รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การวิจัยเพื่อสนับสนุนการใช้สมุนไพรในสัตว์"

โดย นางสาวนันทวัน บุณยะประภัศร
นางสาวอรัญญา ศรีบุศราคัม
นางพนิดา ใหญ่ธรรมสาร
นางสาวกฤติยา ไชยนอก
นางวีณา นุกูลการ

วันที่ 31 กรกฎาคม 2548

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การวิจัยเพื่อสนับสนุนการใช้สมุนไพรในสัตว์"

โดย นางสาวนันทวัน บุณยะประภัศร
นางสาวอรัญญา ศรีบุศราคัม
นางพนิดา ใหญ่ธรรมสาร
นางสาวกฤติยา ไชยนอก
นางวีณา นุกูลการ

วันที่ 31 กรกฎาคม 2548

ส.ค. 31 ก.ค. 2548

สัญญาเลขที่ PDG4720012

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การวิจัยเพื่อสนับสนุนการใช้สมุนไพรในสัตว์"

"Preliminary Studies to Support the Use of Medicinal Plants in Animal Products"

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นางสาวนันทวัน บุณยะประภัศร	คณะเภสัชศาสตร์ ม. มหิดล
2. นางสาวอรัญญา ศรีบุศราคัม	คณะเภสัชศาสตร์ ม. มหิดล
3. นางพนิดา ใหญ่ธรรมสาร	คณะเภสัชศาสตร์ ม. มหิดล
4. นางสาวกฤติยา ไชยนอก	คณะเภสัชศาสตร์ ม. มหิดล
5. นางวีณา นุกูลการ	คณะเภสัชศาสตร์ ม. มหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

Executive Summary

ชื่อโครงการ	การวิจัยเพื่อสนับสนุนการใช้สมุนไพรในสัตว์
หัวหน้าโครงการวิจัย	ศ.ดร. นันทวัน บุณยะประภัศร สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
วัตถุประสงค์	เพื่อศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับสมุนไพรที่ใช้ในการผลิตสัตว์ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการศึกษาอย่างละเอียดต่อไป

ข้อสรุป

ในการพัฒนาชุดโครงการการใช้สมุนไพรในการผลิตสัตว์ พบปัญหาบางอย่างที่ไม่ใหญ่พอที่จะให้ทุน จึงได้ให้นักศึกษาปริญญาโทหรือนักวิจัยของสำนักงานดำเนินการ ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก้ปัญหาต่อไปนี้ คือ

1. ปัญหาการวิเคราะห์คุณภาพฟ้าทะลายโจรโดยวิธีของเภสัชตำรับไทย การหาปริมาณ total lactone พบว่า end point ไม่ sharp ทำให้คำนวณค่าผิดพลาด จึงได้ทดลองพบว่าปัญหาเกิดจาก carbon จึงทดลองเปลี่ยนเป็น celite พบว่าได้ผลดีขึ้น และเห็น end point ได้ชัดเจน

2. การศึกษาศักยภาพของวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมผลิตเครื่องดื่มมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสัตว์ พบว่ากากชามีศักยภาพในการเป็น antioxidant จึงได้พัฒนาวิธีสกัดและวิเคราะห์คุณภาพเพื่อจะได้พัฒนาใช้ในสัตว์ต่อไป ส่วนกากองุ่นมีฤทธิ์ antioxidant เหลืออยู่เพียงเล็กน้อย ไม่คุ้มค่าในการนำมาใช้

บทคัดย่อ

งานศึกษาวิจัยนี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อแก้ปัญหา หรือเพื่อดูศักยภาพเบื้องต้นของสมุนไพรเพื่อที่จะได้พัฒนาเป็นโครงการต่อไป งานศึกษาแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟ้าทะลายโจร การควบคุมมาตรฐานของฟ้าทะลายโจรในเรื่องสารออกฤทธิ์ เป็นการวิเคราะห์ Total lactone และการวิเคราะห์ andrographolide Total lactone วิเคราะห์โดยวิธี titration พบปัญหาเรื่อง end point ไม่ชัดเจน จึงได้ศึกษาวิธีที่ทำให้การวิเคราะห์ชัดเจนขึ้น โดยใช้ celite แทนผงถ่าน พบว่าได้ end point ที่ชัดเจน ส่วนการวิเคราะห์ andrographolide พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย และวิธีที่เหมาะสม คือ ใช้ Soxhlet apparatus โดยสกัดจนได้สารสกัดใสและสกัดต่ออีก 2 ชม. วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม คือใช้ column C_{18} (250x4.6 mm, 5 μ), mobile phase คือ เมทานอล: น้ำ (55:45) ที่ความยาวคลื่น 229 nm และใช้ flow rate 0.8 ml/min

2. การศึกษาศักยภาพของกากชา นำกากชาที่ได้จากโรงงานผลิตชาเขียวมาศึกษาเพื่อดูศักยภาพในการเป็น antioxidant พบว่ายังคงมีฤทธิ์ดีอยู่ จึงได้พัฒนาวิธีสกัด พบว่าเมื่อนำกากชามาสกัดโดยวิธีการต้มนาน 1 ชม. ได้สารที่มี antioxidant สูงสุด โดยได้สารที่มีฤทธิ์ antioxidant 20.19% น้ำหนักสารสกัด และเมื่อตรวจสอบด้วย TLC-DDPH พบว่ายังมีสาร antioxidant อยู่มาก จึงได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญ พบว่าวิธีที่เหมาะสม คือ วิธี HPLC : C_{18} (250x4.6 mm, 5 μ), gradient mobile phase ระหว่าง acetronitrile และ 0.1% phosphoric acid, flow rate 1.0 ml/min, UV detector 280 nm

3. ศึกษาศักยภาพของกากองุ่นในการเป็น antioxidant เมื่อนำกากองุ่นมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 80% เอทานอล, เอทิลอะซีเตท และเมทานอล:กรดฟอร์มิค (95:5) ด้วยวิธีหมักค้างคืนและการ sonicate พบว่า 80% เอทานอล และเมทานอล:กรดฟอร์มิค (95:5) จะสกัดสารได้มากที่สุด และวิธีการหมักจะได้สารสกัดมากกว่าการ sonicate การศึกษาฤทธิ์ antioxidant พบว่าฤทธิ์ที่ได้ไม่ดี ไม่น่าจะนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์

Abstract

Preliminary studies on the quality control and potential of medicinal plants in animal production were performed in order to lower the expense for extensive research. The studies are composed of 3 parts as follows.

1. The quality control of *Andrographis paniculata* (Burm.F.) Nees was developed based on the problem of total lactone assay and HPLC analysis of andro-grapholide. To improve the end point of the titration assay of total lactone, celite was found to be better than carbon to remove impurity and give the sharp end point. Previous HPLC analysis reports varied both extraction and analytical methods. We have developed and found the best extraction method is exhaustively extracting with methanol using soxhlet apparatus. The suitable HPLC system is C_{18} (250x4.6 mm, 5 μ), methanol-water (55: 45), λ 229 nm and flow rate 0.8 ml/min.

2. To verify the potential of tea marc from commercial production of green tea drink, the antioxidant of the marc was determined using DPPH. The studies included the suitable solvents and the duration of extraction. The best extraction method is extracting with boiling water for one hr. The extract showed the high antioxidant content. Further studies on the development of HPLC system and the best system is C_{18} (250x4.6 mm, 5 μ), gradient elution with the combination of acetronitrile and 0.1% phosphoric acid, λ 280 nm and flow rate 1.0 ml/min.

3. Study on antioxidant of the marc of grape obtained from Vine industry was performed using DPPH. Only weak activity was obtained, therefore no further studies was carried out.

สารบัญ

	หน้า
Executive summary	i
บทคัดย่อไทย	ii
บทคัดย่ออังกฤษ	iii
บทนำ	1
ฟ้าทะลายโจร	2
ชา	10
องุ่น	20
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	31

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณ total lactone ในฟ้าทะลายโจรเมื่อใช้ผงถ่านและ celite เป็นตัวกรอง	6
2	ปริมาณของ andrographolide ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ	6
3	ปริมาณสาร andrographolide ที่ได้จากการสกัดด้วย Soxhlet apparatus	7
4	ปริมาณสาร andrographolide ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ	8
5	ปริมาณสารสกัดจากกากชาที่ได้จากการต้มที่เวลา 1, 2 และ 4 ชม	12
6	ฤทธิ์และปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกากชา	15
7	ปริมาณของสารสกัดจากกากองุ่นที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ	21
8	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากองุ่น	24

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	Chromatogram ของสารมาตรฐาน andrographolide, dehydroandro-grapholide, neoandrographolide และตัวอย่างฟ้าทะลายโจร	9
2	TLC ของสารสกัดจากกากชา เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:13) เป็น solvent spray ด้วย 30% กรดซัลฟุริก	13
3	TLC ของสารสกัดจากกากชาและสารมาตรฐาน เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:13) เป็น solvent spray ด้วย 30% กรดซัลฟุริก	13
4	TLC ของสารสกัดจากกากชา เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:13) เป็น solvent spray ด้วย 0.2% DPPH	16
5	TLC ของสารสกัดจากกากชาและสารมาตรฐาน เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (50:5.5: 5.5:13) เป็น solvent spray ด้วย 0.2% DPPH	16
6	Standard curve ของสาร (-)-epigallocatechin gallate (50-300 μg/ml)	18
7	Chromatogram ของตัวอย่างกากชา ความเข้มข้น 1 มก./มล., standard mixture ของ (-)-epigallocatechin, (±)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin gallate และ (-)-epicatechingallate ความเข้มข้น 200 มคก./มล. และ standard caffeine ความเข้มข้น 200 มคก./มล.	19
8	TLC ของสารสกัดจากกากองุ่น เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate: formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:6.5) เป็น solvent spray ด้วย 30% กรดซัลฟุริก	22
9	TLC ของสารสกัดจากกากองุ่น เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate: formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:6.5) เป็น solvent spray ด้วย 0.2% DPPH	25

บทนำ

ในการพัฒนาชุดโครงการ "การใช้สมุนไพรในการผลิตสัตว์" นั้น พบปัญหาบางเรื่องซึ่งไม่สามารถให้ทุนได้ จึงได้ให้นักวิจัยในหน่วยและนักศึกษาปริญญาโทพัฒนา ได้แก่

1. เรื่องการคำนวณปริมาณสมุนไพรที่ใช้ เพื่อควบคุมขนาดที่ออกฤทธิ์ การทดสอบที่ผ่านมาการคำนวณหาปริมาณสมุนไพรที่ใช้ ใช้น้ำหนักสมุนไพรในการคำนวณ แต่เนื่องจากสมุนไพรแต่ละ lot อาจมีสารสำคัญแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องวิเคราะห์วัตถุดิบก่อนผสม ฟ้าทะลายโจรเป็นสมุนไพรที่ใช้ในการเลี้ยงไก่อย่างกว้างขวาง สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ กลุ่ม lactone ได้แก่ andrographolide, deoxyandrographolide และ dihydroandrographolide เป็นต้น การวิเคราะห์ total lactone ประสบปัญหาเรื่อง end point และในการวิเคราะห์ HPLC แตกต่างกันตั้งแต่วิธีการสกัดและ HPLC solvent system การศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสม

2. การศึกษาเบื้องต้นของวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม ผลการทดลองที่ผ่านมาและการสำรวจผลิตภัณฑ์ที่ขายในท้องตลาด พบว่าฤทธิ์ที่สำคัญอันหนึ่งของสมุนไพรที่ช่วยให้สัตว์เจริญเติบโตโดยไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ คือ สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสารเหล่านี้จะช่วยป้องกันอันตรายของอนุมูลอิสระต่อทางเดินอาหาร เมื่อทางเดินอาหารอยู่ในสภาวะที่สมบูรณ์ จะส่งผลให้สัตว์กินอาหารได้ดีและการดูดซึมของอาหารดี สัตว์เติบโตเร็ว และยังพบว่าสารเหล่านี้จะลดปริมาณอนุมูลอิสระในเลือดที่เกิดจากความเครียดจึงลดการสูญเสียไก่หรือสุกร ปัจจุบันมีวัสดุที่เหลือจากการผลิตชาและไวน์ คือ กากชาและกากองุ่นจำนวนมาก มีรายงานเรื่องต้านอนุมูลอิสระของชา (Nanjo et al., 1996; Yokozawa et al., 1998; Guo et al., 1999; Sang et al., 2002; Cabrrera et al., 2003) และองุ่น (Bonilla et al., 1999; Schwarz et al., 2001; Torres et al., 2002; Pastrana-Bonilla et al., 2003; Bartolome et al., 2004) จึงน่าจะทดลองนำกากมาศึกษา หากยังมีอยู่มากอาจนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป และเป็นการใช้ประโยชน์ของวัสดุเหลือใช้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อปรับวิธีการวิเคราะห์คุณภาพของฟ้าทะลายโจร
2. เพื่อศึกษาศักยภาพของวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมเครื่องดื่มในการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมผลิตสัตว์

ฟ้าทะลายโจร

ฟ้าทะลายโจร เป็นพืชที่มีผู้นำมาใช้ทางปศุสัตว์จำนวนมาก โดยมีการศึกษาวิจัยดังนี้

1. ผลต่อสัตว์ปีก

มีการให้ฟ้าทะลายโจรผสมอาหารโดยให้ในรูปผงป่นแห้ง ขนาด 5 ก. ต่ออาหาร 1 กก. และในรูปแคปซูล ขนาด 0.5 ก./ตัว วันเว้นวัน เป็นระยะเวลา 60 วัน เพื่อดูผลต่อปริมาตรเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด น้ำหนักตัว และน้ำหนักอวัยวะภายในในไก่พื้นเมืองคละเพศ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่ได้รับผงฟ้าทะลายโจรผสมกับอาหารและแคปซูลนั้น มีค่าปริมาตรเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในวันที่ 40 ของการทดลอง แต่มีค่าใกล้เคียงกันเมื่อวันสุดท้ายของการทดลอง และกลุ่มที่ได้รับผงฟ้าทะลายโจรผสมอาหารมีแนวโน้มสูงกว่าทุกกลุ่ม แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มที่ได้รับฟ้าทะลายโจรทั้ง 2 กลุ่ม มีลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ มากกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย แต่ทำให้นิวโทรฟิลและอีโอซิโนฟิลลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งกลุ่มที่ได้แคปซูลฟ้าทะลายโจรนั้นมีจำนวนเบโซฟิลมากกว่าทุกกลุ่ม สำหรับผลต่อน้ำหนักตัวพบว่ากลุ่มที่ได้รับแคปซูลฟ้าทะลายโจรนั้นมีน้ำหนักตัวมากกว่าทุกกลุ่ม และน้ำหนักอวัยวะภายในไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (อัญชลี และ วาที, 2544)

มีการศึกษาการเสริมผงฟ้าทะลายโจรในขนาด 0.05% และ 0.1% ของอาหารให้ไก่เนื้อและไก่ไข่ พบว่าอัตราการเลี้ยงรอดของไก่เนื้อกลุ่มที่เสริมฟ้าทะลายโจรสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับสารปฏิชีวนะ (colistin 50%, 105 ppm) กลุ่มที่เสริมฟ้าทะลายโจรในขนาด 0.1% ของอาหาร มีการกินอาหาร และมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับสารปฏิชีวนะ อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion) ของไก่เนื้อที่เสริมฟ้าทะลายโจรทั้ง 2 ระดับ มีประสิทธิภาพสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะและกลุ่มควบคุม การเสริมสมุนไพรลงในอาหารนั้นจะส่งผลต่อสมรรถนะการผลิตของไก่เล็ก (0-3 สัปดาห์) มากกว่าไก่ขุน (3-6 สัปดาห์) ในไก่ไข่จะทำให้ได้ผลผลิตไข่และน้ำหนักไข่สูงสุด และทั้ง 2 กลุ่มที่เสริมฟ้าทะลายโจรให้ผลผลิตไข่สูงกว่ากลุ่มควบคุม ไก่ไข่กลุ่มที่รับการเสริมฟ้าทะลายโจร 0.1% มีประสิทธิภาพในการใช้อาหารดีที่สุดและมีความหนาของเปลือกไข่สูงกว่ากลุ่มที่เสริมกระเทียมผง แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มอื่นๆ และยังพบว่าสีของไข่แดงเข้มกว่าทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับฟ้าทะลายโจร 0.05 และกระเทียม 0.5% ไก่ไข่ที่ได้รับการเสริมฟ้าทะลายโจรผง 0.05-0.1% ของอาหารมีสมรรถนะการผลิตไข่ดีกว่า และมีคุณภาพภายในที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม (สาโรช และคณะ, 2547)

จากการศึกษาการใช้สาร andrographolide บริสุทธิ์ผสมในอาหารไก่ ขนาด 0.45, 0.90 และ 1.80 ก. ต่ออาหาร 100 กก. พบว่าไม่มีผลในการป้องกันและรักษาโรคทางเดินหายใจที่เกิดจากเชื้อ *Myoplasma gallisepticum* (MG) (พัชรี และคณะ, 2544)

การเสริมสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ระดับ 100, 200 และ 300 ppm ในอาหารของไก่กระทง เพื่อเร่งการเจริญเติบโต พบว่าในช่วง 0-3 สัปดาห์ให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและ

กลุ่มที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ แต่มีแนวโน้มว่าในช่วง 3-6 สัปดาห์ การใช้สมุนไพรฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 300 ppm ทำให้น้ำหนักไก่เพิ่ม ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหาร และอัตราการแลกเนื้อดีกว่ากลุ่มควบคุม และทดลองให้ฟ้าทะลายโจรที่ขนาดเดียวกันในการป้องกันโรคนิวคาลเซิลในไก่กระทงที่ได้รับวัคซีนและไม่ได้รับวัคซีนโรคนิวคาสเซิล เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าในไก่กลุ่มที่ได้รับการเสริมสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ขนาด 300 ppm มีแอนติบอดี้สูงสุด แต่ไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมสมุนไพรแต่ได้วัคซีน กลุ่มที่มีการเสริมสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมีอัตราการป่วย และอัตราการตายไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสมุนไพร เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักของไก่แต่ละอายุ พบว่ามีความแตกต่างกัน แต่ไม่ได้มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน (คณิต และคณะ, 2545)

มีการศึกษาผลของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในการป้องกันโรคกัมโบโรในไก่ไข่ โดยให้สมุนไพรฟ้าทะลายโจรเสริมใน 3 ระดับ คือ 100, 200 และ 300 ppm ของอาหารแก่ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนและไม่ได้รับวัคซีนโรคกัมโบโร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าในไก่กลุ่มที่ได้รับการเสริมสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในขนาด 100 ppm มีแอนติบอดี้สูงสุด ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีค่า Bursa to body weight ratio (B:Bw) ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนในไก่อายุ 35 วัน แต่เมื่อไก่ได้รับการ challenge เชื้อไวรัสกัมโบโรแล้ว พบว่าค่า B:Bw ลดลงทุกกลุ่ม ซึ่งไม่สัมพันธ์กับการผสมฟ้าทะลายโจรในอาหารไก่ เมื่อประเมินคะแนนรอยโรคจากค่า Histopathological lesion score (HLS) พบว่าในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนหลังรับไป 14 วัน มีค่า HLS เป็น 0 และมีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แต่ในกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน มีการเปลี่ยนแปลงค่า HLS เพิ่มขึ้นมาก หลังจากได้รับการ challenge เชื้อไวรัส ซึ่งพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการใช้สมุนไพรฟ้าทะลายโจรเสริมในอาหารกับค่า HLS ในเรื่องอัตราการตาย กลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตายเพียงเล็กน้อย แต่กลุ่มที่ไม่ได้รับมีอัตราการตายสูงประมาณ 60-90 % และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการใช้สมุนไพรฟ้าทะลายโจรเสริมอาหารกับอัตราการตายของไก่ที่ได้รับเชื้อไวรัสเลย ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีน้ำหนักต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนช่วง 35 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ในวันที่ 45 หลังจากได้รับการ challenge. เชื้อไวรัสในทุกกลุ่มแล้ว กลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีน้ำหนักมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเสริมฟ้าทะลายโจรในอาหารกับการเพิ่มน้ำหนักตัวไก่ (คณิต และคณะ, 2545)

มีการทดลองเกี่ยวกับการวัดประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของไก่ตั้งแต่เริ่มฟักจนถึง 10 สัปดาห์ โดยเสริมฟ้าทะลายโจรในอาหาร หรือเสริมแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* กลุ่ม Effective Microorganism (EM) ในน้ำดื่ม และกลุ่มที่ได้รับสารปฏิชีวนะ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าไม่มีความแตกต่างในประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ไก่ในกลุ่มที่ได้รับฟ้าทะลายโจร แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* และกลุ่มที่เสริมสารปฏิชีวนะ มีการเพิ่มน้ำหนักตัวและการกินอาหารไม่แตกต่างกัน แต่มีอัตราการแลกเนื้อดีกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อทดลองในไก่ไข่อายุ 23 สัปดาห์ จำนวน 200 ตัว พบว่ากลุ่มที่ได้รับฟ้าทะลายโจรและแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* นั้นมีประสิทธิภาพในการผลิตไข่ และการใช้อาหารดีกว่ากลุ่มควบคุม และลดอัตราการบริโภคประมาณ 3.5-6% แต่ไม่มีผลต่อสีของไข่ไก่ (Mekum *et al.*, 2003)

มีการจดสิทธิบัตรผลิตภัณฑ์ที่ใช้การรักษาโรค pullorum ในสัตว์ปีกซึ่งประกอบด้วย ส่วนเนื้อไม้ของ mahonia (shidagonglao) 10-30 ส่วน, รากของ *Scutellaria* 10-20 ส่วน, *Eclipta* 5-15 ส่วน, ฟ้าทะลายโจร 10-30 ส่วน, ชะเอม 5-9 ส่วน, sulfadiazine 10-20 ส่วน และโซเดียมไบคาร์บอเนต 1-6 ส่วน (Qin, 1996)

มีการจดสิทธิบัตรผลิตภัณฑ์ในการต้านเชื้อจุลชีพที่ใช้ในการรักษา plaque ในไก่ซึ่งประกอบด้วย ฟ้าทะลายโจร 1-3%, Shenqa 7-10%, รากชะเอมจีน 3-5%, realgar 3-5%, โปทัสเซียมอะลูมินัทซัลเฟต 2.5%, pepsin 20-40% และ Shemai 30-40% ที่ผลิตในรูปยาเม็ดหรือลูกกลอนเพื่อควบคุม plaque ในไก่ (Cui, 1989)

2. ผลต่อสุกร

มีการศึกษาการใช้ใบฟ้าทะลายโจรต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกสุกรท้องร่วง พบว่าเมื่อนำสารสกัดด้วยเอทานอลของฟ้าทะลายโจรไปทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E.coli* ที่ทำให้เกิดท้องร่วงในสุกรจำนวน 4 ชนิด พบว่าค่า minimum inhibitory concentration (MIC) อยู่ระหว่าง 480-500 มคก./มล. ส่วนสารสกัดน้ำมีค่ามากกว่า 2,000 มคก./มล. เมื่อทดสอบผลการเสริมใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 500 มก.ต่อครั้ง มีผลทำให้น้ำหนักตัวเมื่อหายป่วยดีกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้เกลือแร่ และให้ผลในการรักษาแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังทำให้อัตราการเจริญเติบโตดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อให้เกลือแร่ขนาด 1 ก./กก. ร่วมกับใบฟ้าทะลายโจรขนาด 1 ก./กก. และใบฝรั่งขนาด 2 ก./กก. แก่ลูกสุกรท้องร่วงระยะหลังหย่านม ทำให้อัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้เกลือแร่ หรือใช้ผงเกลือแร่ ใบฟ้าทะลายโจรขนาด 1 ก./กก. หรือใบฝรั่งขนาด 1.5 ก./กก. เพียงอย่างเดียว หรือใบฝรั่งขนาด 1.5 ก./กก. กับใบฟ้าทะลายโจร 1 ก./กก. หรือร่วมกับเกลือแร่ที่ระดับ 1 ก./กก. ในการเสริมอาหารลูกสุกรดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (วิศิษย์ และคณะ, 2543)

มีการศึกษาผลของฟ้าทะลายโจร 3 ระดับ คือ 250, 500 และ 750 มก./โด้ส/วัน ในการรักษาโรคท้องร่วงในลูกสุกรระยะดูดนมแม่ เปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะ colistin ขนาด 1 มล./โด้ส/วัน และลูกสุกรไม่ป่วย โดยป้อนวันละโด้สเป็นเวลา 3-5 วัน พบว่าการใช้ฟ้าทะลายโจรขนาด 250 หรือ 750 มก./โด้ส/วัน ทำให้ลูกสุกรหายท้องร่วงเร็วที่สุด แต่ไม่แตกต่างกับยาปฏิชีวนะ และพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของลูกสุกรตั้งแต่เริ่มรักษาจนหย่านมมีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันสูงกว่ากลุ่มที่รักษาด้วยยาปฏิชีวนะ และใกล้เคียงกับลูกสุกรที่ไม่ป่วย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (ยุทธนา และคณะ, 2545)

มีการศึกษาการใช้ฟ้าทะลายโจรเพื่อทดแทนสารปฏิชีวนะ เพื่อดูสมรรถภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรอนุบาล โดยให้อาหารที่เสริมฟ้าทะลายโจรในขนาด 0.05, 0.1 และ 0.15% ของอาหาร และฟ้าทะลายโจรขนาด 0.05% ร่วมกับขมิ้นชัน 0.10% และกระเทียมผง 0.25% ของอาหาร พบว่าฟ้าทะลายโจรขนาด 0.05% ของอาหารทำให้อัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะ ระดับการกินอาหารใกล้เคียงกับกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ

เมื่อศึกษาต่อมาพบว่าฟ้าทะลายโจรทำให้อัตราการเจริญเติบโตประมาณ 115.5% ของกลุ่มควบคุมและมีสมรรถภาพการเติบโตสูงสุด (สาโรช และคณะ, 2547)

การศึกษาผลของสาร diterpene lactones จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในการรักษาอาการอุจจาระร่วงในลูกสุกร โดยให้ลูกสุกรอุจจาระร่วงรับประทานยา triple sulfa ซึ่งประกอบด้วย sulfadiazine, sulfumerzine และ sulfadimidine ในขนาด 200 มก. วันละครั้ง เป็นเวลา 4 วัน เปรียบเทียบกับลูกสุกรที่ให้ยาที่เตรียมจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร 2 มล. ในขนาดยา 45 มก. วันละครั้งทุกวัน ติดต่อเป็นเวลา 4 วัน พบว่าอัตราการสูญเสียจากอาการอุจจาระร่วงในลูกสุกรดูดนมที่ใช้ยาปฏิชีวนะ triple sulfa มีอัตราต่างกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฟ้าทะลายโจรเล็กน้อย กลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะมีอัตราการสูญเสียน้อยกว่าประมาณ 5% ส่วนน้ำหนักตัวเฉลี่ยเมื่อถึงอายุหย่านม และค่า ADG ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฟ้าทะลายโจรสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะเล็กน้อย นอกจากนี้เมื่อพบว่าลูกสุกรดูดนมเริ่มป่วยแสดงอาการอุจจาระร่วง ควรรีบบำบัดเพราะจะทำให้มีอัตรารอดสูงกว่า (คณิต และคณะ, 2545)

ปัญหาที่ผลการทดลองแปรปรวน เนื่องจากขาดการควบคุมคุณภาพ จึงได้มีผู้ใช้ความพยายามในการวิเคราะห์ปริมาณ total lactone โดยวิธีของ Thai Pharmacopoeia (Thai Pharmacopoeia, 1995) พบว่ายังมีปัญหาเรื่อง end point การศึกษานี้จึงเป็นการพยายามแก้ปัญหาเรื่อง end point ไม่ชัดเจน และมีผู้ใช้วิธี HPLC วิเคราะห์ andrographolide พบว่ามีความหลากหลายเรื่องวิธีการสกัด และ HPLC system (Xu et al., 2002; สุรพล และคณะ, 2000; Zhao et al., 2002; Patarapanich et al., 2002; Li et al., 2002; Li et al., 2004; Jain et al., 2000; Fu et al., 1995) จึงได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม

วิธีการทดลอง

1. การวิเคราะห์ total lactone

เป็นการวิเคราะห์ตามวิธีของ Thai Herbal Pharmacopeia (ดูภาคผนวก) โดยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้สังเกต end point ได้ง่ายและแม่นยำขึ้น โดยหลังจากใส่ sodium sulfate แล้วนำไป reflux จากนั้นนำมากรองผ่าน celite 1 ก. หลังกรองล้าง celite ด้วย hot ethanol 2 มล. 3 ครั้ง หลังจากนั้นจึงเติมน้ำ 20 มล. ทิ้งให้เย็น เติม 0.1 M sodium hydroxide จนเป็นกลาง โดยใช้ phenolphthalein เป็น indicator แล้วเติม 0.1 M sodium hydroxide 5 มล. reflux บน water bath 30 นาที ทิ้งให้เย็น ไตเตรทด้วย 0.05 M hydrochloric acid โดยใช้ phenolphthalein เป็น indicator คำนวณปริมาณ sodium hydroxide ที่เหลือ และที่ใช้ไปในการทำปฏิกริยากับ lactone ซึ่ง 0.1 M sodium hydroxide 1 มล. จะทำปฏิกริยากับ andrographolide 35.05 มก.

ผลการทดลอง

การวิเคราะห์หาปริมาณ total lactones ด้วยวิธีตาม Thai Herbal Pharmacopoeia พบว่ามีค่าแปรปรวนเนื่องจากการอ่านค่า end point จากการสังเกตพบว่ามีการปนเปื้อนของผงถ่านลงไปในสารละลาย จึงได้ทดลองใช้ celite เป็นตัวช่วยกรอง จากการทดลองพบว่าการกรองด้วย celite จะมีปริมาณ total lactones มากกว่าการใช้ผงถ่าน (ตารางที่ 1) เนื่องจาก celite ไม่ดูดซับปริมาณ lactones นอกจากนี้ยังช่วยให้การสังเกตผลในขั้นตอนของ titration ชัดเจนขึ้น

ตารางที่ 1 ปริมาณ total lactone ในฟ้าทะลายโจรเมื่อใช้ผงถ่านและ celite เป็นตัวกรอง

วิธีวิเคราะห์	ปริมาณ total lactone (%w/w)					
	1	2	3	4	5	Mean ±SD
ใช้ผงถ่าน	6.70	6.98	6.63	6.86	6.77	6.79±0.14*
ใช้ celite	7.52	7.97	7.41	7.85	7.67	7.73±0.23*

* $p < 0.05$

2. การวิเคราะห์สาร andrographolide

2.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสม

ทำการทดลองเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากฟ้าทะลายโจร โดยใช้ตัวทำละลาย คือ เมทานอล, เอทานอล, 95%เอทานอล และอะซีโตน สกัดโดยวิธี soxhlet apparatus นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ andrographolide ด้วย HPLC

ผลการทดลอง

จะเห็นว่าตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ เมทานอล ซึ่งสกัดสาร andrographolide ได้มากที่สุด รองลงมาคือ 95% เอทานอล, เอทานอล และอะซีโตนตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณของ andrographolide ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	ปริมาณ andrographolide (% w/w)			
	1	2	3	mean±SD
เมทานอล	1.87	1.86	1.89	1.87±0.02*
เอทานอล	1.62	1.63	1.62	1.62±0.01*
95%เอทานอล	1.73	1.73	1.74	1.73±0.01*
อะซีโตน	1.43	1.44	1.43	1.43±0.01*

* $p < 0.05$

2.2 การหาวิธีการสกัดที่เหมาะสม

ศึกษาผลของการสกัดด้วยวิธีต่างๆ คือ maceration, soxhlet apparatus และใช้ ultrasonic technique โดยเตรียมสารสกัดดังนี้

2.2.1 การสกัดด้วยวิธี maceration นำผงตัวอย่าง 100 มก. หมักด้วยเมทานอล 30 มล. ทิ้งไว้ 1 คืน กรองสารละลายที่ได้และปรับปริมาตรจนครบ 100 มล. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วย HPLC (ทำการทดลอง 5 ตัวอย่าง)

2.2.2 การสกัดด้วย soxhlet apparatus นำผงตัวอย่าง 100 มก. สกัดด้วย Soxhlet โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จนกระทั่งสารละลายใน chamber ใส แล้วสกัดต่ออีก 1, 2 และ 3 ชม. นำสารสกัดที่ได้มาปรับปริมาตรจนครบ 100 มล. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วย HPLC

2.2.3 การสกัดด้วยวิธี sonicate

- ชั่งผงตัวอย่าง 100 มก. เติมเมทานอล 30 มล. นำไป sonicate ที่เวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ กรองสารละลายที่ได้ และปรับปริมาตรจนครบ 100 มล. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วย HPLC (ทำการทดลอง 5 ตัวอย่าง)

- ชั่งผงตัวอย่าง 100 มก. เติมเมทานอล 10 มล. นำไป sonicate 10 นาที centrifuge กรองแยกสารละลายเก็บไว้ นำส่วนตะกอนนำมาทำซ้ำขั้นตอนเดิมอีก 2ครั้ง รวมสารละลายทั้งหมดปรับปริมาตรจนครบ 100 มล. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วย HPLC (ทำการทดลอง 5 ตัวอย่าง)

ผลการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัด พบว่าสำหรับวิธีการสกัดโดยใช้ soxhlet เมื่อสกัดต่อหลังจากที่สารสกัดครั้งสุดท้ายใสแล้ว 2 ชม. จะมีปริมาณ andrographolide สูงกว่าที่เวลา 1 และที่เวลา 3 ชม. มี andrographolide ลดลง อาจเนื่องจากมีการสลายตัว (ตารางที่ 3) ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการสกัดด้วย soxhlet เมื่อได้สารละลายใสแล้วสกัดต่ออีก 2 ชม.

ตารางที่ 3 ปริมาณสาร andrographolide ที่ได้จากการสกัดด้วย Soxhlet apparatus

ตัวอย่าง	ปริมาณ andrographolide (% w/w)			
	1	2	3	mean±SD
สกัดต่อ 1 ชม.	3.14	3.14	3.17	3.15±0.02
สกัดต่อ 2 ชม	3.27	3.21	3.25	3.24±0.03
สกัดต่อ 3 ชม	2.50	2.80	2.66	2.65±0.15*

* $p < 0.05$

เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยวิธีอื่นจะเห็นว่าวิธีการสกัดที่ได้ปริมาณ andrographolide มากที่สุด คือการสกัดด้วย soxhlet รองลงมาคือวิธี maceration และการ sonicate สำหรับการ sonicate ที่เวลาต่างๆ กัน พบว่าปริมาณสารที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกัน แสดงว่าด้วยวิธีนี้เวลาที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อปริมาณสาร andrographolide (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณสาร andrographolide ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ

วิธีการสกัด	ปริมาณ andrographolide (%w/w)					
	1	2	3	4	5	mean±SD
วิธีสกัดด้วย Soxhlet	1.59	1.59	1.57	1.57	1.57	1.58±0.01*
วิธี maceration	1.33	1.34	1.34	1.36	1.36	1.35±0.01*
วิธี sonicate 5 min.	1.21	1.19	1.19	1.21	1.20	1.20±0.01
วิธี sonicate 10 min.	1.21	1.20	1.25	1.24	1.22	1.22±0.02
วิธี sonicate 15 min.	1.20	1.20	1.21	1.21	1.24	1.21±0.02
วิธี sonicate 20 min.	1.20	1.21	1.22	1.21	1.20	1.21±0.01
วิธี sonicate 10 min.x3 ครั้ง	1.21	1.22	1.23	1.23	1.21	1.22±0.01

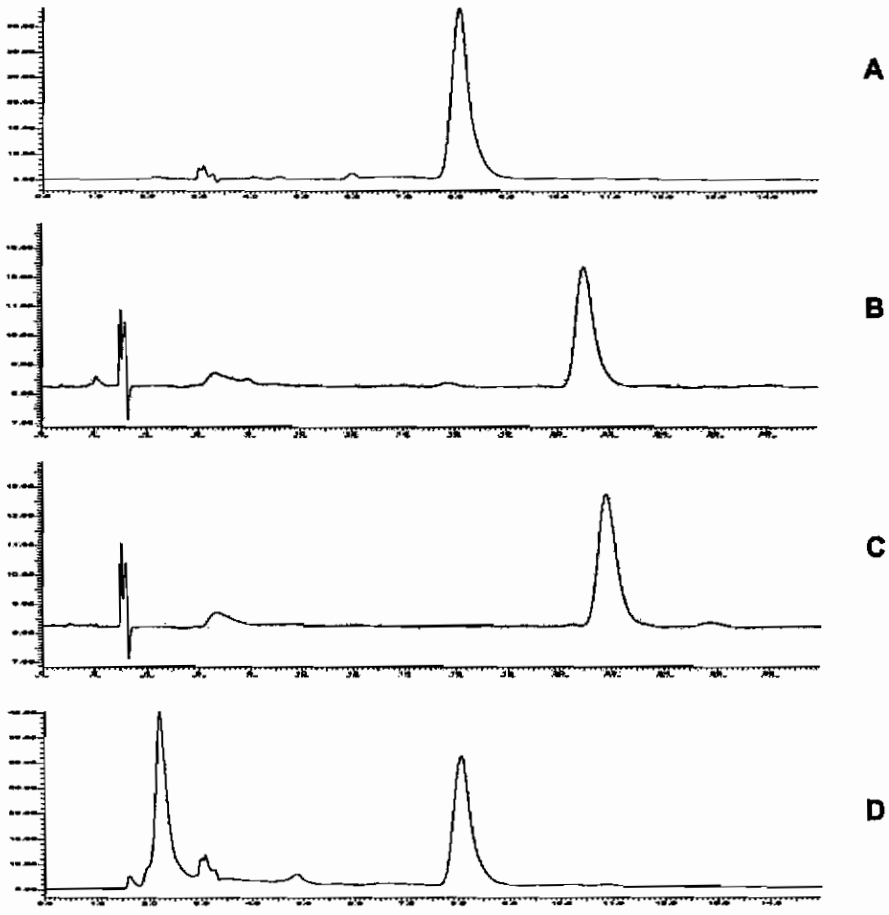
* $p < 0.05$

3. การปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC

ทดลองพัฒนาวิเคราะห์ปริมาณ andrographolide โดยปรับ wavelength ในการdetect และปรับสัดส่วนของตัวทะละลายระหว่างเมทานอลและน้ำ หรือ acetronitrile และน้ำ จนได้สภาวะที่เหมาะสม

ผลการทดลอง

ผลทดลองพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ andrographolide พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ คือ ใช้ column C_{18} (250x4.6 mm, 5 µ) mobile phase คือ เมทานอล:น้ำ (55:45) วัด absorbtion ที่ 229 nm ใช้ flow rate 0.8 ml/min และ injection volume เท่ากับ 10 µl (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 Chromatogram ของสารมาตรฐาน andrographolide (A), dehydroandrographolide (B), neoandrographolide (C) และตัวอย่างฟ้าทะลายโจร (D)

ชา

ชาเป็นพืชที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ มีการศึกษาวิจัยมากมาย จึงได้มีผู้ผลิตเครื่องดื่มจากชาและชาเขียวเพื่อสุขภาพ อุตสาหกรรมขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้มีกากชาเหลือเป็นจำนวนมาก น่าจะได้มีการนำมาศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์ จากการรวบรวมข้อมูลงานวิจัยของชาที่เกี่ยวกับการผลิตสัตว์ พบว่ามีหลายฉบับดังนี้

1. ผลต่อสัตว์ปีก

ไก่ที่กินอาหารผสมด้วยผงชาเขียว 1, 2.5 และ 5% เมื่ออายุ 3-10 สัปดาห์ พบว่าเมื่ออายุ 10 สัปดาห์ น้ำหนักร่างกายจะลดลงตามปริมาณของชาเขียวในอาหารที่เพิ่มขึ้น ความแตกต่างของ feed conversion ระหว่างกลุ่มควบคุม (ไม่ได้กินอาหารผสมชาเขียว) และกลุ่มที่กินอาหารผสมชาเขียว 5% เท่ากับ 0.61 เปอร์เซ็นต์ของเนื้ออกและต้นขาที่ชำแหละแล้ว (dressing percentage) ของไก่ที่กินอาหารผสมชาเขียว 5% จะมีค่าต่ำสุด น้ำหนักไขมันที่ท้องลดลงตามปริมาณชาเขียวในอาหารที่เพิ่มขึ้น สีของเนื้ออกและต้นขาจะเข้มขึ้นตามปริมาณชาที่ผสมในอาหาร (Kaneko *et al.*, 2001) Ueda และคณะ ศึกษาพบว่าไก่ที่กินอาหารผสมด้วยซาโปนินจากชา หรือ quinine sulfate ขนาด 0.5 และ 1% นาน 12 ชม. จะมีผลลดการกินอาหารใน 4 ชม. เช่นกัน เมื่อลองให้ไก่เลือกกินอาหารระหว่างอาหารปกติ อาหารที่ผสมด้วยซาโปนินจากชาหรือ quinine sulfate ขนาด 0.5 และ1% นาน 12 ชม. พบว่าภายใน 4 ชม. ไก่จะปฏิเสธอาหารที่ผสมด้วย quinine sulfate ไก่ชอบที่จะกินอาหารปกติและอาหารที่ผสมซาโปนินจากชามากกว่า และยังไม่พบความแตกต่างของการกินอาหารในที่กินอาหารปกติ และไก่ที่กินอาหารผสมซาโปนิน 0.5% ให้ไก่กินอาหารปกติ และอาหารผสมซาโปนิน 0.5% วันละ 6 ชม. ในวันที่ 12 ของการทดลอง พบว่าการกินอาหารของไก่กินอาหารปกติระหว่าง 0-2 ชม. เป็นปกติ และ 2-6 ชม. ต่อมาจะเพิ่มขึ้น แต่ในไก่ที่กินอาหารผสมซาโปนิน ระหว่าง 0-2 และ 2-6 ช.ม. การกินอาหารอาหารลดลง เนื่องจากการกินอาหารผสมซาโปนินจะไปทำให้กระเพาะอาหารว่างช้าลง (delayed the crop emptying) ซึ่งแสดงว่าผลลดการกินอาหารที่ผสมด้วยชา คาดว่าเนื่องมาจากกระเพาะอาหารยังมีอาหารเหลืออยู่มากกว่าจากรสขมของซาโปนินจากชา (Ueda *et al.*, 2002)

เมื่อแบ่งไก่เป็นกลุ่มๆ เป็นกลุ่มกินอาหารปกติ (กลุ่มควบคุม) กลุ่มไก่กินอาหารปกติผสมยาปฏิชีวนะ 0.05% chlortetracycline กลุ่มไก่ที่กินอาหารปกติผสม 0.5%, 1% และ 2% ของกากชา (tea byproduct) ทุกกลุ่มนาน 6 สัปดาห์ พบว่าไก่กลุ่มที่กินอาหารผสมยาปฏิชีวนะจะมีน้ำหนักร่างกายสูงกว่าทุกกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างของการกินอาหารและ feed efficiency ระหว่างกลุ่มศึกษา การเพิ่มกากชาดูเหมือนว่าจะลด LDL-cholesterol ในเลือดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันในกลุ่มศึกษา อาหารที่ผสมกากชาจะเพิ่ม docosahexaenoic

acid (DHA) ในเลือด และลดปริมาณคลอเลสเตอรอลในเนื้อไก่ ระดับของ lipid peroxidation ในเนื้อไก่จะลดลงในกลุ่มไก่ที่กินอาหารผสมกากชา และยาปฏิชีวนะ แต่โปรตีนในเนื้อไก่ทั้งสองกลุ่มจะลดลงเล็กน้อย ปริมาณไขมันที่ท้องจะเพิ่มขึ้นในไก่ที่กินอาหารผสมกากชา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Yang *et al*., 2003)

ไก่ที่กินอาหารที่ผสมด้วยสาร polyphenol จากชา มีผลช่วยลดการกดการเจริญเติบโต และการเกิดอนุมูลอิสระในไก่ที่กินอาหารผสม corticosterone 10 และ 20 มก./กก. โดยจะช่วยลดปริมาณไขมันที่ท้อง ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด และน้ำหนักตับที่เพิ่มขึ้น ลดการเกิดอนุมูลอิสระในกล้ามเนื้อและตับ และลดปริมาณ corticosterone ในเลือด (Eid *et al*., 2003)

2. ผลต่อปลา

มีการจดสิทธิบัตรอาหารปลาที่มีส่วนประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย และไม่ระเหยหรือสารออกฤทธิ์ ได้แก่ ชา กระเทียม ส้ม กานพลู เป็นต้น จะมีผลป้องกันสัตว์น้ำจากโรคได้ (Harel, 2004)

จากผลการศึกษาวิจัยเบื้องต้นประกอบการวิจัยสมุนไพรในสัตว์ สารที่มี antioxidant มีประโยชน์ต่อสุขภาพสัตว์ หากใช้ในขนาดที่เหมาะสม การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดลองฤทธิ์ anti-oxidant ของกากชา เพื่อดูศักยภาพในการนำมาพัฒนาใช้ และได้ประเมินสารกลุ่ม polyphenol ได้แก่ catechin, catechin gallate, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, gallocatechin และ gallocatechin gallate เป็นต้น

วิธีวิเคราะห์สารสำคัญเหล่านี้ในใบชาสด แห้ง รวมทั้งผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากชาที่นิยมใช้ ได้แก่ วิธี HPLC (Lin et al., 1998; Copeland et al., 1998; Dalluge amd Nelson, 2000; Anonymous, 2001; Pelillo et al., 2002; Del Rio et al., 2004; Sharma et al., 2005) และวิธี Micellar Electrokinetic Cromatography (Watanabe et al., 1998; Bonoli et al., 2003) ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาวิธี HPLC สำหรับนำใช้วิเคราะห์สารสำคัญในกากชาซึ่งเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรม

วิธีการทดลอง

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกากชา

1.1 การเตรียมสารสกัด

ศึกษาผลของการสกัดกากชา โดยใช้วิธีการต้มที่เวลาต่างๆ ชั่งผงกากชาแห้ง 20 กรัม ใส่น้ำกลั่น 300 มล. นำไปต้มที่เวลา 1, 2 และ 4 ชม. (โดยจับเวลาหลังจากน้ำเดือด) กรองสารสกัดแล้วนำไปทำให้แห้งด้วยวิธีการ lyophilized ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ คำนวณหา % yield (ทำการทดลอง 5 ตัวอย่าง)

ผลการทดลอง

จากการประเมินค่า % yield พบว่าปริมาณสารสกัดที่ได้จากการต้มที่เวลา 1 และ 2 ชม. มีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนที่เวลา 4 ชม. มีค่ามากกว่าเล็กน้อย ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารจากกากชา น่าจะเป็นที่ 1 ชม. ถึงแม้ว่าที่ 4 ชม. จะได้ปริมาณสารมากกว่าแต่ต้องใช้เวลานานในการต้ม ซึ่งจะเป็นสิ้นเปลืองเวลาและพลังงานไม่เหมาะกับอุตสาหกรรม (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ปริมาณสารสกัดจากกากชาที่ได้จากการต้มที่เวลา 1, 2 และ 4 ชม.

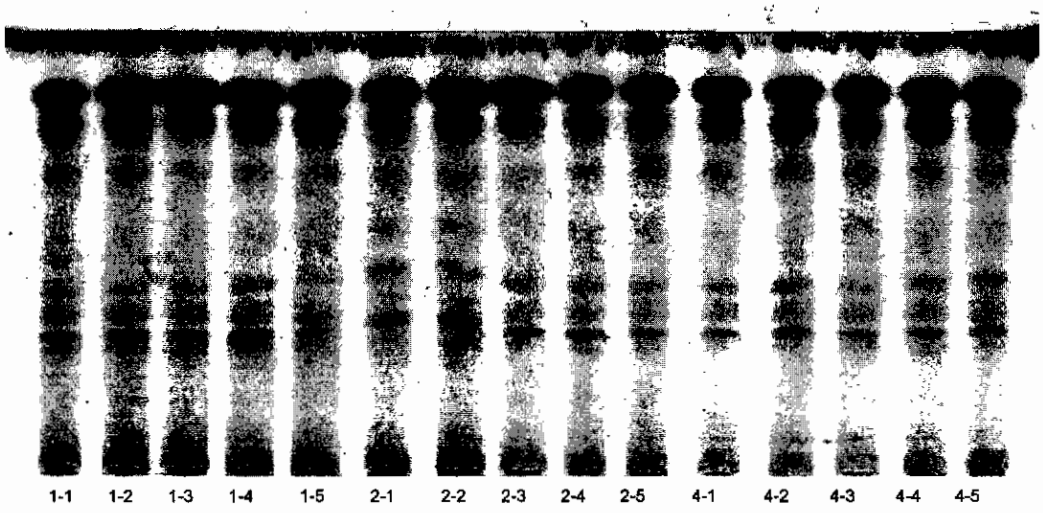
เวลาที่ใช้สกัด (ชม.)	ตัวอย่าง 1		ตัวอย่าง 2		ตัวอย่าง 3		ตัวอย่าง 4		ตัวอย่าง 5		%yield เฉลี่ย (w/w)
	นน.แห้ง (ก.)	นน.สารสกัด (ก.)	นน.แห้ง (ก.)	นน.สารสกัด (ก.)	นน.แห้ง (ก.)	นน.สารสกัด (ก.)	นน.แห้ง (ก.)	นน.สารสกัด (ก.)	นน.แห้ง (ก.)	นน.สารสกัด (ก.)	
1	20.00	2.67	20.01	2.47	20.02	2.40	20.02	2.37	20.01	2.67	**12.57**
2	20.03	2.94	20.02	2.43	20.02	2.53	20.01	2.35	20.01	2.69	**12.93**
4	20.04	3.34	20.00	2.90	20.00	2.66	20.00	2.59	20.00	2.69	**14.17**

1.2 การพัฒนาวิธีตรวจสอบสารสกัดด้วย TLC

ได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารสกัด โดยใช้ silicagel เป็น adsorbent และพัฒนาส่วนผสมของตัวทำละลายหลายๆ system

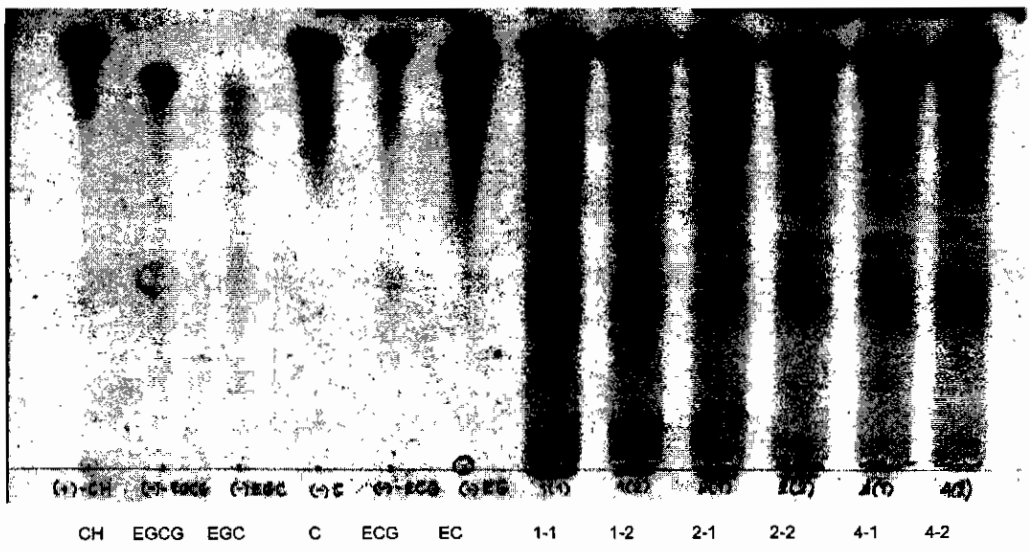
ผลการทดลอง

system ที่เหมาะสมในการแยกสารสกัด คือ ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (50: 5.5:5.5:13) (รูปที่ 2 และ 3)



รูปที่ 2 TLC ของสารสกัดจากกากชา เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate: formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:13) เป็น solvent spray ด้วย 30% กรดซัลฟุริก

(1-2)-(1-5), (2-1)-(2-5) และ (4-1)-(4-2) = กากชาที่ต้มนาน 1, 2 และ 4 ชม. ตามลำดับ



รูปที่ 3 TLC ของสารสกัดจากกากชาและสารมาตรฐาน เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent ใช้ ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:13) เป็น solvent spray ด้วย 30% กรดซัลฟุริก

CH = (+)-catechin hydrate; EGCG = (-)-epigallocatechin gallate; EGC = (-)-epigallocatechin; C = (-)-catechin; ECG = (-)-epicatechin gallate; EC = (-)-epicatechin

(1-2)-(1-5), (2-1)-(2-5) และ (4-1)-(4-2) = กากชาที่ต้มนาน 1, 2 และ 4 ชม. ตามลำดับ

1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากชา โดยใช้วิธี DPPH scavenging model (Hatano et al., 1988; Ancerewiz et al., 1988; Duh and Yen, 1997)

1.3.1 การเตรียมสารมาตรฐาน (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)

- เตรียมสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 100 มคก./มล. โดยละลายในเมทานอล แล้วนำไป sonicate 10 นาที
- เตรียมสารละลาย 1 mM เตรียมสารละลาย 1 mM DPPH ในเมทานอล
- เตรียม mixture ของ reaction ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

หลอดทดลองที่	สารตัวอย่าง (µl)	เมทานอล (µl)	DPPH (µl)
1	0	2,800	200
2	10	2,790	200
3	20	2,780	200
4	30	2,770	200
5	40	2,760	200
6	50	2,750	200
7	60	2,740	200

- ผสม mixture ด้วย vortex mixer แล้วจับเวลา 10 นาที ทันทีหลังจากผสมแล้ว
- นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 515 nm และคำนวณค่า EC_{50} ของสารจากกราฟที่ plot ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารกับ % inhibition โดยคำนวณได้จาก

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(ABS_{control} - ABS_{sample})}{ABS_{control}} \times 100$$

1.3.2 การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

- เตรียมสารสกัดตัวอย่าง ความเข้มข้น 400 มคก./มล. โดยนำผงกากชาที่ lyophyllized 10 มก. มาละลายด้วยน้ำ 2 มล. ให้ละลายจนหมด แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 25 มล.
- เตรียมสารละลาย 1 mM DPPH ในเมทานอล
- เตรียม mixture ของ reaction ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

หลอดทดลองที่	สารตัวอย่าง (µl)	เมทานอล (µl)	DPPH (µl)
1	0	2,800	200
2	10	2,790	200
3	20	2,780	200
4	30	2,770	200
5	40	2,760	200
6	50	2,750	200
7	60	2,740	200
8	70	2,730	200

- ผสม mixture ด้วย vortex mixer แล้วจับเวลา 10 นาที ทันทีหลังจากผสมแล้ว

- นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 515 nm คำนวณค่า EC_{50} ของสารจากกราฟเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน

- คำนวณหาปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกากชา โดยเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน EGCG

ผลการทดลอง

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากชา เมื่อพิจารณาจากค่า EC_{50} พบว่าสารสกัดจากกากชาที่ต้มนาน 1 ชม. จะมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดจากกากชาที่ต้มนาน 2 และ 4 ชม. ในการคำนวณหาปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกากชา โดยเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน EGCG พบว่าสารสกัดจากกากชาที่ต้มนาน 1 ชม. มีปริมาณสูงกว่าสารสกัดจากกากชาที่ต้มนาน 2 และ 4 ชม. โดยคิดเป็น 20.19%, 16.9% และ 16.9% น้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ฤทธิ์และปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกากชา

สารสกัดกากชา	EC_{50} (µg/ml)						mg. equivalence as EGCG					
	1	2	3	4	5	เฉลี่ย	1	2	3	4	5	เฉลี่ย
1 ชม.	5.99	5.56	5.57	5.89	5.60	**5.72**	2.00	2.15	2.34	2.11	2.35	**2.19**
2 ชม.	7.13	7.72	7.70	7.57	7.38	**7.50**	1.75	1.51	1.69	1.69	1.80	**1.69**
4 ชม.	7.60	7.65	7.46	7.48	7.81	**7.58**	1.60	1.70	1.74	1.74	1.53	**1.66**

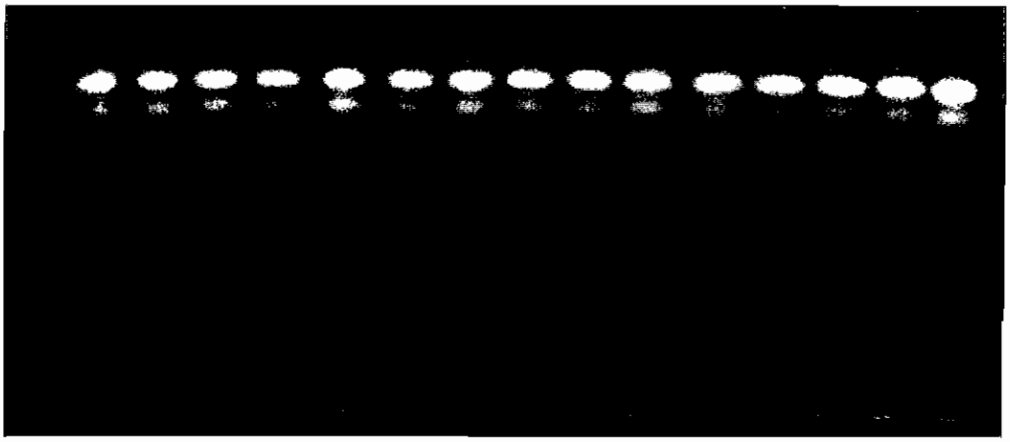
1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC (Sanchez-Medina et al., 2001)

นำสารสกัดกากชา มาวิเคราะห์ด้วย TLC โดยใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:13) เป็น solvent แล้ว spray ด้วย

0.2% DPPH ในเมทานอล นับจำนวน spot ที่ให้ผล positive กับ DPPH คือ spot ที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อทิ้งไว้ 8 ชม.

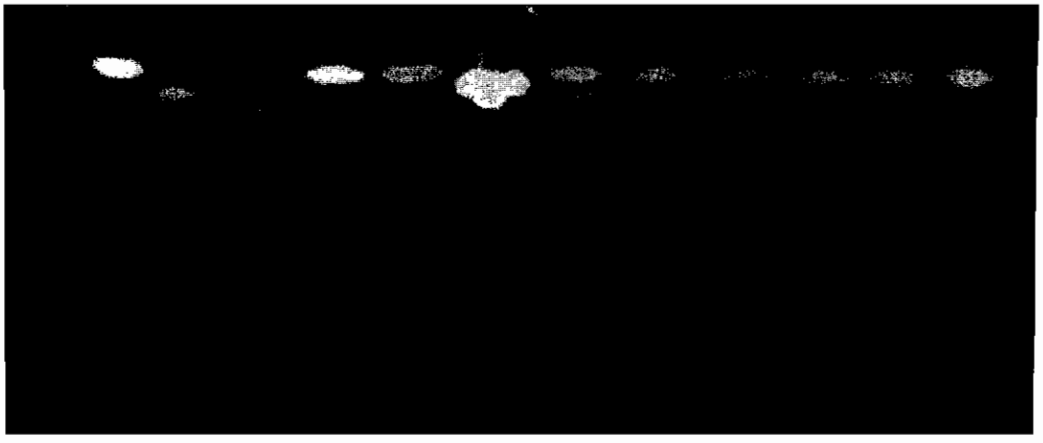
ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่าในสารสกัดมีสารซึ่งแสดงฤทธิ์ antioxidant หลายจุด ดังรูปที่ 4 และ 5



รูปที่4 TLC ของสารสกัดจากกากชา เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:13) เป็น solvent spray ด้วย 0.2% DPPH

(1-2)-(1-5), (2-1)-(2-5) และ (4-1)-(4-2) = กากชาที่ต้มนาน 1, 2 และ 4 ชม. ตามลำดับ



รูปที่ 5 TLC ของสารสกัดจากกากชาและสารมาตรฐาน เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:13) เป็น solvent spray ด้วย 0.2% DPPH

CH = (+)-catechin hydrate; EGCG = (-)-epigallocatechin gallate; EGC = (-)-epi-gallocatechin; C = (-)-catechin; ECG = (-)-epicatechin gallate; EC = (-)-epicatechin

(1-2)-(1-5), (2-1)-(2-5) และ (4-1)-(4-2) = กากชาที่ต้มนาน 1, 2 และ 4 ชม. ตามลำดับ

2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญในตัวอย่างกากชา

ทดลองพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่พบในตัวอย่างกากชาด้วย HPLC โดยปรับสัดส่วนของ mobile phase ที่ใช้ เนื่องจากสารสำคัญที่พบในกากชามีหลายชนิด ซึ่งเป็นสารพวก polyphenol ได้แก่ catechin และอนุพันธ์ รวมทั้ง caffeine ซึ่งระบบการวิเคราะห์โดยใช้ mobile phase ที่เป็นระบบ isocratic จะใช้เวลานานและไม่สามารถแยกสารทั้งหมดออกจากกันได้ ดังนั้นจึงได้ทดลองโดยใช้ระบบที่เป็น gradient

2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)

เนื่องจาก (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) จะพบมากในชา (Lin et al., 1998; Peterson et al., 2005) และมีฤทธิ์แรงในการต้านอนุมูลอิสระ (Nanjo et al., 1996) จึงเลือกใช้เป็นสารมาตรฐานในการทดลองนี้ โดยชั่งสารมาตรฐาน EGCG 5 mg ละลายด้วยเมทานอลแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน จำนวน 2.5, 5.00, 7.50, 10.00, 12.50 และ 15.00 ml นำมาปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ครบ 25 ml จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 µg/ml ตามลำดับ นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC Plot กราฟของ standard curve ระหว่างค่าความเข้มข้นและ peak area

2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างกากชาที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilized จำนวน 10 mg ละลายด้วย 0.1% phosphoric acid นำไป sonicate นาน 10 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วย 0.1% phosphoric acid ให้ครบ 10 ml กรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

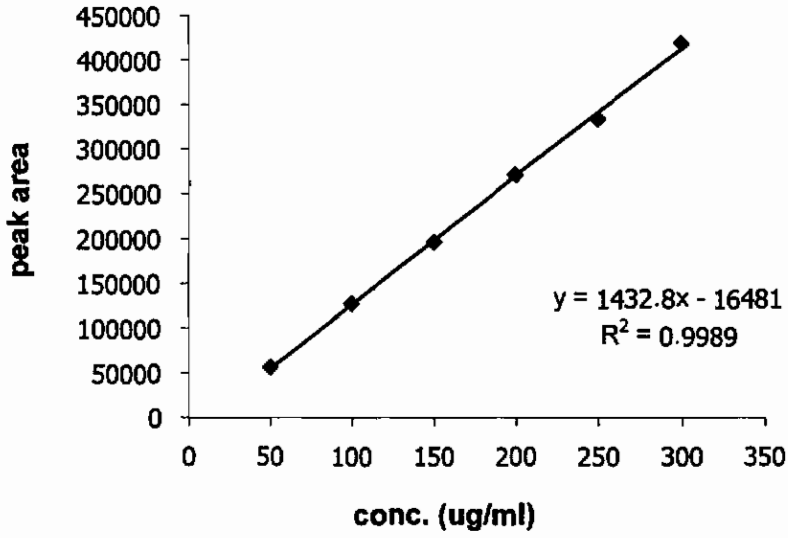
ผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญในตัวอย่างกากชา

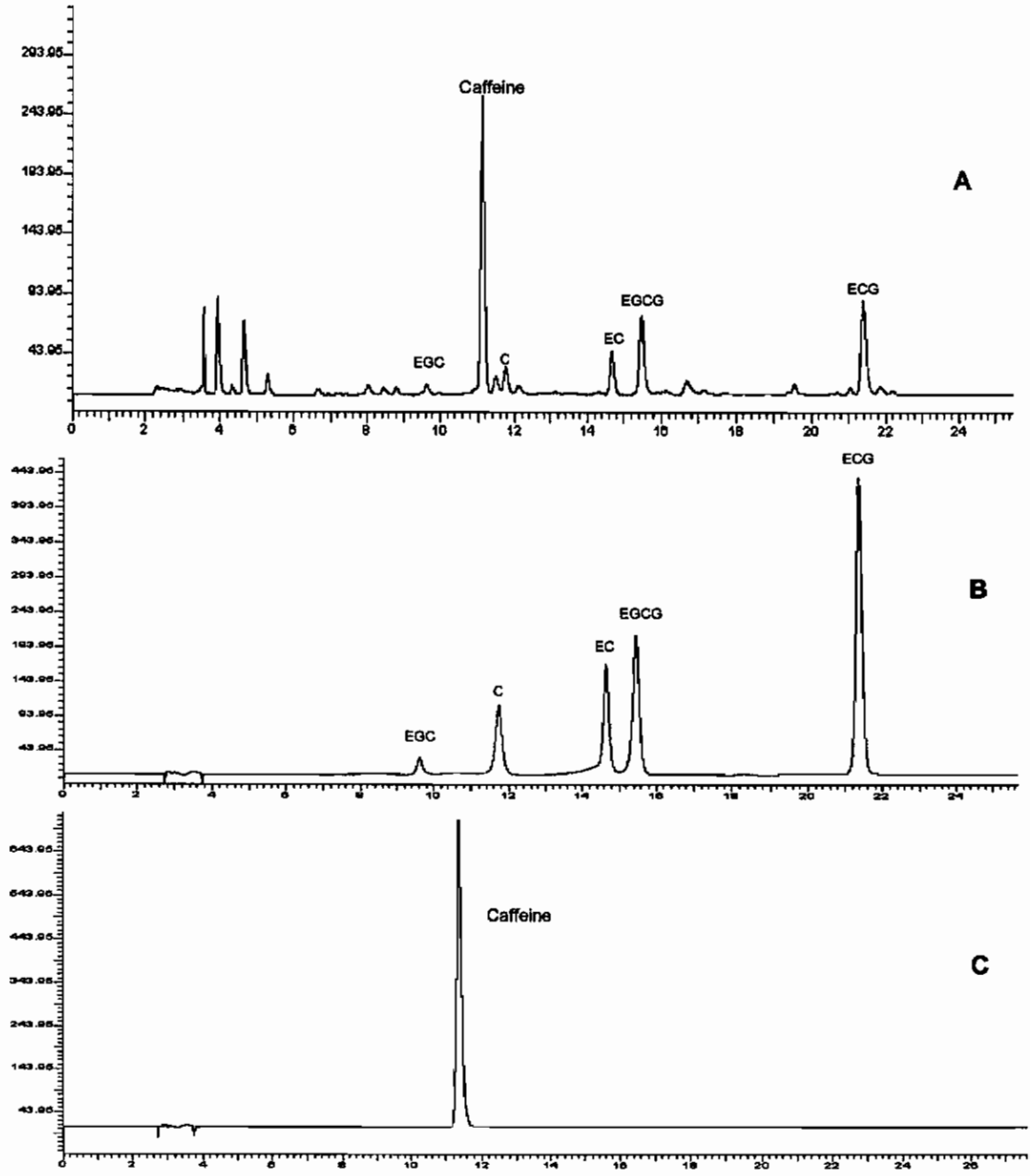
ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่พบในตัวอย่างกากชาด้วย HPLC คือ ใช้ column C_{18} (250x4.6 mm, 5 µ) mobile phase เป็นระบบ gradient ระหว่าง acetronitrile และ 0.1% phosphoric acid ดังตารางด้านล่าง ใช้ flow rate 1.0 ml/min วัด absorption ที่ 280 nm และ injection volume คือ 10 µl

เวลา (นาที)	flow rate (ml/min)	% acetronitrile	% 0.1%phosphoric acid
0	1.0	10	90
20	1.0	25	75
8	1.0	10	90

เมื่อ plot กราฟของสารมาตรฐาน (-)-epigallocatechin gallate จะได้ linear regression line ดังรูปที่ 6 จะเห็นว่าวิธีนี้สามารถแยกสารสำคัญในกากชาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งได้แก่ catechin, epigallocatechin gallate, epigallocatechin, epicatechin gallate และ epicatechin นอกจากนี้ยังสามารถแยกสาร caffeine ได้อีกด้วย (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 Standard curve ของสาร (-)-epigallocatechin gallate (50-300 µg/ml)



รูปที่ 7 Chromatogram ของตัวอย่างกากชา ความเข้มข้น 1 มก./มล. (A), Standard mixture ของ (-)-epigallocatechin, (±)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin gallate และ (-)-epicatechingallate ความเข้มข้น 200 มคก./มล. (B) และ Standard caffeine ความเข้มข้น 200 มคก./มล. (C)

EGC = (-)-epigallocatechin C = (±)-catechin

EC = (-)-epicatechin EGCG = (-)-epigallocatechin gallate

ECG = (-)-epicatechin gallate

องุ่น

อุตสาหกรรมไวน์จากองุ่นได้ขยายมากขึ้นในประเทศไทย จึงมีกากองุ่นเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก จากงานวิจัยที่ผ่านมาองุ่นมีสาร antioxidant ที่มีประโยชน์มาก จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำกากมาทดสอบดูว่ายังคงเหลืออยู่มากน้อยเพียงใด และจากการสำรวจเอกสารการวิจัย พบว่ารายงานการวิจัยถึงสรรพคุณขององุ่นในคนจะมีมาก แต่ในสัตว์ยังมีการใช้น้อย ดังนี้

ผลต่อสุกร

ศึกษาผลของการใช้กรดไขมันจากเมล็ดองุ่น ปริมาณ 2.5, 5 และ 7.5% เป็นอาหารเสริมในสุกรลูกผสมเพื่อการเจริญเติบโต และความสมบูรณ์ของสุกร พบว่าที่ปริมาณ 5% จะให้ผลดีต่อปริมาณการใช้อาหาร (feed intake) และน้ำหนักตัว มีไขมันสันหลังหนาขึ้นในสุกรเพศผู้ และมีการเพิ่มขึ้นของกรด linoleic ในไขมันสันหลังด้วย (Fernando, 1970)

วิธีการทดลอง

1. **การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกากองุ่น**

1.1 การเตรียมสารสกัด ศึกษาผลของการสกัดด้วยวิธีต่างๆ โดยเตรียมสารสกัดดังนี้

1.1.1 การสกัดด้วยวิธี maceration

นำผงกากองุ่น 10 ก. หมักด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ 80% เอทานอล, เอทิลอะซีเตท และเมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5) อย่างละ 50 มล. ทิ้งไว้ค้างคืน กรองเก็บส่วนใสไว้ ส่วนกากองุ่นนำไปหมักต่อจนกระทั่งสารสกัดที่ได้มีสีจางจนเกือบไม่มีสี รวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมด นำไประเหยแห้งภายใต้แรงดันสุญญากาศ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ คำนวณหา % yield (ทำการทดลอง 5 ตัวอย่าง)

1.1.2 การสกัดด้วยการ sonicate

ชั่งผงตัวอย่าง 10 ก. ใส่ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ 80% เอทานอล, เอทิลอะซีเตท และเมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5) อย่างละ 50 มล. นำไป sonicate ที่เวลา 10, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ จากนั้นกรองแล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งภายใต้แรงดันสุญญากาศ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ คำนวณหา % yield (ทำการทดลอง 5 ตัวอย่าง)

ผลการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัด พบว่าตัวทำละลาย เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5) จะให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายตัวอื่น และการสกัดด้วยวิธี maceration จะให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารจากกากองุ่น คือ วิธี maceration โดยใช้ตัวทำละลายคือ เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ปริมาณของสารสกัดจากกากองุ่นที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ

วิธีการสกัด	ตัวทำละลาย	% yield (w/w)					
		1	2	3	4	5	เฉลี่ย
Maceration	80% เอทานอล	23.92	23.05	22.26	24.10	22.53	**23.17**
	เอทิลอะซีเตท	10.47	9.79	9.86	10.06	9.37	**9.91**
	เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5)	24.15	23.88	24.52	24.87	23.55	**24.19**
Sonicate 10 min.	80% เอทานอล	6.18	5.19	5.68	7.27	5.97	**6.06**
	เอทิลอะซีเตท	8.66	7.63	8.46	8.11	7.59	**8.09**
	เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5)	13.65	14.54	14.24	14.47	13.14	**14.01**
Sonicate 15 min.	80% เอทานอล	4.98	6.06	4.57	5.16	5.78	**5.31**
	เอทิลอะซีเตท	8.03	8.06	7.84	8.01	7.89	**7.97**
	เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5)	12.92	13.63	14.03	13.35	14.56	**13.53**
Sonicate 20 min.	80% เอทานอล	4.89	5.29	5.28	6.48	6.65	**5.72**
	เอทิลอะซีเตท	8.33	8.43	8.12	8.42	8.20	**8.30**
	เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5)	11.96	14.16	13.00	10.36	12.36	**12.37**

1.2 การพัฒนาวิธีตรวจสอบสารสกัดด้วย TLC

ได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารสกัด โดยใช้ silicagel เป็น adsorbent และพัฒนาส่วนผสมของตัวทำละลายหลายๆ system

ผลการทดลอง

system ที่เหมาะสมในการแยกสารสกัด คือ ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (50: 5.5:5.5:13) (รูปที่ 8)

รูปที่ 8 TLC ของสารสกัดจากกากองุ่น เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate: formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:6.5) เป็น solvent spray ด้วย 30% กรดซัลฟุริก

1 = (-)-catechin, 2 = (-)-epigallocatechin, 3 = (-)-epicatechin gallate, 4 = (-)-epigallocatechin gallate, 5 = (-) -epicatechin

6, 7, 8 = สารสกัดองุ่นที่ได้จากวิธี maceration ด้วยตัวทำละลายเมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5), 80% เอทานอล และเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ

9, 10, 11 = สารสกัดองุ่นที่ได้จากวิธี sonication 10 min. ด้วยตัวทำละลายเมทานอล: กรดฟอร์มิก (95:5), 80% เอทานอล และเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ

12, 13, 14 = สารสกัดองุ่นที่ได้จากวิธี sonication 15 min. ด้วยตัวทำละลายเมทานอล: กรดฟอร์มิก (95:5), 80% เอทานอล และเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ

15, 16, 17 = สารสกัดองุ่นที่ได้จากวิธี sonication 20 min. ด้วยตัวทำละลายเมทานอล: กรดฟอร์มิก (95:5), 80% เอทานอล และเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ

1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากองุ่น โดยใช้วิธี DPPH scavenging model (Hatano et al., 1988; Ancerewiz et al., 1988; Duh and Yen, 1997)

1.3.1 การเตรียมสารมาตรฐาน (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)

- เตรียมสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 100 มคก./มล. โดยละลายในเมทานอล แล้วนำไป sonicate 10 นาที
- เตรียมสารละลาย 1 mM เตรียมสารละลาย 1 mM DPPH ในเมทานอล
- เตรียม mixture ของ reaction ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

หลอดทดลองที่	สารตัวอย่าง (µl)	เมทานอล (µl)	DPPH (µl)
1	0	2,800	200
2	10	2,790	200
3	20	2,780	200
4	30	2,770	200
5	40	2,760	200
6	50	2,750	200
7	60	2,740	200

- ผสม mixture ด้วย vortex mixer แล้วจับเวลา 10 นาที ทันทีหลังจากผสมแล้ว
- นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 515 nm แล้ว plot standard curve ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของสาร

1.3.2 การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

- เตรียมสารสกัดตัวอย่าง โดยเตรียมความเข้มข้นดังนี้

<u>ตัวทำละลาย:เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5)</u>

Maceration : สารสกัดที่ได้ละลายด้วยเมทานอล 100 มล. จากนั้นนำสารละลายมา 1 มล. และปรับปริมาตรเป็น 50 มล.

Sonication : สารสกัดที่ได้ละลายด้วยเมทานอล 100 มล. จากนั้นนำสารละลายมา 2 มล. และปรับปริมาตรเป็น 50 มล.

<u>ตัวทำละลาย: 80% เอทานอล</u>

Maceration : สารสกัดที่ได้ละลายด้วยเมทานอล 100 มล. จากนั้นนำสารละลายมา 1 มล. และปรับปริมาตรเป็น 50 มล.

Sonication : สารสกัดที่ได้ละลายด้วยเมทานอล 100 มล. จากนั้นนำสารละลายมา 4 มล. และปรับปริมาตรเป็น 50 มล.

- เตรียมสารละลาย 1 mM DPPH ในเมทานอล
- เตรียม mixture ของ reaction ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

หลอดทดลองที่	สารตัวอย่าง (µl)	เมทานอล (µl)	DPPH (µl)
1	0	2,800	200
2	40	2,760	200
3	80	2,720	200

- ผสม mixture ด้วย vortex mixer แล้วจับเวลา 10 นาที ทันทีหลังจากผสมแล้ว

- นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 515 nm คำนวณหาปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกากชาที่เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน EGCG โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงของ standard curve

ผลการทดลอง

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากองุ่น เมื่อพิจารณาจากปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน EGCG พบว่าปริมาณสารสกัดจากกากองุ่นด้วยตัวทำละลายเมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5) จะให้ปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด และการสกัดด้วยวิธี maceration จะให้ปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารจากกากองุ่นให้มีปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือวิธี maceration โดยใช้ตัวทำละลาย คือ เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5) โดยคิดเป็น 11.89% จากน้ำหนักสารสกัด (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากองุ่น

วิธีการสกัด	ตัวทำละลาย	mg. equivalence as EGCG					
		1	2	3	4	5	เฉลี่ย
Maceration	80% เอทานอล	250.55	229.76	252.41	226.31	263.61	**244.53**
	เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5)	307.48	281.71	271.26	279.49	306.47	**289.48**
Sonicate 10 min.	80% เอทานอล	79.09	42.79	85.40	92.31	83.71	**84.66**
	เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5)	143.70	159.62	145.70	157.86	161.90	**153.76**
Sonicate 15 min.	80% เอทานอล	64.39	73.70	61.57	66.00	70.98	**67.33**
	เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5)	149.49	158.78	165.30	169.04	171.48	**162.82**
Sonicate 20 min.	80% เอทานอล	66.2	77.76	83.29	87.4	96.09	**82.15**
	เมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5)	170.84	159.89	149.15	149.84	164.08	**158.76**

สารสกัดจากกากองุ่นด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท ปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน EGCG มีน้อยมาก ซึ่งต้องใช้ปริมาณสารสกัดที่ความเข้มข้นมากกว่า 16.7 มก./มล. จึงสรุปได้ว่าเอทิลอะซีเตทเป็นตัวทำละลายที่ไม่ดีในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากกากองุ่น

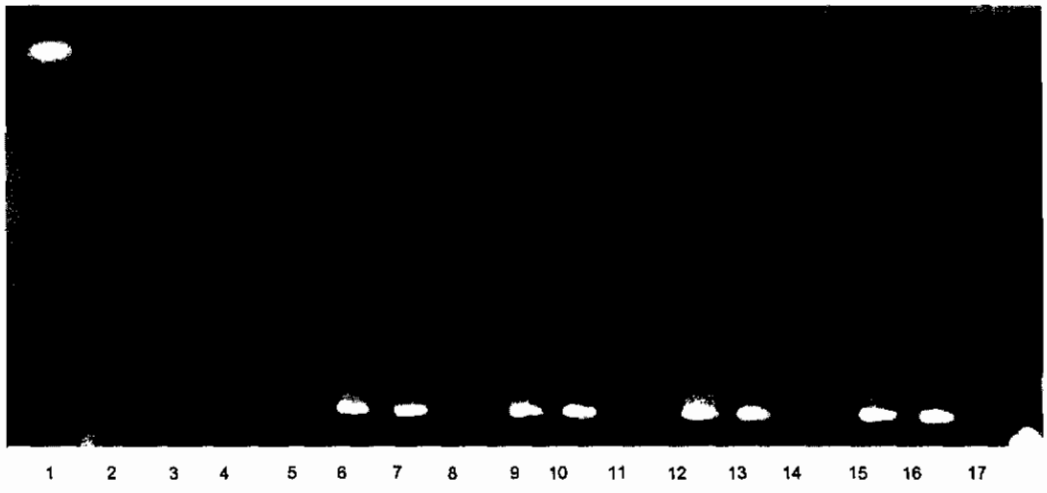
1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC (Sanchez-Medina et al., 2001)

นำสารสกัดกากองุ่น มาวิเคราะห์ด้วย TLC โดยใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate:formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:6.5) เป็น solvent spray ด้วย 0.2%

DPPH ในเมทานอล นับจำนวน spot ที่ให้ผล positive กับ DPPH คือ spot ที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อทิ้งไว้ 8 ชม.

ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกากองุ่น (spot ที่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง) จะเป็นสารกลุ่มอื่นที่มีความเป็นขั้วมากกว่า catechin และอนุพันธ์ ซึ่งพบว่าปริมาณน้อยในกากองุ่น (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 TLC ของสารสกัดจากกากองุ่น เมื่อใช้ silica gel G60 เป็น adsorbent และ ethyl acetate: formic acid:acetic acid:water (50:5.5:5.5:6.5) เป็น solvent spray ด้วย 0.2% DPPH

1 = (-)-catechin, 2 = (-)-epigallocatechin, 3 = (-)-epicatechin gallate, 4 = (-)-epigallocatechin gallate, 5 = (-) -epicatechin

6, 7, 8 = สารสกัดองุ่นที่ได้จากวิธี maceration ด้วยตัวทำละลายเมทานอล:กรดฟอร์มิก (95:5), 80% เอทานอล และเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ

9, 10, 11 = สารสกัดองุ่นที่ได้จากวิธี sonication 10 min. ด้วยตัวทำละลายเมทานอล: กรดฟอร์มิก (95:5), 80% เอทานอล และเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ

12, 13, 14 = สารสกัดองุ่นที่ได้จากวิธี sonication 15 min. ด้วยตัวทำละลายเมทานอล: กรดฟอร์มิก (95:5), 80% เอทานอล และเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ

15, 16, 17 = สารสกัดองุ่นที่ได้จากวิธี sonication 20 min. ด้วยตัวทำละลายเมทานอล: กรดฟอร์มิก (95:5), 80% เอทานอล และเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ

2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญในตัวอย่างกากองุ่น

เมื่อพิจารณาจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากองุ่น พบว่ามีฤทธิ์อ่อน ซึ่งอาจนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปได้น้อย จึงไม่ได้ทำการทดลองในส่วนที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญในกากองุ่น

เอกสารอ้างอิง

Ancerewiz J, Migliavacca E, Carrupt PA, et al.. Structure-property relationships of rimetazidine derivatives and model compounds as potential antioixidants. Free Radical Biology & Medicine 1998;25(1):113-20.

Anonymous. Standard operating protocol (SOP). Available from www.fn.cfs.purdue.edu/bot/Downloads/PDF/greenteasop.pdf. Modified date 5/15/01.

Bartolome B, Nunez V, Monagas M, Gomez-Cordoves C. In vitro antioxidant activity of red grape skins. Eur Food Res Technol 2004;218:173-7.

Bonilla F, Mayen M, Merida J, Medina M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. Food Chemistry 1999;66:209-15.

Bonoli M, Pelillo M, Toschi TG, Larcker G. Analysis of green tea catechins: comparative study between HPLC and HPCE. Food Chemistry 2003;81:631-8.

Cabrera C, Gimenez R, Lopez CM. Determination of tea components with antioxidant activity. J Agric Food Chem 2003;51:4427-35.

Copeland EL, Clifford MN, Williams CM. Preparation of (-)-epigallocatechin gallate from commercial green tea by caffeine precipitation and solvent partition. Food Chemistry 1998;61(1/2):81-7.

Cui M. Antibacterial compositions for treatment of plaque in chick. Faming Zhuanli Shenquing Gongkai Shuomingshu 1989:3pp.

Dalluge JJ and Nelson BC. Determination of tea catechins. J Chromatogr A 2000;881:411-24.

Del Rio D, Stewart AJ, Mullen W, et al. HPLC-MS^n analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. J Agric Food Chem 2004;52: 2807-15.

Der Duh P, Yen GC. Antioxidative activity of three herbal water extracts. Food Chemistry 1997;60(4):639-45.

Eid YZ, Ohtsuka A, Hayashi K. Tea polyphenols reduce glucocorticoid-induced growth inhibition and oxidative stress in broiler chickens. Br Poult Sci 2003;44(1):127-32.

Fernando SC, Alejandro SK, Juan GRW, Jaime DB. Effect of adding plant fatty acids to pig growing and fattening rations. Agr Tec (Santiago de Chile) 1970;30(4):202-9.

Fu X, Zhou F, Zhang L. Determination of andrographolide in medicinal preparations by HPLC. Zhongguo Zhongyao Zazhi 1995;20(6):351-2, 383-4.

Guo Q, Zhao B, Shen S, Hou J, Hu J, Xin W. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. Biochimica et Biophysica Acta 1999;1427:13-23.

Harel M. Feed additives against disease infection in terrestrial and aquatic animals. Patent: PCT Int Appl WO 2004091307, 2004:28pp.

Hatano T, Kagana H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root; their relative astringency and radical scavenging effects. Chem Pharm Bull 1988;36:2090-7.

Jain DC, Gupta MM, Saxean S, Kumar S. LC analysis of hepatoprotective diterpenoids from *Andrographis paniculata*. J Pharm Biomed Anal 2000;22:705-9.

Kaneko K, Yamasaki K, Tagawa Y, Tokunaga M, Tobisa M, Furuse M. Effects of dietary Japanese green tea powder on growth, meat ingredient and lipid accumulation in broilers. Nippon Kakin Gakkaishi 2001;38(5):J77-85.

Li W and Fitzloff JF. Determination of andrographolide in commercial andrographis (*Andrographis paniculata*) products using HPLC with evaporative light scattering detection. J Liq Chromatogr Related Technol 2002;25(9):1335-43.

Li W and Fitzloff JF. HPLC-PDA determination of bioactive diterpenoids from plant materials and commercial products of *Andrographis paniculata*. J Liq Chromatogr Related Technol 2004;27(15):2407-20.

Lin JK, Lin CL, Liang YC, Lin-Shiau SY, Juan IM. Survey of catechins, gallic acid and methylxanthines in green, oolong, Pu-erh and black teas. J Agric Food Chem 1998;46:3635-42.

Mekum W, Tangtaweewipat S, Cheva-Isarakul B. The potential production of antibiotic free chicken meat and eggs. Proceeding of the Kasetsart University Annual Conference, 41st, Bankgok, Thailand, Feb 3-7, 2003:249-57.

Ministry of Public Health. Fa Tha Lai. In:Thai Herbal Pharmacopoeia. Vol. 1. Bangkok:Prachachon Co. Ltd., 1995:24-31

Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Free Radical Biology & Medicine 1996;12(6):895-902.

Pastrana-Bonilla E, Akoh CC, Sellappan S, Krewer G. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. J Agric Food Chem 2003;51:5497-5503.

Patarapanich C, Chaichantipayuth C, Laungcholatan S, Mahaverawat N, Pummangura S. Quantitative determination of active constituents from *Andrographis paniculata*, Nees planted in various seasons and regions in Thailand. Thai J Pharm Sci 2002;26(uppl.):35.

Pelillo M, Biguzzi B, Bendini A, Toschi TG, Vanzini M, Lercker G. Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins. Food Chemistry 2002;78:369-74.

Peterson J, Dwyer J, Bhagwat S, et al. Major flavonoids in dry tea. J Food Composition Analysis 2005;18:487-501.

Qin J. Oral liquids for treating pollorum disense in fowl. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu 1996:6pp.

Sanchez-Medina A, Garcia-Sosa K, May-Pat S, Pena-Rodriguez LM. Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucateacan traditional medicine part I. Antioxidant, antimicrobial and β-glucosidase inhibition activities. Phytomedicine 2001;8(2):144-51.

Sang S, Cheng X, Stark RE, Rosen RT, Yang CS, Ho CT. Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins : analysis of radical reaction products of catechins and epicatechin with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2002;10:2233-7.

Schwarz K, Bertelsen G, Nissen LR, et al. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. Eur food Res Technol 2001;212:319-28.

Shama V, Gulati A, Ravindranath SD, Kumar V. A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. J Food Composition Analysis 2005;18:583-94.

Torres JL, Lozano C, Julia L, Sanchez-Baeza FJ, Anglada JM, Centelles JJ, Cascante M. Cysteinyl-flavan-3-ol conjugates from grape procyanidins. Antioxidant and antiproliferative properties. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2002;10:2497-2509.

Ueda H, Takagi A, Katou K, Matsumoto S. Feeding behavior in chicks fed tea saponin and quinine sulfate. J Poult Sci 2002;39(1):34-41.

Watanabe T, Nishiyama R, Yamamoto A, Nagai S, Terabe S. Simultaneous analysis of individual catechins, caffeine, and ascorbic acid in commercial canned green and black teas by Micellar Electrokinetic Chromatography. Anal Sci 1998;14:435-8.

Xu X, Hu G, Shen J, Li Q, Wang X. Determination of andrographolide and dehydroandrographolide in *Andrographis paniculata* Nees materials and related patent medicines by reversed-phase high performance liquid chromatography. Sepu 2002; 20(5): 446-8.

Yang CJ, Yang IY, Oh DH, *et al*. Effects of green tea by-product on performance and body composition in broiler chicks. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 2003;16(6):867-72.

Yokozawa T, Dong E, Nakagawa T, Kashiwagi H, Nakagawa H, Takeuchi S, Chung HY. In vitro and in vivo studies on the radical-scavenging activity of tea. J Agric Food Chem 1998;46:2143-50.

Zhao J, Yang G, Liu H, Wang D, Song X, Chen Y. Determination of andrographolide, deoxyandrographolide and neoandrographolide in the Chinese herb *Andrographis paniculata* by Micellar electrokinetic capillary chromatography. Phytochem Anal 2002;13:222-7.

คณิต สุวรรณบริรักษ์ สุนิพนธ์ ภุมมากูร ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ. การพัฒนาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเพื่อใช้เป็นยาและวัตถุเติมในอาหารสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์: แบบรายงานความก้าวหน้าของการวิจัย ปีที่ 2 (ครั้งที่ 1 และ 2) คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ กันยายน 2544-มิถุนายน 2545.

พัชรี ทองคำคูณ วันทนีย์ เนรมิตมานสุข สุภาพร อิสริโยดม งามผ่อง คงคาทิพย์ บุญส่ง คงคาทิพย์. ผลของการใช้ andrographolide จากใบฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Wall ex Nees.) ในการป้องกันและรักษาโรคทางเดินหายใจอักเสบเรื้อรัง (CRD) ในไก่กระทง. สัตวแพทยสาร ปีที่ 52 เล่มที่ 3 กันยายน-ธันวาคม 2544:43-51.

ยุทธนา ศิริวัธนนุกูล สุรพล ชลดำรงค์กุล สมเกียรติ ทองรักษ์. ผลของฟ้าทะลายโจร ใบฝรั่ง ขมิ้นชัน ไพล และเปลือกมังคุด ต่อการรักษาโรคท้องร่วงในลูกสุกร. การประชุมวิชาการ : สมุนไพรไทย โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมผลิตสัตว์, กรุงเทพฯ, 24-25 มกราคม 2545:115-27.

วิศิษย์ เกตปัญญาพงศ์ ยุทธนา ศิววัชนพุกูล อรุณพร อิฐรัตน์ วันวิสาข์ งามผ่องใส. ผลของใบฟ้าทะลายโจรและใบฝรั่งต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกสุกรท้องร่วง. รวมบทคัดย่องานวิจัยการแพทย์แผนไทย และทิศทางการวิจัยในอนาคต, สถาบันการแพทย์แผนไทย 2543:36-7.

สาโรช ค้าเจริญ บังอร ศรีพานิชกุลชัย เยาวมาลย์ ค้าเจริญ คมกริช พิมพ์ภักดี พิชญรัตน์ แสนไชยสุริยะ. การศึกษาและพัฒนาการผลิตและการใช้สมุนไพรกระเทียม ฟ้าทะลายโจร และขมิ้นชันทดแทนสารต้านจุลชีพและสารสังเคราะห์เติมอาหารไก่และสุกร. การประชุมวิชา

การ: สมุนไพรไทย โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์, ครั้งที่ 2, กรุงเทพฯ, 15-16 มกราคม 2547:145-62.

สุรพล นธการกิจกุล, วีรศักดิ์ เชื้อมโนชาญ, สัมพันธ์ วงศ์เทพ. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร. เชียงใหม่เวชสาร 2000;40(ฉบับเสริม):75.

อัญชลี เนตดกูล วาที คงบรรทัด. ผลของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nee) ต่อการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดในไก่พื้นเมือง. รายงานการวิจัย ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 2544.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์ Total lactone ตามเภสัชตำรับไทย

Total lactones content Not less than 6.0 percent w/w of total lactones, calculated as andrographolide, when determined by the following method.

Basic lead acetate solution Triturate 14 g of lead (II) oxide with 10 ml of water, add 10 ml of water and transfer into a 100-ml volumetric flask. Add a solution prepared by dissolving 22 g of lead (II) actate in 70 ml of water, shake vigorously for 5 minutes, set aside for 1 week, filter, and add sufficient previously boiled water to produce 100 ml.

Procedure Place about 1 g of Andrographis Herb in No.180 powder, accurately weighed, in a 100-ml round-bottom flask, add 50 ml of ethanol (85 percent), reflux in a water-bath for 2 hours, and filter. Wash the marc with sufficient amount of ethanol (85 percent) until the last washing is almost colourless. Combine the washings and the filtrate and allow to cool. Add 1 ml of Basic lead acetate solution, set aside for 15 minutes, filter, and wash the precipitate with ethanol until the last washing is no longer green. Combine the washings and the filtrate, add dropwise with swirling 1 ml of a 25 percent w/v solution of sodium sulfate and mix well. Set aside for 1 hour, add 500 mg of decolorizing charcoal, and reflux in a water-bath for 10 minutes. Filter through the BXchner funnel containing 500 mg of decolorizing charcoal and wash with three 2-ml portions of hot ethanol. Combine the washings and the filtrate, add 20 ml of distilled water, allow to cool, and neutralized with 0.1 M sodium hydroxide, using phenolphthalein TS as indicator. Add 5.0 ml of 0.1 M sodium hydroxide VS, reflux in a water-bath for 30 minutes, allow to cool, and titrate with 0.05 M hydrochloric acid VS. Perform a blank determination (Residual Titrations, Appendix 6.17). Each ml of 0.1 M sodium hydroxide VS is equivalent to 35.05 mg of andrographolide, $C_{20}H_{30}O_5$