



**DEVELOPMENT OF A CONTINUOUS-FLOW *IN VITRO*
METHOD FOR ESTIMATING THE BIOAVAILABILITY OF
CALCIUM**

WUTTHIKA KITTHIKHUN
z

อธิษัฒนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(APPLIED ANALYTICAL AND INORGANIC CHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2001

ISBN 974-04-0903-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH

W993d

2001

c.2

4136691 SCAI/M : MAJOR APPLIED ANALYTICAL AND INORGANIC CHEMISTRY;
M. Sc.(APPLIED ANALYTICAL AND INORGANIC CHEMISTRY)

KEY WORDS : *IN VITRO* / BIOAVAILABILITY / CALCIUM

WUTTHIKA KITTHIKHUN: DEVELOPMENT OF A CONTINUOUS- FLOW
IN VITRO METHOD FOR ESTIMATING THE BIOAVAILABILITY OF CALCIUM.
THESIS ADVISORS: JUWADEE SHIOWATANA, Ph.D. DUANGJAI NACAPRICHA,
Ph.D. 106 p. ISBN 974-04-0903-2

In this study, a simple, rapid and cost effective *in vitro* method is presented as an alternative to human and animal *in vivo* methods for estimating the availability of minerals. This research, then, utilizes the *in vitro* method based on Miller which was developed into a continuous-flow system for the estimation of calcium bioavailability.

The method explored here involves a simulated gastric digestion with pepsin, followed by dialysis occurring during a continuous-flow of dialysing solution (NaHCO_3) for 2 h. Gradual change of pH, similar to that occurring in the gastrointestinal tract, was obtained by optimization of flow rate and concentration of NaHCO_3 . The best condition of concentration and flow rate of NaHCO_3 to obtain a pH change of original gastric pH of 2.0 to 7.0-7.5 of intestinal pH was 0.001 M and 2-8 mL/min respectively are necessary. The dialysate collected in fractions was analysed to determine total amount of dialysed minerals and the percentage of dialysed minerals (dialysability) was also obtained. A continuous-flow *in vitro* method is believed to be a closer simulation of *in vivo* physiological conditions than the *in vitro* method based on equilibrium dialysis, because dialysable components are continuously removed from the pancreatic digestion mixture.

The proposed continuous-flow *in vitro* method was used to estimate calcium bioavailability for three different types of calcium source (calcium carbonate, calcium citrate and dissolved calcium in vinegar). The dialysability order was dissolved calcium in vinegar > calcium citrate > calcium carbonate. Effect of pH, initial calcium concentration and addition time of pancreatin bile extract mixture (PBE) on the dialysability were investigated. There was a decrease in the dialysability of calcium with increasing pH for all samples. Initial concentration of calcium affected pH change, which in turn influenced the dialysability of calcium. The degree of this influence was dependent on the type of sample. The time of addition of PBE had no significant effect on the dialysability of calcium.

When compared to the equilibrium *in vitro* method, the continuous-flow *in vitro* method showed higher dialysability of calcium than the equilibrium *in vitro* method, for all types of calcium sources. The result shows that the continuous removal of dialysable components from pancreatic digestion mixture in the continuous dialysis system has a marked influence on the dialysability of calcium. Further research is however necessary in particular to increase the sample base or comparative studies which would build on the findings discussed here.

4136691 SCAI/M : สาขาวิชา: เคมีวิเคราะห์และเคมีอินทรีย์ประยุกต์;

วท.ม. (เคมีวิเคราะห์และเคมีอินทรีย์ประยุกต์)

วุฒิภา กิจธิคุณ: การพัฒนาวิธีในหลอดแก้วแบบไหลต่อเนื่องเพื่อประมาณค่าความสามารถในการนำแคลเซียมไปใช้ (DEVELOPMENT OF A CONTINUOUS-FLOW *IN VITRO* METHOD FOR ESTIMATING THE BIOAVAILABILITY OF CALCIUM) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ยูวดี เชี่ยววัฒนา, Ph.D., ดวงใจ นาคะปรีชา, Ph.D. 106 หน้า. ISBN 974-04-0903-2

วิธีในหลอดแก้วเป็นเทคนิคที่มีความง่าย รวดเร็ว และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย จึงเป็นวิธีหนึ่งนอกเหนือจากวิธีการตรวจวัดในคนหรือสัตว์ที่ใช้ในการศึกษาถึงความสามารถในการนำแร่ธาตุไปใช้ งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีในหลอดแก้วโดยประยุกต์วิธีในหลอดแก้วของมิลเลอร์ให้เป็นแบบไหลต่อเนื่อง เพื่อประมาณค่าความสามารถในการนำแคลเซียมไปใช้

วิธีในหลอดแก้วที่พัฒนาขึ้นทำได้โดยเลียนแบบการย่อยในกระเพาะอาหารด้วยเอนไซม์เปปซิน ตามด้วยการไหลของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตเพื่อเก็บส่วนที่ไคอะไลต์ได้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในระบบที่พัฒนาขึ้นนี้จะศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของอัตราการไหลและความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH อย่างค่อยเป็นค่อยไปเหมือนกับที่เกิดขึ้นในระบบย่อยอาหาร ความเข้มข้นและอัตราการไหลของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่เหมาะสมซึ่งจะปรับ pH ของอาหารที่ผ่านการย่อยในกระเพาะ จาก 2.0 เป็น 7.0-7.5 ซึ่งเป็น pH ในลำไส้ คือ 0.001 โมลาร์ และ 2-8 มิลลิลิตร ต่อนาที สารละลายที่ไคอะไลต์ได้นำมาวิเคราะห์และตรวจวัดเพื่อหาปริมาณโดยรวมของธาตุที่สนใจเพื่อหาเปอร์เซ็นต์ที่สามารถนำไปใช้ได้ต่อไป วิธีในหลอดแก้วแบบไหลต่อเนื่องนี้กระบวนการดูดซึมจะมีความใกล้เคียงกับสภาวะที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตมากกว่าวิธีในหลอดแก้วแบบสมดุล เพราะวิธีนี้มีการลำเลียงออกของธาตุที่สามารถนำไปใช้ได้อย่างต่อเนื่องในขั้นตอนของการย่อย

เทคนิควิธีหลอดแก้วแบบไหลต่อเนื่องที่พัฒนาขึ้นได้นำไปศึกษาปริมาณแคลเซียมที่ไคอะไลต์ได้ในตัวอย่างสารเสริมแคลเซียม ซึ่งได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมซิเตรท และแคลเซียมที่ละลายในน้ำส้มสายชู จากการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างแคลเซียมที่ละลายในน้ำส้มสายชู มีปริมาณแคลเซียมที่ไคอะไลต์ได้สูงที่สุด รองลงมาคือ แคลเซียมซิเตรท และแคลเซียมคาร์บอเนต ตามลำดับ นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาถึงผลของ pH, ความเข้มข้นเริ่มต้นของแคลเซียมในตัวอย่าง และเวลาในการเติมของผสมของเอนไซม์จากตับและตับอ่อน (Pancreatin bile extract mixture, PBE) ต่อปริมาณแคลเซียมที่ไคอะไลต์ได้ ตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด จะมีปริมาณแคลเซียมที่ไคอะไลต์ได้ลดลงเมื่อค่า pH สูงขึ้น ความเข้มข้นเริ่มต้นจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในระหว่างการย่อย ซึ่งจะมีอิทธิพลต่อไปยังปริมาณแคลเซียมที่ไคอะไลต์ได้ โดยความแรงของอิทธิพลจะขึ้นกับชนิดของตัวอย่าง เวลาในการเติม PBE ไม่ได้ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อปริมาณแคลเซียมที่ไคอะไลต์ได้

ปริมาณแคลเซียมที่ไคอะไลต์ได้จากตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด เมื่อศึกษาด้วยวิธีในหลอดแก้วแบบไหลต่อเนื่องจะให้ค่าที่สูงกว่าวิธีในหลอดแก้วแบบสมดุล จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าผลของการลำเลียงออกของแคลเซียมในระหว่างการย่อยมีผลต่อปริมาณแคลเซียมทั้งหมดที่ไคอะไลต์ได้