



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การเตรียมและการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์
จากสารสกัดใบฝรั่งเพื่อใช้สำหรับการผลิตสัตว์”

โดย ผศ.ดร.จินดาพร ภูริพัฒนางษ์ และคณะ
กันยายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การเตรียมและการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์
จากสารสกัดใบฝรั่งเพื่อใช้สำหรับการผลิตสัตว์”

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|---|--------------------------|
| 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินดาพร ภูมิพัฒนางษ์ | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 2. รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณพร อธิรัตน์ | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริศมี ปิ่นสุวรรณ | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิมาลย์ อิงคถาวรวงศ์ | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 5. นายสุริยา สุขยิ่ง | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |

ชุดโครงการ “การใช้สมุนไพรในการผลิตสัตว์”

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive Summary

การวิจัยด้านสมุนไพรมะขาม ได้ถูกกำหนดให้เป็นหนึ่งในทิศทางของการวิจัยที่มุ่งเน้นของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งเน้นตั้งแต่การศึกษาทางพิษวิทยา การสกัด การแยกสารสำคัญ การทดสอบเอกลักษณ์ การทดสอบทางเภสัชวิทยา รวมทั้งการแปรรูปสมุนไพรรูปหรือนำมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นยา อาหาร และเครื่องสำอาง อย่างครบวงจร ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของสมุนไพรมะขามที่ได้เข้ามามีความสำคัญในชีวิตของคนไทย ตลอดจนในระบบเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมของประเทศในสภาวะปัจจุบันมากขึ้น การนำสมุนไพรมะขามมาใช้ไม่ได้จำกัดอยู่ในมนุษย์เท่านั้น แต่ยังสามารถนำมาใช้ในการผลิตสัตว์อย่างกว้างขวาง โดยนำมาใช้เสริมเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรค และเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ อันเป็นการลดปัญหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์ และลดอัตราการตายของสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีรูปแบบของผลิตภัณฑ์สมุนไพรมะขามที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตสัตว์ ตลอดจนขาดการควบคุมคุณภาพ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เหล่านี้ขึ้น

งานวิจัยนี้ได้นำวิธีการทางวิทยาศาสตร์มาใช้ในการศึกษาเพื่อเตรียมสารสกัดจากใบฝรั่ง โดยเน้นงานวิจัยด้านการพัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพและมาตรฐาน (quality control and standardization) ของสารสกัดใบฝรั่ง และผลิตภัณฑ์ที่เตรียมขึ้นมา ตลอดจนศึกษาความคงตัวของสารสกัด และผลิตภัณฑ์ เพื่อให้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการกำหนดคุณลักษณะ (specification) ที่แน่นอนและเหมาะสมของสารสกัดใบฝรั่งได้ โดยจากผลสรุปจากการวิจัยสามารถพัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพ มาตรฐานของสารสำคัญ quercetin ซึ่งเป็นองค์ประกอบในใบฝรั่ง และหาความคงตัวของสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในการหาปริมาณสารสำคัญ quercetin ซึ่งมีอยู่ในใบฝรั่งได้ นอกจากนี้อาจประยุกต์ใช้กับสมุนไพรมะขามที่สาร quercetin เป็นองค์ประกอบได้เช่นเดียวกัน และผลจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปถ่ายทอดให้กับหน่วยงานของรัฐ หรือเอกชน เช่น หน่วยวิจัยสมุนไพรมะขาม วิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นต้น ในการกำหนดวิธีการในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ หรือผลิตภัณฑ์ของใบฝรั่ง อันจะเป็นประโยชน์ต่อการสมุนไพรมะขามไทย ตลอดจนอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ของประเทศ และจะส่งผลในการเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของประเทศในตลาดโลกอย่างต่อเนื่องและยั่งยืน

บทคัดย่อ

การนำสมุนไพรมานำมาใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพสำหรับสัตว์ ปัญหาที่พบคือความไม่แน่นอนของปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ ซึ่งในพืชจะมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง โดยอาจมาจากชนิดของพันธุ์พืช ฤดูกาล และแหล่งเพาะปลูก ปัจจุบันสมุนไพรมานำมาใช้ในสัตว์นั้นยังไม่มีกระบวนการในการตรวจสอบมาตรฐาน และควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ หรือปริมาณสารสำคัญ งานวิจัยนี้ได้นำวิธีการทางวิทยาศาสตร์ มาใช้ในการศึกษาเพื่อเตรียมสารสกัดจากใบฝรั่ง พัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพและมาตรฐาน ของสารสกัดใบฝรั่งและผลิตภัณฑ์ที่เตรียมขึ้นมา เพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบในการกำหนดคุณลักษณะ (specification) ที่แน่นอนและเหมาะสมในการนำใบฝรั่งมาเตรียมเป็นสารสกัดและผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์

งานวิจัยนี้ได้เตรียมสารสกัดจากใบฝรั่งสองสายพันธุ์คือพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์เวียดนาม กระบวนการสกัดสมุนไพรมานำมาใช้โดยการใช้ตัวทำละลายคือ 50% ethanol in DI-water แล้วนำไประเหยตัวทำละลาย ทำให้สารสกัดแห้งด้วย Speed Vac® และ Vacuum oven ได้สารสกัดใบฝรั่งในรูปของผงแห้งสีน้ำตาลเข้มของใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์เวียดนาม คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักใบฝรั่งแห้งเท่ากับ 10.19 w/w และ 8.08 w/w ตามลำดับ นำสารสกัดของใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัด ซึ่งสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในใบฝรั่งคือ quercetin การวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญดังกล่าวโดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ชนิด reversed phase (C-18) ใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ 0.1% aq. phosphoric acid – methanol เท่ากับ 1:1 โดยมีอัตราการไหล 1.2 ml/min และตรวจวัดสารสำคัญ quercetin ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 255 nm โดยใช้เครื่อง diode-arrays พบว่า retention time ของสารสำคัญ quercetin เท่ากับ 19.6 นาที ซึ่งวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้มีความถูกต้อง แม่นยำ และจำเพาะเจาะจง สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 100.75 - 101.55% โดยมี %RSD น้อยกว่า 1.61% การตรวจสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ มีค่า %RSD ของการทำกราฟมาตรฐานทั้ง intra-day และ inter-day มีค่าน้อยกว่า 2% และ 3% ตามลำดับ ในการหา linearity ของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญ quercetin มีค่า r^2 ของกราฟมาตรฐานอยู่ในช่วงระหว่าง 0.9937 – 0.9998 ในช่วงความเข้มข้น 0.0165 – 0.3300 mg/ml สำหรับการหา specificity ของการวิเคราะห์พบว่า Aerosil® ใช้เป็นสารดูดความชื้นที่เติมในสารสกัดเพื่อเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ของสารสกัดใบฝรั่ง ไม่รบกวนวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ดังนั้น HPLC-condition ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ทั้งในสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง

ในสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองพบว่ามีปริมาณสารสำคัญ quercetin มากกว่าพันธุ์เวียดนามประมาณ 4.8 เท่า และเมื่อนำไปทดสอบหาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารสกัด

ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์เวียดนามมีค่า EC_{50} เท่ากับ 3.31 $\mu\text{g/ml}$ ($r^2 = 1$) และ 4.48 $\mu\text{g/ml}$ ($r^2 = 0.9991$) ของสารสกัดตามลำดับ ดังนั้นในการพัฒนาเพื่อเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์จะเตรียมจากสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง อย่างไรก็ตามพบว่าสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งมีความไม่คงตัวต่อความร้อน แสง ความชื้น ในสภาวะที่เป็นกรด และด่าง การเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองในการวิจัยครั้งนี้ได้เติมสารดูดความชื้น aerosil[®] ลงไป 3.35% w/w ในขณะที่ทำให้แห้งได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาล นำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมไปหาปริมาณสารสำคัญ quercetin ได้เท่ากับ 1.71% w/w และมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (EC_{50}) น้อยกว่า 5 $\mu\text{g/ml}$ ของสารสกัดในสภาวะเร่งเพื่อการศึกษาความคงตัว (เก็บที่อุณหภูมิ 45, 60 and 70°C ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) ของทั้งสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง พบว่าการสลายตัวของสารสำคัญ quercetin ของสารสกัด และผลิตภัณฑ์ไม่เป็นเส้นตรง มีรูปแบบการสลายตัวเป็นแบบ second-order kinetic เหมือนกัน ซึ่งในการหาค่าครึ่งชีวิตจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเริ่มต้น และค่าคงที่ของอัตราการสลายตัวจะขึ้นอยู่กับเงื่อนไขแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามพบว่าในผลิตภัณฑ์ของสารสกัดจากใบฝรั่งพบว่าจะมี lag time ของการสลายตัวของสารสำคัญ quercetin โดยการสลายตัวจะเกิดขึ้นน้อยมากในช่วง 7 วันแรกของการทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารดูดความชื้นสามารถป้องกันการสลายตัวได้ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 45 และ 60°C และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปทดสอบความคงตัวโดยการผ่านความร้อนสูงเป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที พบว่าปริมาณสารสำคัญเท่ากับ 99.44, 83.38 และ 77.06% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น จะเห็นว่ามีเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญน้อยมากที่เวลา 3 นาที ซึ่งเป็นเวลาเดียวกันกับที่โรงงาน ผลิตอาหารสำเร็จรูปใช้ทำอาหารสัตว์ให้แห้งในชั้น ตอนสุดท้าย และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ในสภาวะเร่งไปหาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน พบว่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่มีค่า EC_{50} ประมาณ 10 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเวลาเริ่มต้น แต่พบว่ายังคงมีฤทธิ์ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ BHT ที่ใช้เป็น positive control (19.92 $\mu\text{g/ml}$)

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าควรจะต้องทำการเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งใหม่ ให้มีความคงตัวที่ดีขึ้น โดยอาจเปลี่ยนสารดูดความชื้น และเพิ่มสารช่วยตัวอื่นลงไปด้วย แต่ปัจจัยหนึ่งที่ผู้วิจัยจะต้องคำนึงถึงคือ ต้นทุนที่ใช้ เพราะหากจะให้มีการนำสมุนไพรมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ต้นทุนจะต้องไม่สูงเกินไปจนผู้ผลิตไม่สามารถนำไปใช้ได้ อย่างไรก็ตามวิธีการสกัด การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ และการหาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในการวิจัยครั้งนี้สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์สำหรับการนำสมุนไพรมาใช้สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ได้

Abstract

The main problem of using plants as alternative medicines or functional food for health promotion in animals is due to the variation in their active ingredients content. This variation emerges from species differences, the places of plantation and seasons of harvesting. Currently, there is no standard procedure for their quality control. In this research, crude extracts of guava leaves were studied for their preparation and standardization.

Two varieties of guava; Local and Vietnam types, were used in our study. Dried guava leaves were extracted in an aqueous solution of 50% ethanol and then dried under Speed Vac[®] and vacuum oven. The percentage yields of the dried extracts obtained from Local and Vietnam guava were 10.19 and 8.08, respectively. One of the active ingredients, quercetin was selected to be used as a marker in suitable high performance liquid chromatography (HPLC) system developed in this study. Separation was performed at room temperature on a reversed phase C-18 column, with a mobile phase consisted of 0.1% aqueous solution of phosphoric acid and methanol in the ratio of 1:1. The column eluent was monitored using a diode array at a wavelength of 255 nm, a flow rate of 1.2 ml/min. The retention time of quercetin was about 19.6 minutes. The reproducibility of the assay varied between 100.75 to 101.55% with the maximum relative standard deviation of 1.61%. Each standard calibration curve of quercetin was found to be linear over the concentration range of 16.5 to 330 $\mu\text{g/ml}$. The correlation coefficient (r^2) values were in range of 0.9937 to 0.9998. For specificity evaluation, it was found that the HPLC system can detect quercetin retaining in both the extracts and the product without any interfering from the additive added.

The amount of quercetin detected in local guava was about 4.8 times higher than that detected in Vietnam type. Both extracts showed potent antioxidant activities with the EC_{50} of 3.31 $\mu\text{g/ml}$ for local type and 4.48 $\mu\text{g/ml}$ for Vietnam type. Accordingly, the extract from local guava was selected for further study to its product development and stability. However, it has been found that quercetin in both crude extracts are not stable in several conditions such as light, heat, moisture as well as acid and base. The product of guava extract was prepared by combining 3.35% w/w Aerosil[®] with the extract before drying, giving a more physically stable powders. The product contained 1.71%w/w quercetin and the EC_{50} of less than 5 $\mu\text{g/ml}$ of extract.

Under accelerated conditions (45, 60 and 70°C, 75%RH), the overall loss of quercetin in both extract and product forms displays a non-linear profiles indicating the complex decomposition in solid state. Its initial phase of degradation exhibits an apparent second-order kinetic behavior where the half-life is dependent on the initial concentration and the degradation rate constant at each condition. The initial lag time was also observed in the degradation of the product, suggesting the protective effect of the additive in formulation. No degradation was observed in the product kept at 45 and 60°C for 7 days. Similar result was found after heating the product at high temperature (80°C) for 3, 5 and 7 minutes, the remained quercetin was 99.44, 83.38 and 77.06%, respectively. It should emphasize that there is no significant decrease in the amount of quercetin heated at 80°C for 3 minutes which is a normal condition for exudation in manufacturing of animal food. Moreover, it has been found that the EC₅₀ of the product kept under accelerated conditions, increased to about 10 µg/ml. Although the anti-oxidant activity of the product decreases, but it is still better than the activity of the positive control, BHT (EC₅₀ 19.92 µg/ml).

Overall, It seems to be able to develop a product of guava extract with better physical and chemical stability. This may be achieved by modifying the formulation or using higher production technology. However, it has to concern that the cost of overall production has to be reasonable for industry of animal production. This research may be useful and can be applied for the study of other herbal plants for animal production.

สารบัญ

	หน้า
Executive Summary	iii
บทคัดย่อ	iv
Abstract	vi
สารบัญ	viii
สารบัญตาราง	ix
สารบัญรูป	x
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตัวอย่างสมุนไพรร เครื่องมือ สารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์	12
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง	31
บทที่ 5 บทสรุป	55
บทที่ 6 บรรณานุกรม	58
ภาคผนวก	64

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4-1 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	35
ตารางที่ 4-2 กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟ (standard curve) ของสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	36
ตารางที่ 4-3 ปริมาณสารสำคัญ quercetin ที่มีอยู่ในสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์เวียดนาม	38
ตารางที่ 4-4 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งเมื่อวางให้โดนแสง	38
ตารางที่ 4-5 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งเมื่อโดนความร้อน	39
ตารางที่ 4-6 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งเมื่อวางภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ 75%	40
ตารางที่ 4-7 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด	41
ตารางที่ 4-8 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง	42
ตารางที่ 4-9 สรุปผลการทดสอบความคงตัวในสภาวะต่าง ๆ ของสารสกัดใบฝรั่ง	43
ตารางที่ 4-10 ค่า % inhibition และ EC_{50} ของ quercetin	44
ตารางที่ 4-11 ค่า % inhibition และ EC_{50} ของสารสกัดใบฝรั่ง 2 สายพันธุ์	44
ตารางที่ 4-12 ค่า observed apparent second-order rate constant (k_{obs}) ของการสลายตัวของสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง	46
ตารางที่ 4-13 ค่า % inhibition และ EC_{50} ของสารสกัดใบฝรั่งที่นำไปวางที่อุณหภูมิ 45, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% ณ เวลาต่าง ๆ กัน	47
ตารางที่ 4-14 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากใบฝรั่งที่ผ่านความร้อน 100 องศาเซลเซียสในเวลาต่าง ๆ กัน	49
ตารางที่ 4-15 ค่า observed apparent second-order rate constant (k_{obs}) ของการสลายตัวของ quercetin ในผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง	52
ตารางที่ 4-16 ค่า % inhibition และ EC_{50} ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งที่นำไปวางไว้ ณ อุณหภูมิ 45, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% ทั้งไว้ในเวลาต่าง ๆ กัน	53

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1-1 <i>Psidium guajava</i> Linn., MYRTACEAE	2
รูปที่ 1-2 โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ Quercetin	5
รูปที่ 2-1 ลักษณะผลของฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง (ซ้าย) และฝรั่งพันธุ์เวียดนาม (ขวา)	12
รูปที่ 4-1 ลักษณะของสารสกัดใบฝรั่งเมื่อทำให้แห้งโดยใช้ SpeedVac [®] (A) และ Vacuum oven (B)	31
รูปที่ 4-2 TLC-profile ของสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม (ว) และพันธุ์พื้นเมือง (พ)	32
รูปที่ 4-3 Chromatogram (fingerprint) ของสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง	34
รูปที่ 4-4 Chromatogram (fingerprint) ของสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม	34
รูปที่ 4-5 Chromatogram (fingerprint) ของสารสำคัญ quercetin	34
รูปที่ 4-6 PDA-curve ของสารสำคัญ quercetin ในสารมาตรฐานอ้างอิง Quercetin (Q) และ สารสกัดใบฝรั่ง (Cr)	35
รูปที่ 4-7 กราฟมาตรฐานของ quercetin	36
รูปที่ 4-8 Chromatogram ของสารดูดความชื้น Aerosil [®]	37
รูปที่ 4-9 Chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งเมื่อโดนแสง	39
รูปที่ 4-10 Chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งเมื่อโดนความร้อน	40
รูปที่ 4-11 Chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งเมื่อวางภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ มากกว่า 75%	41
รูปที่ 4-12 Chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด	42
รูปที่ 4-13 Chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง	43
รูปที่ 4-14 Stability profiles ของ quercetin ในผงแห้งของสารสกัดใบฝรั่ง ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความชื้นสัมพัทธ์ 75%	45
รูปที่ 4-15 Second-order kinetic plots ของการสลายตัวในช่วงแรกของ สารสำคัญ quercetin ในผงแห้งของสารสกัดใบฝรั่ง เมื่อเก็บที่ อุณหภูมิต่าง ๆ ความชื้นสัมพัทธ์ 75%	46
รูปที่ 4-16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\log K_{obs}$ และ $1/T$ ของการสลายตัว ในช่วงแรกของ quercetin ในผงแห้งของสารสกัดใบฝรั่ง	47
รูปที่ 4-17 ความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่งที่อุณหภูมิต่างกัน ในเวลาต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ EC_{50}	48
รูปที่ 4-18 ลักษณะของสารสกัด (C) และผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่งที่เตรียมได้จาก การเติม Aerosil [®] (AE) และ Avicel [®] PH101 (AV)	49

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4-19 ปริมาณของ Quercetin ในสารสกัด (กราฟแท่งซ้ายมือ) และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง (กราฟแท่งขวามือ) เมื่อให้ความร้อนสูงเป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที	50
รูปที่ 4-20 stability profiles ของ quercetin ในผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความชื้นสัมพัทธ์ 75%	51
รูปที่ 4-21 Second-order kinetic plots ของการสลายตัวในช่วงแรกของ quercetin ในผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความชื้นสัมพัทธ์ 75%	51
รูปที่ 4-22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\log K_{obs}$ และ $1/T$ ของการสลายตัวในช่วงแรกของ quercetin ในผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง	52
รูปที่ 4-23 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งที่อุณหภูมิต่างกัน ในเวลาต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ EC_{50}	53

บทที่ 1

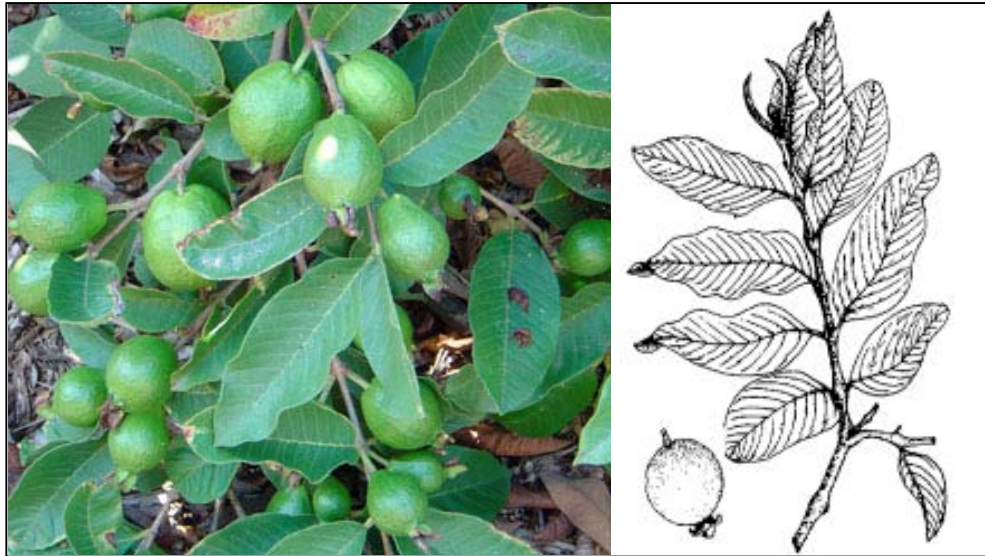
บทนำ

การเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยได้มีการพัฒนา และขยายผลของกำลังการผลิตสู่ระบบอุตสาหกรรม โดยมีการเลี้ยงในจำนวนที่มากขึ้น มีการพัฒนาศักยภาพการผลิตของสัตว์สูงขึ้น จึงทำให้เกิดสภาวะเครียดกับตัวสัตว์ และก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรคมมากขึ้น ทำให้มีการนำเอายาปฏิชีวนะมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในแง่การรักษาและการป้องกันโรคในสัตว์ ตลอดจนใช้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของสัตว์ จนทำให้เกิดภาวะดื้อยาและต้องใช้ปริมาณยาสูงขึ้น ทำให้มีปัญหาตามมาในเรื่องของสารตกค้างในการผลิตสัตว์ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค ปัจจุบัน EU หรือสหภาพยุโรปได้มีการห้ามใช้สาร หรือยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคสำหรับการเลี้ยงสัตว์ รวมทั้งสารเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ ซึ่งส่งผลให้มีการตกค้างในเนื้อสัตว์ ทำให้ผู้ประกอบการธุรกิจการส่งออกเนื้อสัตว์ของประเทศไทยไปยังต่างประเทศโดยเฉพาะในกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป (EU) ไม่สามารถดำเนินธุรกิจได้ ดังนั้นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาเหล่านี้ อาจทำได้โดยการนำสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการรักษาคนมาใช้ในสัตว์ เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ และสารเร่งการเจริญเติบโต ตลอดจนช่วยในการขจัดปัญหาตกค้างในเนื้อสัตว์ และเป็นการส่งเสริมธุรกิจการส่งออกของบริษัทส่งออกเนื้อสัตว์ และอาหารสัตว์ของประเทศ และช่วยเพิ่มขีดความสามารถของประเทศไทยในตลาดการค้าโลก

ฝรั่งเป็นสมุนไพรที่นิยมนำมาใช้โดยทั่วไป มีการใช้ต่อเนื่องกันมานาน ในอดีตหมอแผนโบราณนำใบฝรั่ง หรือผลอ่อน (ดิบ) มาใช้เป็นยารักษาอาการท้องเสีย ปัจจุบันกระทรวงสาธารณสุขได้แนะนำให้ใช้ฝรั่งเป็นสมุนไพรรักษาอาการท้องเสียในสาธารณสุขมูลฐาน โดยใช้ใบแก่ 10 – 15 ใบ บดไฟและชงน้ำร้อนเป็นชาดื่ม (มานิช และเพ็ญญา, 2537) ได้มีงานวิจัย และมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฝรั่งเป็นจำนวนมาก ดังจะได้นำกล่าวต่อไป และมีรายงานว่ามีการนำฝรั่งไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์ โดยสามารถลดอัตราการตายของสัตว์ได้ แต่การใช้ใบฝรั่งสำหรับการเลี้ยงสัตว์ในปัจจุบันยังไม่มีรูปแบบที่เหมาะสม เพราะยังใช้อยู่ในรูปของผงใบฝรั่งแห้งผสมในอาหารสัตว์ ซึ่งมีปัญหาในการเก็บรักษา และความชื้นในอากาศจะทำให้เชื้อเกิดขึ้นง่าย และการเก็บรักษาผงใบฝรั่งจะต้องใช้เนื้อที่เก็บมาก หากนำมาพัฒนาให้อยู่ในรูปของสารสกัดจะทำให้ลดปัญหาที่เกิดขึ้น ปริมาณในการใช้ลดลง และสะดวกในการนำไปใช้ ดังนั้นฝรั่งจึงเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการที่จะนำมาพัฒนาเป็นสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเพื่อใช้สำหรับการผลิตสัตว์ นอกจากนี้การศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบฝรั่งก็ยังไม่มีการศึกษาวิจัย ดังนั้นผู้วิจัยได้เล็งเห็นความสำคัญของปัญหาดังกล่าวจึงได้คิดโครงการวิจัยนี้ขึ้นมา เพื่อพัฒนาใบฝรั่งให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีรูปแบบเหมาะสม มีความคงตัวที่ดีสำหรับผสมอาหารในการเลี้ยงสัตว์เพื่อให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรงปราศจากโรค ช่วยให้ผู้บริโภคปลอดภัยจากการรับประทานเนื้อสัตว์ที่

ปราศจากสารเคมีตกค้าง และเป็นการส่งเสริมธุรกิจส่งออกอาหารสัตว์ให้เป็นที่ยอมรับในตลาดโลกอีกด้วย

ข้อมูลทั่วไปของฝรั่ง



รูปที่ 1-1 *Psidium guajava* Linn., MYRTACEAE

ชื่อสามัญ : Guava

ชื่อทางวิทยาศาสตร์ : *Psidium guajava* Linn.

ชื่อวงศ์ : MYRTACEAE

ชื่อเรียกตามภาษาท้องถิ่น:

- | | |
|----------|--|
| ภาคกลาง | : ฝรั่ง |
| ภาคเหนือ | : ก้อยก่า มะมัน สุโขทัยเรียก มะปุ่น มะจีน แม่ฮ่องสอนเรียก มะกา |
| ภาคอีสาน | : สีดา บักสีดา หมากสีดา |
| ภาคใต้ | : ย่าหุ่ม ยามู สุราษฎร์ธานีเรียก จุ่มโป ปัตตานีเรียก ชมพู |

รูปลักษณะ : ไม้ยืนต้น สูง 3 - 10 เมตร เปลือกต้นเรียบ

ใบ : เดี่ยว เรียงตรงข้าม หรือรูปวงรีแกมขอบขนาน กว้าง 3 - 8 ซม. ยาว 6 - 14 ซม.

ดอก : เดี่ยวหรือช่อ 2 - 3 ดอก ออกที่ซอกใบ กลีบดอกสีขาว ร่วงง่าย เกสรตัวผู้จำนวนมาก

ผล : เป็นผลสดฉ่ำน้ำ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Anon, 2547)

ฝรั่งเป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกาเขตร้อน และถูกนำมาปลูกในประเทศเขตร้อนทั่วไป

ฝรั่งที่รับประทานผลสดมีอยู่หลายพันธุ์อาจแบ่งตามถิ่นกำเนิดได้เป็น

- ฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองของไทย ได้แก่ พันธุ์ขึ้นก ผลมีขนาดเล็กมาก รูปวงรีมีทั้งกลมและรูปไข่ ผิวเรียบ เนื้อสีชมพู เนื้อบาง รสหวานอมเปรี้ยว หรือมีรสฝาดปน ไล่สีแดง ติดผล

เป็นกลุ่ม เมล็ดมีจำนวนมาก ลำต้นแข็งแรง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีมาก ไม่มีการปลูกเป็นการค้า ปัจจุบันจะหาได้ตามชนบท

- ฝรั่งพันธุ์เวียดนาม มีถิ่นเดิมอยู่ในประเทศเวียดนาม นำเข้าประเทศไทยประมาณ 10 ปีที่ผ่านมา ผลขนาดใหญ่ ประมาณ 700 – 1,200 กรัม ผิวขรุขระ เนื้อหนา กรอบ มีเมล็ดจำนวนมาก ให้ผลดก ลำต้นแข็งแรงมาก ทรงต้นแผ่กว้างมาก แบ่งออกได้หลายพันธุ์ตามรูปร่างลักษณะของผล เช่น

1. พันธุ์กลมสาเล่ ผลกลมมีขนาดใหญ่ ผิวสีเขียวอ่อน เนื้อหนาแน่นและกรอบ รสหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย
2. พันธุ์ขาวเสวต (ศรีวิชัยหนึ่ง) ผลขนาดใหญ่มาก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15 ซม. รูปร่างยาว รสหวาน ผิวเขียวอ่อนเกือบขาว
3. พันธุ์กลมทูลเกล้า (ศรีวิชัยสอง) ลักษณะเหมือนพันธุ์ขาวเสวต แต่มีรูปร่างผลกลมมาก ลักษณะใบกลม รสชาติเหมือนพันธุ์ขาวเสวต
4. พันธุ์บางกอกแอปเปิล ได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์อู่แก้ว (ฝรั่งอินเดีย) กับพันธุ์กลมสาเล่ (พันธุ์เวียดนาม) เป็นพันธุ์ไม่มีเมล็ด ลำต้นหรือกิ่งกระโดงหรือกิ่งที่แตกใหม่มีลักษณะเป็นเหลี่ยม ใบมนใหญ่ค่อนข้างกลม ขอบใบเป็นคลื่นเล็กน้อย เส้นใบเมื่อมองด้านบนจะเป็นร่องลึกและห่างอย่างเด่นชัดต่างกับฝรั่งทั่ว ๆ ไป ผลมีขนาดใหญ่ น้ำหนักอยู่ระหว่าง 600 – 1,100 กรัม ค่อนข้างกลมคล้ายแอปเปิล เนื้อหนาแน่นตลอดทั้งผล กรอบ รสชาติคล้ายสาลี่อมเปรี้ยวนิด ๆ สุกช้า ขอบเสีย คือ ติดผลยาก และให้ผลผลิตต่ำ
5. พันธุ์แป้นสีทอง ได้จากการคัดเลือกพันธุ์ที่เพาะเมล็ดมาจากพันธุ์กลมสาเล่ ลักษณะผลมีขนาดใหญ่ ขั้วใหญ่ และหัวบ่มมากกว่าพันธุ์กลมสาเล่ ผิวขรุขระ เมื่อผลอายุมากขึ้นผลจะเปลี่ยนรูปร่างจากกลมเป็นกลมแป้น และมีครีบขึ้นคล้ายฟักทอง เนื้อหนาและเมล็ดน้อยจนแทบจะไม่มี ลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มเตี้ย (ต้นไม่สูงเหมือนพันธุ์กลมสาเล่) กิ่งค่อนข้างทอด (เวลาปลูกจึงต้องเอาไม้ค้ำกิ่งไว้) ใบมีสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบเป็นแบบกางปลา ใบเรียวยาวใหญ่ ผลดก

ส่วนที่นำมาใช้: ใบ ใบสด ผลดิบ ผลสุก

สารที่มีคุณประโยชน์ : วิตามินซี แทนนิน Fe, Ca, ไขมันอิ่มนหอมระเหย

สรรพคุณทางยา: แก้ก้องร่ว ก้องเดิน เป็นบิดเรื้อรัง แก่ลมพิษ ผดผื่นคัน ใช้ใบสดขยี้ใส่แผลสด ใช้เปลือกหรือใบสดอมแก้ปวดฟัน เหงือกบวม และรักษากลิ่นปาก แก่ลำไส้อักเสบ แก่กระเพาะอาหารอักเสบ แก่ความดันโลหิตสูง ใช้เป็นยาสมานแผล และใบฝรั่งสามารถนำมาขยี้ให้คนที่เมาค้างดื่มเพื่อลดอาการคลื่นไส้ และมีเม็ขีระได้

สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยา

ใบ - แก้ท้องร่วง บิดมูกเลือด ระวังกลืนปาก รักษาการท้องเสีย มีการทดลองกับผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง โดยให้กินผงใบแห้ง 500 มก. ทุก 3 ชม. เป็นเวลา 3 วัน พบว่าได้ผลดีกว่ายาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน

ราก - ขับปัสสาวะ

ภูมิปัญญาชาวบ้าน : ชาวบ้านจะนำใบฝรั่งมาเคี้ยวเพื่อบดกลืนปากและได้ผลดี

สารประกอบในฝรั่ง

สารประกอบจากผลฝรั่ง

terpenic hydrocarbons, 3-hydroxy-2-butanone, 3-penten-2-ol, 2-butenyl acetate, acetic acid, 3-hydroxy-2-butanone, 3-methyl-1-butanone, 2,3-butanediol, 3-methylbutanoic acid, (Z)-3-hexen-1-ol, 6-methyl-5-hepten-2-one, limonene, octanol, ethyl octanoate, 3-phenylpropanol, cinnamyl alcohol, alpha-copaene (Jordán, *et al.*, 2003), 1-O-*trans*-cinnamoyl- α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranose, 1-O-*trans*-cinnamoyl- β -D-glucopyranose (Latza, *et al.*, 1996), β -carotene, α -carotene, γ -carotene, zeinoxanthin, lycopene, 5,6,5',6'-diepoxy- β -carotene and 5,8-epoxy-3,3',4-trihydroxy β -carotene, *Cis*- γ -carotene, 5,8-epoxy-zeinoxanthin, vitamin A, vitamin C (Padula and Rodriguez-Amaya, 1986), (*E*)-cinnamoic acid, (Z)-3-hexenoic acid (Idstein, *et al.*, 1985), polyphenol (iso-strictinin) (Okuda, *et al.*, 1980), สารกลุ่ม carotenoids ได้แก่ phytofluene, (all-*E*)-, (9Z)-, (13Z)-, and (15Z)-beta-carotene, (all-*E*)-gamma-carotene, (all-*E*)-, (9Z)-, (13Z)-, and (15Z)-lycopene, (all-*E*,3*R*)-beta-cryptoxanthin, (all-*E*,3*R*)-rubixanthin, (all-*E*,3*S*,5*R*,8*S*)-cryptoflavin, (all-*E*,3*R*,3'*R*,6'*R*)-lutein, (all-*E*,3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,8'*R*)-, and (all-*E*,3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,8'*S*)-neochrome (Mercadante, *et al.*, 1999), pectinmethylesterase (PME) (Maria da Silva Cerqueira Leite, *et al.*, 2005)

เมื่อศึกษาปริมาณ dietary fiber ที่อยู่ในผลไม้ชนิดต่าง ๆ พบว่าฝรั่งเป็นผลไม้ให้ dietary fiber ในปริมาณสูงมาก (Candlish, *et al.*, 1987)

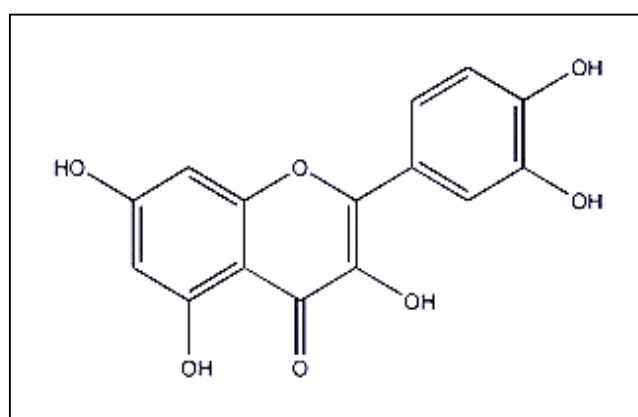
จากการศึกษาพบว่าในน้ำฝรั่งสดมี vitamin C อยู่ 80.1 mg/100 g แต่หลังจากผ่านกระบวนการ freeze-dried จะทำให้ vitamin C ลดลงเหลือ 41.4% (Suntornsak, *et al.*, 2002)

สารประกอบจากใบฝรั่ง

พบสารกลุ่ม sesquiterpene hydrocarbon จาก essential oil ในใบฝรั่ง (Smitth and Siwatibau, 1975)

guajavolide (2 α ,3 β ,6 β ,23-tetrahydroxyurs-12-en-28,20- β -olide), guavenoic acid (2 α ,3 β ,6 β ,23-tetrahydroxyurs-12,20(30)-dien-28-oic acid), oleanolic acid (Begum, *et al.*,

2002), 20 β -acetoxy-2 α ,3 β -dihydroxyurs-12-en-28-oic acid (guavanoic acid), 2 α ,3 β -dihydroxy-24-*p*-Z-coumaroyloxyurs-12-en-28-oic acid (guavacoumaric acid), 2 α -hydroxy ursolic acid, jacoumaric acid, isoneriucoumaric acid, asiatic acid, ilelatifol D and β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (Begum, *et al.*, 2002), morin-3-O- α -L-lyxopyranoside, morin-3-O- α -L-arabopyranoside, flavonoids (guaijavarin และ quercetin (รูปที่ 1-2)) (Hidetoshi and Gen-ichi, 2002), guajavanoic acid, obtusin, gorenishic acid (Begum, *et al.*, 2002), pentacyclic triterpenoid guajanoic acid, β -sitosterol, uvaol, oleanolic acid, ursolic acid and 1(3- β -*p*-E-coumaroyloxy-2- α -methoxyurs-12-en-28-oic acid (Begum, *et al.*, 2004)



รูปที่ 1-2 โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ Quercetin

ในการแยก essential oil จากใบฝรั่งโดยใช้ GC-MS พบสาร caryophyllene (18.81%), copaene (11.80%), [1 α R-(1 α ,4 α ,7 α ,7 β ,7 β)]-decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-1H-cycloprop[e]azulene (10.27%) and eucalyptol (7.36%) (Li, *et al.*, 1999)

สารประกอบในเมล็ดฝรั่ง

สารสกัดชั้น chloroform-methanol ของเมล็ดฝรั่งมี lipid อยู่ 9.1% และมี protein อยู่ 9.73% ของน้ำหนักแห้ง (Habib, 1986)

ฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัดส่วนเนื้อ (pulp) และเปลือก (peel) ฝรั่งมี dietary fiber อยู่ 48.55-49.42% และมี polyphenol อยู่ 2.62-7.79% สาร polyphenol ในเปลือกฝรั่งแห้งน้ำหนัก 1 g มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบด้วย free radical DPPH scavenging, ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) และ inhibition of copper-catalyzed in vitro human low-density

lipoprotein (LDL) oxidation โดยผลที่ได้มีค่าเทียบเท่ากับการใช้ Trolox 43, 116 และ 176 mg ตามลำดับ (Jiménez-Escrig, *et al.*, 2001)

ในการศึกษา total antioxidant และ lipid (total cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol และ HDL-cholesterol) ของผู้ชายที่รับประทานฝรั่ง 400 g/วัน โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ baseline phase (1 สัปดาห์), treatment phase (4 สัปดาห์) และ control phase (4 สัปดาห์) แล้ววัดค่า total antioxidant, glucose, lipid profile และ antioxidant enzymes ในเลือดด้วยเครื่อง Cobas Mira auto analyzer (Roche) หลังจากการทดลองพบว่า ปริมาณ total antioxidant, total cholesterol, triglyceride และ HDL-cholesterol ของผู้ที่รับประทานฝรั่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (Rahmat, *et al.*, 2004)

ในการศึกษาหา total phenolic ในสารสกัดฝรั่งด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's phenol method แล้วคำนวณหา gallic acid equivalent (GAE) พบว่าสารสกัดชั้น ethanol และชั้นน้ำมี total phenolic 575.3 ± 15.5 และ 511.6 ± 6.2 mg of GAE/g มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วย DPPH (Qian and Nihorimbere, 2004)

ฤทธิ์ด้านการอักเสบ

เมื่อนำสารสกัดใบฝรั่งชั้น methanol ที่สกัดด้วยวิธี maceration มาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านปวดโดยให้สารสกัดกับสัตว์ทดลองทางปาก พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง paw oedema ที่ถูก induced ด้วย carrageenan ในหนูและมีฤทธิ์ยับยั้งอาการปวดที่ถูก induced ด้วย acetic acid ในหนู mice ที่ความเข้มข้น 50-200 mg/kg นอกจากนี้หลังจากให้สารสกัดทางปากแก่หนูพบว่าสารสกัดขนาด 50-200 mg/kg มีฤทธิ์ลด transit time ในลำไส้หนูและมีฤทธิ์ป้องกันอาการท้องร่วงในหนู mice ที่ถูก induced ด้วย castor oil รวมทั้งยังออกฤทธิ์ CNS depressant โดยการ potentiating phenobarbitone sleeping time ในหนู mice (Olajide, *et al.*, 1999)

ฤทธิ์ลดอาการท้องร่วง

เมื่อทดลองให้สารสกัดใบฝรั่งในรูปแคปซูลขนาด 500 mg กับผู้ป่วยท้องร่วงเฉียบพลันจำนวน 50 คน ทุกๆ 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน พบว่าผู้ป่วยมีอาการปวดท้องลดลง (Xavier, *et al.*, 2002)

สารสกัดชั้นน้ำจากใบฝรั่งมีฤทธิ์ antidiarrhoeic ในหนูที่ถูกทำให้ติดเชื้อ enteropathogenic agent (Almeida, *et al.*, 1995)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ antidiarrhoeal ของสารสกัดชั้นน้ำของใบฝรั่งสดในหนูสายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 200-250 กรัม พบว่าสารสกัดขนาด 0.2 ml/kg สามารถยับยั้งการเคลื่อนตัวของลำไส้เล็ก (propulsion) ได้ 65% เช่นเดียวกับการใช้ morphine sulphate โดยกล

ไกการออกฤทธิ์อาจเนื่องมาจากการยับยั้งการเพิ่มการคัดหลั่งน้ำ ซึ่งโดยปกติแล้วจะมีการหลั่งน้ำในลำไส้เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยท้องร่วง (Lutterodt, 1992)

เมื่อนำสาร quercetin และ quercetin-3-arabinoside ที่สกัดจากใบฝรั่งไปทดสอบกับลำไส้ส่วน ileum ของหนูตะเภาที่ถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วยกระแสไฟฟ้า พบว่าสารสกัดเริ่มออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง acetylcholine ที่ความเข้มข้น 1.6 μ g/ml คล้ายกับการออกฤทธิ์ของ morphine (Lutterdt, *et al.*, 1989)

ในการศึกษาฤทธิ์ antidiarrheal activity ในลำไส้ส่วน ileum ของหนูตะเภาแบบ in vitro พบว่าสาร quercetin ในใบฝรั่งออกฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของ ileum ของหนูตะเภา ยับยั้งการเคลื่อนที่ของลำไส้เล็กและช่วยลด permeability ของ abdominal capillaries ซึ่งเป็นกลไกที่ช่วยลดอาการท้องร่วง (Zhang, *et al.*, 2003)

สารสกัดชั้น methanol ของใบฝรั่งออกฤทธิ์ลดปริมาณอุจจาระได้ 33.55% ส่วนสารสกัดชั้นน้ำออกฤทธิ์ลดปริมาณอุจจาระได้ 38.49% และพบว่าสารสกัดทั้งสองชั้นยังยับยั้ง PGE₂ ในลำไส้ได้ซึ่งจะส่งผลให้ของเหลวในลำไส้ลดลง (Lin, *et al.*, 2002)

ฤทธิ์ต้านเชื้อต่าง ๆ

สารสกัดจากฝรั่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Holeta, *et al.*, 2002) สารสกัดชั้น ethanol ของฝรั่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ enterobacteria ที่ก่อให้เกิดโรคในคน (Cáceres, *et al.*, 1993) ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriar* และ *Shigella flexneri* (Caceres, *et al.*, 1990)

สารสกัดชั้นน้ำและชั้น methanol ของเปลือกต้นฝรั่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยมีค่า MIC ของสารสกัดชั้นน้ำเท่ากับ 1.69, 6.79, 13.05 และ 13.06 mg/ml ตามลำดับ และค่า MIC ของสารสกัดชั้น methanol เท่ากับ 4.52, 9.03, 18.06 และ 9.03 mg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดความเข้มข้น 45 mg/ml ยังฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จาก urinary tract และเชื้อ *Proteus vulgaris* ที่แยกได้จากบาดแผล โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone มากกว่า 15 mm (Abdelrahim, *et al.*, 2002)

เมื่อทดสอบสารสกัดส่วนใบและส่วนต้นฝรั่งที่ได้จากวิธี decoction กับการต้านเชื้อ *Entamoeba histolytica* พบว่าสารสกัดจากส่วนใบมีค่า MIC เท่ากับ 62.5 μ g/ml และสารสกัดจากส่วนต้นมีค่า MIC $\leq$ 7.81 μ g/ml (Tona, *et al.*, 1998)

เมื่อนำสารสกัดฝรั่งด้วยน้ำร้อนมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง reverse transcriptase ด้วย Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (M-MuLV-RT) ที่ react ด้วย 3H-dTTP และวัดปริมาณ radioactive ด้วย scintillation counter พบว่าสารสกัดมีค่า inhibitory ratio (IR) เท่ากับ 61% (Suthienkul, *et al.*, 1993)

สารสกัดชั้น ethanol และชั้นน้ำของใบอ่อนฝรั่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากเนื้อปลาและกุ้ง โดยมีค่า inhibition zone 13 mm (Vieira, et al., 2001)

เมื่อนำสารสกัดของผลฝรั่งใน 80% methanol และสารสกัดในชั้นน้ำร้อนมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Arthrinium sacchari* M001 และ *Chaetomium funicola* M002 โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร PDA พบว่าที่สารสกัดชั้น 80% methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml เชื้อ *Arthrinium sacchari* M001 และ *Chaetomium funicola* M002 มีเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญเติบโตเท่ากับ 3.2 และ 5.4 cm ส่วนที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ ส่วนสารสกัดในชั้นน้ำความเข้มข้น 1 mg/ml เชื้อ *Arthrinium sacchari* M001 และ *Chaetomium funicola* M002 มีเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญเติบโตเท่ากับ 3.8 และ 6.1 cm ส่วนที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Arthrinium sacchari* M001 แต่เชื้อ *Chaetomium funicola* M002 มีเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญเติบโตเท่ากับ 1.5 cm (Sato, et al., 2000)

เมื่อนำสารสกัดจากส่วนลำต้นและเปลือกต้นฝรั่งมาทดสอบฤทธิ์ antiplasmodial activity ด้วยวิธี parasite lactate dehydrogenase (pLDH) assay method ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์แบบ in vitro enzymatic method เพื่อหาสารที่เป็น antimalarial โดยใช้เชื้อ *Plasmodium falciparum* D10 ที่เป็น chloroquine-sensitive strain พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ antiplasmodial activity มีค่า IC₅₀ ระหว่าง 10-20 µg/ml และจากการวิเคราะห์ทาง phytochemistry พบสาร anthraquinones, flavonoids, secoirridoids และ terpenoids (Nundkumar and Ojewole, 2002)

นำสารสกัดชั้นน้ำของใบฝรั่งมาทดสอบฤทธิ์ anti-rotavirus activity กับ simian (SA-11) และ human (HCR3) rotavirus พบว่าสารสกัดความเข้มข้น 8 µg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะ simian (SA-11) rotavirus เป็นค่า 93.8% และมีค่า maximum non-toxic concentration (MNTC) เท่ากับ 8 µg/ml (Goncalves, et al., 2005)

นำสารสกัดชั้นน้ำใบฝรั่งมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยวิธี plate count, disc inhibition zone และ turbidity techniques พบว่าสารสกัดความเข้มข้น 40 mg/ml ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* มีค่า inhibition zone เท่ากับ 8-10 mm สารสกัดความเข้มข้น 8 mg/ml ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* บน agar และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวได้สมบูรณ์เมื่อทดสอบแบบ turbidity (Gnan and Demello, 1999)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง strain ATCC 25923 ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี disc diffusion method ของสารสกัดชั้นน้ำจากใบฝรั่ง พบว่าสารสกัดความเข้มข้น 250, 500 และ 750 µg/disc ให้ค่า inhibition zone เท่ากับ 11, 13, 14 mm สารสกัดชั้น methanol ของใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 500, 750 และ 1000 µg/disc ให้ค่า inhibition zone เท่ากับ 9, 10,

11 mm ส่วนสารสกัดชั้น chloroform ของใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 3000, 4000 และ 5000 μ g/disc ให้ค่า inhibition zone เท่ากับ 9, 10, 12 mm (Jaiarj, *et al.*, 1999)

สารสกัดชั้น methanol ของใบฝรั่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella* spp. (*S. flexneri*, *S. virchow* และ *S. dysenteriae*) และ *Escherichia coli* โดยมีค่า inhibition zone ≥ 10 mm (Lin, *et al.*, 2002)

สาร polyphenolic ที่ได้จากใบฝรั่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Entamoeba histolytica* มีค่า MIC น้อยกว่า 10 μ g/ml (Tona, *et al.*, 2000)

สาร morin-3-O- α -L-lyxopyranoside และ morin-3-O- α -L-arabopyranoside จากใบฝรั่งความเข้มข้น 200 μ g/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *Samonella enteritidis* และที่ความเข้มข้น 250 และ 300 μ g/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* ได้ ตามลำดับ (Hidetoshi and Gen-ichi, 2002)

นำสารสกัดใบฝรั่งไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยวิธี agar diffusion และ dilution method สามารถหาค่าสัดส่วนระหว่าง inhibition zone ของสารสกัดต่อ inhibition zone ของ neomycin 200-500 μ g/ml ได้ดังนี้ สารสกัดชั้นน้ำ (1 mg/ml) มีค่าสัดส่วนระหว่าง inhibition zone ของสารสกัดต่อ inhibition zone ของ neomycin ในเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* เป็น 0.52, 0.33, 0.26, 0, 0 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดชั้น methanol (1 mg/ml) มีค่าสัดส่วนระหว่าง inhibition zone ของสารสกัดต่อ inhibition zone ของ neomycin ในเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* เป็น 1.20, 0.45, 0.28, 0, 0 ตามลำดับ (Rabe and Staden, 1997)

นำสารสกัดชั้น methanol ของใบฝรั่งมาทดสอบการต้านเชื้อด้วยวิธี paper disc agar diffusion method พบว่าสารสกัดสามารถต้านเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ได้ (Voravutthikulchai, *et al.*, 2004)

ฤทธิ์ลดอาการหดเกร็ง

สาร Asiatic acid จากใบฝรั่งขนาด 10-500 μ g/ml ช่วยลดอาการหดเกร็งของลำไส้ส่วน jejunum ที่แยกได้จากกระต่าย (Begum, *et al.*, 2002)

สาร quercetin ที่สกัดจากใบฝรั่งมีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของลำไส้เล็กที่แยกออกมาจากหนูตะเภา โดยกลไกการหดตัวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแคลเซียม (Morales, *et al.*, 1994)

สารสกัดใบฝรั่งความเข้มข้น 80 μ g/ml ออกฤทธิ์ยับยั้ง acetylcholine และ/หรือ KCl ในลำไส้หนูตะเภาที่แยกไว้ใน organ bath (Tona, *et al.*, 2000)

ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด

สารสกัดจากใบฝรั่งมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดหนู ออกฤทธิ์ผ่าน protein tyrosine phosphatase1B (PTP1B) และมีฤทธิ์ antidiabetic type 2 โดยการลดจำนวน lipid droplets ในตับหนูที่ treat ด้วย butanol-solution fraction (Oh, *et al.*, 2005)

น้ำฝรั่งขนาด 1 g/kg ที่ให้ทาง i.p. แก่หนู mice ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงได้ชั่วคราวแต่การออกฤทธิ์ยังคงให้ผลน้อยกว่าการให้ chlorpropamide และ metformin และพบว่าน้ำฝรั่งสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดผู้ป่วยเบาหวานและอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีได้ (Cheng and Yang, 1983)

นำสารสกัดใบฝรั่งในชั้นน้ำมาทดสอบการลดระดับน้ำตาล (hypoglycemic) ในหนู alloxan-induced diabetic rat โดยให้ทางปากทั้งแบบ acute และ sub-acute test พบว่าสารสกัดขนาด 250 mg/kg สามารถลดระดับน้ำตาลได้อย่างมีนัยสำคัญ (Mukhtar, *et al.*, 2004)

ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic)

จากการทดสอบสารสกัดชั้นน้ำของฝรั่งพบว่ามียูฤทธิ์ inactivate mutagenicity ใน *Salmonella typhimurium* ที่ถูกทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี direct-acting mutagens โดยใช้ 4-nitro-O-phenylenediamine, sodium azide, และ S9-dependent mutagen (2-aminofluorene) เป็น mutagen และพบว่าสารสกัดยังคงให้ฤทธิ์เช่นเดิมแม้จะผ่านการ autoclave เป็นเวลา 15 นาที (Grover and Bala, 1993)

ฤทธิ์ต่อพฤติกรรมเคลื่อนไหวน

เมื่อนำสารสกัด non-polar fraction ที่ได้จากสารสกัดชั้น methanol ของใบฝรั่งแห้งมาทดลองให้กับหนู mice ทางช่องท้อง พบว่าสารสกัดขนาด 3.3 และ 6.6 mg/kg สามารถยับยั้ง exploratory activity ได้ 90% โดยมี onset time 6-8 นาที และยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนไหวนแบบ spontaneous locomotor activity ได้ (Lutterodt and Maleque, 1988)

ฤทธิ์เกี่ยวกับ neuromuscular junction

สาร quercetin จากฝรั่งช่วยลดการปลดปล่อย acetylcholine (ACh) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเป็นผลมาจาก interaction กับ presynaptic calcium channel (Re, *et al.*, 1999)

ฤทธิ์ต้านการไอ (Anticough)

สารสกัดชั้นน้ำของใบฝรั่งความเข้มข้น 2 และ 5 g/kg ที่ให้ทางปากแก่หนูและหนูตะเภาที่ได้รับ capsaicin aerosol พบว่าสามารถช่วยลดความถี่ของการไอได้ 35 และ 54% ตามลำดับ ($P < 0.01$) ภายใน 10 นาทีหลังจากให้สารสกัด แต่ผลที่ได้น้อยกว่าการให้

dextromethorphan 3 mg/kg ซึ่งสามารถลดความถี่ของการไอได้ถึง 78% ($P < 0.01$) (Jaiarj, *et al.*, 1999)

ฤทธิ์ต่อ central nervous system

สารสกัดชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol ของใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 20, 100, 500 และ 1250 mg/kg ออกฤทธิ์ต้านอาการเจ็บปวดที่เกิดจากสารเคมีและอุณหภูมิโดยการต้านการเจ็บปวดเป็นแบบ dose-dependent (Shaheen, *et al.*, 2000)

บทที่ 2

ตัวอย่างสมุนไพร เครื่องมือ สารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์

ตัวอย่างสมุนไพร

ในการวิจัยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างพืชคือใบฝรั่ง (*Psidium guajava* วงศ์ Myrtaceae) 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์พื้นเมือง และสายพันธุ์เวียดนาม โดยเก็บจากอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ได้นำกิ่งที่สมบูรณ์มาทำเป็นพิพิธภัณฑ์พืชแห้ง (Herbarium, No. PG47001) และได้ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification) โดยเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยากับตัวอย่างสมุนไพรมาตรฐานของภาควิชาเภสัชเวท และเภสัชพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



รูปที่ 2-1 ลักษณะผลของฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง (ซ้าย) และฝรั่งพันธุ์เวียดนาม (ขวา)

เครื่องมือ

1. UV/Vis Spectrophotometer (Spectronic[®])
2. HPLC (Millennium Water[®])
3. HPLC-MS (Water[®])
4. Rotary Evaporator (Eyela[®])
5. Hot Air Oven (Mettler[®])
6. Vacuum Oven (Hauser[®])
7. Centrifugal Evaporator (Speed Vac[®])
8. Microplate Reader (Bio-TEK[®])
9. Balance (Shimadzu[®])
10. Fraction Collector (Retriever II[®])
11. Hot Plate
12. Sonicator (Crest[®])

13. Dryer (National[®])

สารเคมี

1. 95% Ethanol (Merck[®])
2. Absolute Ethanol (Merck[®])
3. Methanol AR grade (Labscan[®])
4. Ethyl acetate (Merck[®])
5. Chloroform (Merck[®])
6. *n*-Hexane
7. Acetone
8. Distilled water
9. DI-water
10. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Sigma[®])
11. Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck[®])
12. Silica gel 60 for column chromatography (Merck[®])
13. Conc. HCl (Merck[®])
14. Phosphoric acid (Merck[®])
15. Reference Standard Quercetin (more than 98%) (Merck[®])
16. Avicel[®] PH101
17. Aerosil[®]

Note : solvent ที่ไม่ระบุบริษัทจำหน่ายเป็น commercial grade จะต้องกลั่นก่อนนำมาใช้

วัสดุ และอุปกรณ์

1. Beaker
2. Test tube
3. Erlenmyer flask
4. Pear-shape Flask
5. Volumetric flask
6. 96-well microplate
7. TLC tank
8. TLC-plate (Silica gel GF₂₅₄, Merck[®])
9. Vial
10. กระดาษกรอง #4
11. Stirring rod

12. Foil
13. Pipette
14. Multi-channel pipette & Tip
15. Micropipette & Tip
16. Cylinder
17. Forcep
18. Cotton
19. Sand
20. Evaporating dish
21. Dropper
22. Glass Column

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

การเตรียมสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดของใบฝรั่งเพื่อใช้สำหรับการผลิตสัตว์นั้น เป็นวิธีการหนึ่งของการสร้างทางเลือกในการนำสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ให้มากที่สุด ซึ่งการใช้ใบฝรั่งเพื่อการเลี้ยงสัตว์นั้นจะใช้เป็นสารเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ ทำให้สัตว์ลดความเครียดที่อยู่รวมกัน ซึ่งจะส่งผลในการลดอัตราการตายของสัตว์ โดยสารที่ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันคือ quercetin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม Flavonoids มีฤทธิ์เป็น antioxidant ซึ่งการพัฒนาสมุนไพรเพื่อนำไปใช้นี้จำเป็นที่จะต้องทำการควบคุมคุณภาพเช่นเดียวกัน เพื่อที่จะได้ทราบว่าในแต่ละครั้งก็นำไปใช้นั้นจะได้สมุนไพรที่มีปริมาณสารที่ต้องการนั้นเท่ากันทุกครั้ง และจะต้องหาอายุของผลิตภัณฑ์เพื่อที่จะได้บ่งบอกถึงความคงตัวของสารสำคัญที่อยู่ในผลิตภัณฑ์นั้น

การวิจัยครั้งนี้เป็นการเตรียมสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญของสารสกัดใบฝรั่ง ตลอดจนการหาความคงตัวของสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอน และรายละเอียด ดังนี้

1. เตรียมสารสกัดจากใบฝรั่ง 2 สายพันธุ์ โดยทำการเตรียมสารสกัดใบฝรั่งโดยใช้ 50% ethanol in DI-water เป็นตัวทำละลาย และทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Vacuum Dry โดยไม่ใช้ความร้อน
2. พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยหา HPLC Chromatographic Condition ที่สามารถแยกสารสำคัญ Quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง
3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Method Validation) สาร Quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง
4. พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดใบฝรั่งด้วย HPLC ให้เป็น Stability-Indicating Assay (SIA)
5. นำสารสกัดใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์มาหาปริมาณสารสำคัญ และฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยใช้วิธี DPPH-scavenging Assay
6. นำสารสกัดใบฝรั่งสายพันธุ์ที่มีปริมาณสารสำคัญสูง และมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ไปทดสอบความคงตัวของสารสกัดโดยใช้แสง ความร้อน ความชื้น ความเป็นกรด – ด่าง และเมื่อเก็บในสภาวะเร่ง (นำไปเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 45, 60 และ 70 °C

- ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 0, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 วัน ตามลำดับ) เพื่อหาอายุของสารสกัด
5. นำสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว มาทำการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง โดยการเติมสารที่เหมาะสมลงไปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรูปลักษณะดี มีความสะดวกในการเตรียมเป็นอาหาร และมีความคงตัวดีขึ้น
 6. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเตรียมในข้อ 5 มาหาปริมาณสารสำคัญ และฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยใช้วิธี DPPH-scavenging Assay
 7. ศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่งในสภาวะต่าง ๆ เช่น การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที (เลียนแบบการเตรียมอาหารสำหรับสัตว์) และในสภาวะเร่ง (นำไปเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 45, 60 และ 70 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 0, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 วัน ตามลำดับ) เพื่อใช้ในการกำหนดอายุของสารผลิตภัณฑ์

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดใบฝรั่ง

- 1.1 เก็บใบฝรั่ง 2 สายพันธุ์คือพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์เวียดนาม นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ 3 ครั้งจากนั้นนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำเข้าตู้อบ อบที่อุณหภูมิประมาณ 40-45 °C เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง
- 1.2 นำใบฝรั่งที่แห้งดีแล้วไปทำการบดให้เป็นผงหยาบ
- 1.3 นำผงใบฝรั่งที่ได้ทั้งสองสายพันธุ์ไปทำการหมัก หรือแช่ในตัวทำละลายของ 50% ethanol in DI-water โดยเติมตัวทำละลายให้ท่วมผงของใบฝรั่ง เป็นเวลา 3 วัน
- 1.4 เมื่อครบกำหนดให้นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง กากของผงใบฝรั่งนำกลับไปหมักซ้ำด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมอีก 3 ครั้ง
- 1.5 นำสารละลายที่กรองได้จากข้อ 1.4 ไประเหยด้วยวิธีการลดความดัน (rotary evaporation, 40 °C, 120 mbar) พยายามระเหยให้ตัวทำละลายออกไปให้มากที่สุด จากนั้นนำไปทำให้แห้งในขั้นตอนสุดท้ายด้วยเครื่อง centrifugal evaporation (SpeedVac®) หรือเครื่อง vacuum oven ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่ได้
- 1.6 ชั่งสารสกัดที่ได้นำไปคำนวณหา %yield เมื่อเทียบกับน้ำหนักของใบฝรั่งเริ่มต้น
- 1.7 รวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมดบรรจุในภาชนะกันแสงที่ปิดสนิท ชั่งน้ำหนัก และหา %yield ของสารสกัดที่ได้ แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้รักษาความชื้น เพื่อทำการทดลองต่อไป

2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Quercetin

เนื่องจากใบฝรั่งยังไม่มีข้อกำหนดเป็น monograph ใน Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ที่มีอยู่ในสารสกัดใบฝรั่งขึ้นมาโดยในขั้นแรกเป็นการหารูปแบบของการเคลื่อนที่ของสารสำคัญไปบนแผ่น thin-layer chromatography (TLC-pattern) และเลือกใช้ HPLC เป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์เพราะเป็นที่นิยมในปัจจุบัน เป็นวิธีที่สามารถพัฒนาต่อไปเป็น Stability-Indicating Assay (SIA) ได้ นอกจากนี้ วิธี HPLC ยังเป็นวิธีที่เป็นที่ยอมรับว่ามีความถูกต้องแม่นยำในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในวัตถุดิบและเภสัชภัณฑ์ โดยวิธีการวิเคราะห์นี้ได้พัฒนามาจากวิธีวิเคราะห์สารสำคัญ Quercetin ที่มีอยู่ในสารสกัดใบแปะก๊วย (Stricher, 1993) ขั้นตอนในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์มีดังต่อไปนี้

2.1 ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์

นำสารสกัดใบฝรั่งที่เตรียมได้จากข้อ 1.7 มาทำการหารูปแบบของการเคลื่อนที่ของสารสำคัญในสารสกัดแผ่น thin-layer chromatography (TLC-pattern) ชนิดที่เป็น SiO_2 โดยใช้ mobile phase คือ ethyl acetate - *n*-hexane ในอัตราส่วน 3:7 และ 3:2 ตามลำดับ การตรวจวัดจะใช้การส่องภายใต้แสง UV และใช้ spraying reagent คือ 50% sulphuric acid in ethanol แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 120 °C ดูการเปลี่ยนแปลงของสี และฉีดพ่นด้วย DPPH-reagent แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

2.2 การหา HPLC Chromatographic Condition ที่สามารถแยกสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง

2.2.1 เตรียม stock solution ของ standard quercetin

ชั่ง standard quercetin อย่างถูกต้องแม่นยำมา 3.0 mg. ใส่ลงไปใน volumetric flask ขนาด 10 ml. ปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้นเท่ากับ 0.3 mg/ml)

2.2.2 เตรียม working solution จาก 2.2.1

pipet สารจาก 2.2.1 มา 500 μL . ด้วย autopipet แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 2.0 ml. ด้วย methanol (ความเข้มข้นเท่ากับ 0.075 mg/ml)

2.2.3 เตรียม stock solution ของสารสกัดใบฝรั่ง

ชั่งสารสกัดใบฝรั่งอย่างถูกต้องแม่นยำ 200.0 mg. ใส่ลงไปใน volumetric flask ขนาด 10 ml. ปรับปริมาตรด้วย methanol

2.2.4 เตรียม working solution จาก 2.2.3

ใช้สารที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.3 เป็น working solution สำหรับใช้ฉีด HPLC

2.2.5 ฉีด working solution จาก 2.2.3 และ 2.2.4

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

HPLC Column : Apollo C-18 4.6mm x 150mm, 5 micron
Mobile Phase : MeOH – 0.1% aq. phosphoric acid ในอัตราส่วนต่าง ๆ
Flow Rate : 1.0, 1.2, 1.4, 1.5 และ 2.0 ml/min
Detection : 255 nm
Injection Volume : 10 µl
Temperature : ambient

นำ chromatogram ที่ได้มาเปรียบเทียบลักษณะ การแยกของ peak ต่าง ๆ และศึกษา รูปแบบของการดูดกลืนคลื่นแสง (PDA-curve) เพื่อคัดเลือก peak ของสารสำคัญ Quercetin ในเงื่อนไขที่เหมาะสมในการทำวิจัยในหัวข้อต่อไป

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Method Validation) ของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง

3.1 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์การวิเคราะห์

3.1.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

1. ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin 3.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 0.3 mg/ml)

3.1.2 การเตรียม Reference Standard Solution

1. ปิเปิด Reference Standard Stock Solution จากข้อ 3.1.1 มา 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1 และ 0.05 ml. ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย methanol (จะได้ความเข้มข้น 0.03, 0.015, 0.0075, 0.00325, 0.003 และ 0.0015 mg/ml ตามลำดับ)

3.1.3 การเตรียม Sample Quercetin Solution

1. ชั่งสารมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักแน่นอนของ quercetin ประมาณ 7.0 mg. ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml.
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 0.07 mg/ml)
3. ปิเปิดสารละลายจากข้อ 2 มา 1500 และ 800 µl. แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 2000 µl. (ได้ความเข้มข้น 0.0525 และ 0.028 mg/ml ตามลำดับ)

4. คำนวณหาค่าน้ำหนักที่แท้จริงของสาร โดยที่ Quercetin มีค่า %purity = 98%
(ค่า Actual Conc. ของ Quercetin)

3.1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

HPLC Column : Apollo C-18 4.6mm x 150mm, 5 micron
Mobile Phase : MeOH – 0.1% aq. phosphoric acid (50:50)
Flow Rate : 1.2 ml/min
Detection : 255 nm
Injection Volume : 10 µl
Temperature : ambient

บันทึก chromatogram นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาน้ำหนักของสารสำคัญ quercetin (ได้ค่า Observed Conc. ของ Quercetin)

3.1.5 การคำนวณ

นำค่าที่ได้จากการฉีด HPLC มาคำนวณหาค่าต่าง ๆ ดังนี้

Observed Conc. ของ Quercetin

Actual Conc. ของ Quercetin

% Recovery = (Observed Concentration / Actual Concentration) x 100

3.2 การตรวจสอบความเที่ยงตรง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

3.2.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

1. ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin 3.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 0.3 mg/ml)

3.2.2 การเตรียม Reference Standard Solution

1. ปิเปิด Reference Standard Stock Solution จากข้อ 3.2.1 มา 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1 และ 0.05 ml. ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (จะได้ความเข้มข้น 0.03, 0.015, 0.0075, 0.00325, 0.003 และ 0.0015 mg/ml ตามลำดับ)

3.2.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system 2 ครั้ง โดยให้ห่างกัน 1 วัน และฉีดความเข้มข้นละ 3 ครั้ง โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

HPLC Column : Apollo C-18 4.6mm x 150mm, 5 micron
 Mobile Phase : MeOH – 0.1% aq. phosphoric acid (50:50)
 Flow Rate : 1.2 ml/min
 Detection : 255 nm
 Injection Volume : 10 µl
 Temperature : ambient

บันทึก chromatogram นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาพื้นที่ของสารสำคัญ quercetin ของการฉีด HPLC ทั้งสองวัน แล้วนำค่าที่ได้ (Observed Conc. ของ Quercetin) มาหาค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ และหาค่า % Relative Standard Deviation (%RSD)

3.2.5 การคำนวณ

นำค่าที่ได้จากการฉีด HPLC มาคำนวณหาค่าต่าง ๆ ดังนี้

Observed Conc. ของ Quercetin

Actual Conc. ของ Quercetin

% Recovery = (Observed Concentration / Actual Concentration) x 100

% RSD = [SD / Mean] x 100

3.3 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีวิเคราะห์

3.3.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

1. ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin 3.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 0.3 mg/ml)

3.3.2 การเตรียม Reference Standard Solution

1. ปิเปิด Reference Standard Stock Solution จากข้อ 3.3.1 มา 0.1 ml. ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (จะได้ความเข้มข้น 0.003 mg/ml)

3.3.3 การเตรียม Sample Solution จาก Aerosil

1. ชั่ง Aerosil อย่างถูกต้องแม่นยำมา 500 mg. ใส่ลง volumetric flask ขนาด 10.0 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรให้ครบด้วย methanol

3.3.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

HPLC Column	: Apollo C-18 4.6mm x 150mm, 5 micron
Mobile Phase	: MeOH – 0.1% aq. phosphoric acid (50:50)
Flow Rate	: 1.2 ml/min
Detection	: 255 nm
Injection Volume	: 10 µl
Temperature	: ambient

บันทึก chromatogram นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ และสรุป ความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีวิเคราะห์

4. การหาปริมาณสารสำคัญ Quercetin และการสลายตัวของสารสำคัญในสารสกัดใบฝรั่ง

4.1 ตรวจสอบลักษณะทั่วไปทางกายภาพ (Physical Appearance) ของสารสกัดใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์ โดยตรวจสอบลักษณะของสารสกัด โดยดูจากสี กลิ่น และลักษณะผงยา บันทึกข้อมูล

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ในสารสกัด

4.2.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

1. ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin 3.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 0.3 mg/ml)

4.2.2 การเตรียม Reference Standard Solution

1. ปิเปิด Reference Standard Stock Solution จากข้อ 4.2.1 มา 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1 และ 0.05 ml. ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (จะได้ความเข้มข้น 0.03, 0.015, 0.0075, 0.00325, 0.003 และ 0.0015 mg/ml ตามลำดับ)

4.2.3 การเตรียม Sample Solution จากสารสกัดใบฝรั่ง (ทำ 3 ซ้ำ)

1. ชั่งสารสกัดใบฝรั่งอย่างถูกต้องแม่นยำมา 200 mg. ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 125 ml.
2. เติม methanol 20 ml. และน้ำกลั่น 20 ml. นำไป sonicated เป็นเวลา 5 นาที
3. เติม และปรับปริมาตรให้ครบด้วย methanol

4.2.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

HPLC Column	: Apollo C-18 4.6mm x 150mm, 5 micron
Mobile Phase	: MeOH – 0.1% aq. phosphoric acid (50:50)
Flow Rate	: 1.2 ml/min
Detection	: 255 nm
Injection Volume	: 10 µl
Temperature	: ambient

บันทึก chromatogram นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณของสารสำคัญ Quercetin

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ในสารสกัดที่สลายตัวไปในสภาวะต่าง ๆ

4.3.1 การวิเคราะห์ chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยแสง

1. ชั่งสารสกัดใบฝรั่งอย่างถูกต้องแม่นยำมา 1.0 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 100 ml.
2. นำไปวางให้ถูกแสงภายใต้โคมไฟส่องสว่างขนาด 100 watt. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสี หรือลักษณะของสารสกัด
3. ถ่ายสารสกัดลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml.
4. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 20 mg/ml)
5. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ด้วย HPLC ตามข้อ 4.2.4

4.3.2 การวิเคราะห์ chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยความร้อน

1. ชั่งสารสกัดใบฝรั่งอย่างถูกต้องแม่นยำ 1.0 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 100 ml.
2. ให้ความร้อนประมาณ 100 °C โดยนำไปวางบน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสี หรือลักษณะของสารสกัด
3. ถ่ายสารสกัดลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml.
4. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 20 mg/ml)
5. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ด้วย HPLC ตามข้อ 4.2.4

4.3.3 การวิเคราะห์ chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยความชื้น

1. ชั่งสารสกัดใบฝรั่งอย่างถูกต้องแม่นยำ 1.0 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 100 ml.
2. นำไปวางใน desiccator ที่ทำให้อิ่มตัวด้วยไอน้ำ (ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสี หรือลักษณะของสารสกัด
3. ถ่ายสารสกัดลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml.
4. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 20 mg/ml)
5. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ด้วย HPLC ตามข้อ 4.2.4

4.3.4 การวิเคราะห์ chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยกรด

1. ชั่งสารสกัดใบฝรั่งอย่างถูกต้องแม่นยำ 1.0 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 100 ml.
2. เติมกรด HCl ความเข้มข้น 0.1 M ลงไป 5 ml. แกว่งให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง ในตู้คว่ำ สังเกตการเปลี่ยนสี หรือลักษณะของสารสกัด
3. ถ่ายสารสกัดลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml.
4. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 20 mg/ml)
5. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ด้วย HPLC ตามข้อ 4.2.4

4.3.5 การวิเคราะห์ chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยด่าง

1. ชั่งสารสกัดใบฝรั่งอย่างถูกต้องแม่นยำ 1.0 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 100 ml.
2. เติมด่าง NaOH ความเข้มข้น 0.1 M ลงไป 5 ml. แกว่งให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสี หรือลักษณะของสารสกัด
3. ถ่ายสารสกัดลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml.
4. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 20 mg/ml)
5. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ด้วย HPLC ตามข้อ 4.2.4

5 ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ของสารสกัดใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์ (Yamasaki, *et. al.*, 1994.)

5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Reference Standard Stock Solution ของ DPPH

1. ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin 2.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำใน volumetric flask ขนาด 100.0 ml.
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 2 µg./ml.)

5.2 การเตรียม Reference Standard Solution ของ DPPH

1. ปิเปต Reference Standard Stock Solution จากข้อ 5.1 มา 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 ml.
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 2.0 ml. (จะได้ความเข้มข้น 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 µg./ml. ตามลำดับ)

5.3 การเตรียม Sample Stock Solution

1. ชั่งสารสกัดใบฝรั่งหนัก 200.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำลงใน volumetric flask ขนาด 100.0 ml.
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 2000 µg./ml.)

5.4 การเตรียม Sample Solution

1. ปิเปตสารละลายจากข้อ 5.3 (2) มา 1.0 ml. ลงใน volumetric flask ขนาด 10.0 ml.
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 10.0 ml. (ความเข้มข้น 200 µg./ml.)
3. ปิเปตสารละลายจากข้อ 2 มา 1000, 500, 200 และ 100 µl.
4. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 2.0 ml. (ความเข้มข้น 100, 50, 20 และ 10 µg./ml. ตามลำดับ)

5.4 วิธีการวัดค่า DPPH-radical scavenger

1. ปิเปตสารละลายที่ต้องการวัดค่ามา 500 µl. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย DPPH solution ลงไป 500 µl.
2. ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm.
4. นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (EC₅₀) ของสารสกัดใบฝรั่ง โดยใช้สารมาตรฐาน quercetin และ BHT เป็น positive control

6. การศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบฝรั่ง

คัดเลือกสารสกัดใบฝรั่งสายพันธุ์ที่มีปริมาณสารสำคัญ Quercetin สูง และมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดีเพื่อมาทำการศึกษาความคงตัวของสารสกัด โดยวิธีการศึกษามีดังต่อไปนี้

6.1 การหาปริมาณสารสำคัญ quercetin

คัดเลือกสารสกัดใบฝรั่งสายพันธุ์ที่มีปริมาณสารสำคัญ Quercetin สูง และมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดีเพื่อมาทำการศึกษาความคงตัวของสารสกัด โดยวิธีการศึกษามีดังต่อไปนี้

- 6.1.1 นำสารสกัดใบฝรั่งที่เตรียมได้ไปเก็บในภาชนะปิดสนิท นำไปไว้ในสถานที่ที่มีอุณหภูมิ 45, 60 และ 70 °C และมีความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 วัน

6.1.2 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

1. ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin 3.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 0.3 mg/ml)

6.1.3 การเตรียม Reference Standard Solution

1. ปิเปิด Reference Standard Stock Solution จากข้อ 6.1.2 มา 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1 และ 0.05 ml. ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย methanol (จะได้ความเข้มข้น 0.03, 0.015, 0.0075, 0.00325, 0.003 และ 0.0015 mg/ml ตามลำดับ)

6.1.4 การเตรียม Sample Solution จากสารสกัดใบฝรั่งจากข้อ 6.1.1 โดยสุ่มตัวอย่างมาทำการทดลอง (ทำ 3 ซ้ำ) ดังนี้

1. ชั่งสารสกัดใบฝรั่งอย่างถูกต้องแม่นยำมา 200 mg. ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 125 ml.
2. เติมน้ำ methanol 20 ml. และน้ำกลั่น 20 ml. นำไป sonicated เป็นเวลา 5 นาที
4. เติมน้ำ conc. HCl ลงไป 4.0 ml. แกว่งให้เข้ากัน นำไป reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำสารที่ได้ ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 50.0 ml.
6. เติมน้ำและปรับปริมาตรให้ครบด้วย methanol

6.1.5 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

HPLC Column : Apollo C-18 4.6mm x 150mm, 5 micron
Mobile Phase : MeOH – 0.1% aq. phosphoric acid (50:50)
Flow Rate : 1.2 ml/min
Detection : 255 nm
Injection Volume : 10 µl
Temperature : ambient

บันทึก chromatogram นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ที่เวลาต่าง ๆ แล้วนำมาคำนวณหาอายุของสารสกัดใบฝรั่ง

6.2 ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ของสารสกัดใบฝรั่ง

6.2.1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Reference Standard Stock Solution ของ DPPH

1. ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin 2.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำใน volumetric flask ขนาด 100.0 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 2 µg./ml.)

6.2.2 การเตรียม Reference Standard Solution ของ DPPH

1. ปิเปิด Reference Standard Stock Solution จากข้อ 6.2.1 มา 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 2.0 ml. (จะได้ความเข้มข้น 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 µg./ml. ตามลำดับ)

6.2.3 การเตรียม Sample Stock Solution

1. ชั่งสารสกัดใบฝรั่งหนัก 200.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำลงใน volumetric flask ขนาด 100.0 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 2000 µg./ml.)

6.2.4 การเตรียม Sample Solution

1. ปิเปตสารละลายจากข้อ 2 มา 1.0 ml. ลงใน volumetric flask ขนาด 10.0 ml.
2. เติมน้ำ และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 10.0 ml. (ความเข้มข้น 200 μ g./ml.)
3. ปิเปตสารละลายจากข้อ 2 มา 1000, 500, 200 และ 100 μ l.
4. เติมน้ำ และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 2.0 ml. (ความเข้มข้น 100, 50, 20 และ 10 μ g./ml. ตามลำดับ)

6.2.4 วิธีการวัดหาค่า DPPH-radical scavenger

1. ปิเปตสารละลายที่ต้องการวัดค่ามา 500 μ l. เติมน้ำละลายของ 6×10^{-5} M DPPH solution ลงไป 500 μ l.
2. ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm.

7. การเตรียมสารสกัดใบฝรั่งให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับสัตว์

เนื่องจากสารสกัดใบฝรั่งที่ได้มีลักษณะไม่ดีคือดูดความชื้นเร็วทำให้เยิ้มเหลว และหนืด ซึ่งไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้พัฒนาสารสกัดใบฝรั่งดังกล่าวให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงสัตว์ เช่น เป็นผงแห้ง ไม่ดูดความชื้นอย่างรวดเร็ว และเพื่อความสะดวกในการนำไปใช้ เป็นต้น โดยวิธีการพัฒนา จะเป็นการเติมน้ำดูดความชื้นสารสกัดขณะทำให้แห้ง 2 ชนิดคือ Aerosil® และ Avicel® PH101 ซึ่งจะเติมลงไปในส่วนไม่เกิน 7 และ 32% w/w ตามลำดับ แล้วสังเกตดูลักษณะของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งที่เตรียมได้ทันที และเมื่อวางทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน

8. การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง

คัดเลือกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 7 ที่มีลักษณะดี เป็นผงร่วน ทนต่อความชื้นในอากาศเมื่อวางทิ้งไว้ 1 เดือน นำมาศึกษาหาความคงตัว และอายุของผลิตภัณฑ์ และฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยนำผลิตภัณฑ์ของสารสกัดใบฝรั่งที่คัดเลือกแล้วไปเก็บในภาชนะปิดสนิท แล้วนำไปทำการทดลองดังต่อไปนี้

8.1 การหาปริมาณสารสำคัญ quercetin

การหาปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งจะทำการทดลอง 2 วิธีการคือ

1. นำผลิตภัณฑ์ไปผ่านความร้อนสูงประมาณ 100 °C เป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที ตามลำดับ
2. นำไปเก็บไว้ในสถานที่ที่มีอุณหภูมิ 45, 60 และ 70 °C และมีความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 วัน ตามลำดับ

นำตัวอย่างที่ผ่านขบวนการในข้อ 1 และ 2 มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ที่มีอยู่ผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง ตามข้อที่ 8.1.1 – 8.1.4

8.1.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

1. ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin 3.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 0.3 mg/ml)

8.1.2 การเตรียม Reference Standard Solution

1. ปิเปิด Reference Standard Stock Solution จากข้อ 8.1.1 มา 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1 และ 0.05 ml. ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (จะได้ความเข้มข้น 0.03, 0.015, 0.0075, 0.00325, 0.003 และ 0.0015 mg/ml ตามลำดับ)

8.1.3 การเตรียม Sample Solution จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารสกัดใบฝรั่งที่คัดเลือกได้จากข้อ 7 โดยสุ่มตัวอย่างมาทำการทดลอง (ทำ 3 ซ้ำ) ดังนี้

1. ชั่งสารสกัดใบฝรั่งอย่างถูกต้องแม่นยำมา 200 mg. ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 125 ml.
2. เติม methanol 20 ml. และน้ำกลั่น 20 ml. นำไป sonicated เป็นเวลา 5 นาที
4. เติม conc. HCl ลงไป 4.0 ml. แกว่งให้เข้ากัน นำไป reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำสารที่ได้ ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 50.0 ml.
6. เติม และปรับปริมาตรให้ครบด้วย methanol

8.1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

HPLC Column	: Apollo C-18 4.6mm x 150mm, 5 micron
Mobile Phase	: MeOH – 0.1% aq. phosphoric acid (50:50)
Flow Rate	: 1.2 ml/min
Detection	: 255 nm
Injection Volume	: 10 µl
Temperature	: ambient

บันทึก chromatogram นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ณ เวลาต่าง ๆ แล้วนำมาคำนวณหาความคงตัว และอายุของผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง

8.2 ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ของผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง

8.2.1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Reference Standard Stock Solution ของ DPPH

1. ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin 2.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำใน volumetric flask ขนาด 100.0 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 2 µg./ml.)

8.2.2 การเตรียม Reference Standard Solution ของ DPPH

1. ปิเปิด Reference Standard Stock Solution จากข้อ 8.1 มา 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 2.0 ml. (จะได้ความเข้มข้น 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 µg./ml. ตามลำดับ)

8.2.3 การเตรียม Sample Stock Solution

1. ชั่งสารสกัดใบฝรั่งหนัก 200.0 mg. อย่างถูกต้องแม่นยำลงใน volumetric flask ขนาด 100.0 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 2000 µg./ml.)