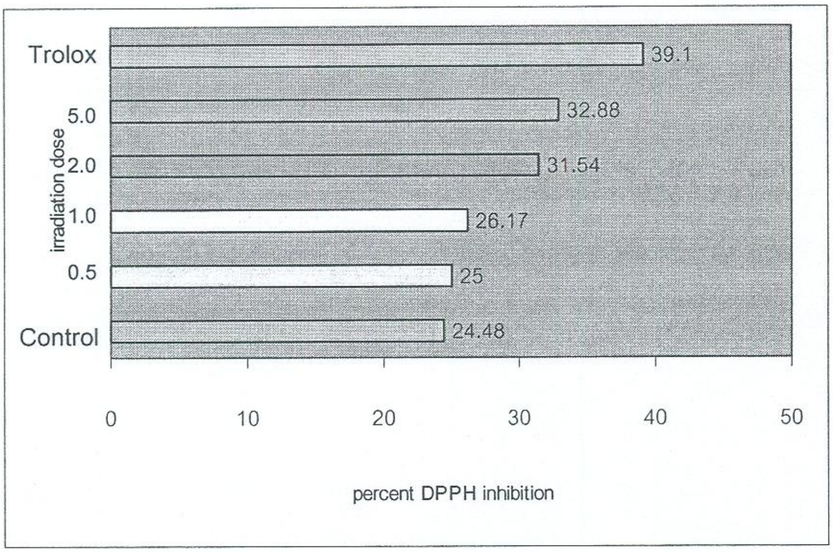


รูปที่ 15 แสดงปริมาณสารไอโซฟลาโวนที่ผ่านการ incubate 120 องศาเซลเซียสในสภาวะความด่างและกลางเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Ungar, Y. *et al*, 2003)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงการใช้ความร้อนภายใต้สภาวะความเป็นกรด เพื่อทำให้อนุพันธ์กลัยโคไซด์ของไอโซฟลาโวนสลายตัวเป็นอะกลัยโคน ได้แก่ เจนิสเตอีน และเดดเซอีน และมีรายงานถึงความไม่คงตัวของอะกลัยโคนภายใต้สภาวะความร้อนและสารละลายกรดด้วย โดยพบว่าเจนิสเตอีนมีความคงตัวต่ำกว่าเดดเซอีนภายใต้สภาวะดังกล่าว (Wang *et al*., 1990)

5. **ปัจจัยด้านรังสี**

การใช้รังสีพลังงานสูง เช่น รังสีแกมมาและรังสีเอ็กซเรย์ ในระหว่างการสกัดสารไอโซฟลาโวนหรือการใช้ลำแสงพลังงานสูงของอิเล็กตรอน สามารถเพิ่มสัดส่วนของอะกลัยโคนในสารสกัดได้ เนื่องจากรังสีพลังงานสูงสามารถทำลายพันธะกลัยโคไซด์ และสามารถฆ่าเชื้อที่ปนมากับถั่วเหลืองได้อีกด้วยและจากการศึกษาปัจจัยของรังสีที่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของสารเจนิสเตอีน พบว่าถั่วเหลืองที่ผ่านการฉายรังสีพลังงานสูงจะมีปริมาณเจนิสเตอีนเพิ่มขึ้น ซึ่งสัดส่วนการเพิ่มขึ้นของเจนิสเตอีนนั้นแปรผันตรงกับความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ดังรูปที่ 16 (Prasad *et al*, 2004)



รูปที่ 16 แสดงความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของรังสีให้กับถั่วเหลือง (รูปจาก Prasad *et al*, 2004)

การศึกษาความเป็นพิษของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง

ไอโซฟลาโวนมีคุณสมบัติเป็นไฟโตเอสโตรเจน กำลังเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางในการนำมาใช้ประโยชน์เป็นฮอร์โมนทดแทนสำหรับหญิงวัยหมดประจำเดือนเพื่อป้องกันโรคกระดูกพรุน โรคหัวใจ ลด

ระดับไขมันในเลือด และป้องกันโรคเรื้อรังทั้งหลายรวมทั้งโรคมะเร็ง โดยเฉพาะสารเจนิสเตอีน ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนชนิดอะกลัยโคนที่มีมากที่สุดในสารสกัดถั่วเหลือง ถึงแม้ว่าจะมีการบริโภคถั่วเหลืองกันอย่างมากในคนแถบเอเชียโดยไม่มีรายงานถึงอาการข้างเคียงที่เกิดขึ้น การได้รับสารเจนิสเตอีนในปริมาณที่มากเกินไปอาจนำมาซึ่งการเกิด potential adverse effect อื่นๆได้ เนื่องจากคุณสมบัติการเป็น estrogenic agent ของมัน

Mcclain และคณะทำการศึกษาความเป็นพิษของสารเจนิสเตอีนในหนู Wistar โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ลักษณะคือ ความเป็นพิษเฉียบพลัน (ทำการศึกษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์), ความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง (ทำการศึกษาเป็นเวลา 13 สัปดาห์), และความเป็นพิษเรื้อรัง (ทำการศึกษาเป็นเวลา 52 สัปดาห์) พบว่า เจนิสเตอีนมีความเป็นพิษในระดับที่ต่ำสำหรับความเป็นพิษเฉียบพลัน โดยในการให้ยาซ้ำ 3 ครั้ง ขนาดที่ปลอดภัยอยู่ที่ระดับ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ที่ระดับดังกล่าว จะพบการลดลงของการบริโภคอาหารและการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง จากการตรวจเลือดพบว่ามีระดับของเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลงและ reticulocytes เพิ่มขึ้น นอกจากนี้จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ จากผลทางการตรวจทางเคมีคลินิกที่แสดงถึงความเป็นพิษ อย่างไรก็ตาม ผลจากการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังเมื่อให้เจนิสเตอีนในปริมาณมากถึง 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลาติดต่อกัน 52 สัปดาห์ พบว่าเกิดการคั่งของน้ำในมดลูกและพบเนื้องอกในรังไข่ ในหนูเพศผู้ (male rats) พบว่าตับ ม้าม และถุงอัณฑะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น สำหรับในหนูเพศเมีย (female rats) พบว่าตับ ไต ม้าม มดลูก และรังไข่ มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น การให้เจนิสเตอีนในปริมาณสูงมากกว่า 52 สัปดาห์ติดต่อกัน พบว่าหนูเพศผู้มี vacuolation ของ epididymal epithelium และพบการอักเสบของต่อมลูกหมากในความถี่ที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับการให้เจนิสเตอีนในขนาดเพียง 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ในหนูเพศเมียจะพบการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ของมดลูก ตรวจพบ squamous metaplasia จากการให้เจนิสเตอีนทั้งในขนาด 50 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน และตรวจพบ hyperplasia จากการให้เจนิสเตอีนในขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบภาวะ osteopetrosis (hyerostosis) ในหนูทั้งเพศผู้และเพศเมียในขนาดเจนิสเตอีน 50 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน พร้อมกับการเพิ่มขึ้นของ hemopoiesis ที่ม้าม ซึ่งพบว่าในเพศเมียมากกว่าเพศผู้ นอกจากนี้ยังพบภาวะ hepatocellular hypertrophy และ minimal bile duct proliferation ซึ่งแสดงถึงภาวะการเสื่อมของตับเมื่อให้เจนิสเตอีนขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน

จากที่กล่าวมา อาการที่ทำการศึกษาเป็นอาการที่สัมพันธ์กับการมีฤทธิ์เป็น estrogenic agent ของสารเจนิสเตอีน ดังนั้นอาการที่แสดงออกจึงเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนในร่างกายสัตว์ทดลอง ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอาการต่างๆจะเกิดขึ้นเมื่อให้เจนิสเตอีนในปริมาณสูงมากถึง 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน และพบว่าอาการต่างๆสามารถผันกลับได้ แต่ไม่พบความเป็นพิษหรืออาการข้างเคียงใดๆ จากฤทธิ์การเป็น estrogenic agent ของสารเจนิสเตอีน เมื่อให้เจนิสเตอีนในปริมาณที่น้อยลง คือ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน (Mcclain et al., 2006)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังและพิษเรื้อรังของสารเจนิสเตอีนในสุนัข (beagle dogs) โดยทำการศึกษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์และ 52 สัปดาห์ มีการให้เจนิสเตอีนในขนาด 50, 150 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่าในเวลา 4 สัปดาห์ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆที่สัมพันธ์กับการให้สารเจนิสเตอีนเมื่อให้เจนิสเตอีนในขนาดต่ำและขนาดปานกลาง แต่เมื่อให้เจนิสเตอีนขนาดสูงถึง 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน จะพบการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมดลูกในสุนัขเพศเมีย และพบว่าหลังการให้สารเจนิสเตอีนขนาดสูงเป็นเวลา 13 สัปดาห์ติดต่อกัน จะมีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของสุนัขทั้งในเพศผู้และเพศเมีย โดยพบว่าอัณฑะ epididymus และต่อมลูกหมากในเพศผู้ จะมีขนาดและน้ำหนักลดลง บ่งชี้ให้เห็นถึงการเกิด atrophy ของอัณฑะและต่อมลูกหมาก และไม่พบ spermatozoa ใน epididymus ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงนี้น้อยมากจากการให้เจนิสเตอีนในขนาด 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ส่วนในสุนัขเพศเมีย พบว่าการให้เจนิสเตอีนในขนาดสูง น้ำหนักของมดลูกจะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้น้ำหนักของรังไข่จะลดลงเล็กน้อย โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงในด้าน histopathology โดยสรุป จากการศึกษานี้การให้เจนิสเตอีนแก่สุนัขในระยะเวลา 4 ถึง 52 สัปดาห์ พบว่าไม่มีผลทางด้าน systemic toxicity โดยเจนิสเตอีนจะมีผลต่อระบบสืบพันธุ์เมื่อให้ในขนาดที่สูงมากเป็นระยะเวลาติดต่อกันเท่านั้น (Mcclain et al., 2005)

จากการทบทวนวรรณกรรมถึงประโยชน์ของถั่วเหลืองต่อสุขภาพนั้น พบว่ามีสารมากมายหลายชนิดในถั่วเหลืองที่ให้ประโยชน์ต่อสุขภาพทั้งในด้านการป้องกันหรือรักษาโรค สารไอโซฟลาโวนเป็นสารที่ได้รับความสนใจและพัฒนา โดยพบว่าไอโซฟลาโวนในรูปแบบอะกลัยโคนจะมีความพร้อมในการถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและออกฤทธิ์ทางชีววิทยา หากแต่ไอโซฟลาโวนในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของกลัยโคไซด์เป็นส่วนใหญ่ (>80% ของไอโซฟลาโวนทั้งหมด) และพบว่าสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองที่มีจำหน่ายในรูปอาหารเสริมสุขภาพนั้นจะเป็นไอโซฟลาโวนในรูปแบบผสมของกลัยโคไซด์และอะกลัยโคนตามธรรมชาติ แม้ไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองจะได้รับความสนใจและถูกศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างละเอียด หากมีข้อจำกัดที่ทำให้ไม่สามารถพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนหรือยารักษาโรคอื่นๆตามฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ข้อจำกัดที่สำคัญคือความแปรปรวนไม่แน่นอนของสัดส่วนและปริมาณไอโซฟลาโวนรวมในถั่วเหลือง ตลอดจนความหลากหลายของอนุพันธ์ไอโซฟลาโวนในสารสกัด ซึ่งเกิดขึ้นจากปัจจัยต่างๆมากมาย ทั้งปัจจัยทางการเพาะปลูก การเก็บรักษา ชนิดของสายพันธุ์ รวมไปถึงขั้นตอนการสกัด พบว่าหากสารประกอบไอโซฟลาโวนสามารถถูกปรับสภาพในอยู่ในรูปโครงสร้างทางเคมีที่เจาะจง ลดความหลากหลายของอนุพันธ์ จะทำให้การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนทำได้อย่างถูกต้องรวดเร็วและไม่ซับซ้อน ซึ่งจะนำไปสู่การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ที่ถูกต้องแม่นยำ ทำให้สามารถกำหนดขนาดการรับประทานเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคได้อย่างถูกต้องต่อไป

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาหาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อปริมาณสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง โดยได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญอะกลัยโคนในถั่วเหลืองทั้งก่อนการ

บดและหลังการบดถั่วเหลือง และทำการตรวจหาปริมาณอะกลัยโคนและอนุพันธ์กลัยโคไซด์ในถั่วเหลือง เมื่อผ่านกระบวนการต่างๆทางกายภาพและทางเคมี โดยมุ่งเน้นถึงการประยุกต์และปรับใช้ปัจจัยดังกล่าวในระหว่างขั้นตอนการสกัดเพื่อปรับเปลี่ยนสารประกอบกลัยโคไซด์และอนุพันธ์ให้เป็นอยู่ในรูปอนุพันธ์อะกลัยโคนในปริมาณสูง ทั้งนี้เพื่อลดความหลากหลายของอนุพันธ์ไอโซฟลาโวน และทำให้สารสำคัญไอโซฟลาโวนอยู่ในรูปที่พร้อมดูดซึมและออกฤทธิ์ ตลอดจนง่ายต่อการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ การศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ โดยมุ่งเน้นถึงปัจจัยที่มีความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ต่อไปในระดับอุตสาหกรรม ข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะถูกถ่ายทอดพร้อมข้อเสนอแนะไปยังโครงการวิจัยต่อเนื่อง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำข้อมูลไปปรับใช้ในการสกัดถั่วเหลืองในระดับการผลิตอะกลัยโคนเชิงอุตสาหกรรม เพื่อให้ได้สารพร้อมออกฤทธิ์ในปริมาณสูง เภสัชกรสามารถกำหนดปริมาณการใช้สารสำคัญได้อย่างเหมาะสม สามารถคำนวณเภสัชจลนศาสตร์ของสารสำคัญอะกลัยโคนในร่างกายมนุษย์ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการติดตามการใช้ยา นำไปสู่ความปลอดภัยในการนำสารอะกลัยโคนไปใช้เป็นฮอร์โมนทดแทน นอกจากความปลอดภัยต่อผู้บริโภคในการใช้ยาแล้ว การที่ขั้นตอนการผลิตนำไปสู่การได้มาของสารสำคัญอะกลัยโคนในปริมาณสูง จะยังช่วยลดต้นทุนของการผลิต ซึ่งนำไปสู่ราคาและค่าใช้จ่ายที่ลดลงสำหรับผู้บริโภค

จากการทบทวนวรรณกรรมถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง งานวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ตอนหลัก คือ ตอนที่ 1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography และทำการตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ตอนที่ 2 การทดสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญก่อนการบดถั่วเหลือง และ ตอนที่ 3 การทดสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญหลังการบดถั่วเหลือง

ในการทดสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญก่อนการบดถั่วเหลือง มีการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาผลของการแช่น้ำต่อปริมาณสารสำคัญ โดยทำการแช่น้ำทั้งที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิที่สูงขึ้น สำหรับการทดสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญหลังการบดถั่วเหลือง มีการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดในระดับต่างๆ โดยศึกษาดูปัจจัยดังกล่าวทั้งที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิต่างๆ เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาขั้นตอนการสกัดสารสำคัญในถั่วเหลืองให้อยู่ในรูปอะกลัยโคนให้มากที่สุด โดยปัจจัยต่างๆที่เลือกทำการศึกษา ผู้วิจัยมุ่งเน้นถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในการผลิตสารสกัดอะกลัยโคนในระดับอุตสาหกรรมหรือกึ่งอุตสาหกรรมเป็นหลัก

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

(Methodology)

1. วัตถุดิบและสารเคมี

1.1 ถั่วเหลืองสายพันธุ์ สจ. 2

1.2 สารมาตรฐาน

เจนิสติน (Genistin), เจนิสเตอีน (Genistein), เดดซิน (Daidzin), เดดเซอีน (Daidzein), และฟลูออเรสซีน (Fluorescein) จาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)

1.3 Methanol, HPLC grade จาก Fisher scientific Co.

1.4 Acetonitrile, HPLC grade จาก Fisher scientific Co.

1.5 Concentrated hydrochloric acid, reagent grade จาก Fisher scientific Co.

1.6 Hexane, reagent grade จาก Fisher scientific Co.

1.7 Phosphoric acid, HPLC grade จาก Fisher scientific Co.

1.8 Deionized water

2. อุปกรณ์

2.1 High performance liquid chromatography system :

- Shimadzu LC-10 Series ควบคุมด้วย binary gradient pump LC-10AD
- 100 μl injection loop, autosampler SIL-10A
- Degasser DGU-14A
- Autoinjector SIL-10AD
- UV-Vis spectrometric detector SPD-10A
- System controller SCL-10A
- HPLC column: Reversed phase C18; Water Symmetry®: 5μm, ขนาด 3.9 x 150 mm I.D.

2.2 Sonicator : Branson 5210, Branson ultrasonics corporation

2.3 pH meter

2.4 Pipette

- Micropipette ขนาด 10, 100 และ 1000 μl
- Measuring pipette ขนาด 1, 2, 5, 10 ml

- Transfering pipette ขนาด 1, 2, 5, 10, 25 ml

2.5 Nylon membrane filter 0.45µm, 47mm diameter

2.6 Volumetric flask ขนาด 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 ml

2.7 Beaker ขนาด 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ml

2.8 Cylinder ขนาด 10, 100, 250, 500 ml

2.9 Electrical analytical balance

2.10 Aluminum foil

2.11 Parafilm

2.12 Test tube

2.13 Polypropylene microtube ขนาด 1.5 ml

2.14 Water bath

3. ขั้นตอนการวิจัย

3.1 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

A. สารละลายมาตรฐานเจนิสเตอีน (Preparation of genistein standard solution)

1. เตรียม Stock solution ของสารมาตรฐานเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 320 µg/ml
2. นำ stock solution มาเตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น ในช่วงความเข้มข้น 0.8 µg/ml ถึง 20 µg/ml

B. สารละลายมาตรฐานเจนิสติน (Preparation of genistin standard solution)

1. เตรียม Stock solution ของสามาตรฐานเจนิสตินที่ความเข้มข้น 320 µg/ml
2. นำ stock solution มาเตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น ในช่วงความเข้มข้น 0.8 µg/ml ถึง 20 µg/ml

C. สารละลายมาตรฐานเดดเซอีน (Preparation of daidzein standard solution)

1. เตรียม Stock solution ของสารมาตรฐานเดดเซอีนที่ความเข้มข้น 320 µg/m

D. สารละลายมาตรฐานเดดซิน (Preparation of daidzin standard solution)

1. เตรียม Stock solution ของสารมาตรฐานเดดซินที่ความเข้มข้น 320 µg/ml

E. สารละลายมาตรฐานฟลูออเรสซีน (Preparation of fluorescein standard solution, internal standard)

1. เตรียม Stock solution ของสารมาตรฐานฟลูออเรสซีนที่ความเข้มข้น 320 µg/ml

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานต่าง ๆ

จากการทดลอง มีการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับสารมาตรฐาน 2 ชนิด คือ เจนิสเตอีนและเจนิสติน ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้

1. วัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ 6 ระดับความเข้มข้น และทำการทดลองซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง
2. นำพื้นที่ใต้พีกของแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำค่าที่ได้มาพล็อตกราฟ โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้น และแกน Y เป็นพื้นที่ใต้พีก
3. หาสมการความสัมพันธ์ของค่า X และ Y

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อการหาปริมาณเจนิสเตอีนและเจนิสติน

A. ความเฉพาะเจาะจง (Specificity)

ความเฉพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์คือความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์สารเจนิสเตอีนได้โดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง การทดลองนี้ทำโดยเปรียบเทียบ retention time ของสารเจนิสเตอีนกับสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนชนิดอื่นๆที่พบในสารสกัดถั่วเหลือง โดยการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนชนิดต่างๆ
รวมทั้งมีการฉีดสารมาตรฐานเจนิสเตอีนร่วมกับฟลูออเรสซีน (internal standard) แล้วเปรียบเทียบ retention time ที่ได้ เพื่อตรวจสอบว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้สามารถแยกสารที่เราต้องการวิเคราะห์ออกจากสารปนเปื้อนอื่นๆได้

B. ขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

เป็นค่าที่ใช้บอกความสามารถของเครื่องมือและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ว่าสามารถตรวจพบสารตัวอย่างได้ในความเข้มข้นต่ำสุดเท่าไร

ในการทดสอบจะทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเจนิสเตอีนที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน โดยฉีดสารละลายมาตรฐานเจนิสเตอีนที่ระดับความเข้มข้นต่ำเข้าเครื่อง HPLC แล้วทำการลดความเข้มข้นของสารละลายลงไปเรื่อยๆจนได้ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่วิธีการวิเคราะห์ยังสามารถตรวจพบได้ จากนั้นนำความเข้มข้นสุดท้ายที่วัดได้ (ปรากฏพีกบนโครมาโตแกรม) มาฉีดซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง เพื่อดูว่าวิธีวิเคราะห์และเครื่องตรวจวัดที่ใช้ยังสามารถพบพีกอยู่หรือไม่ ความเข้มข้นสุดท้ายที่วัดได้คือขีดจำกัดในการตรวจวัด

C. ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantification, LOQ)

เป็นการทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายมาตรฐานเจนิสเตอีนที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างแม่นและเที่ยง โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าวต้องมีการคำนวณหาความแม่น (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้หรือไม่

ทดสอบสารที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานเจนิสเตอีนที่ระดับความเข้มข้นต่ำเข้าเครื่อง HPLC แล้วทำการลดความเข้มข้นของสารละลายลงไปเรื่อยๆจนได้ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่วิธีการวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างถูกต้อง ทำการฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ที่ความเข้มข้นดังกล่าวซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าความแม่น (accuracy) โดยรายงานผลเป็นค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) และคำนวณหาค่าความเที่ยง (precision) โดยรายงานผลเป็นค่า % relative standard deviation (%RSD) ดังนี้

ค่าความแม่น (Accuracy) คำนวณได้จากสมการ

$$\%Recovery = \frac{\text{Measured conc.} \times 100}{\text{Standard conc.}} \qquad \text{สมการที่ 1}$$

ช่วงที่ยอมรับได้คือ $\%Recovery = 100 \pm 20$

ค่าความเที่ยง (Precision) คำนวณได้จากสมการ

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{Mean} \qquad \text{สมการที่ 2}$$

ช่วงที่ยอมรับได้คือ $\%RSD \leq 20\%$

D. ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีก (peak area) กับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ โดยควรจะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อจะได้ใช้เปรียบเทียบในการวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง

ในการทดลองนี้ ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐานเจนิสตินและเจนิสเตอีน โดยทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีก (peak area) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเจนิสเตอีนและเจนิสติน ในช่วงระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ระดับความเข้มข้นสูง กลางและต่ำ โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

สารมาตรฐานเจนิสเตอีนจะทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 8 μg/ml ถึง 240 μg/ml

สารมาตรฐานเจนิสตินจะทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 8 μg/ml ถึง 320 μg/ml

โดยนำค่าพื้นที่ใต้พีกมาพล็อตกับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แล้วหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear equation) และหาค่า correlation coefficient (R^2)

E. ความแม่น (Accuracy)

เป็นการตรวจสอบความแม่นของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งบอกถึงว่าปริมาณของสารสำคัญที่วิเคราะห์ได้ห่างจากค่าที่เป็นจริงเท่าใด จะแสดงผลเป็นค่าร้อยละการคืนกลับ

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

1. ความแม่นภายในวันเดียว (Intra-day accuracy)
2. ความแม่นระหว่างวัน (Inter-day accuracy)

ขั้นตอนการทำดังนี้

สำหรับสารมาตรฐานเจนิสเตอีน

วัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเจนิสเตอีนที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 8, 32, 130 และ 240 μg/mL ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง และทำวิธีเดียวกันซ้ำ 3 วันติดต่อกัน จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าความแม่นภายในวันเดียวและค่าความแม่นระหว่างวัน โดยจะรายงานในรูปร้อยละการคืนกลับ ตามสมการที่ 1

สำหรับสารมาตรฐานเจนิสติน

วัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเจนิสตินที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 16, 128, 160 และ 256 μg/mL ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง และทำวิธีเดียวกันซ้ำ 3 วันติดต่อกัน จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าความแม่นภายในวันเดียวและค่าความแม่นระหว่างวัน โดยจะรายงานในรูปร้อยละการคืนกลับ ตามสมการที่ 1

F. ความเที่ยง (Precision)

เป็นการตรวจสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งจะต้องให้ผลการวิเคราะห์ออกมาเหมือนเดิมกรณีที่มีการทำซ้ำตามกระบวนการเดิม

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

1. ความเที่ยงภายในวันเดียว (Intra-day precision หรือ repeatability)
2. ความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day precision หรือ reproducibility)

ขั้นตอนการทำดังนี้

สำหรับสารมาตรฐานเจนิสเตอีน

วัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเจนิสเตอีนที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 8, 32, 130 และ 240 μg/mL ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง และทำวิธีเดียวกันซ้ำ 3 วัน นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าความเที่ยงภายในวันเดียวและค่าความเที่ยงระหว่างวัน โดยจะรายงานในรูปของ %Relative Standard Deviation (%RSD)

สำหรับสารมาตรฐานเจนิสติน

วัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเจนิสตินที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 16, 128, 160 และ 256 µg/mL ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง และทำวิธีเดียวกันซ้ำ 3 วันติดต่อกัน จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าความเที่ยงภายในวันเดียวและค่าความเที่ยงระหว่างวัน โดยจะรายงานในรูปของ %Relative Standard Deviation (%RSD)

3.2 การศึกษาปัจจัยต่าง ๆที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง จะเน้นสารสำคัญ 2 ชนิด คือ สารเจนิสติน และสารเจนิสเตอีน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน คือ

ตอนที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญไอโซฟลาโวนก่อนการบดถั่วเหลือง เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการแช่น้ำกับปริมาณสารสำคัญ และความสัมพันธ์ของอุณหภูมิในการแช่น้ำและระยะเวลาของการแช่กับปริมาณสารสำคัญ

ตอนที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญไอโซฟลาโวนหลังการบดถั่วเหลือง เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการแช่ถั่วเหลืองในสารละลายกรดกับปริมาณสารสำคัญ ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดกับปริมาณสารสำคัญ และ ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในสภาวะกรดกับปริมาณสารสำคัญ

ตอนที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญไอโซฟลาโวนก่อนการบดถั่วเหลือง

1. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการแช่น้ำกับปริมาณสารสำคัญ

ชั่งถั่วเหลืองแห้งมาตัวอย่างละ 1 กรัม จำนวน 6 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างจะถูกแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง (25° C) ด้วยระยะเวลาแตกต่างกัน ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างขจัดสิ่งสกปรกออกแต่ไม่ได้แช่น้ำ
ตัวอย่างที่ 2 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างให้สะอาด แล้วแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 3 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างให้สะอาด แล้วแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 4 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างให้สะอาด แล้วแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 5 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างให้สะอาด แล้วแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 6 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างสะอาด แล้วแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาที่กำหนด รินน้ำออกให้หมด นำมาผึ่งบนถาดสะอาด วางในตู้ดูดอากาศจนถั่วเหลืองแห้งสนิท บดถั่วเหลืองที่แห้งแล้วให้ละเอียด สกัดด้วยเฮกเซน 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เทเฮกเซนทิ้ง แล้วผึ่งตัวอย่างให้แห้งในตู้ดูดอากาศ (ได้ defatted soybean) นำแต่ละตัวอย่างที่ได้มาสกัดด้วย 5 มิลลิลิตร ของ 80% เมทานอล เป็นเวลา 5 ชั่วโมง กรองเอาส่วนใส สกัดกากที่ได้ซ้ำด้วย 80% เมทานอล อีก 2 ครั้ง แล้วรวมสารละลายใสที่ผ่านการกรองแล้วเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตร

สุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร โดยการระเหยตัวทำละลายออกจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาส่วนประกอบของไอโซฟลาโวนในสารสกัด โดยวิธี HPLC โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาปริมาณไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองแต่ละตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไอโซฟลาโวนแต่ละชนิด แล้วคำนวณหาปริมาณไอโซฟลาโวนจากน้ำหนักถั่วเหลืองแห้งก่อนการสกัด ทำการทดลองข้างต้นทั้งหมดซ้ำ อย่างน้อย 3 ครั้ง

2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการแช่น้ำกับปริมาณสารสำคัญ

ชั่งถั่วเหลืองแห้งมาตัวอย่างละ 1 กรัม จำนวน 6 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างจะถูกแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C ด้วยระยะเวลาแตกต่างกัน ดังนี้

ตัวอย่างที่ 7 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างขจัดสิ่งสกปรกออกด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิ 60°C แต่ไม่ได้แช่น้ำ
ตัวอย่างที่ 8 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างให้สะอาด แล้วแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 9 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างให้สะอาด แล้วแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 10 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างให้สะอาด แล้วแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 11 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างให้สะอาด แล้วแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 12 ถั่วเหลืองถูกนำมาล้างให้สะอาด แล้วแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาที่กำหนด รินน้ำออกให้หมด นำมาผึ่งบนถาดสะอาด วางในตู้ดูดอากาศจนถั่วเหลืองแห้งสนิท บดถั่วเหลืองที่แห้งแล้วให้ละเอียด สกัดด้วยเฮกเซน 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เทเฮกเซนทิ้ง แล้วผึ่งตัวอย่างให้แห้งในตู้ดูดอากาศ (ได้ defatted soybean) นำแต่ละตัวอย่างที่ได้มาสกัดด้วย 5 มิลลิลิตร ของ 80% เมทานอล เป็นเวลา 5 ชั่วโมง กรองเอาส่วนใส สกัดกากที่ได้ซ้ำด้วย 80% เมทานอล อีก 2 ครั้ง แล้วรวมสารละลายใสที่ผ่านการกรองแล้วเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร โดยการระเหยตัวทำละลายออกจนได้ปริมาตรสุดท้าย นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาส่วนประกอบของไอโซฟลาโวนในสารสกัด โดยวิธี HPLC โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาปริมาณไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองแต่ละตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไอโซฟลาโวนแต่ละชนิด แล้วคำนวณหาปริมาณไอโซฟลาโวนจากน้ำหนักถั่วเหลืองแห้งก่อนการสกัด ทำการทดลองข้างต้นทั้งหมดซ้ำ อย่างน้อย 3 ครั้ง

ตอนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญไอโซฟลาโวนหลังการบดถั่วเหลือง

1. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการแช่ถั่วเหลืองในสภาวะกรดกับปริมาณสารสำคัญ

ล้างถั่วเหลืองให้สะอาด เพื่อกำจัดเศษผงต่างๆ จากนั้นนำมาผึ่งบนถาดสะอาด วางในตู้ดูดอากาศจนถั่วเหลืองแห้งสนิท นำถั่วเหลืองที่แห้งและสะอาดมาบดให้ละเอียด ชั่งถั่วเหลืองแต่ละตัวอย่าง

มา 1 กรัม สกัดด้วยเฮกเซน 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เทเฮกเซนทิ้ง แล้วผึ่งตัวอย่างให้แห้งในตู้ดูดอากาศ (ได้ defatted soybean) จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ในระยะเวลาที่แตกต่างกันดังนี้

ตัวอย่างที่ 13 และ 14 แช่ในสารละลาย 75% v/v เมทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (กรดเข้มข้น 0 N) (control)

ตัวอย่างที่ 15 และ 16 แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่ 17 และ 18 แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำสารตัวอย่างมากรอง ปรับปริมาตรให้ได้ 40 มิลลิลิตร ปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลาย NaOH หากมีตะกอนให้กรองอีกครั้ง ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตรโดยการระเหยออก เก็บในภาชนะปิดสนิท แล้วนำส่วนใสไปตรวจหาส่วนประกอบของไอโซฟลาโวนในสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองแต่ละตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไอโซฟลาโวนแต่ละชนิด แล้วคำนวณหาปริมาณไอโซฟลาโวนจากน้ำหนักถั่วเหลืองแห้งก่อนการสกัด

2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดกับปริมาณสารสำคัญ

ล้างถั่วเหลืองให้สะอาด เพื่อกำจัดเศษผงต่างๆ จากนั้นนำมาผึ่งบนถาดสะอาด วางในตู้ดูดอากาศจนถั่วเหลืองแห้งสนิท นำถั่วเหลืองที่แห้งและสะอาดมาบดให้ละเอียด ชั่งถั่วเหลืองแต่ละตัวอย่างมา 1 กรัม สกัดด้วยเฮกเซน 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เทเฮกเซนทิ้ง แล้วผึ่งตัวอย่างให้แห้งในตู้ดูดอากาศ (ได้ defatted soybean) จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงดังนี้

ตัวอย่างที่ 19 และ 20 แช่ในสารละลาย 75% v/v เมทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (กรดเข้มข้น 0 N) (control)

ตัวอย่างที่ 21 และ 22 แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่ 23 และ 24 แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.9 N ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่ 25 และ 26 แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.6 N ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำสารตัวอย่างมากรอง ปรับปริมาตรให้ได้ 40 มิลลิลิตร ปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลาย NaOH หากมีตะกอนให้กรองอีกครั้ง ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตรโดยการระเหยออก เก็บในภาชนะปิดสนิท แล้วนำส่วนใสไปตรวจหาส่วนประกอบของไอโซฟลาโวนในสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองแต่ละตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไอโซฟลาโวนแต่ละชนิด แล้วคำนวณหาปริมาณปริมาณไอโซฟลาโวนจากน้ำหนักถั่วเหลืองแห้งก่อนการสกัด

3. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในสภาวะความเป็นกรดกับปริมาณสารสำคัญ

ล้างถั่วเหลืองให้สะอาด เพื่อกำจัดเศษผงต่างๆ จากนั้นนำมาผึ่งบนถาดสะอาด วางในตู้ดูดอากาศจนถั่วเหลืองแห้งสนิท นำถั่วเหลืองที่แห้งและสะอาดมาบดให้ละเอียด ชั่งถั่วเหลืองแต่ละตัวอย่างมา 1 กรัม สกัดด้วยเฮกเซน 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เทเฮกเซนทิ้ง แล้วผึ่งตัวอย่างให้แห้งในตู้ดูดอากาศ (ได้ defatted soybean) จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมงโดยเขย่าสารละลายที่อุณหภูมิต่างๆกันดังนี้

ตัวอย่างที่ 27 และ 28 เขย่าสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 29 และ 30 เขย่าสารละลายที่อุณหภูมิ 45° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 31 และ 32 เขย่าสารละลายที่อุณหภูมิ 60° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 33 และ 34 เขย่าสารละลายที่อุณหภูมิ 80° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 35 และ 36 เขย่สารละลายที่อุณหภูมิ 90° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 37 และ 38 เขย่าสารละลายที่อุณหภูมิ 100° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำสารตัวอย่างมากรอง ปรับปริมาตรให้ได้ 40 มิลลิลิตร ปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลาย NaOH หากมีตะกอนให้กรองอีกครั้ง ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5มิลลิลิตรโดยการระเหยออก เก็บในภาชนะปิดสนิท แล้วนำส่วนใสไปตรวจหาส่วนประกอบของไอโซฟลาโวนในสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองแต่ละตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไอโซฟลาโวนแต่ละชนิด แล้วคำนวณหาปริมาณปริมาณไอโซฟลาโวนจากน้ำหนักถั่วเหลืองแห้งก่อนการสกัด

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารไอโซฟลาโวนโดยเทคนิค HPLC

HPLC Conditions

HPLC column: Water symmetry RP C18, 5μm, 3.90*150mm
Mobile phase: A: 0.1% Phosphoric acid Solution
B: Acetonitrile

Gradient solvent system:

Time (minute)	%A	%B
0 - 3	90	10
43	65	35
45	50	50
45 - 50	50	50
55	90	10
55 - 65	90	10

Flow rate: 1 ml/min

Injection volume : 20 µl

Detection wavelength : 255 nm

Running time : 65 นาที

บทที่ 3

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

(Results and Discussion)

1. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

1.1 Retention time ของสารมาตรฐานไอโซฟลาโวน

การวิเคราะห์หาสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองด้วยเทคนิค HPLC ภายใต้สภาวะที่พัฒนาขึ้น จะได้โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเจนิสเตอีน (genistein), เจนิสติน (genistin), เดดเซอีน (daidzein) และเดดซีน (daidzin) ดังรูปที่ 1 โดย retention time ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดเป็นดังนี้

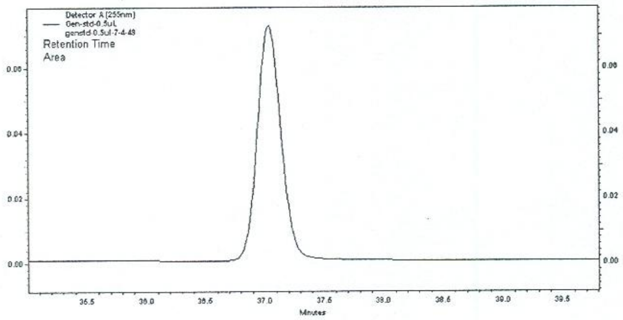
Retention time ของเจนิสเตอีนมีค่าประมาณ 36.86 นาที

Retention time ของเดดเซอีนมีค่าประมาณ 29.21 นาที

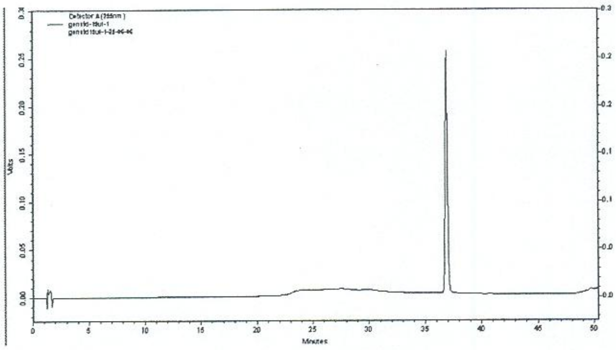
Retention time ของเจนิสตินมีค่าประมาณ 20.68 นาที

Retention time ของเดดซินมีค่าประมาณ 15.37 นาที

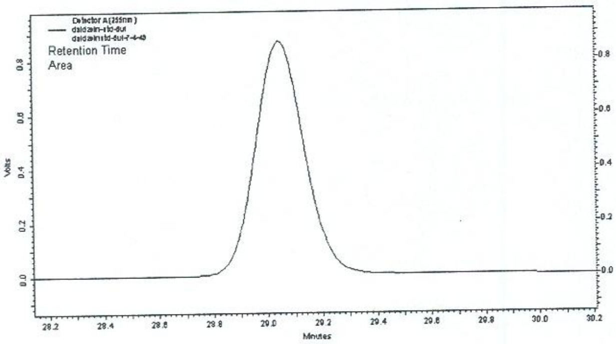
A-1



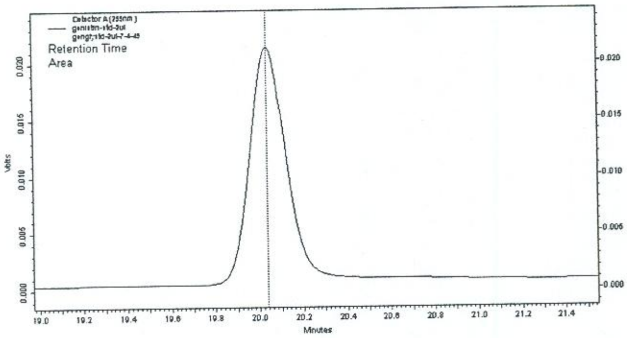
A-2



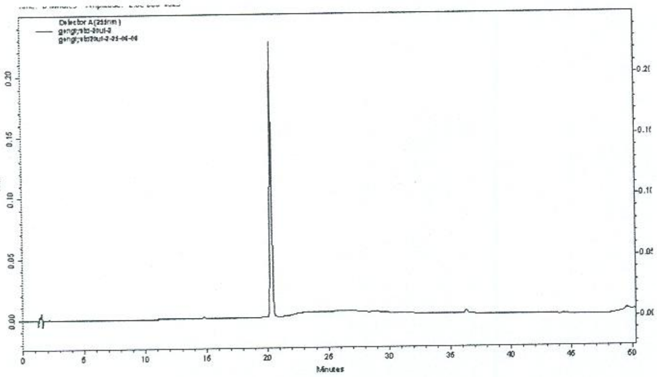
B.


Detector A (255nm)
daidzein-std-8ul
daidzeinstd-8ul-7-4-49
Retention Time
Area
Volts
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
28.2
28.4
28.6
28.8
29.0
29.2
29.4
29.6
29.8
30.0
30.2
Minutes

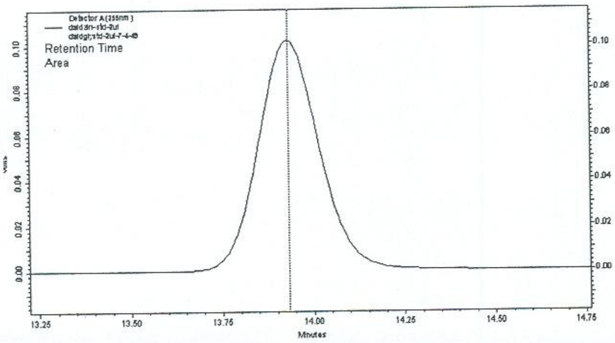
C-1.


Detector A (255nm)
genistin-std-2ul
gengt;std-2ul-7-4-49
Retention Time
Area
Volts
0.000
0.005
0.010
0.015
0.020
19.0
19.2
19.4
19.6
19.8
20.0
20.2
20.4
20.6
20.8
21.0
21.2
21.4
Minutes

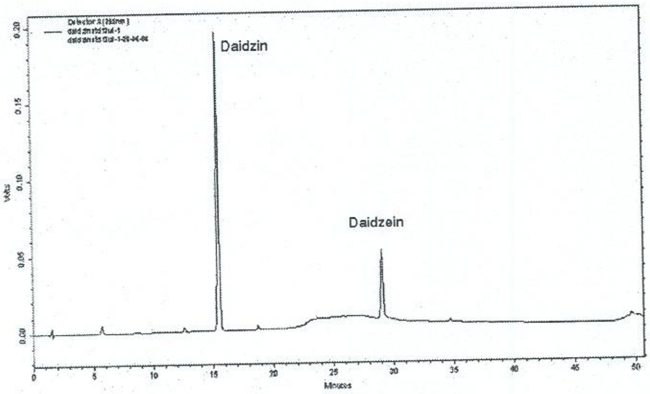
C-2


Detector A (255nm)
gengt;std-20ul-2
gengt;std20ul-2-25-06-09
Volts
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Minutes

D.


Detector A (255nm)
daidzin-std-2ul
daidgt;std-2ul-7-4-49
Retention Time
Area
Volts
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
13.25
13.50
13.75
14.00
14.25
14.50
14.75
Minutes

E.



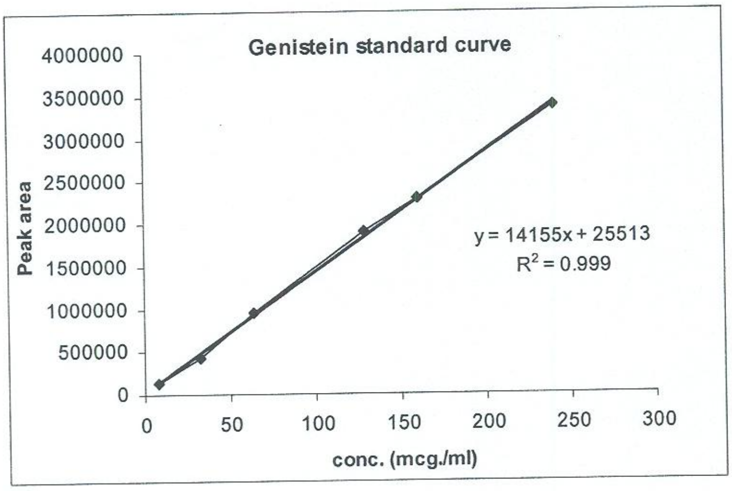
รูปที่ 17 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มไอโซฟลาโวน : A: genistein (Rt = 36.86 นาที), B: Daidzein (Rt = 29.21 นาที), C: genistin (Rt = 20.68 นาที), D: daidzin (Rt = 15.37 นาที), E: Daidzein และ Daidzin

1.2 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานไอโซฟลาโวน

1.2.1. กราฟมาตรฐานเจนิสเตอีน (genistein standard curve)

ตารางที่ 4 แสดงพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารเจนิสเตอีน

ความเข้มข้น (µg/ml)	พื้นที่ใต้พีก			เฉลี่ย (N=3)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
8	129788	129566	129762	129705.3
32	454756	424663	423654	434357.7
64	952956	954216	953126	953432.7
128	1902725	1912182	1877256	1897388
160	2286243	2352071	2258154	2298823
240	3386874	3383327	3385862	3385354

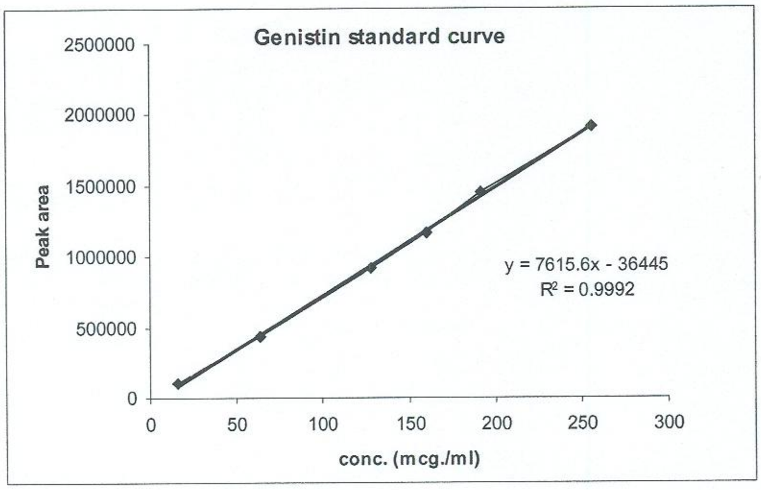


รูปที่ 18 แสดงกราฟมาตรฐานของสารเจนิสเตอีน

1.2.2 กราฟมาตรฐานเจนิสติน (genistin standard curve)

ตารางที่ 5 แสดงพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารเจนิสติน

ความเข้มข้น (µg/ml)	พื้นที่ใต้พีก			เฉลี่ย (N=3)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
16	109450	95656	106523	103876.3
64	441362	424745	446176	437427.7
128	916743	922341	919262	919448.7
160	1176695	1161983	1169882	1169520
192	1452429	1464170	1444506	1453720
256	1896087	1926020	1913052	1911720



รูปที่ 19 แสดงกราฟมาตรฐานของสารเจนิสติน

ตารางที่ 6 แสดงค่าสมการและค่า correlation coefficient (R^2) ของกราฟมาตรฐาน

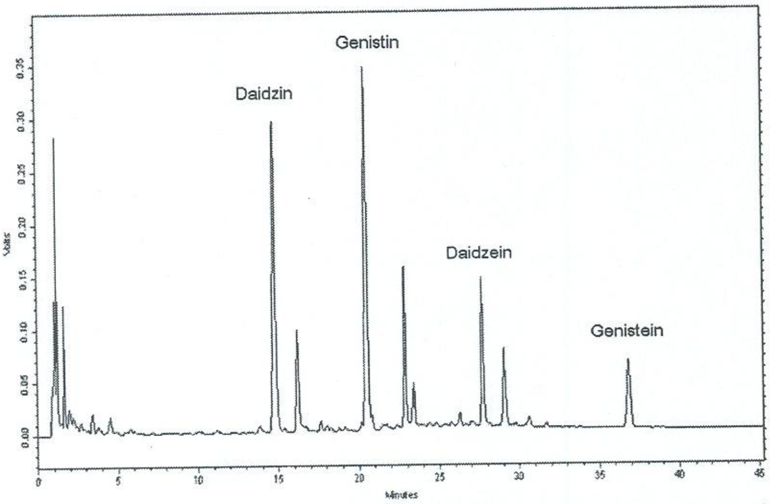
กราฟมาตรฐาน (n=3)	สมการ	R^2
เจนิสเตอีน	y = 14155x +25513	0.999
เจนิสติน	y = 7615.6x +36445	0.9992

1.3 **การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์**

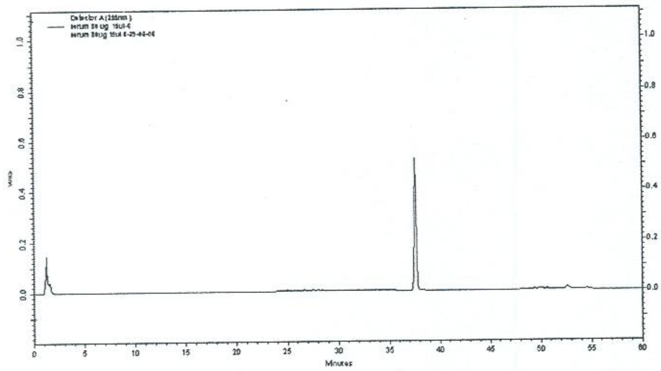
A. ความเฉพาะเจาะจง (Specificity)

ความเฉพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์คือความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์สารเจนิสเตอีนได้โดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่นๆในตัวอย่าง พบว่า retention time ของสารมาตรฐานเจนิสเตอีนและสารมาตรฐานอื่นๆ มีระยะห่างกันอย่างน้อย 5 นาที

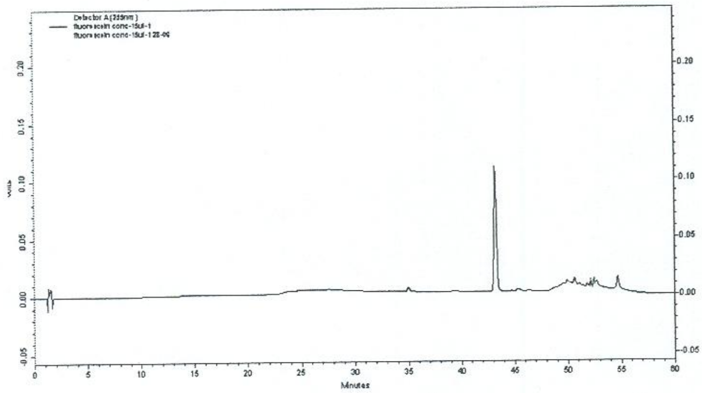
จากการทดลอง พบว่าการวิเคราะห์สารเจนิสเตอีนด้วยเทคนิค HPLC ตามสภาวะที่ใช้ สามารถแยกพีกของสารเจนิสเตอีน ออกจากสารไอโซฟลาโวน อื่นๆที่พบในสารสกัดจากถั่วเหลือง และจากสารฟลูออเรสซีน (Internal standard) ได้ โดยพบว่า retention time ของสารมาตรฐานเจนิสเตอีน เจนิสติน เดดเซอีน และเดดซีน มีค่า 36.86 นาที, 20.68 นาที, 29.21 นาที และ 15.37 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 20) นอกจากนี้เมื่อมีการฉีดสารมาตรฐานเจนิสเตอีนร่วมกับฟลูออเรสซีน (internal standard) พบว่าสารทั้งสองสามารถแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ และมี retention time ต่างกันประมาณ 5 นาที โดยพีกของสารเจนิสเตอีนและฟลูออเรสซีนมี retention time ที่เวลาประมาณ 37 นาที และ 43 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 20-23)



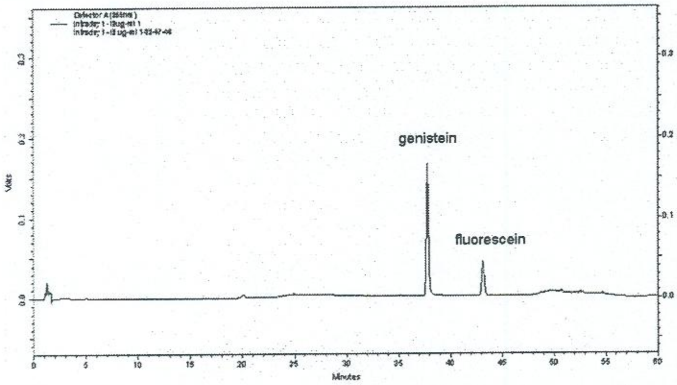
รูปที่ 20 แสดงโครมาโตแกรมของสารผสมของเจนิสเตอีน เจนิสติน เดดเซอีน และเดดซีน



รูปที่ 21 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเจนิสเตอีน (Rt = 36.86 นาที)



รูปที่ 22 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานฟลูออเรสซีน (Rt = 43.42 นาที)



รูปที่ 23 แสดงโครมาโตแกรมของสารผสมระหว่างเจนิสเตอีน และฟลูออเรสซีน

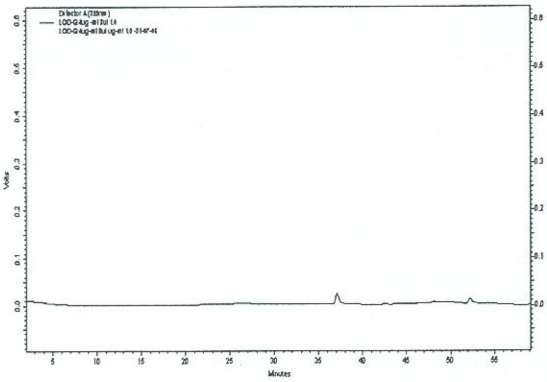
B. ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection)

จากการทดลองหาความเข้มข้นของเจนิสเตอีนที่ต่ำที่สุดที่วิธีวิเคราะห์ยังสามารถแยกสารเจนิสเตอีนออกจากสารปนเปื้อนอื่นๆ พบว่าความเข้มข้นของสารเจนิสเตอีนที่สามารถตรวจพบได้คือ 0.5 ug/ml แต่เมื่อลดความเข้มข้นลง โดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.25 ug/ml จะไม่ปรากฏพีกบนโครมาโตแกรม ดังนั้นความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารเจนิสเตอีนที่สามารถตรวจพบได้โดยใช้ HPLC ที่สภาวะดังกล่าว คือ 0.5 ug/ml และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 0.5 ug/ml ซ้ำอีก 5 ครั้ง ปรากฏว่าวิธีการวิเคราะห์และเครื่องตรวจวัดที่ใช้ยังสามารถตรวจพบสารเจนิสเตอีน และยังสามารถที่จะแยกพีกของสารดังกล่าวออกจากพีกของสารปนเปื้อนได้ ดังแสดงในรูปที่ 24

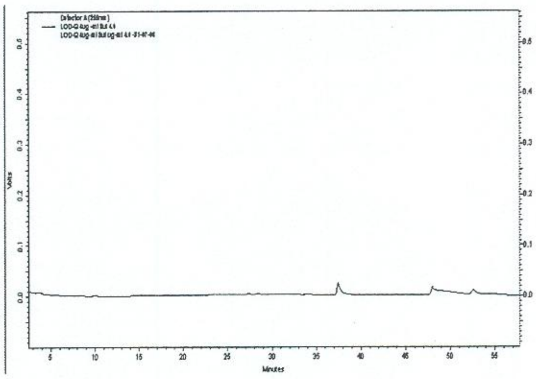
C. ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of Quantification)

จากผลการทดลอง พบว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณสารเจนิสเตอีนโดยเทคนิค HPLC ภายใต้สภาวะที่พัฒนาขึ้น คือ 1 µg/mL โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นดังกล่าวซ้ำ 5 ครั้ง พบว่าค่าความแม่นที่แสดงในรูปร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) อยู่ในช่วง 88.47 ถึง 92.63 และค่าความเที่ยงที่แสดงในรูป %RSD มีค่าเท่ากับ 1.74% ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ฉีดครั้งที่ 1

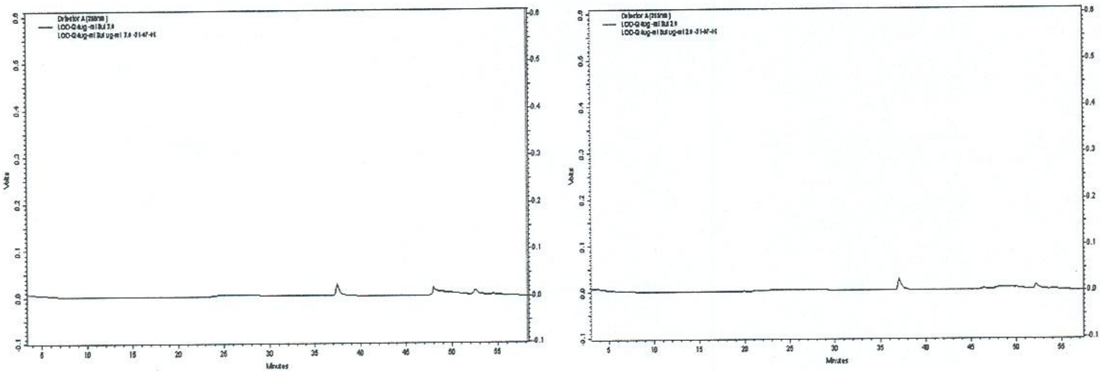


ฉีดครั้งที่ 2

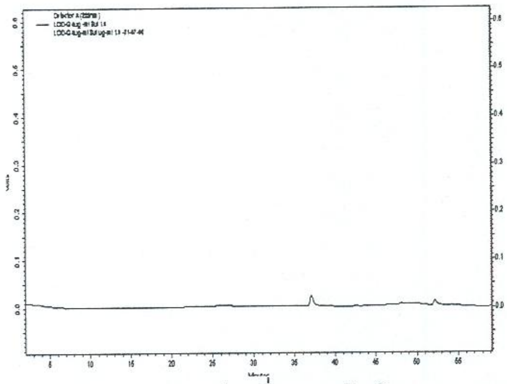


ฉีดครั้งที่ 3

ฉีดครั้งที่ 4



ฉีดครั้งที่ 5



รูปที่ 24 แสดงโครมาโตแกรมของสารเจนิสเตอีน ที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml

ตารางที่ 7 แสดงค่าความแม่นและค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์สารเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 1 µg/ml

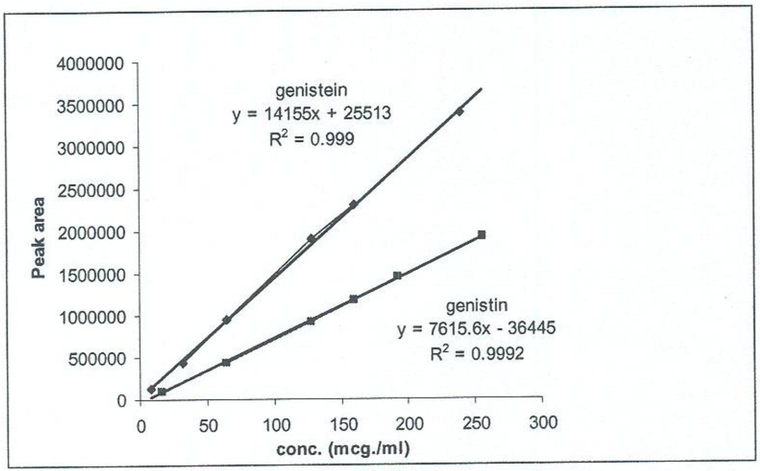
ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	mean (SD)	%Recovery	%RSD
1	38254	0.9001	0.9074 (0.0158)	90.01	1.74
2	38463	0.9149		91.49	
3	38036	0.8847		88.47	
4	38625	0.9263		92.63	
5	38404	0.9107		91.07	

D. ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ โดยความสัมพันธ์ที่ได้ควรจะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม

จากการทดลองพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเจนิสเตอีนในช่วงความเข้มข้น 8 µg/ml ถึง 240 µg/ml โดยมีค่า R^2 = 0.999 และพบความสัมพันธ์เชิง

เส้นตรงของพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเจนิสตินในช่วงความเข้มข้น 8 µg/ml ถึง 256 µg/ml โดยมีค่า R^2 = 0.9992



รูปที่ 25 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเจนิสเตอีนและสารมาตรฐานเจนิสติน

E. ความแม่น (Accuracy)

ในการตรวจสอบค่าความแม่นของวิธีการวิเคราะห์ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารเจนิสตินและเจนิสเตอีน ทำได้โดยวิเคราะห์หาความถูกต้อง 2 วิธี คือ ความแม่นภายในวันเดียว (Intra-day accuracy) และความแม่นระหว่างวัน (Inter-day accuracy) เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน ทำที่ 4 ระดับความเข้มข้นโดยครอบคลุมความเข้มข้นในระดับ สูง กลางและต่ำ แสดงผลในรูปร้อยละการคืนกลับ การทดลองนี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารเจนิสเตอีนและเจนิสติน ในช่วงความเข้มข้น 8 -240 µg/ml และความเข้มข้น 16 -256 µg/ml ตามลำดับ ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง

ความแม่นภายในวันเดียวสำหรับสารเจนิสเตอีน

ตารางที่ 8 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 8 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้	Mean	SD	%recovery
1	129788	7.3666	7.3608	0.0086	92.08
2	129566	7.3510			91.89
3	129762	7.3642			92.06
			%Recovery เฉลี่ย = 92.01		

ตารางที่ 9 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 32 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้	mean	SD	%recovery
1	454756	30.3245	28.8834	1.2485	94.76
2	424663	28.1985			88.12
3	423654	28.1272			87.90
			%Recovery เฉลี่ย = 90.26		

ตารางที่ 10 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 130 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้	mean	SD	%recovery
1	1902725	132.6183	132.2413	1.2762	102.01
2	1912182	133.2864			102.53
3	1877256	130.8190			100.63
			%Recovery เฉลี่ย =101.72		

ตารางที่ 11 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 240 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้	mean	SD	%recovery
1	3386874	237.4681	237.3607	0.1291	98.85
2	3383327	237.2175			98.84
3	3385862	237.3966			98.92
			%Recovery เฉลี่ย = 98.90		

ความแม่นภายในวันเดียวสำหรับสารเจนิสติน

ตารางที่ 12 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 16 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้	mean	SD	%recovery
1	109450	19.1574	18.4255	0.9540	119.7338
2	95656	17.3461			108.4131
3	106523	18.7730			117.3312
			%Recovery เฉลี่ย = 115.1594		

ตารางที่ 13 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 128 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้	mean	SD	%recovery
1	916743	125.1626	125.5178	0.3681	97.7834
2	922341	125.8974			98.3573
3	919262	125.4933			98.0416
			%Recovery เฉลี่ย = 98.0608		

ตารางที่ 14 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 160 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้	mean	SD	%recovery
1	1176695	159.2967	158.3546	0.9667	99.5604
2	1161983	157.3649			98.3531
3	1169882	158.4021			99.0013
			%Recovery เฉลี่ย = 98.9716		

ตารางที่ 15 แสดงค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 256 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้	mean	SD	%recovery
1	1896087	253.7597	255.8124	1.9710	99.1249
2	1926020	257.6901			100.6602
3	1913052	255.9873			99.9950
			%Recovery เฉลี่ย = 99.9267		

ตารางที่ 16 ตารางสรุปค่าความแม่นภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนและสารเจนิสติน แสดงเป็นค่าร้อยละการคืนกลับ ทั้ง 4 ความเข้มข้น

ไอโซฟลาโวน	ความเข้มข้น (µg/ml)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ ± SD (µg/ml) (n = 3)	%Recovery
เจนิสเตอีน	8	7.36 ± 0.01	92.01
	32	28.88 ± 1.25	90.26
	130	132.24 ± 1.28	101.72
	240	237.36 ± 0.13	98.90
เจนิสติน	16	18.43 ± 0.95	115.16
	128	125.52 ± 0.37	98.06
	160	158.35 ± 0.97	98.97
	256	255.81 ± 1.97	99.92

ความแม่นระหว่างวันสำหรับสารเจนิสเตอีน

ตารางที่ 17 แสดงค่าความแม่นระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณสารเจนิสเตอีน

ความเข้มข้น (ug/ml)	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)			mean	SD	%recovery
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3			
8	7.3608	8.0278	7.8001	7.7296	0.3390	96.6196
32	28.8834	28.5284	29.3652	28.9257	0.4200	96.4189
130	132.2413	133.2546	131.2923	132.2627	0.9813	101.7406

%Recovery ของสารมาตรฐานเจนิสเตอีนอยู่ในช่วง 96.42-101.74

ความแม่นระหว่างวันสำหรับสารเจนิสติน

ตารางที่ 18 แสดงค่าความแม่นระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณสารเจนิสติน

ความเข้มข้น (ug/ml)	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)			mean	SD	%recovery
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3			
16	18.4255	18.2546	17.4826	18.0542	0.5024	112.8390
128	125.5178	124.9625	125.9283	125.4695	0.4847	98.0231
256	255.8124	254.7863	254.6998	255.0995	0.6189	99.6482

%Recovery ของสารมาตรฐานเจนิสตินอยู่ในช่วง 98.02-112.84

F. ความเที่ยง (Precision)

ในการตรวจสอบความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารเจนิสตินและเจนิสเตอีน ทำได้โดยวิเคราะห์หาความเที่ยง 2 วิธี คือ ความเที่ยงภายในวันเดียว (Intra-day precision) และความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day precision) เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน ทำที่ 4 ระดับความเข้มข้นโดยครอบคลุมความเข้มข้นในระดับ สูง กลางและต่ำ แสดงผลในรูป %Relative Standard Deviation (%RSD) ในการทดลองนี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารเจนิสเตอีนและเจนิสติน ในช่วงความเข้มข้น 8 - 240 µg/ml และความเข้มข้น 16 -256 µg/ml ตามลำดับ ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง

ความเที่ยงภายในวันเดียวสำหรับสารเจนิสเตอีน

ตารางที่ 19 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 8 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)	mean	SD	%RSD
1	129788	7.3666	7.3608	0.0086	0.1168
2	129566	7.3510			
3	129762	7.3642			

ตารางที่ 20 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 32 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)	mean	SD	%RSD
1	454756	30.3245	28.8834	1.2485	4.3226
2	424663	28.1985			
3	423654	28.1272			

ตารางที่ 21 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 130 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)	mean	SD	%RSD
1	1902725	132.6183	132.2413	1.2762	0.9651
2	1912182	133.2864			
3	1877256	130.8190			

ตารางที่ 22 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสเตอีนที่ความเข้มข้น 240 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)	mean	SD	%RSD
1	3386874	237.4681	237.3607	0.1291	0.0544
2	3383327	237.2175			
3	3385862	237.3966			

ความเที่ยงภายในวันเดียวสำหรับสารเจนิสติน

ตารางที่ 23 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 16 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)	mean	SD	%RSD
1	109450	19.1574	18.4255	0.9540	5.1776
2	95656	17.3461			
3	106523	18.7730			

ตารางที่ 24 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 128 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)	mean	SD	%RSD
1	916743	125.1626	125.5178	0.3681	0.2933
2	922341	125.8974			
3	919262	125.4933			

ตารางที่ 25 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 160 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)	mean	SD	%RSD
1	1176695	159.2967	158.3546	0.9667	0.6105
2	1161983	157.3649			
3	1169882	158.4021			

ตารางที่ 26 แสดงค่าความเที่ยงภายในวันเดียวของการวิเคราะห์ปริมาณเจนิสตินที่ความเข้มข้น 256 ug/ml

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)	mean	SD	%RSD
ครั้งที่ 1	1896087	253.7597	255.8124	1.9710	0.7705
ครั้งที่ 2	1926020	257.6901			
ครั้งที่ 3	1913052	255.9873			

ความเที่ยงระหว่างวันสำหรับสารเจนิสเตอีน

ตารางที่ 27 แสดงค่าความเที่ยงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณสารเจนิสเตอีน

เจนิสเตอีน (ug/ml)	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)			mean	SD	%RSD
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3			
8	7.3608	8.0278	7.8001	7.7296	0.3390	4.3856
32	28.8834	28.5284	29.3652	28.9257	0.4200	1.4520
130	132.2413	133.2546	131.2923	132.2627	0.9813	0.7419

%RSD ของสารมาตรฐานเจนิสเตอีนอยู่ในช่วง 0.7419-4.3856

ความเที่ยงระหว่างวันสำหรับสารเจนิสติน

ตารางที่ 28 แสดงค่าความเที่ยงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณสารเจนิสติน

เจนิสติน (ug/ml)	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ug/ml)			mean	SD	%RSD
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3			
16	18.4255	18.2546	17.4826	18.0542	0.5024	2.7827
128	125.5178	124.9625	125.9283	125.4695	0.4847	0.3863
256	255.8124	254.7863	254.6998	255.0995	0.6189	0.2426

%RSD ของสารมาตรฐานเจนิสตินอยู่ในช่วง 0.2426-2.7827

ตารางที่ 29 ตารางสรุปค่าการตรวจสอบความแม่นและน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเจนิสเตอีนและเจนิสติน

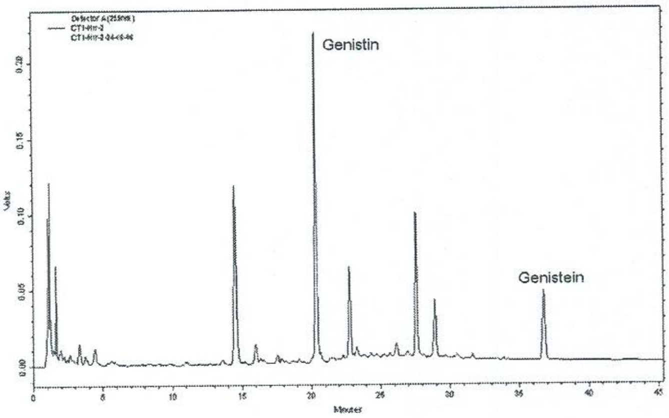
Parameters	**สารมาตรฐาน**	
	เจนิสเตอีน	**เจนิสติน**
ความจำเพาะเจาะจง	มี	มี
ขีดจำกัดของการตรวจวัด	0.5 µg/mL	N/A
ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ	1.0 µg/mL	N/A
ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง - Linear equation - Correlation coefficient (r^2)	 y = 14155x +25513 0.999	 y = 7615.6x +36445 0.9992
ความแม่น (%Recovery) - ภายในวันเดียว - ระหว่างวัน	 95.72 96.42-101.74	 103.03 98.02-112.84
ความเที่ยง (%RSD) - ภายในวันเดียว - ระหว่างวัน	 1.36 0.74-4.39	 1.71 0.24-2.78

2. การศึกษาปัจจัยต่าง ๆที่มีผลต่อปริมาณสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง

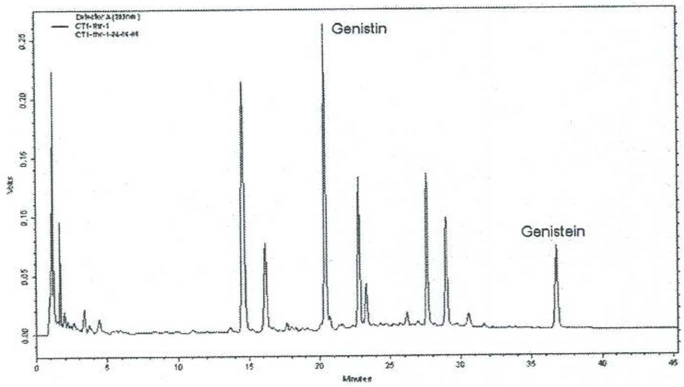
ตอนที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญไอโซฟลาโวนก่อนการบดถั่วเหลือง

1. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการแช่น้ำกับปริมาณสารสำคัญ

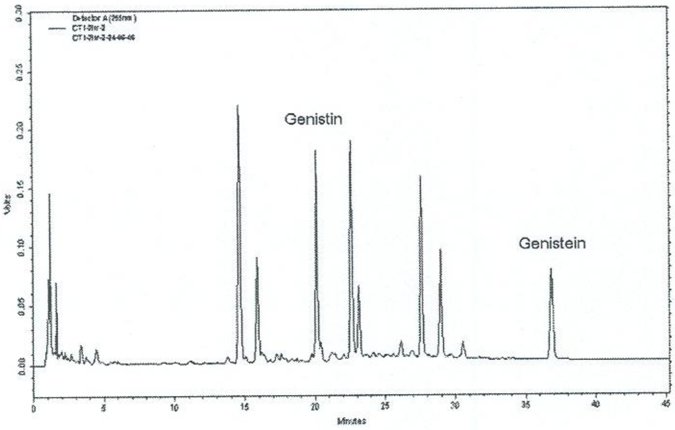
A

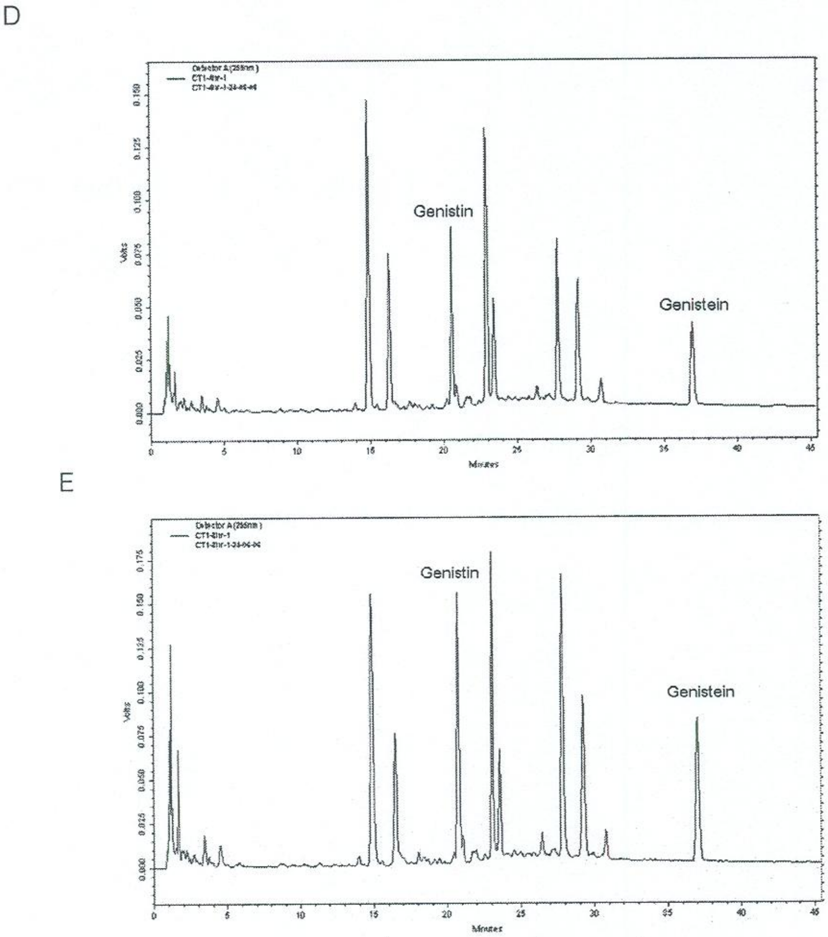


B



C



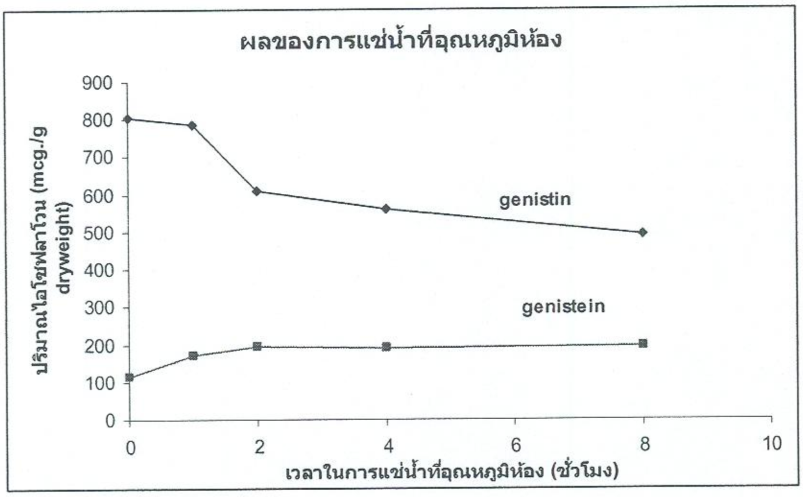


รูปที่ 26 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดถั่วเหลือง A ถั่วเหลืองที่ผ่านการล้างขจัดสิ่งสกปรกออกแต่ไม่ได้แช่น้ำ, B ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง, C ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง, D ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง, E ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

ตารางที่ 30 แสดงปริมาณสารเจนิสเตอีน และเจนิสตินในสารสกัดถั่วเหลือง (n =3) เมื่อผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องตามเวลาต่างๆ

ระยะเวลาที่แช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง (ชั่วโมง)	ปริมาณสารไอโซฟลาโวน (μg/g dry weight)	
	เจนิสติน	เจนิสเตอีน
0	803.46 ± 2.59	112.50 ± 3.96
1	787.25 ± 3.84	172.32 ± 5.95
2	611.91 ± 3.80	195.08 ± 5.14
4	561.28 ± 7.07	190.87 ± 3.29
8	493.81 ± 2.15	192.99 ± 4.74
24	N/A*	N/A*

* การแช่ถั่วเหลืองไว้ข้ามคืน ทำให้เกิดการเปื่อยยุ่ยของเมล็ดถั่วเหลือง ทำให้เกิดการสูญเสียสารไอโซฟลาโวนกับน้ำเป็นจำนวนมาก ทำให้ไม่สามารถสกัดสารสำคัญออกมาได้



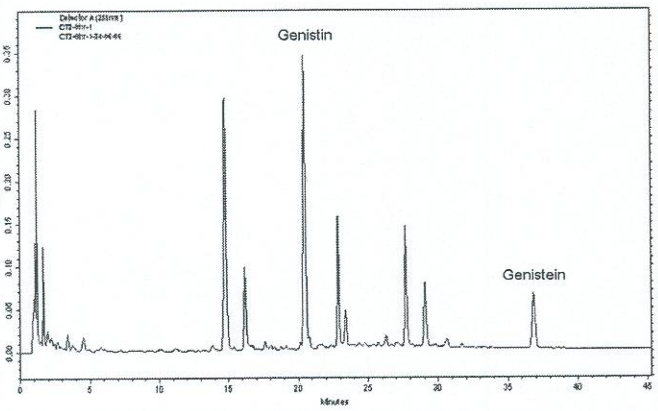
รูปที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองกับระยะเวลาการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง

จากผลการศึกษา พบว่าปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการแช่น้ำ โดยปริมาณสารเจนิสเตอีนจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการแช่น้ำ การแช่ถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 25°C พบการเพิ่มขึ้นของสารเจนิสเตอีนในช่วงเวลา 2 ชั่วโมงแรก จากนั้นไม่พบการเพิ่มขึ้นอีก

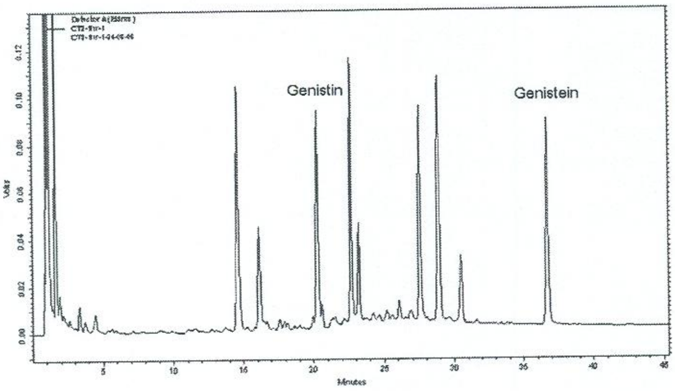
ในช่วงเวลาการแช่ 2 ถึง 8 ชั่วโมง ส่วนการแช่ถั่วเหลืองข้ามคืนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เกิดการเปื่อยยุ่ยของเมล็ดถั่วเหลือง ส่งผลให้เกิดการสูญเสียสารไอโซฟลาโวนกับน้ำเป็นจำนวนมาก ในการทดลองนี้จึงไม่สามารถนำถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมงไปตรวจหาปริมาณสารสำคัญได้ พบว่าการเพิ่มขึ้นของเจนิสเตอีน (อะกลัยโคน) เมื่อแช่น้ำที่อุณหภูมิ 25°C น่าจะเป็นผลมาจากการเกิดไฮโดรไลซิสของสารเจนิสตินและอนุพันธ์ (มาโลนิลเจนิสตินและอะเซทิลเจนิสติน) โดยการทำงานของเอนไซม์ ß-glycosidase ที่เปลือกด้านในของถั่วเหลืองซึ่งสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25°C ถึง 45°C (Matsuura and Obata, 1993; Wang and Murphy, 1996; Kao et al., 2004) สอดคล้องกับข้อสรุปข้างต้น พบว่า ณ อุณหภูมิดังกล่าว ปริมาณสารเจนิสตินลดลงตามลำดับตามระยะเวลาการแช่น้ำ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ ß-glycosidase ในการทำลายพันธะกลัยโคซิดิคเพื่อตัดหมู่น้ำตาลออกจากโมเลกุล จึงเกิดการเปลี่ยนเจนิสตินเป็นเจนิสเตอีนนั่นเอง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Chiou RY และ Cheng SL ที่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณเจนิสเตอีนและเดดเซอีน และลดลงของปริมาณเดดซีนและเจนิสตินภายหลังจากการแช่ถั่วเหลืองในน้ำเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Chiou RY and Cheng SL, 2001) อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของสารเจนิสเตอีนและการลดลงของสารเจนิสตินอาจไม่จำเป็นต้องเป็นสัดส่วนกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของผู้วิจัยกลุ่มอื่นๆ เนื่องจากสารประกอบเหล่านี้สามารถเสื่อมสลาย (degradation) ไปเป็นสารอื่นๆ (unknown products) ในระหว่างขั้นตอนการแช่น้ำและขั้นตอนการสกัดได้ (Wardhani DH et al., 2008) นอกจากนี้การลดลงของปริมาณสารเจนิสตินอาจเป็นผลมาจากการสูญเสียสารเจนิสตินไปบางส่วนกับน้ำในระหว่างการแช่น้ำ เนื่องจากสารกลุ่มกลัยโคไซด์นี้สามารถละลายน้ำได้ดีคาดว่าการสูญเสียกลัยโคไซด์ไปกับน้ำจะมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการแช่น้ำยาวนานขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ว่าระยะเวลาการแช่น้ำที่นานจะก่อให้เกิดการสูญเสียอนุพันธ์กลัยโคไซด์ไปในปริมาณมาก (Jackson et al., 2002, Simonne et al., 2000)

2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการแช่น้ำกับปริมาณสารสำคัญ

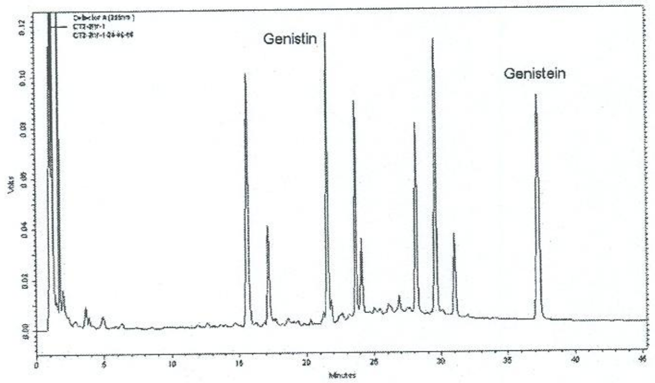
A



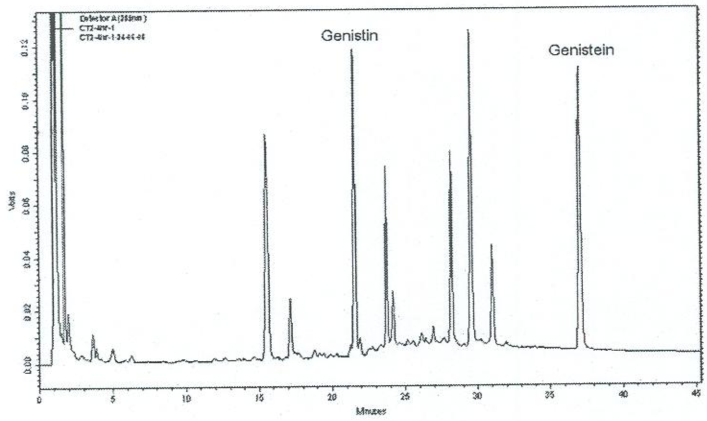
B


Genistin
Genistein
Volts
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Minutes

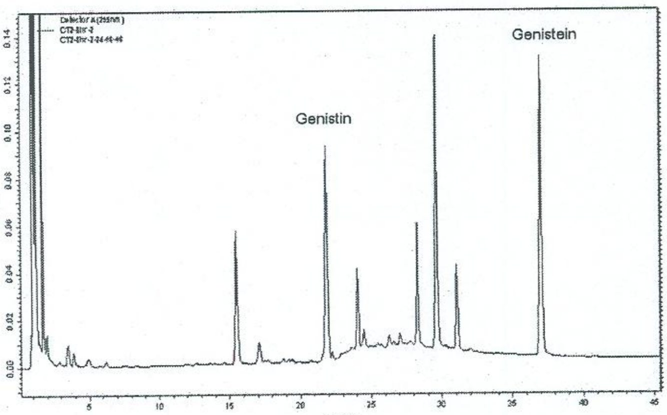
C


Genistin
Genistein
Volts
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Minutes

D


Genistin
Genistein
Volts
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Minutes

E

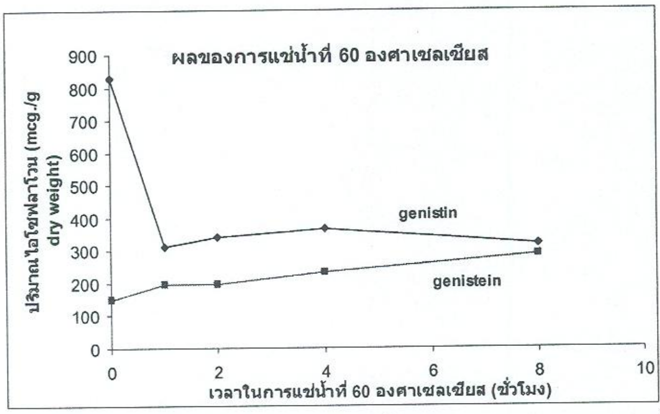


รูปที่ 28 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดถั่วเหลือง A ถั่วเหลืองที่ผ่านการล้างด้วยน้ำอุณหภูมิ 60° C แต่ไม่ได้แช่น้ำ, B ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, C ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง, D ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง, E ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

ตารางที่ 31 แสดงปริมาณสารเจนิสเตอีน และเจนิสตินในสารสกัดถั่วเหลือง (n =3) เมื่อผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60° C ตามเวลาต่างๆ

ระยะเวลาที่แช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C (ชั่วโมง)	ปริมาณสารไอโซฟลาโวน (µg/g dry weight)	
	เจนิสติน	เจนิสเตอีน
0	826.99 ± 3.96	150.46 ± 0.17
1	311.42 ± 3.44	195.92 ± 4.81
2	340.48 ± 4.67	196.16 ± 0.91
4	367.30 ± 3.97	231.13 ± 1.67
8	321.05 ± 2.53	286.27 ± 5.06
24	N/A*	N/A*

* การแช่ถั่วเหลืองไว้ข้ามคืน ทำให้เกิดการเปื่อยยุ่ยของเมล็ดถั่วเหลือง ทำให้เกิดการสูญเสียสารไอโซฟลาโวนกับน้ำเป็นจำนวนมาก ทำให้ไม่สามารถสกัดสารสำคัญออกมาได้



รูปที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองกับระยะเวลาการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60° C

จากผลการศึกษา พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาในการแช่น้ำมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารสำคัญในถั่วเหลือง เมื่อแช่ถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 60°C จะพบการเพิ่มขึ้นของสารเจนิสเตอีนเป็นลำดับ พบว่าหลังจากการแช่ถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ปริมาณเจนิสเตอีนเพิ่มจาก 150.46 ไมโครกรัม/กรัม เป็น 286.27 ไมโครกรัม/กรัม คิดเป็นปริมาณที่เพิ่มขึ้น 135.81 ไมโครกรัม/กรัม (คิดเป็น 90.26%) ในขณะที่ปริมาณของสารเจนิสตินจะลดลงตามระยะเวลาการแช่น้ำ ปริมาณของเจนิสตินลดลงคิดเป็นปริมาณ 505.94 ไมโครกรัม/กรัม (คิดเป็น 61.18%) หลังการแช่ถั่วเหลืองเป็นเวลา 8 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการแช่ถั่วเหลืองข้ามคืนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เกิดการเปื่อยยุ่ยของเมล็ดถั่วเหลือง ส่งผลให้เกิดการสูญเสียสารไอโซฟลาโวนกับน้ำเป็นจำนวนมาก ในการทดลองนี้จึงไม่สามารถนำถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมงไปตรวจหาปริมาณสารสำคัญได้

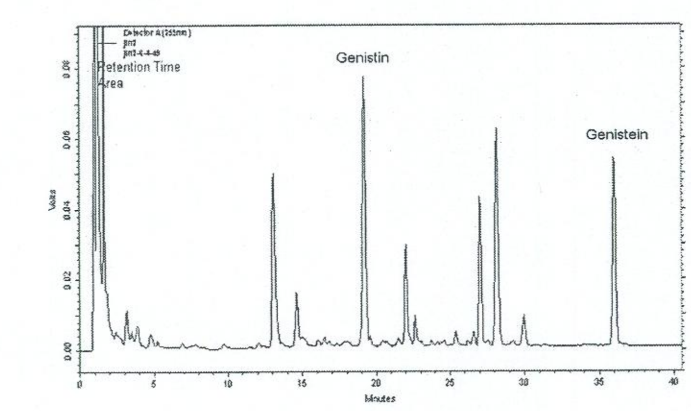
พบว่าความสัมพันธ์ของระยะเวลาและอุณหภูมิของการแช่น้ำกับปริมาณสารสำคัญในถั่วเหลืองนั้น ปริมาณของเจนิสเตอีนเพิ่มขึ้นและปริมาณเจนิสตินที่ลดลงเป็นลำดับตามระยะเวลาการแช่ถั่วเหลืองในน้ำที่อุณหภูมิ 60°C น่าเป็นผลมาจากความร้อนไปทำลายพันธะกลัยโคซิดิคทำให้เกิดการเปลี่ยนกลัยโคไซด์ป็นอะกลัยโคน เนื่องจากมีรายงานว่าเอนไซม์ ß-glycosidase จะถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°C (Matsuura et al., 1995; Pandjaitan et al., 2000) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณอะกลัยโคนจึงไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวที่เปลือกด้านในของถั่วเหลือง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยว่าความร้อนสามารถทำลายสารประกอบกลัยโคไซด์ในถั่วเหลือง (Chien 2005) เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณสารเจนิสตินจะลดลงอย่างรวดเร็วภายในหนึ่งชั่วโมงแรกของการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C จากนั้นปริมาณของสารดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเป็นลำดับภายหลังจากหนึ่งชั่วโมงแรกจนกระทั่งการแช่น้ำผ่านไปสี่ชั่วโมงสารเจนิสตินจึงมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ปริมาณสารเจนิสเตอีนยังคงเพิ่มขึ้นเป็นลำดับตามระยะเวลาการแช่น้ำ ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารเจนิสตินภายหลังจากหนึ่งชั่วโมงแรกของการแช่น้ำ น่าจะเกิดจากการสลายตัวของอนุพันธ์กลัยโคไซด์อื่นๆในถั่วเหลือง

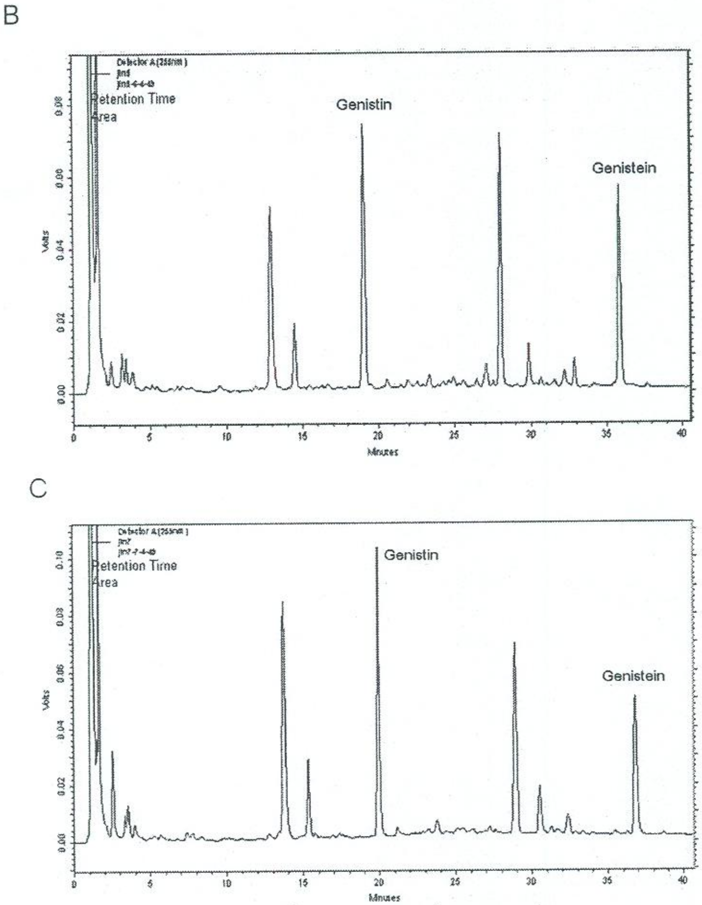
โดยเฉพาะอนุพันธุ์มาโลนิลเจนิสตินไปเป็นสารเจนิสตินและเจนิสเตอีนตามลำดับ (Chien 2005) โดยอัตราการสลายตัวของอนุพันธ์มาโลนิลเจนิสตินไปเป็นเจนิสตินนั้นสูงกว่าอัตราการสลายตัวของเจนิสตินไปเป็นเจนิสเตอีนอยู่มาก จึงทำให้ปริมาณสารเจนิสเตอีนที่ตรวจพบมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นไปในทิศทางเดียวกับการเพิ่มขึ้นของเจนิสเตอีน การลดลงของปริมาณเจนิสตินภายหลังการแช่น้ำไปแล้วสี่ชั่วโมงน่าจะเกิดจากอัตราการสลายตัวของอนุพันธ์มาโลนิลเจนิสตินไปเป็นเจนิสตินนั้นลดลงต่ำกว่าอัตราการสลายตัวของเจนิสตินไปเป็นเจนิสเตอีน เนื่องจากปริมาณสารตั้งต้นของเจนิสติน (อนุพันธ์มาโลนิลเจนิสติน) ที่ลดลง และสารตั้งต้นของเจนิสเตอีน (เจนิสติน) ที่เพิ่มขึ้น จึงทำให้ปริมาณสารเจนิสเตอีนในช่วงระยะเวลาการแช่น้ำจากสี่ถึงแปดชั่วโมงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ปริมาณสารเจนิสตินลดลงในช่วงเวลาดังกล่าว

จากการทดลองพบว่าการแช่ถั่วเหลืองที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°C จะเป็นการเพิ่มปริมาณสารอะกลัยโคนโดยอาศัยกลไกการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยความร้อน ไม่ได้อาศัยเอนไซม์ที่เปลือกด้านในของถั่วเหลือง พบว่าปัจจัยด้านอุณหภูมิการแช่น้ำมีผลต่อปริมาณสารอะกลัยโคนมากกว่าปัจจัยด้านระยะเวลาการแช่น้ำ อย่างไรก็ตามอาจเกิดการสูญเสียกลัยโคไซด์ไปกับน้ำเมื่อระยะเวลาการแช่น้ำยาวนานขึ้น พบว่าการแช่น้ำที่ 60°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เป็นสภาวะเบื้องต้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สารสำคัญในถั่วเหลืองก่อนการบดเปลี่ยนรูปทางเคมีจากกลัยโคไซด์เป็นอะกลัยโคน เพื่อให้สารสกัดจากถั่วเหลืองมีสารสำคัญที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

ตอนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญไอโซฟลาโวนหลังการบดถั่วเหลือง

1. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการแช่ถั่วเหลืองในสภาวะกรดกับปริมาณสารสำคัญ

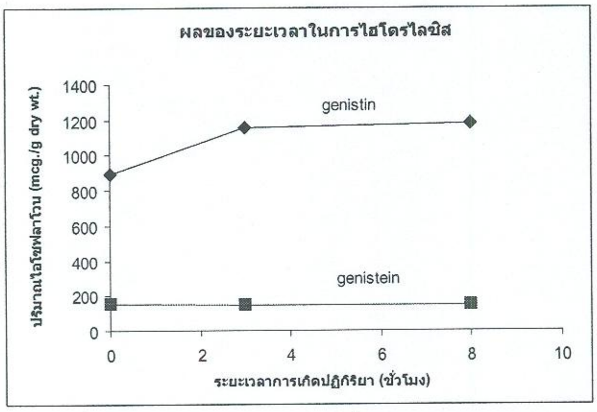




รูปที่ 30 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดถั่วเหลือง A ถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการแช่ในกรด, B ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง, C ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

ตารางที่ 32 แสดงปริมาณสารเจนิสเตอีน และเจนิสตินในสารสกัดถั่วเหลือง (n =3) เมื่อผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N เป็นเวลาต่างๆกัน

ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (N)	ระยะเวลาการแช่ถั่วเหลืองในกรด (ชั่วโมง)	ปริมาณไอโซฟลาโวน (µg/g dry weight) (n = 3)	
		เจนิสติน	เจนิสเตอีน
0	3	891.87 ± 67.58	153.92 ± 10.78
1.0	3	1153.09 ± 155.36	146.36 ± 15.19
1.0	8	1180.24 ± 168.58	148.46 ± 8.04

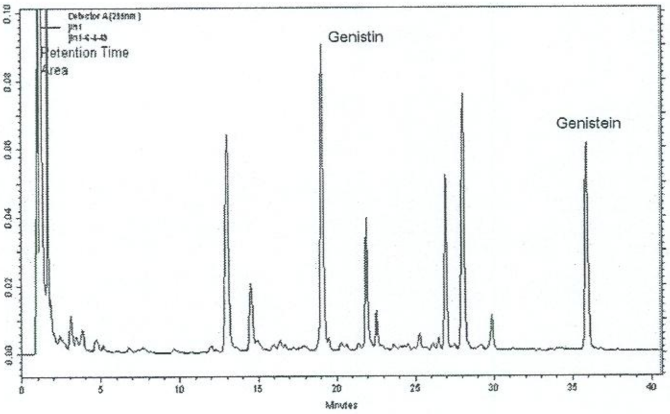


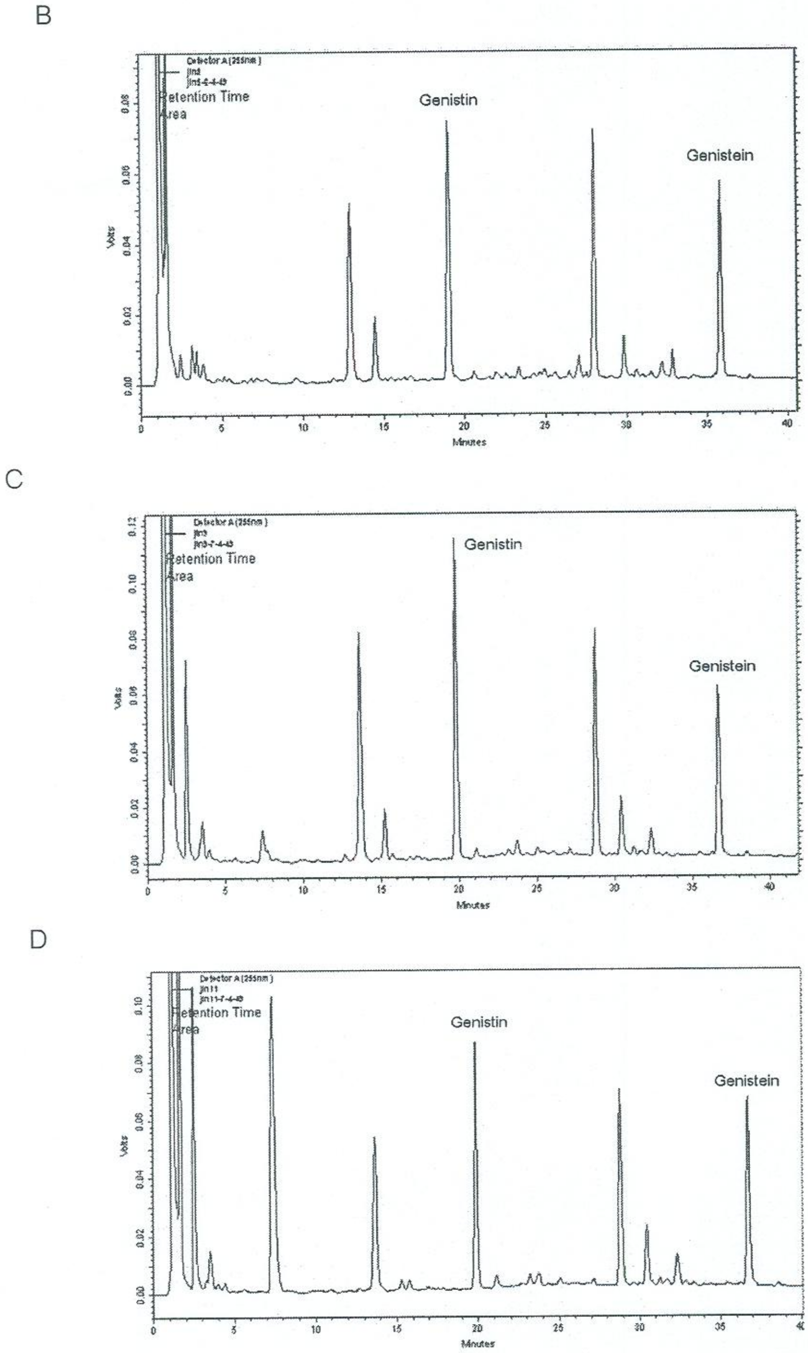
รูปที่ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองกับระยะเวลาการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ที่อุณหภูมิห้อง

จากการทดลองพบว่า หากแช่ถั่วเหลืองในกรดที่มีความเข้มข้นต่ำ จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารเจนิสเตอีนในถั่วเหลือง แม้จะแช่ถั่วเหลืองในกรดเป็นเวลาถึง 8 ชั่วโมง เนื่องจากความเข้มข้นของกรดที่ 1.0 N เป็นความเข้มข้นที่ต่ำเกินไปจึงไม่ก่อให้เกิดการไฮโดรไลซ์เจนิสตินไปเป็นเจนิสเตอีน อย่างไรก็ตามการแช่ถั่วเหลืองในสาระลายกรดเข้มข้น 1.0 N ที่อุณหภูมิห้อง พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารเจนิสตินเป็นลำดับตามระยะเวลาของการแช่ถั่วเหลืองในสารละลายกรด เนื่องจากสภาวะกรดที่ 1.0 N สามารถก่อการเกิดปฏิกิริยาในการไฮโดรไลซ์สารอนุพันธ์กลัยโคไซด์ชนิดอื่นๆมาเป็นสารเจนิสตินได้

2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดกับปริมาณสารสำคัญ

A

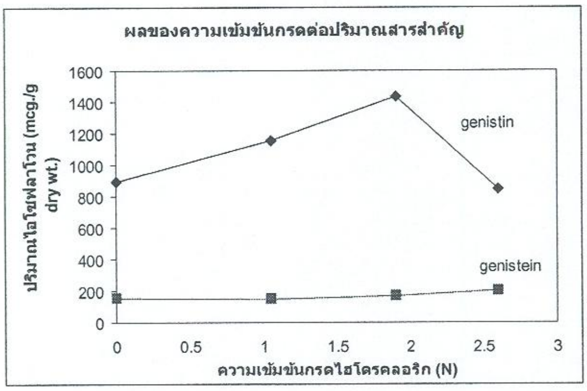




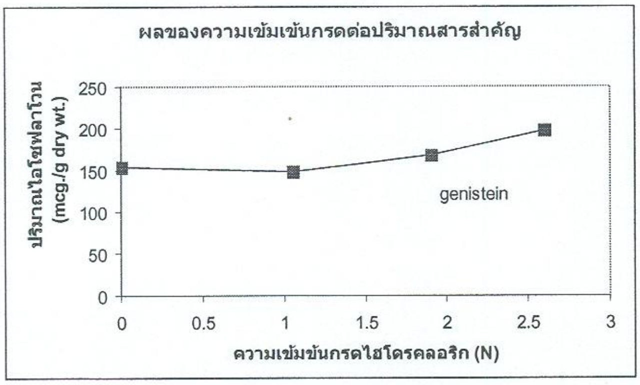
รูปที่ 32 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดถั่วเหลือง: A ถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการแช่ในกรด, B ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง, C ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.9 N ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง, ถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.6 N ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 33 แสดงปริมาณสารเจนิสเตอีน และเจนิสตินในสารสกัดถั่วเหลือง (n =3) เมื่อผ่านการแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (N)	ระยะเวลาการแช่ในกรด (ชั่วโมง)	ปริมาณไอโซฟลาโวน (µg/g dry weight) (n = 3)	
		เจนิสติน	เจนิสเตอีน
0	3	891.87 ± 67.58	153.92 ± 10.78
1.0	3	1155.87 ± 156.65	148.23 ± 14.51
1.9	3	1430.64 ± 25.10	167.24 ± 7.06
2.6	3	847.61 ± 11.24	197.17 ± 13.88



รูปที่ 33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองกับความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก



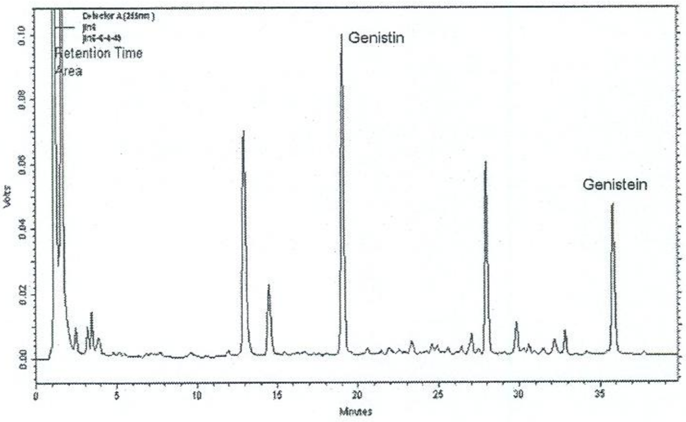
รูปที่ 34 แสดงส่วนขยายของกราฟในรูป 33 เพื่อให้เห็นการเพิ่มขึ้นของสารเจนิสเตอีนในสารสกัดถั่วเหลืองกับเมื่อความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเพิ่มขึ้น

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกรดมีผลต่อปริมาณสารสำคัญในถั่วเหลืองทั้งต่อปริมาณของสารเจนิสเตอีนและเจนิสติน โดยปริมาณสารเจนิสเตอีนจะเพิ่มขึ้นเป็นลำดับตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของกรด เนื่องจากความเข้มข้นของกรดที่มากขึ้นก่อให้เกิดความรุนแรงของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการเปลี่ยนเจนิสตินไปเป็นเจนิสเตอีนในปริมาณที่มากขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามสารละลายกรดเข้มข้น 1.0 N มีความเข้มข้นน้อยเกินไปที่จะไฮโดรไลซ์กลัยโคไซด์ไปเป็นอะกลัยโคน จึงไม่พบความแตกต่างของปริมาณเจนิสเตอีนในถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำและผ่านการแช่ในสารละลายกรดเข้มข้น 1.0 N ในขณะที่ปริมาณสารเจนิสตินจะเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อแช่ถั่วเหลืองในสารละลายกรดเข้มข้น 1.0 N และ 1.9 N เนื่องจากสภาวะกรดที่เข้มข้นมากขึ้นจะสามารถไฮโดรไลซ์สารอนุพันธ์กลัยโคไซด์ชนิดอื่นๆเปลี่ยนมาเป็นสารเจนิสตินได้มากขึ้น แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าจะไม่พบการเพิ่มขึ้นของสารเจนิสตินในถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ในกรดเข้มข้น 2.6 N ซึ่งอาจจะมาจากสาเหตุ 2 ประการคือ มีการทำลายพันธะไกลโคซิดิคทำให้เกิดการเปลี่ยนสารเจนิสตินไปเป็นเจนิสเตอีน โดยพบว่าปริมาณสารเจนิสเตอีนมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 28.10 หรือสารละลายกรดที่ความเข้มข้น 2.6 N มีความเข้มข้นที่รุนแรงเกินไป ทำให้เกิดการสลายตัวของอนุพันธ์กลัยโคไซด์รวมทั้งเจนิสติน โดยจากโครมาโตแกรมจะพบว่าอนุพันธ์กลัยโคไซด์อื่นๆ มีปริมาณที่ลดลงทั้งสิ้น

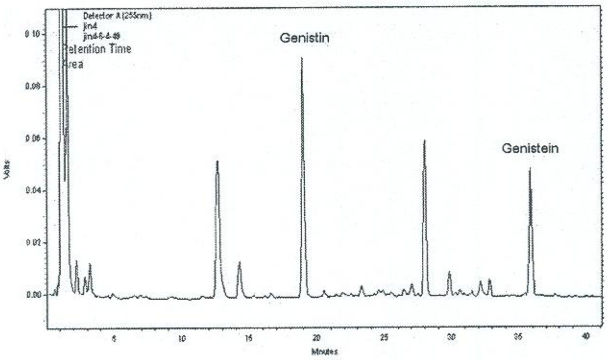
ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะที่แสดงถึงการใช้ความร้อนภายใต้สภาวะความเป็นกรด เพื่อทำให้อนุพันธ์กลัยโคไซด์ของไอโซฟลาโวนสลายตัวเป็นอะกลัยโคน รวมทั้งมีรายงานถึงความไม่คงตัวของไอโซฟลาโวนภายใต้สภาวะความร้อนและสารละลายกรดด้วย (Wang *et al*., 1990)

3. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในสภาวะกรดกับปริมาณสารสำคัญ

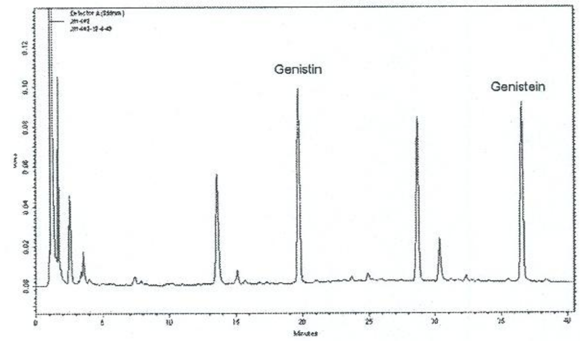
A



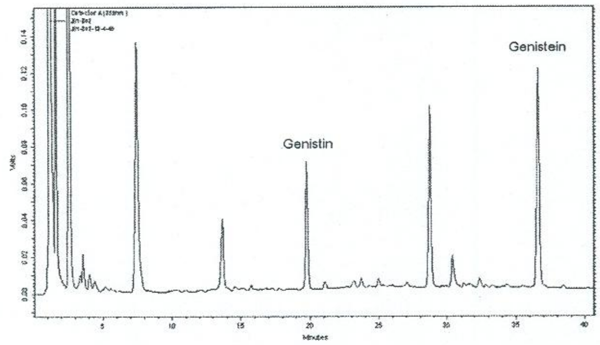
B


Detector A (255nm)
jin4
jin4-6-4-49
Retention Time
Area
Genistin
Genistein
Volts
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
5
10
15
20
25
30
35
40
Minutes

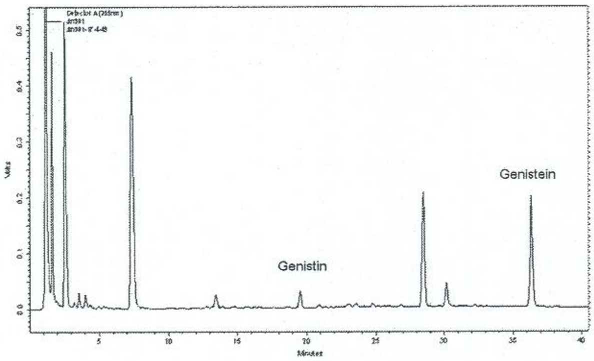
C


Detector A (255nm)
Genistin
Genistein
Volts
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Minutes

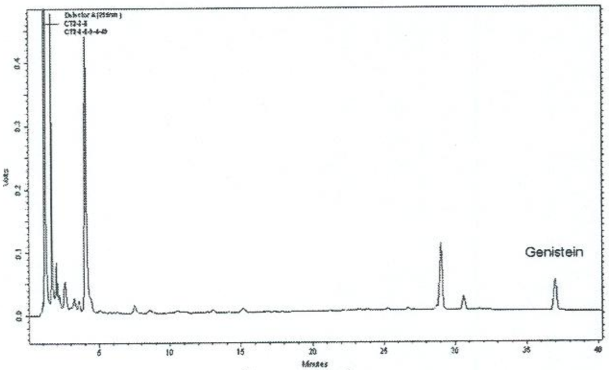
D


Detector A (255nm)
Genistein
Genistin
Volts
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
5
10
15
20
25
30
35
40
Minutes

E


Detector A (255nm)
Genistein
Genistin
Volts
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
5
10
15
20
25
30
35
40
Minutes

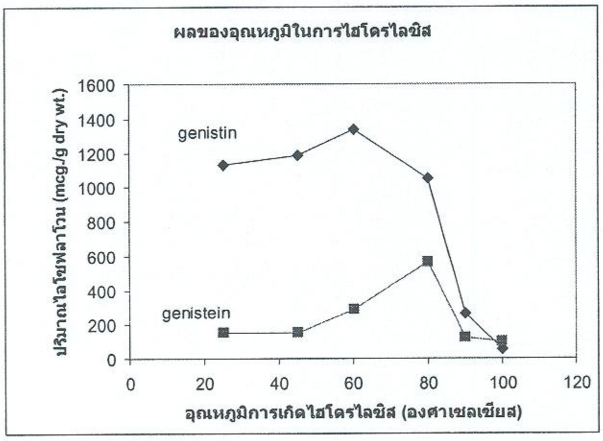
F



รูปที่ 35 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดถั่วเหลืองที่ผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N : A เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง, B เขย่าที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, C เขย่าที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, D เขย่าที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, E เขย่าที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, F เขย่าที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 34 แสดงปริมาณสารเจนิสเตอีน และเจนิสตินในสารสกัดถั่วเหลือง (n =3) เมื่อผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 N ที่อุณหภูมิต่างๆกันเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของกรด (N)	ระยะเวลาที่เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (ชั่วโมง)	อุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยา (องศาเซลเซียส)	ปริมาณไอโซฟลาโวน (µg/g dry weight) (n = 3)	
			เจนิสติน	เจนิสเตอีน
1.0	3	25	1130.36 ± 150.29	149.84 ± 17.88
1.0	3	45	1183.72 ± 14.42	153.83 ± 20.50
1.0	3	60	1339.48 ± 44.39	284.65 ± 54.02
1.0	3	80	1048.24 ± 26.84	562.61 ± 18.90
1.0	3	90	261.34 ± 51.20	124.27 ± 5.12
1.0	3	100	56.68 ± 1.24	100.55 ± 26.41



รูปที่ 36 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองกับอุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่าการแช่ถั่วเหลืองบดในสารละลายกรดเข้มข้น 1.0 N เป็นเวลา 3 ชั่วโมงไม่ก่อให้เกิดการไฮโดรไลซ์สารเจนิสตินเป็นเจนิสเตอีน แม้จะเพิ่มระยะเวลาการแช่ถั่วเหลืองเป็น 8 ชั่วโมงก็ตาม เนื่องจากกรดมีความเข้มข้นต่ำเกินไป จึงไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้

จากการทดลองนี้พบว่าเมื่อทำการแช่ถั่วเหลืองบดในสารละลายกรดเข้มข้น 1.0 N เป็นเวลา 3 ชั่วโมงโดยเพิ่มอุณหภูมิของสภาวะการแช่ให้สูงขึ้น จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง เนื่องจากอุณหภูมิมีผลกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายกรด โดยพบว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้รุนแรงมากขึ้น โดยปริมาณสารเจนิสเตอีนจะเพิ่มขึ้นเป็นลำดับตามการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจาก 25°C จนถึง 80°C ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของเจนิสตินเป็นเจนิสเตอีน อย่างไรก็ตามเรายังพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารเจนิสตินในช่วงอุณหภูมิ 25°C จนถึง 60°C ทั้งนี้น่าจะเกิดจากการสลายตัวของอนุพันธ์กลัยโคไซด์อื่นๆในถั่วเหลือง โดยเฉพาะอนุพันธุ์มาโลนิลเจนิสตินไปเป็นสารเจนิสตินและเจนิสเตอีนตามลำดับ (Wang *et al.*, 1990) โดยอัตราการสลายตัวของอนุพันธ์มาโลนิลเจนิสตินไปเป็นเจนิสตินนั้นสูงกว่าอัตราการสลายตัวของเจนิสตินไปเป็นเจนิสเตอีนอยู่มาก จึงทำให้ปริมาณสารเจนิสเตอีนที่ตรวจพบมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นไปในทิศทางเดียวกับการเพิ่มขึ้นของเจนิสเตอีน การลดลงของปริมาณเจนิสตินที่อุณหภูมิ 80°C ในขณะที่ปริมาณเจนิสเตอีนยังคงสูงขึ้นตามลำดับ น่าจะสืบเนื่องมาจากภาวะอุณหภูมิดังกล่าวมีความรุนแรงเกินไปกับสารกลัยโคไซด์ทำให้เกิดการสลายตัวของอนุพันธ์กลัยโคไซด์ รวมถึงอนุพันธ์มาโลนิลเจนิสตินซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเจนิสติน ทำให้อัตราการสร้างสารเจนิสตินลดลงต่ำกว่าอัตราการสลายตัวของเจนิสตินไปเป็นเจนิสเตอีน เนื่องจากปริมาณสารตั้งต้นของเจนิสติน (อนุพันธ์มาโลนิลเจนิสติน) ที่ลดลง อย่างไรก็ตามพบว่าอุณหภูมิที่สูงกว่า

80°C จะทำให้ปริมาณสารสำคัญทั้งสองชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากข้อมูลบนโครมาโตแกรมพบว่าอุณหภูมิในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่สูงกว่า 80°C ส่งผลให้เกิดการทำลายสารไอโซฟลาโวนเกือบทุกชนิดในถั่วเหลือง

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

(Conclusion)

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารเจนิสตินและสารเจนิสเตอีนในถั่วเหลือง ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ที่มีความแม่นและความเที่ยง และสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารเจนิสเตอีนและเจนิสตินได้โดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่นๆในตัวอย่าง จากการตรวจสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ (Method Validation) หาปริมาณสารเจนิสตินและเจนิสเตอีน พบว่าวิธีการวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจง มีความถูกต้องและแม่นยำ ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 35 ตารางสรุปค่าการตรวจสอบความแม่นและน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเจนิสเตอีนและเจนิสติน

Parameters	**สารมาตรฐาน**	
	เจนิสเตอีน	**เจนิสติน**
ความจำเพาะเจาะจง	มี	มี
ขีดจำกัดของการตรวจวัด	0.5 µg/mL	N/A
ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ	1.0 µg/mL	N/A
ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง - Linear equation - Correlation coefficient (r^2)	 y = 14155x +25513 0.999	 y = 7615.6x +36445 0.9992
ความแม่น (%Recovery) - ภายในวันเดียว - ระหว่างวัน	 95.72 96.42-101.74	 103.03 98.02-112.84
ความเที่ยง (%RSD) - ภายในวันเดียว - ระหว่างวัน	 1.36 0.74-4.39	 1.71 0.24-2.78

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง จะเน้นสารสำคัญ 2 ชนิด คือ สารเจนิสติน และสารเจนิสเตอีน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน คือ

ตอนที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญไอโซฟลาโวนก่อนการบดถั่วเหลือง เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการแช่น้ำกับปริมาณสารสำคัญ และความสัมพันธ์ของอุณหภูมิในการแช่น้ำและระยะเวลาของการแช่กับปริมาณสารสำคัญ

จากผลการศึกษา พบว่าปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการแช่น้ำ โดยปริมาณสารเจนิสเตอีนจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการแช่น้ำ เนื่องจากการเกิดไฮโดรไลซิสของสารเจนิสตินและอนุพันธ์ (มาโลนิลเจนิสตินและอะเซทิลเจนิสติน) โดยการทำงานของเอนไซม์ ß-glycosidase ที่เปลือกด้านในของถั่วเหลืองซึ่งสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25°C ถึง 45°C พบว่า ณ อุณหภูมิดังกล่าว ปริมาณสารเจนิสตินลดลงตามลำดับตามระยะเวลาการแช่น้ำ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ ß-glycosidase ในการทำลายพันธะกลัยโคซิดิคเพื่อตัดหมู่น้ำตาลออกจากโมเลกุล จึงเกิดการเปลี่ยนเจนิสตินเป็นเจนิสเตอีนนั่นเอง

จากผลการศึกษา พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาในการแช่น้ำมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารสำคัญในถั่วเหลือง เมื่อแช่ถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 60°C จะพบการเพิ่มขึ้นของสารเจนิสเตอีนเป็นลำดับ ในขณะที่ปริมาณของสารเจนิสตินจะลดลงตามระยะเวลาการแช่น้ำ ซึ่งน่าเป็นผลมาจากความร้อนไปทำลายพันธะกลัยโคซิดิคทำให้เกิดการเปลี่ยนกลัยโคไซด์ป็นอะกลัยโคน เนื่องจากมีรายงานว่าเอนไซม์ ß-glycosidase จะถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°C ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณอะกลัยโคนจึงไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวที่เปลือกด้านในของถั่วเหลือง โดยปริมาณการเพิ่มขึ้นของเจนิสเตอีนไม่จำเป็นต้องเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการลดลงของเจนิสติน เนื่องจากสารเจนิสตินสามารถมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้จากการสลายตัวของอนุพันธ์กลัยโคไซด์อื่นๆในถั่วเหลือง โดยเฉพาะอนุพันธุ์มาโลนิลเจนิสติน เนื่องจากอนุพันธ์มาโลนิลมีความคงตัวต่ำในความร้อน ดังนั้นสัดส่วนการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของปริมาณสารสำคัญทั้งสองขึ้นอยู่กับอัตราการสลายตัวของอนุพันธ์มาโลนิลเจนิสตินไปเป็นเจนิสติน กับอัตราการสลายตัวของเจนิสตินไปเป็นเจนิสเตอีน โดยมีปัจจัยต่างๆร่วมด้วย อย่างไรก็ตามการแช่ถั่วเหลืองข้ามคืนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เกิดการเปื่อยยุ่ยของเมล็ดถั่วเหลือง ส่งผลให้เกิดการสูญเสียสารไอโซฟลาโวนกับน้ำเป็นจำนวนมาก ในการทดลองนี้จึงไม่สามารถนำถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมงไปตรวจหาปริมาณสารสำคัญได้

จากการทดลองตอนที่ 1 พบว่าการแช่น้ำที่ 60°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เป็นสภาวะเบื้องต้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สารสำคัญในถั่วเหลืองก่อนการบดเปลี่ยนรูปทางเคมีจากกลัยโคไซด์เป็นอะกลัยโคน เพื่อให้สารสกัดจากถั่วเหลืองมีสารสำคัญที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

ตอนที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญไอโซฟลาโวนหลังการบดถั่วเหลือง เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการแช่ถั่วเหลืองในสารละลายกรดกับปริมาณสารสำคัญ ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดกับปริมาณสารสำคัญ และ ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในสภาวะกรดกับปริมาณสารสำคัญ

จากการทดลองพบว่า หากแช่ถั่วเหลืองในกรดที่มีระดับความเข้มข้นต่ำ 1.0 N จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารเจนิสเตอีนในถั่วเหลือง แม้จะแช่ถั่วเหลืองในกรดเป็นเวลาถึง 8 ชั่วโมง เนื่องจากความเข้มข้นของกรดที่ 1.0 N เป็นความเข้มข้นที่ต่ำเกินไปจึงไม่ก่อให้เกิดการไฮโดรไลซ์เจนิสตินไปเป็นเจนิสเตอีน อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อทำการแช่ถั่วเหลืองบดในสารละลายกรดเข้มข้น 1.0 N เป็นเวลา 3 ชั่วโมงโดยเพิ่มอุณหภูมิของสภาวะการแช่ให้สูงขึ้น จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง เนื่องจากอุณหภูมิมีผลกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายกรด โดยพบว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้รุนแรงมากขึ้น โดยปริมาณสารเจนิสเตอีนจะเพิ่มขึ้นเป็นลำดับตามการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจาก 25°C จนถึง 80°C ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของเจนิสตินเป็นเจนิสเตอีน ในขณะที่ยังพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารเจนิสตินในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว เนื่องจากการสลายตัวของอนุพันธ์กลัยโคไซด์อื่นๆในถั่วเหลืองไปเป็นเจนิสตินนั่นเอง พบว่าอุณหภูมิที่สูงกว่า 80°C ในสภาวะกรดจะทำให้ปริมาณเจนิสเตอีนและเจนิสตินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากข้อมูลบนโครมาโตแกรมพบว่าอุณหภูมิในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่สูงกว่า 80°C ส่งผลให้เกิดการทำลายสารไอโซฟลาโวนเกือบทุกชนิดในถั่วเหลือง

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกรดมีผลต่อปริมาณสารสำคัญในถั่วเหลืองทั้งต่อปริมาณของสารเจนิสเตอีนและเจนิสติน โดยปริมาณสารเจนิสเตอีนจะเพิ่มขึ้นเป็นลำดับตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของกรด เนื่องจากความเข้มข้นของกรดที่มากขึ้นก่อให้เกิดความรุนแรงของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการเปลี่ยนเจนิสตินไปเป็นเจนิสเตอีนในปริมาณที่มากขึ้นด้วย พบว่าสารละลายกรดที่ความเข้มข้น 2.6 N แม้จะทำให้สารเจนิสเตอีนเพิ่มขึ้น แต่ก็มีความเข้มข้นที่รุนแรงเกินไป ทำให้เกิดการสลายตัวของอนุพันธ์กลัยโคไซด์รวมทั้งเจนิสติน โดยจากโครมาโตแกรมจะพบว่าอนุพันธ์กลัยโคไซด์อื่นๆมีปริมาณที่ลดลงทั้งสิ้น

จากการทดลองตอนที่ 2 พบว่าการแช่ถั่วเหลืองในสารละลายกรดความเข้มข้น 1.0 N ที่ความร้อน 80°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เป็นสภาวะเบื้องต้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สารสำคัญในถั่วเหลืองหลังการบดให้เปลี่ยนรูปทางเคมีของกลัยโคไซด์ไปเป็นอะกลัยโคน เพื่อให้สารสกัดจากถั่วเหลืองมีสารสำคัญที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

การศึกษานี้ทำการทดสอบความคงตัวของไอโซฟลาโวนในเมล็ดถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านการแปรรูปเพื่อศึกษาถึงปัจจัยต่างๆทีละปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของไอโซฟลาโวนทั้งก่อนการบดและหลังการ

บดเมล็ดถั่วเหลือง โดยมุ่งเน้นการเพิ่มปริมาณสัดส่วนของอะกลัยโคน เพื่อนำผลการศึกษาที่ได้ถ่ายทอดต่อไป เพื่อประยุกต์ใช้เป็นเทคนิคการสกัดในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

หากการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลในการเพิ่มสัดส่วนอะกลัยโคนในสารสกัดจากถั่วเหลือง สามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้ปัจจัยต่างๆร่วมกัน แล้วพัฒนาไปสู่วิธีการสกัดที่สามารถทำให้ได้สารสกัดไอโซฟลาโวนที่อยู่ในรูปอะกลัยโคนได้ทั้งหมด จะเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับขั้นตอนการผลิตในระดับกึ่งอุตสาหกรรมต่อไป และหากสารสกัดนี้ถูกนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนสำหรับผู้ป่วย จะลดปัญหาการเลือกซื้อวัตถุดิบเพื่อการผลิต ซึ่งจะมีความแตกต่างในปริมาณสารสำคัญตั้งต้น โดยพบว่าสัดส่วนของกลัยโคไซด์ต่ออะกลัยโคนจะแตกต่างกันในถั่วเหลืองต่างสายพันธุ์ ทั้งยังพบความแตกต่างของปริมาณสารสำคัญในถั่วเหลืองสายพันธ์เดียวกัน แต่มีความแตกต่างในเรื่องพื้นที่เพาะปลูก ลักษณะการเพาะปลูก หรือแตกต่างในเรื่องฤดูกาลเก็บเกี่ยว ตลอดจนระยะเวลาการเก็บรักษาวัตถุดิบทั้งในเรื่องอุณหภูมิและความชื้นในระหว่างการเก็บ ทำให้การผลิตเพื่อใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนจะมีความยุ่งยากในอนาคตในเรื่องคุณภาพความไม่สม่ำเสมอของวัตถุดิบ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเนื่องไปยังการกำหนดขนาดรับประทาน และการคำนวณค่าเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดไอโซฟลาโวน

เอกสารอ้างอิง

(References)

Aldercreutz, H. (1990) Western diet and western diseasesK some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 201, 3-23.

Adlercreutz, H., Goldin, BR., Gorbach, SL. (1995) Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J. Nutr.* 125, 757S-770S.

Adlercreutz, H., Yamada, T., Wahala, K., Watanabe, S. (1999) Maternal and neonatal phytoestrogens in Japanese women during birth. *Am. J. Obstst. Glynecol.* 180, 737-743.

Allred, C.D., Ju, Y.H., Allred, K.F., Chang, J., and Helferich, W.G. (2001) Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis.* 22 (10), 1667-1673.

Anderson, J.J., Ambrose W.W., and Garner, S.C. (1995) Orally dosed genistein from soy and prevention of cancerous bone loss in two overieoctomized rat models. *J. Nutr.* 123, 799S.

Badger, T.M., Ronis, M.J.J., Hakkak, R., Rowlande, J.C., Korovnan, S. (2002) The health consequences of early soy consumption. *J. Nutr.* 132, 559S-565S.

Barnes, S., Grubbs, C., Setchell, K.D., and Carlson, J. (1990) Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.* 347, 239-253.

Barnes, S., Kirk, M., and Coward, L. (1994) Isoflavones and their conjugates in soy foods : Extraction conditions and analysis by HPLC-Mass Spectrometry. *J. Agri. Food Chem.* 42, 2466-2474.

Barnes, S., Kirk, M., and Coward, L. (1994) Isoflavones and their conjugates in soy food. *J. Agric. Food Chem.* 42, 466-478.

Barnes, S. (1995) Effect of genistein on In vitro and In vivo models of cancer. *J Nutr.* 125, 777S-783S.

Barnes, S., Coward, L., Kirk, M., and Sfakianos, J. (1998a) HPLC-mass spectrometry analysis of isoflavones. Proc. Soc. *Exp. Biol. Med.* 217, 254-262.

Barnes, S., Coward, L., Kirk, M., and Sfakianos, J. (1998b) HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217, 263-273.

Barnes, S., Kim, H., and Xu, J. (1999) Soy in the prevention and treatment of chronic diseases. *J. Med. Foods.* 2, 295-308.

Birt, D.F., Frendrich, S., and Wang, W. (2001) Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids pharmacology and therapeutics. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 157-177.

Brown, J.P. (1988) Hydrolysis of glycosides and esters. In Role of the gut flora in toxicity and cancer (pp. 109-144). San Diego, CA; Academic Press.

Cassidy, A., Bringham, S., and Setchell, K.D.R. (1994) Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 333-340.

Chien, JT., Hsieh, HC., Kao, TH., Chen, B. (2005) Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food Chem. 91*, 425-434.

Chiou, R.Y., and Cheng, S.L. (2001) Isoflavone transformation during soybean Koji preparation and subsequent Miso fermentation supplemented with ethanol and NaCl. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3656-3660.

Clarke, D.B., Lloyd, A.S., Botting, N.P., Oldfield, M.F., Needs, P.W., and Wiseman, H.W. (2002) Measurement of intact sulfate and glucuronide phytoestrogen conjugates in human urine using isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with C13 isoflavone internal standards. *Anal. Biochem.* 309, 158-172.

Col. N. F., Hirola, L. K., Orr, H. K., Erban, J. K., Wong, J. B., Lau, J. (2001) Hormone replacement therapy after breast cancer: a systemic review and quantitative assessment of risk. *J. Clin. Oncol.* 19, 2357-2363.

Coward, L., Barnes, NC., Setchell, KD., Barnes, S. (1993) Genistein, daidzein and their b-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and asian diets. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1961-1967.

Coward, L., Kirk, M., Albin, N., and Barnes, S. (1996) Analysis of plasma isoflavones by reversed-phase HPLC-multiple reaction ion monitoring-mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta.* 247, 121-142.

Coward, L., Smith, M., Kirk, M., Barnes, S. (1998) Chemical modification of isoflavone in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1486-1491.

Daniel, R.D., Hebron, C.C., Mora, I.C., Lee, H.C. (1999) Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Natl. Center Tox. Res.* 28, 300-307.

Eldridge, C.A., Kwolek, W.F. (1982) Soybean isoflavones: Effect of environment and variety on composition. *J. Agric. Food Chem.* 31, 394-396.

Food and Drug Administration, U.S., Department of Health and Human Services. FDA Talk Paper: FDA Approves New Health Claim for Soy Protein and Coronary Heart Disease: T99-48, October 20, 1999; http://fda.gov.

Franke, A.A., Custer, L.J., Cerna, C.M., and Narala, K. (1995) Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. *Proc. Soc. Exp. Boil. Med.* 208 (1), 18-26.

Friend, D.R., and Chang, G.W. (1984) A colon-specific drug-delivery system based on drug glycosides and the glycosidases of colonic bacteria. *J. Med. Chem.* 27, 261-266.

Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamaru, H., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (1996) Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food Chem. Toxicol.* 34, 457-461.

Griffith, A.P., Collison, M.W. (2001) Improve methods for extraction and analysis of isoflavones from soy containing foods and nutritional supplements by reverse-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr A.* 913, 397-43.

Hawksworth, G., Drasar, B.S., and Hill, M.J. (1971) Intestinal bacteria and hydrolysis of glycosidic bonds. *J. Med. Microbiol.* 4, 451-459.

Hendrich, S., and Lee, K. (1993) Antioxidant and anticarcinogenic effect of soybean isoflavones. *Int. News Fats Oil Related Mater.* 4, 529 (abstract).

Holder, C.L., Churchwell, M.I., and Doerge, D.R. (1999) Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS. *J. Agri. Food Chem.* 47, 3764-3770.

Huntley, A.L., Ernst, E. (2004) Soy for the treatment of perimenopausal symptoms-a systematic review. *Maturitas.* 47, 1-9.

Hutchins, A.M., Slavin, J.L., and Lampe, J.W. (1995) Urinary isoflavonoid estrogen and lignin excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. Am. Diet. Assoc.* 95, 545-551.

Hutchins, A.M., Slavin, J.L., Lampe, J.W. (1998) Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1492S-1495S.

Imizu, T., Piskula, MK., Osawa, S. (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* 130, 1695-1699.

Jackson, C.J.C., Dini, J.P., Lie, L., Kingsmill, C., Faulkner, H., and DeGrandis, S. (1999) The influence of variety, location and growth year on phytoestrogen levels in Ontario soybeans and processed food products. *J. Med. Food.* 2, 3-4.

Jackson, C.J.C., Dini, J.P., Lavendier, C., Rupasinghe, H.P.V., Faulkner, H., Poysa, V., Buzzell, D., DeGrandis, S. (2002) Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Proc. Bio.* 37, 1117-1123.

Kao, T.H., Chen, B.H. (2002) An improved method for determination of isoflavone in soybean powder by liquid chromatography. *Chromatographia.* 56, 423-430.

Kao, T.H., Lu, Y.F., Hsieh, H.C., Chen, B.H. (2004) Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. *Food Res. Int.* 37, 891-900.

Kudou, S., Fleury, Y., Welti, D., Okubo, K. (1991) Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (Glycine max Merrill). *Agri. Biol. Chem.* 155, 2227-2233.

Liggins, J., Bluck, L.J.C., Coward, W.A., and Bingham, S.A. (1998) Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Anal. Biochem.* 264, 1-7.

Liu, K.S. (1997) Soybeans: Chemistry, technology, and utilization. New York: Chapman and Hall.

Mahungu, S.M., Diaz-Mercado, S., Li, J., Schwenk, M., Singeltary, K., Faller, J. (1999) Stability of isoflavones during extrusion processing of corn or soy mixture. *J. Agric. Food Chem.* 47, 279-284.

Matsuura, M.A., Obata, A. (1989) Objectinable flavor of soymilk observed during the soaking of soybeans and its control. *J. Food. Sci.* 54, 602-605.

Matsuura, M., Obata, A. (1993) ß-glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *J. Food Sci.* 58, 144-147.

Matsuura, M., Sasaki, J., Murao, S. (1995) Studies on ß-glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1623-1327.

Maubach, J., Bracke, M.E., Heyerick, A., Depypere, H.T., Serreyn, R.F., Mareel, M.M., Keukeleire, D. (2003) Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr B.* 784, 137-144.

Mazur, W., Fotsis, T., Wahala, K., Ojala, S., Salakka, A., and Adlercreuta, H. (1996) Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol, and lignans in food samples. *Anal. Biochem.* 233, 169-180.

Mcclain, R.M., Wolz, E., Davidovich, A., Pfannkuch, F., Edwards, J.A., and Bausch, J. (2006) Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. *Food Chem. Tox.* 44, 56-80.

Mcclain, R.M., Wolz, E., Davidovich, A., Pfannkuch, F., and Bausch, J. (2005) Subchronic and chronic safety studies with genistein in dogs. *Food Chem. Tox.* 43, 1461-1482.

Messina, M, and Barnes, S. (1991) The role of soy products in reducing risk of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 541-546.

Messina, M.J., Pershy, V., Setchell, K.D.R., and Barnes, S. (1994) Soy intake and cancer risk: a review of the In vitro and In vivo data. *Nutr Cancer.* 21, 113-131.

Messina, M.J., and Loprinzi, C.L. (2006) Soy for breast cancer survivors: A critical review of the literature. *J. Nutr.*139: 3095S – 3108S.

Morton, M.S., Arisaka, O., Miyake, N., Morgan, L.D., and Evans, B.A.J. (2002) Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J. Nutr.*132: 3168 – 3171.

Murphy, P.A., Barua, K., and Hauck, C.C. (2002) Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. *J. Chromatogr B.* 777, 129-138.

Nagata, C., Takatsuka, N., Kawakami, N., Shimizu, H. (2001) Soy product intake and hot flashes in Japanese women: results from a community-based prospective study. *Am. J. Epid.* 153, 790-733.

Nguyenle, T., Wang, E., and Cheung, A.P. (1995) An investigation on the extraction and concentration of isoflavones in soy-based products. J. Pharm. *Biomed. Anal.* 14, 221-232.

Normura, A., Henderson, B.E., and Lee, J. (1978) Breast cancer and diet among the Japanese in Hawaii. *Am. J. Clin. Nutr.* 31, 2020-2025.

Okubo, K., Kobayzshi, Y., and Takahashi, K. (1983) Improvement of soymilk and tofu process on the behavior of undesirable taste component such as glycosides. *Up to Date Food Processing*. 18, 16-22.

Pandjaitan, N., Hettiarachy, N., Ju, ZY. (2000) Enrichment of genistein in soy protein concentrate with ß-glucosidases. *J. Food Sci.* 65, 401-407.

Park, KY., Alencar, MS., Nery, AI., Auiar, LC., Pacheco, TARC. Enrichment of isoflavone aglycone in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β-glucosidase. (2001) *Food Sci. Ind.* 34, 14-99.

Potter, S.M., Buam, J.A., Teng, H., Stillman, R.J., Shay, N.F., and Erdman, J.W. (1998) Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1375S-1379S.

Prasad, S.V., Ashwini, L., Arun, S. (2004) Radiation –induced enhancement of antioxidant content of soybean (Glycine max Merrill). *J. Agric. Food Chem.*52, 3385-3388.

Richelle, M., Kirschner, A.S., Cassidy, A., Heuvi, J.E., Pridmore-Merten, S., Bodenstab, S., Enslen, M., and Offord, E.A. (2002) Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by beta-glycosidase does not alter plasma and urine pharmacokinetics in post-menopausal women. *J. Nutr.* 132, 2587-2592.

Riou, C., Salmon, J.M., Vallier, M.J., Gunata, Z., Barre, P. (1998) Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant beta-glucosidase from Aspergillus oryzae. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3607-3614.

Robin, YY., Chiou. Cheng, SL. (2001) Isoflavone transformation during soybean koji preperation and subsequent miso fermentation supplementated with ethanol and NaCl. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3656-3660.

Schmid, D., and Zulli, F., (2003) Penetration and metabolism of isoflavones in human skin. *Cosmetics and Toiltries magazine.* 118, 71-76.

Setchell, K.D.R., and Andercreutz, H. (1988) Mammalian lignans and phytoestrogens. Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In: Role of gut flora in toxicity and cancer (Rowland, I.R., ed.), pp. 315-345. Academic Press, London, UK.

Setchell, K.D.R., Brown, N.M., Desai, P., Zimmer, L., Wolfe, B.E., and Wrashear, W.T. (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J. Nutr.* 131, 1362S-1375S.

Setchell, K.D.R., Lydeking-Olson, E. (2003) Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Amer. J. Clin. Nutr.* 78, (3 Suppl): 593S-609S.

Simonne, A.H., Smith, M., Weaver, D.B., Vail, T., Barnes, S., Wei, C.I. (2000) Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame) during processing. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6061-6069.

Slavin, J.L., Karr, S.C., Hutchins, A.M., and Lampe, J.W. (1998) Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1492S-1495S.

Somekawa, Y., Chiguchi, M., Ishibashi, T., Aso, T. (2001) Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet. Gynecol.* 97, 109-115.

Taylor, J.I., Grace, P.B., Bingham, S.A. (2005) Optimization of conditions for the enzymatic hydrolysis of phytoestrogen conjugates in urine and plasma. *Anal. Chem.* 341, 220-229.

Toda, T., Sakamoto, A., Takayanagi, T., and Yokotsuka, K. (2000) Changes in isoflavone compositions of soybean foods during cooking process. *Food Sci. Technol. Res.* 6(4), 314-319.

Toda, T., Sakamota, A., Takayanaki, T., and Yokatasuka, K. (2001) Changes in isoflavone composition of soybean during soaking in water. *Food Sci. Tech. Res.* 6, 314-319.

Ungar, Y., Osundahunsi, O.F., and Shimoni, E. (2003) Thermal stability of genistein and diadzein and its effects on their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4394-4399.

Wakai, K., Egami, I., Kata, K., Kawamura, T., Tamakoshi, A., Lin, Y., Nakayama, T., Wada, M., and Ohno, Y. (1999) Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. *Nutr. Cancer.* 33, 139-145.

Wang, G.J., Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, G.M., and Carnan, A.S. (1990) A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J. Agri. Food Chem.* 38, 185-190.

Wang, H., and Murphy, PA. (1994) Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agri. Food Chem.* 42, 1666-1673.

Wang, H., and Murphy, PA. (1994) Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J. Agri. Food Chem.* 42, 1674-1677.

Wang, H., and Murphy, PA. (1996) Mass balance study of isoflavone during soybean processing. *J. Agri. Food Chem.* 44, 2377-2383.

Wang, C., Ma, Q., Pagadala, S., Sherrard, M., Krishnan, P.G. (1998) Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 44, 2377-2383.

Walter, ED. (1941) Genistin (an isflavone glucoside) and its aglycone, genistin, from soybeans. *J. Am. Chem. Soc.* 63, 3273- 3276.

Wardhari, D.H., Vazquez, J.A., Pandiella, S.S. (2008) Kinetics of daidzin and genistin transformations and water absorption during soybean soaking at different temperatures. *Food Chem.* 111, 13-19.

www.fujicco.co.jp/english/

Xu, X., Keecha, S.H., Wang, H.J., Murphy, P.A., and Hendrich, S. (1995) Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J. Nutr.* 125, 2307-2315.

Zava, D., Duwe, G. (1997) Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavanoids in human breast cancer cells. *Nutr. Cancer.* 27, 31-40.

Zhang, Y., Wang, G.J., Song, T.T., Murphy, P.A., Hendrich, S. (1999) Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein, and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. *J. Nutr.* 129, 957-962.

Zheng, W., Dai, Q., Custer, L.J., Shu, X.O., Wen, W.Q., Jin, F., and Franke, A.A. (1997) Urinary excretion of isoflavonoids and the risk of breast cancer. *Canc. Epid. Biomarkers Prev.* 8, 35-40.

ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์. (2544) ประโยชน์ของไฟโตเอสโตรเจน. *วารสารโภชนบำบัด*. 12, 8-19.

1. ชื่อ นางจารุวรรณ **นามสกุล** ธนวิรุฬห์

Name: Mrs. Charuwan **Last name:** Thanawiroon

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100600856988

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 7

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ถนนวาริน-เดชอุดม กม. 10
อำเภอวารินชำราบ อุบลราชธานี 34190
โทรศัพท์ 045-353611 /โทรสาร 045-288384

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2546	เอก	Ph.D	Medicinal and Natural Product Chemistry	University of Iowa	USA
2542	โท	M.S.	Medicinal and Natural Product Chemistry	University of Iowa	USA
2539	ตรี	ตรี	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

6.สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างวุฒิการศึกษา)

Analytical chemistry : specialized on the method development of LC/MS method

7. ประสบการณ์ในงานวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-ไม่มี-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.2.1 การสกัดและแยกบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง (Extraction and purification of biological compounds, isoflavones, from soybean)

ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2548

สถานภาพในการวิจัย : อยู่ระหว่างการส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

7.2.2 การสกัด แยกบริสุทธิ์ และศึกษาความคงตัวทางเคมี ของสารสกัดสมุนไพรเพื่อรักษาอาการผมร่วง และเร่งการงอกของผมใหม่ (Extraction, purification and chemical stability study of herbal extracts for hair loss prevention and hair growth promotion) ภายใต้แผนงานวิจัย เรื่องการวิจัย และพัฒนาเวชสำอางจากสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อป้องกันและรักษาอาการผมร่วงและเร่งการงอกของผมใหม่ (Research and Development for Hair Loss Prevention and Hair Growth Promotion Cosmeceuticals from Natural Products)

ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551-2553