การประเมินสารสกัดชาเขียวในการป้องกันรังสีเหนือม่วง และการยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์และเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

นางสาว พรรณเพ็ญ เดี่ยวพานิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3883-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

481927

EVALUATION OF GREEN TEA EXTRACTS FOR UV PROTECTION AND INHIBITION OF MELANIN SYNTHESIS IN CELLS AND TISSUE CULTURES

Miss Panpen Diawpanich

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Technology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-14-3883-4

Copyright of Chulalongkorn University

I25199857

Thesis Title	EVALUATION OF GREEN TEA EXTRACTS FOR UV PROTECTION AND INHIBITION OF MELANIN SYNTHESIS IN CELLS AND TISSUE CULTURES
By	Miss Panpen Diawpanich
Field of Study	Pharmaceutical Technology
Thesis Advisor	Associate Professor Papavadee Klongpityapong
Thesis Co – advisor	Patricia Watts,Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Papavadee Klongpityapong.)

..... Member

(Assistant Professor Roongtawan Supabphol, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Boonsri Ongpipattanakul, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D.)

พรรณเพ็ญ เดี่ยวพานิช : การประเมินสารสกัดชาเขียวในการป้องกันรังสีเหนือม่วง และการยับยั้งการสังเคราะห์ เมลานินในเซลล์และเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (EVALUATION OF GREEN TEA EXTRACTS FOR UV PROTECTION AND INHIBITION OF MELANIN SYNTHESIS IN CELLS AND TISSUE CULTURES) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: Dr. Patricia Watts, 107 หน้า ISBN 974-14-3883-4.

ชาเขียวเป็นเครื่องดื่มที่มีผู้นิยมบริโภคทั่วโลกประกอบด้วยสารโพลีฟีนอล (Polyphenol) ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ในระหว่างสารโพลีฟีนอลของชาเขียว อีจีซีจี (EGCG) ได้รับการรายงานว่ามีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุด ในการวิจัยนี้ได้สกัดชาเขียวด้วยน้ำกลั่นและซิเตรทบัฟเฟอร์ (Citrate Buffer) ที่พีเอชต่างๆ คือ 3, 3.5, 4 และ 4.5 พบว่าผลที่ได้จากการสกัดด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์มีปริมาณอีจีซีจีมากกว่าสกัดด้วยน้ำกลั่น 3 เท่าและพีเอชของบัฟเฟอร์มีผลแตกต่างกันน้อย การทดลองนี้ได้เลือกใช้สารสกัดชาเขียวด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์พีเอช 4.5 ซึ่งใกล้เคียงกับพีเอชของผิวหนัง ได้นำเคอราติโนไซท์, เมลาโนไซท์ และไฟโบรบลาสท์ที่เตรียมจากผิวหนังทารกแรกเกิดมาทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดชาเขียวและอีจีซีจีด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีที (MTT Assay Method) พบว่าความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์คือต่ำกว่า 90 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากการศึกษาการยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์เพาะเลี้ยงเมลาโนไซท์ร่วมกับเคอราติโนไซท์พบว่าสารสกัดชาเขียวและโคจิกแอซิดลดปริมาณเมลานินได้ 14.47 และ 33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เคอราติโนไซท์ที่เลี้ยงในสารละลายอาหารร่วมกับสารทดสอบและอาบรังสีเหนือม่วงบี (Ultraviolet light B:UVB) ที่ 400 มิลลิจูล แล้ววิเคราะห์ปริมาณเซลล์มีชีวิตด้วยวิธีเอ็มทีที พบเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายอาหารหรือสารละลายอาหารร่วมกับสารสกัดชาเขียวหรืออีจีซีจีหรือเอ็คโตอินรอดชีวิตเท่ากับ 73.54, 98.15, 96.32 และ 101.05 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แบบจำลองผิวหนัง 3 มิติ (3D Skin Model) จากเซลล์เพาะเลี้ยงมีลักษณะเทียบเท่าผิวหนังจริงประกอบด้วยเคอราติโนไซท์ที่แบ่งตัวอยู่บนแผ่นคอลลาเจนที่มีไฟโบรบลาสท์อยู่ด้านในแบบจำลองผิวหนังและผิวหนังที่ได้จากการผ่าตัด (Excised Human Skin) ได้รับการเลี้ยงในสารละลายอาหารร่วมกับสารทดสอบแล้วอาบรังสีเหนือม่วงบี ได้นำส่วนผิวหนังไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตหรือปริมาณเซลล์ที่ถูกเผาไหม้ (Sunburn Cell) โดยการตัดชิ้นตัวอย่างเป็นแผ่นบางๆ แล้วย้อมสีด้วยฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน ส่วนที่เป็นน้ำได้นำไปวัดปริมาณอินเตอร์ลูคิน 1 แอลฟ่า (IL1α) ด้วยชุดทดสอบอีไลซ่า (ELISA KIT) หลังจากอาบรังสีเหนือม่วงบี พบว่าผลการทดลองแบบจำลองผิวหนังที่เลี้ยงด้วยสารละลายอาหาร สารละลายอาหารร่วมกับสารสกัดชาเขียวหรือเอ็คโตอิน มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเท่ากับ 59.29, 94.08 และ97.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีปริมาณอินเตอร์ลูคิน 1 แอลฟ่าเท่ากับ 15.13, 14.52 และ 14.05พิกโคกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ขณะที่ผิวหนังที่ได้จากการผ่าตัดที่เลี้ยงในสารละลายอาหาร สารละลายอาหารร่วมกับสารสกัดชาเขียวหรือเอ็คโตอินมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเท่ากับ 68.81, 85.24 และ 92.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีจำนวนเซลล์ที่ถูกเผาไหม้เท่ากับ 2000, 900 และ 1000 เซลล์ต่อมิลลิเมตรของผิวหนังตามลำดับ และมีปริมาณอินเตอร์ลูคิน 1 แอลฟ่าเท่ากับ 105.36, 77.04 และ 79.28 พิกโคกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สารสกัดชาเขียวช่วยลดการถูกทำลายจากรังสีเหนือม่วงในเซลล์และเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงรวมทั้ง ลดการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์เพาะเลี้ยง

สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม ..... ลายมือชื่อนิสิต Pampan Diawpanich .....

ปีการศึกษา 2548 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Prapavadee Kongkitsagorn .....

#4476957733: MAJOR PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY
KEYWORDS: GREEN TEA/EGCG/UV/PHOTOPROTECTION

PANPEN DIAWPANICH: EVALUATION OF GREEN TEA EXTRACTS FOR UV PROTECTION AND INHIBITION OF MELANIN SYNTHESIS IN CELLS AND TISSUE CULTURES. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PAPAVADEE KLONGPITYAPONG. THESIS COADVISOR: PATRICIA WATTS, Ph.D. 107 pp. ISBN 974-14-3883-4.

Green tea, a popularly consumed beverage worldwide, contains polyphenols that have been shown to provide many attributes to health. Among green tea polyphenols, EGCG (Epigallocatechin gallate) is reported to be the most active antioxidant. In this research green tea leaves were extracted using distilled water, and citrate buffer of various pH: 3, 3.5, 4 and 4.5. It was found that the EGCG yield with citrate buffer was 3 folds greater than with distilled water; however, the pH of the buffer had little effect.This experiment chose green tea extract with citrate buffer pH 4.5 which close to skin pH. Keratinocytes, melanocytes and fibroblasts were prepared from newborn foreskins and used to examine the cytotoxicity of green tea extract and EGCG with the MTT assay method. The results show concentrations below 90 and 60 μg/ml respectively, were not toxic. Inhibition of melanin synthesis was studied on melanocyte/keratinocyte co-cultures. Green tea extract and kojic acid reduced melanin content by 14.47 and 33%, respectively. Keratinocytes were cultured in medium containing test sample, irradiated with ultraviolet light B (UVB) at 400 mj and assayed for cell viability by MTT method. It was found that survival of cultured cells irradiated in medium or medium containing green tea, EGCG or Ectoin were 73.34, 98.15, 96.32 and 101.05%, respectively. A 3D skin model was derived from skin cells resulting in a skin equivalent consisting of fibroblasts in collagen raft supporting differentiated keratinocytes. The skin model and excised human skin were cultured in medium containing test sample and were irradiated with UVB. The skins were assayed for cell viability or evaluated for sunburn cells by preparing paraffin cross sections stained with Haematoxylin and Eosin. Supernatant was assessed by measuring interleukin 1 alpha (IL1α) content using ELISA kit. The results show that after irradiation, survival of cells in the cultured skin model with medium or medium containing green tea extracts or Ectoin was 59.29, 94.08 and 97.29 %, respectively, and IL1α content was 15.13, 14.52 and 14.05 pg/ml, respectively. While the survival of cells in excised human skin cultured in medium or medium containing green tea extracts or Ectoin, was 68.81, 85.24 and 92.02%,respectively; number of sunburn cells was 2000, 1000 and 900 cells/mm of skin, respectively; and IL1α content was 105.36, 79.28 and 77.04 pg/ml, respectively. Green tea extract could reduce damage from UVB irradiation in cells and tissue cultures including inhibited melanin synthesis in cell cultures.

Field of study Pharmaceutical Technology Student's signature Panpen Diawpanich

Academic Year 2005 Advisor's signature Papavadee Klongpityapong

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to Associate Professor Papavadee Klongpiyapong, my advisor, for her valuable guidance, advice, supervision and encouragement throughout the study. She was never lacking in kindness and support.

This thesis would never have succeeded without support and advice from Dr. Patricia Watts, my thesis co-adviser. Her great advice will be memorable to me and to those who find the usefulness of this work.

I am greatly indebted to the examining committees, Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D., Assistant Professor Roongtawan Supabphol, Ph.D., Assistant Professor Boonsri Ongpipattanakul, Ph.D., Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D., for their valuable suggestion, criticism and correction of this thesis.

I would like to thank BIOTEC Central Research Unit, Pathumthani for generously providing laboratory facilities.

I am most thankful to Bamrungrad Hospital, nursery room and surgery room for providing the excised human skins.

Finally, special thanks to Miss Sukittaya Veeranondha for her kind supervision, to Miss Nuntawan Pidthong and to the persons at Animal Cell Culture Laboratory, BIOTEC Central Research Unit for their assistance.

CONTENTS

PAGES

ABSTRACT (THAI)..... iv

ABSTRACT (ENGLISH)..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... ix

LIST OF FIGURES..... xi

LIST OF ABBREVIATIONS..... xiv

CHAPTER

I INTRODUCTION..... 1

II LITERATURE REVIEW..... 5

1. Skin..... 5
2. Ultraviolet light..... 7
3. Effect of UV radiation on skin..... 9
4. Protective mechanisms of skin against ultraviolet light..... 15
5. Antioxidant activity of Flavonoids and Phenolic acids..... 20
6. Green tea..... 23
7. Kojic acid..... 25
8. Keratinocytes and immunological cytokines..... 26
9. Interleukin-1..... 27

III MATERIALS AND METHOD..... 29

1. Preparation of green tea extracts..... 32
2. Determination of Polyphenols in green tea extracts..... 33
3. Analytical method validation..... 35
4. Preparation of monolayer cell cultures..... 35
5. Preparation of reconstituted 3-dimentional human skin..... 38
6. Cytotoxicity testing for green tea extract and EGCG..... 39
7. Inhibition of melanin synthesis studies..... 41
8. UV protection studies in keratinocyte cell cultures..... 42
9. UV protection studies in 3D skin model..... 43
10. UV protection studies on excised human breast skin..... 45

IV RESULTS..... 47
1. Preparation of green tea extracts.....47
2. Determination of Polyphenols in green tea extracts.....48
3. Analytical method validation.....50
4. Preparation of monolayer cell cultures.....51
5. Preparation of reconstituted 3-dimentional human skin.....56
6. Cytotoxicity testing for green tea extract and EGCG.....59
7. Inhibition of melanin synthesis studies.....62
8. UV protection studies in keratinocyte cell cultures.....66
9. UV protection studies in 3D skin model.....67
10. UV protection studies on excised human breast skin.....71
V DISCUSSION AND CONCLUSIONS.....76
REFERENCES..... 80
APPENDICES.....85
APPENDIX A..... 86
APPENDIX B..... 91
APPENDIX C..... 100
APPENDIX D..... 103
VITA..... 107

LIST OF TABLES

PAGES

Table 1. Some dietary sources of flavonoids and phenolic acids..... 21
Table 2. The concentrations of EGCG in test sample..... 40
Table 3. The concentrations of GTE in test sample..... 40
Table 4. The total yield of freeze dried extracts using citrate buffer pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 and distilled water 47
Table 5. Contents of epicatechin derivatives in dried green tea leaves; extracting with citrate buffer p H 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 and distilled water..... 49
Table 6. Percent survival data of EGCG on L 929, NHFM, NHFK and NHFF by MTT assay..... 60
Table 7. Percent survival data of GTE on L 929, NHFM, NHFK and NHFF by MTT assay..... 61
Table 8. Analysis data of melanin content in cell cultures..... 64
Table 9. Percentage of melanin in the cultures..... 65
Table 10. Percent survival data of Ectoin, EGCG and GTE on keratinocytes by MTT assay..... 66
Table 11. The percent survival of cells in 3D skin..... 69
Table 12. IL 1α content in 3D skin model..... 70
Table 13. Number of sunburn cells/ cm of excised human skin..... 73
Table 14. The percent survival of cells in excised human skin..... 73
Table 15. IL 1α content in excised human skin..... 75
Table 16. Accuracy data of EGC assayed by the HPLC method..... 92
Table 17. Accuracy data of EGCG assayed by the HPLC method..... 92
Table 18. Accuracy data of EC assayed by the HPLC method..... 93
Table 19. Accuracy data of ECG assayed by the HPLC method..... 93
Table 20. Precision data of EGC assayed by the HPLC method..... 94
Table 21. Precision of EGCG assayed by the HPLC method..... 94
Table 22. Precision data of EC assayed by the HPLC method..... 94
Table 23. Precision data of ECG assayed by the HPLC method..... 94
Table 24. Linearity data of EGC assayed by the HPLC method..... 95

Table 25. Linearity data of EGCG assayed by the HPLC method.....96
Table 26. Linearity data of EC assayed by the HPLC method..... 97
Table 27. Linearity data of EGC assayed by the HPLC method..... 98
Table28. Conclusion data of green tea analytical method validation..... 99
Table 29. The optical density data of melanin standard
at different wave lengths..... 101
Table 30. Analysis data of catechin contents using
different extracting methods.....104
Table 31. Multiple Comparisons of different extracting methods..... 105

LIST OF FIGURES

PAGES

Figure 1. Basic structure of skin.....7
Figure 2. Electromagnetic spectrum of ultraviolet radiation.. 8
Figure 3. Adjacent pyrimidine bases on the same strand pyrimidine dimer (1a) or (6–4) pyrimidine–pyrrimidone photo product (1b) alter absorbing UVB light energy.....12
Figure 4. Role of oxidative stress in aging and UV. 13
Figure 5. Histologic appearance of skin. A, untreated skin. B, 48 hours after UV exposure.....14
Figure 6. Morphological and biochemical features of SBC formation in UVB irradiated human skin equivalents.....15
Figure 7. Diagram of optical pathways in human skin.....17
Figure 8. Epidermal melanocytes are situated in the basal layer.....19
Figure 9. Melanin synthesis pathway 20
Figure 10. Structural groups for radical scavenging.....22
Figure 11. Chemical structures of major catechins.....24
Figure 12. Chemical structures of kojic acid.....26
Figure 13. The total yield of freeze dried extracts using citrate buffer pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 and distilled water.....48
Figure 14. Catechin contents (EGC, EGCG, EC and ECG) in the dried leaves; extracting with citrate buffer pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 and distilled water.....49
Figure 15. Keratinocytes and melanocytes at 5 days of culture.....51
Figure 16. Melanocyte / keratinocyte co-culture at 12 days of culture.....51
Figure 17. The confluent melanocyte / keratinocyte coculture at 20 days of culture.....52
Figure 18. Keratinocytes with some melanocytes at 4 days of culture.....52
Figure 19. The keratinocyte/melanocyte co- culture at 14 days of culture.....53
Figure 20. The confluent keratinocytes.....53
Figure 21. Melanocytes 5 days of culture.....54

Figure 22. Melanocytes 10 days of culture.....54
Figure 23. Fibroblasts after 4 days of culture.....55
Figure 24. Fibroblasts 10 days of culture.....55
Figure 25. The confluent fibroblasts 17 days of culture.....56
Figure 26. Collagen raft.....57
Figure 27. Fibroblasts in collagen raft.....57
Figure 28. Epidermal cells on collagen raft.....58
Figure 29. Monolayer of keratinocytes and fibroblasts on collagen raft.....58
Figure 30. Paraffin cross sections of 3D skin model stained with Haematoxylin and Eosin.....59
Figure 31. The dose-response curve from the cytotoxicity studies of EGCG on L929, NHFM, NHFK and NHFF by MTT assay.....60
Figure 32. The dose-response curve from the cytotoxicity studies of GTE on L929, NHFM, NHFK and NHFF by MTT assay.....61
Figure 33. The photograph of untreated (control) melanocyte/keratinocyte co-culture, taken after dopa reaction.....62
Figure 34. The photograph of melanocyte/keratinocyte co-culture treated with kojic acid, taken after dopa reaction.....63
Figure 35. The photograph of melanocyte/keratinocyte co-culture treated with GTP 30 mg/ml, taken after dopa reaction.....63
Figure 36. Comparison of melanin content (pg/cell) in cell cultures treated with kojic acid and green tea extract.....64
Figure 37. Comparison of melanin content (%) in cell cultures treated with with kojic acid and green tea extract.....65
Figure 38. Survival of keratinocytes after UVB irradiation.....66
Figure 39. H/E staining of cultured 3D skin model in medium.....68
Figure 40. H/E staining of cultured 3D skin model in medium and irradiated with 400 mj UVB.....68
Figure 41. H/E staining of cultured 3D skin model in medium containing Ectoin and irradiated with 400 mj UVB.....68
Figure 42. H/E staining of cultured 3D skin model in medium containing GTE and irradiated with 400 mj UVB.....69

Figure 43. Tissue viability of 3D skin model..... 69
Figure 44. IL 1α content in 3D skin model 70
Figure 45. H/E staining of cultured excised human skin in medium.....71
Figure 46. H/E staining of cultured excised human skin in medium
and irradiated with 400 mj UVB..... 72
Figure 47. H/E staining of cultured excised human skin in medium
containing Ectoin and irradiated with 400 mj UVB.....72
Figure 48. H/E staining of cultured excised human skin in medium
containing GTE and irradiated with 400 mj UVB..... 73
Figure 49. Tissue viability of excised human skin..... 74
Figure 50. IL 1α content in excised human skin..... 75
Figure 51. HPLC Chromatogram of EGC Reference Standard..... 87
Figure 52. HPLC Chromatogram of Caffeine Reference Standard.....87
Figure 53. HPLC Chromatogram of EGCG Reference Standard..... 88
Figure 54. HPLC Chromatogram of EC Reference Standard..... 88
Figure 55. HPLC Chromatogram of ECG Reference Standard..... 88
Figure 56. The calibration curve of the EGC standard 89
Figure 57. The calibration curve of the EGCG standard 89
Figure 58. The calibration curve of the EC standard 89
Figure 59. The calibration curve of the ECG standard 89
Figure 60. HPLC Chromatogram of Green tea extract..... 90
Figure 61. The representative linearity curve for EGC..... 95
Figure 62. The representative linearity curve for EGCG..... 96
Figure 63. The representative linearity curve for EC.....97
Figure 64. The representative linearity curve for ECG..... 98
Figure 65. The calibration curve of the melanin standard
at different wave lengths.....101
Figure 66. The calibration curve of the melanin standard at 405 nm.....102
Figure 67. The calibration curve of the IL1α standard at 450 nm..... ...102

LIST OF ABBREVIATIONS

%	percentage
°C	degree Celsius (centigrade)
µg	microgram (s)
µl	microlitre (s)
bFGF	basic fibroblast growth factor
BPE	bovine pituitary extract
cm^2	square centimeter
conc	concentration
CO_2	carbon dioxide
DMEM	Dulbecco' Modified Eagle's Medium
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechin gallate
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin gallate
FBS	fetal bovine serum
et al.	et alii, and others
DMSO	Dimethylsulphoxide
GTE	green tea extract
g	gram
H&E	Haematoxylin and Eosin
hr	hour
HPLC	high performance liquid chromatography
IL-1α	interleukin-1-alpha
KSFM	Keratinocyte Serum Free Medium
LPS	lipopolysaccharide
MEM	Mini Essential Medium
MSH	Melanocyt Stimulating Hormone
mg	milligram (s)
min	minute (s)

mj	millijoule
mL	milliliter
mM	millimolar
MTT	Methyl thiazoletetrazolium
N	Normality
NHFF	normal human foreskin fibroblast
NHFK	normal human foreskin keratinocyte
NHFM	normal human foreskin melanocyte
nM	nanomolar
nm	nanometer
OD	optical density
pc (pcs)	piece
PBS	phosphate buffer saline
pH	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
P/S	Penicillin/Streptomysin
rEGF	recombinant epidermal growth factor
ROS	reactive oxygen species
SBC	sunburn cell
TC	tissue culture
UV	ultraviolet
U	unit
UVA	ultraviolet A
UVB	ultraviolet B
w/v	weight by volume