



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การทดสอบความคงตัวของตำรับสารสกัดจากใบฝรั่ง
รูปแกรนูลแบบระยะยาวและเมื่อผสมกับอาหารสัตว์

โดย รศ.ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล และคณะ

พฤศจิกายน 2555

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การทดสอบความคงตัวของตำรับสารสกัดจากใบฝรั่ง
รูปแกรณูลแบบระยะยาวและเมื่อผสมกับอาหารสัตว์

ผู้วิจัย

รศ.ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล

รศ.ดร.กรกนก อิงคินันท์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

โครงการ “การทดสอบความคงตัวของตำรับสารสกัดจากใบฝรั่งรูปแกรนูลแบบระยะยาวและ
เมื่อผสมกับอาหารสัตว์”

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร
(Executive Summary)

ปัจจุบันมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอนุมูลอิสระและการเกิดโรคต่างๆ จำนวนมาก และพบว่าการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันการเกิดโรคได้หลายชนิด จึงมีการใช้สารสกัดจากสมุนไพรผสมลงในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มความสามารถในการต้านโรคที่เกิดจากสภาวะเครียด คณะผู้ทำวิจัยได้รวบรวมเอกสารทางวิชาการแล้วพบว่าสารสกัดจากใบฝรั่งมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณและความแรงที่สูงกว่าพืชอื่นหลายชนิด อีกทั้งเป็นพืชและใช้ส่วนของพืชที่สามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการเสื่อมสลายตัวของสาร quercetin ซึ่งเป็นสารสำคัญชนิดหนึ่งในสารสกัดใบฝรั่งมีปฏิกิริยาการเสื่อมสลายแบบอันดับสอง ทั้งในรูปสารสกัดและตำรับแกรนูล และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระลดลงในอุณหภูมิ และเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่จะลดลงน้อยมากในช่วงเวลา 7 วันแรกที่อุณหภูมิ 45-70 องศาเซลเซียส การศึกษานี้เป็นการตั้งตำรับและทดสอบความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งภายใต้การเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส ในภาชนะป้องกันความชื้นและแสง นาน 1 ปี ศึกษาความคงตัวเมื่อผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 5, 10 และ 30 นาที และศึกษาความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งเมื่อผสมกับอาหารสัตว์ในระยะยาว เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ของการผลิตจำหน่ายในรูปแบบอาหารสัตว์สำเร็จรูป โดยทำการทดสอบความคงตัวของ quercetin ทดสอบหาปริมาณ total phenolic compounds และทดสอบความแรงของสารต้านอนุมูลอิสระ ในตำรับสารสกัดใบฝรั่งก่อนและหลังการผสมกับอาหารสัตว์ที่สภาวะต่างๆ เพื่อให้สามารถนำไปใช้จริงได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป นอกจากนี้ยังเตรียมสารสกัดจากใบฝรั่งปริมาณ 3 กิโลกรัม เพื่อผลิตตำรับแกรนูลสำหรับการใช้ในการทดลองในสัตว์ทดลองต่อไป

การทดลองนี้พบว่าการเตรียมสารสกัดใบฝรั่งด้วยวิธีการพ่นแห้งโดยใช้เบต้าไซโครเดกซ์ทรีนเป็นสารช่วย ทำให้ได้ตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่มีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาล ร่วน ไม่จับก้อนจากการดูดความชื้น ซึ่งวิธีการพ่นแห้งนี้เป็นวิธีการที่สามารถปรับใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อผลิตตำรับสารสกัดใบฝรั่งปริมาณมากได้ง่าย เมื่อนำตำรับสารสกัดใบฝรั่งพ่นแห้งไปทดสอบความคงตัวของตำรับที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และฤทธิ์

การต้านอนุมูลอิสระเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนที่ 6 เป็นต้นไป แต่จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในเดือนที่ 6, 9 และ 12

การผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการผสมนาน 5, 10 และ 30 นาที ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่งร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนักไม่ได้ทำให้ปริมาณ quercetin ต่างกัน แต่มีแนวโน้มทำให้ปริมาณ total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลงเล็กน้อยเมื่อใช้เวลาในการผสมนาน 30 นาที การศึกษานี้พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการผสมที่ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ส่วนการเก็บตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมกับอาหารสัตว์ที่อัตราส่วนการผสมต่างๆ ในรูปที่ผสมแล้ว ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณความชื้น โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้มีปริมาณ quercetin และ total phenolic compounds มากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลงน้อยกว่าและปริมาณความชื้นต่ำกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จึงควรเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อยืดอายุการใช้งาน

โครงการ “การทดสอบความคงตัวของตำรับสารสกัดจากใบฝรั่งรูปแกรนูลแบบระยะยาวและ
เมื่อผสมกับอาหารสัตว์”

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอนุมูลอิสระและการเกิดโรคต่างๆ จำนวนมาก และพบว่าการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันการเกิดโรคได้หลายชนิด สารสกัดจากใบฝรั่งมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณและความแรงที่สูงกว่าพืชอื่นหลายชนิด อีกทั้งเป็นพืชและใช้ส่วนของพืชที่สามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาตำรับสารสกัดใบฝรั่งในรูปผงจากการพ่นแห้งและทดสอบความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งภายใต้การเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส ในภาชนะป้องกันความชื้นและแสง นาน 1 ปี ศึกษาความคงตัวเมื่อผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 5, 10 และ 30 นาที และศึกษาความคงตัวของตำรับเมื่อผสมกับอาหารสัตว์ในระยะยาว เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ของการผลิตจำหน่ายในรูปแบบอาหารสัตว์สำเร็จรูป โดยการหาปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และทดสอบความแรงของสารต้านอนุมูลอิสระ จากการทดลองพบว่า การเตรียมสารสกัดใบฝรั่งด้วยวิธีการพ่นแห้งโดยใช้เบต้าไซโครเด็คทรีนเป็นสารช่วย ทำให้ได้ตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่มีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาล ร่วน ไม่จับก้อนจากการดูดความชื้น เมื่อนำตำรับสารสกัดใบฝรั่งพ่นแห้งไปทดสอบความคงตัวของตำรับที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนที่ 6 เป็นต้นไป แต่จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในเดือนที่ 6, 9 และ 12

การผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการผสมนาน 5, 10 และ 30 นาที ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่งร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนักไม่ได้ทำให้ปริมาณ quercetin ต่างกัน แต่มีแนวโน้มทำให้ปริมาณ total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลงเล็กน้อยเมื่อใช้เวลาในการผสมนาน 30 นาที การศึกษานี้พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการผสมที่ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลต่อปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ส่วนการเก็บตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมกับอาหารสัตว์เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้มีปริมาณ quercetin และ total phenolic compounds มากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลงน้อยกว่าและปริมาณความชื้นต่ำกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จึงควรเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อยืดอายุการใช้งาน

Abstract

Recently, numbers of studies revealed that free radicals closely related to many diseases and found out that antioxidants could prevent the occurrence of diseases. Guava leave extract contains a high number of antioxidants, the leave part was easily harvested, and guava also commonly found in Thailand.

This study aims at developing guava leave extract formulation by spray drying and stability studies of the formulation by storage at 4, 25 and 45 °C in air tight, light resistant container for 1 year. Stability studies of the formulation mixed with animal feed at 80 and 100 °C for 5, 10 and 30 minutes together with long term stability studies for feasibility of marketing were tested using quercetin, total phenolic compounds, and antioxidant activity as markers. The results revealed that the formulation prepared by spray drying using β -cyclodextrin as an excipient produced brownish, free flowing powder without clumping. Stability studies of the formulation at 4, 25 and 45 °C showed that quercetin, total phenolic compounds and antioxidant activity decreased after 6 months. However, the marker levels at 6, 9, and 12 months remained unchanged afterward.

Mixing the formulation with animal feed at 80 and 100 °C for 5, 10, and 30 minutes at the concentration of 5, 10, and 20 %w/w did not resulted in different levels of quercetin, while total phenolic compounds and antioxidant activity slightly decreased for 30 minutes mixing time. The results showed that mixing at 80 and 100 °C retained the same levels of the markers while storage at 4 °C provided higher quercetin, total phenolic compounds and antioxidant activity than storage at 45 °C.

สารบัญ

		หน้าที่
1	บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร	i
2	บทคัดย่อภาษาไทย	iii
3	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
บทที่ 1	บทนำ	
1	หลักการและเหตุผล	1
2	วัตถุประสงค์	4
3	ประโยชน์ของโครงการ	4
บทที่ 2	การทดลองและผลการทดลอง	
Part I	การเตรียมสารสกัดจากใบฝรั่งและการเตรียมตำรับ สารสกัดจากใบฝรั่ง	5
1	การเตรียมสารสกัดจากใบฝรั่ง	6
2	การเตรียมตำรับสารสกัดจากใบฝรั่ง	5
Part II	การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญและการทดสอบ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	8
1	การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ในสารสกัด ใบฝรั่งด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	8
1.1	การหาปริมาณสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง	8
1.2	การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของ วิธีวิเคราะห์	8
2	การทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH	12
2.1	วิธีการเตรียมสาร quercetin	12
2.2	วิธีการเตรียมสารตัวอย่างสารสกัดใบฝรั่งแบบผง	12
2.3	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	12

	หน้า
3 การวิเคราะห์ total phenolic compounds	15
3.1 วิธีการเตรียมตัวอย่าง	15
3.2 การทำ calibration curve ของ Gallic acid	15
3.3 วิธีการวิเคราะห์ Total polyphenol	15
4 การตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Method Validation) ของสาร quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง	18
4.1 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์	18
4.2 การตรวจสอบความเที่ยงตรง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์	19
4.3 การวิเคราะห์หาค่า LOD และ LOQ	20
4.4 การทดสอบ Linearity Range	20
Part III การศึกษาความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งและตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมกับอาหารสัตว์	22
1 การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษาตำรับสารสกัดใบฝรั่ง	22
2 การศึกษาความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมกับอาหารสัตว์	32
2.1 ความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมกับอาหารสัตว์ที่เวลาเริ่มต้น (ทันทีหลังจากการผสม)	32
2.2 ความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมกับอาหารสัตว์ที่เวลา 0, 3, 6 และ 9 เดือน	44
2.2.1 กราฟสรุปภาพรวมผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งและอาหารสัตว์	57
2.2.2 กราฟสรุปภาพรวมผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมอาหารสัตว์	62

	หน้าที่
บทที่ 3 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	67
เอกสารอ้างอิง	68

บทที่ 1

บทนำ

หลักการและเหตุผล

ปัจจุบันมีการศึกษาเชื่อมโยงการเกิดอนุมูลอิสระที่มีผลต่อร่างกายและส่งผลต่อการเกิดโรคต่างๆ เช่น มะเร็ง ความชรา เบาหวาน รวมถึงโรคหัวใจและหลอดเลือด (Moskovitz, Yim and Chok, 2002) ซึ่งมีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคเหล่านี้โดยการป้องกันอันตรายต่อเซลล์จากสภาวะเครียด (Halliwell and Gutteridge, 1999) งานวิจัยหลายส่วนแสดงให้เห็นว่าอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระปริมาณสูงมีส่วนช่วยในการป้องกันโรคหัวใจหลอดเลือด มะเร็ง (Kris-Etherton et.al., 2002) และการเสื่อมของระบบประสาท (Di Matteo and Esposito, 2003) จึงทำให้มีการศึกษาสารเคมีและผลของสารเคมีที่ได้จากพืชต่อสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ฝรั่ง หรือ *Psidium guajava* Linn. เป็นพืชในตระกูล Myrtaceae ที่เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กที่มีน้ำมันหอมระเหยซินีออล (cineol) แทนนิน (tannin) ไตรเทอร์ปีนส์ (triterpenes) รวมประมาณร้อยละ 8-10 ส่วนผลดิบก็มีแทนนิน วิตามินซี แคลเซียมออกซาเลต และอื่นๆ สารแทนนินที่มีอยู่ในใบและผลดิบของฝรั่งมีฤทธิ์ฝาดสมาน ใช้รักษาอาการท้องเสีย และสารสกัดน้ำจากใบฝรั่งยังออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียอีกด้วย (Abdelrahim et.al., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบฝรั่งสามารถใช้ในการรักษาอาการท้องเสียได้ เมื่อศึกษาวิธีการสกัดใบฝรั่งด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน, เอทิลอะซิเตท, ปิวทานอล และเมทานอล พบว่าสารสกัดใบฝรั่งด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ตามด้วยปิวทานอลและเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ โดยที่ฤทธิ์ดังกล่าวแปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอล (phenolic compounds) ที่พบ มีรายงานว่าสารกลุ่มฟีนอลนี้สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ และสามารถนำมาใช้ป้องกันโรคหลายชนิด (Kinsella et al., 1993)

ตารางที่ 1 – แสดงค่า Percentage Yield และค่า TEAC ของสารสกัดเอทานอลของพืช 24 ชนิด

Plants	Part used	Yield (%) (w/w)	TEAC (mM/mg) ^a
<i>Andrographis paniculata</i>	Leaf	6.48	0.397 ± 0.022
	Stem	1.54	0.648 ± 0.047
<i>Clausena lansium</i>	Leaf	8.66	0.491 ± 0.011
<i>Citrus hystrix</i>	Leaf	7.42	0.781 ± 0.013
	Fruit peel	17.52	1.20 ± 0.034
<i>Cocos nucifera</i>	Fruit peel	5.80	1.53 ± 0.044
<i>Cymbopogon citratus</i>	Leaf	10.05	0.631 ± 0.057
	Stem	16.37	0.324 ± 0.014
<i>Dregea volubilis</i>	Leaf and stem	12.38	1.06 ± 0.087
<i>Garcinia mangostana</i>	Fruit peel	7.21	3.00 ± 0.016
<i>Gymnema inodorum</i>	Leaf	11.92	0.902 ± 0.052
	Stem	3.91	0.718 ± 0.027
<i>Hylocereus undatus</i>	Fruit peel	1.40	0.685 ± 0.021
<i>Hyptis suaveolens</i>	Leaf and stem	4.34	0.850 ± 0.022
<i>Lansium domesticum</i>	Fruit peel	5.71	0.507 ± 0.002
<i>Leucaena leucocephala</i>	Leaf	6.09	1.43 ± 0.007
	Pod	1.20	1.71 ± 0.033
<i>Marsdenia glabra</i>	Leaf	11.56	0.673 ± 0.044
<i>Mentha cordifolia</i>	Leaf	11.13	1.84 ± 0.030
	Stem	7.04	0.364 ± 0.006
<i>Musa sapientum</i>	Fruit peel	7.66	1.80 ± 0.038
<i>Nephelium lappaceum</i>	Fruit peel	10.68	3.07 ± 0.003
<i>Ocimum basilicum</i>	Leaf	9.82	0.877 ± 0.010
	Stem	4.85	0.783 ± 0.022
<i>Ocimum gratissimum</i>	Leaf	6.17	1.35 ± 0.014
<i>Ocimum sanctum</i>	Leaf	6.04	1.48 ± 0.030
	Stem	3.65	0.877 ± 0.004
<i>Oroxylum indicum</i>	Pod	7.50	0.506 ± 0.009
<i>Passiflora foetida</i>	Fruit peel	2.60	0.591 ± 0.023
<i>Piper sarmentosum</i>	Leaf	3.06	1.46 ± 0.020
<i>Psidium guajava</i>	Leaf	8.70	4.91 ± 0.050
	Stem	1.12	1.96 ± 0.016
	Fruit pulp	4.65	0.898 ± 0.008
<i>Thunbergia laurifolia</i>	Leaf	4.47	1.66 ± 0.011

^a Values represent means ± SD (n = 3).

Tachakittirungrod และคณะ (2007) ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชในประเทศไทยทั้งหมด 24 ชนิดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายสกัด พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ค่า TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) เท่ากับ 4.91 ± 0.050 mM/mg ของสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 1

ใบฝรั่งประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยได้แก่ α -pinene, β -pinene, limonene, menthol, terpenyl acetate, isopropyl alcohol, logicyclene, caryophyllene, β -bisabolene, cineol, caryophyllene oxide, β -copanene, farnesene, humulene, selinene, cardinene และ cucumene (Zakaria and Mohd, 1994; Li et al., 1999) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์และซาโปนินส์ร่วมกับ oleanolic acid (Arima and Danno, 2002), nerolidiol, β -sitosterol, ursolic, crategolic, guayavolic acids (Iwu, 1993) นอกจากนี้ยังมีสารกลุ่ม triterpenic acids ฟลาโวนอยด์ เช่น avicularin และ 3-L-4-pyranoside ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Oliver-Bever, 1986), fixed oil ร้อยละ 6, เรซินร้อยละ 3.15 และ แทนนินร้อยละ 8.5 และสารกลุ่มอื่นๆ เช่น ไขมัน เซลลูโลส คลอโรฟิลล์ และเกลือแร่ (Nadkarni and Nadkarni, 1999) ใบฝรั่งประกอบด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ปริมาณมาก ได้แก่ myricin, quercetin, luteolin และ kaempferol และอื่นๆ อีกหลายชนิด โดยมีรายงานว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น protocatechuic acid, quercetin, guavin B (Thaipong et al., 2005), ascorbic acid, gallic acid, caffeic acid (Jimenez et al., 2001)

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดใบฝรั่งที่ได้มีลักษณะไม่ดีคือดูความชื้นเร็วทำให้เยิ้มเหลว และเหนียว ซึ่งไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ จึงได้พัฒนาสารสกัดใบฝรั่งดังกล่าวให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงสัตว์ เช่น เป็นผงแห้ง ไม่ดูความชื้นอย่างรวดเร็ว และเพื่อความสะดวกในการนำไปใช้ เป็นต้น โดยวิธีการพัฒนา จะเป็นการเติมสารดูดความชื้นสารสกัดขณะทำให้แห้ง 2 ชนิดคือ Aerosil® และ Avicel® PH101 ซึ่งจะเติมลงไปในอัตราส่วนไม่เกิน 7 และ 32% w/w ตามลำดับ แล้วสังเกตดูลักษณะของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งที่เตรียมได้ทันที และเมื่อวางทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน ติดตามการเสื่อมสลายตัวของสาร Quercetin ซึ่งเป็นสารสำคัญชนิดหนึ่งในสารสกัดใบฝรั่ง พบว่ามีปฏิกิริยาการเสื่อมสลายแบบอันดับสอง ทั้งในรูปสารสกัดและตำรับแกรนูล และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระลดลงในอุณหภูมิ และเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่จะลดลงน้อยมากในช่วงเวลา 7 วันแรกที่อุณหภูมิ 45-70 องศาเซลเซียส (จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์ และคณะ, 2548) การศึกษานี้เป็นการทดสอบความคงตัวของตำรับแกรนูลสารสกัดใบฝรั่งภายใต้การเก็บที่อุณหภูมิ 5, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ในภาชนะป้องกันความชื้นและแสง นาน 1 ปี ศึกษาความคงตัวเมื่อผสมตำรับแกรนูลกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 และ 10 นาที และศึกษาความคงตัวของตำรับเมื่อผสมกับอาหารสัตว์ในระยะยาว เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ของการผลิตจำหน่ายในรูปแบบอาหารสัตว์สำเร็จรูป โดยทำการทดสอบความคงตัวของ Quercetin ทดสอบหาปริมาณ Total phenolic compounds และทดสอบความแรงของสารต้านอนุมูลอิสระ ในตำรับแกรนูลก่อนและหลังการผสมกับอาหารสัตว์ที่สภาวะต่างๆ เพื่อให้สามารถนำไปใช้จริงได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป นอกจากนี้ยังเตรียมสารสกัดจากใบฝรั่งปริมาณ 3 กิโลกรัม เพื่อผลิตตำรับแกรนูลสำหรับใช้ในการทดลองในสัตว์ทดลองต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความคงตัวของตำรับแกรนูลในระยะยาวที่อุณหภูมิ 5, 30 และ 40 องศาเซลเซียสในภาชนะป้องกันแสงและความชื้น นาน 1 ปี
2. เพื่อศึกษาความคงตัวของตำรับแกรนูลเมื่อผสมกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 และ 10 นาที
3. เพื่อศึกษาความคงตัวของตำรับแกรนูลเมื่อผสมกับอาหารสัตว์แล้วในระยะยาวที่อุณหภูมิ 5, 30 และ 40 องศาเซลเซียสในภาชนะป้องกันแสงและความชื้น นาน 1 ปี
4. เพื่อผลิตสารสกัดจำนวน 3 กิโลกรัมแล้วนำไปผลิตแกรนูลสำหรับการทดลองในสัตว์ต่อไป

ประโยชน์ของโครงการ

ได้ผลิตภัณฑ์ผลิตตำรับสำหรับการทดลองในสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาผลในสัตว์ทดลอง

บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

Part I. การเตรียมสารสกัดจากใบฝรั่งและการเตรียมตัวรับสารสกัดจากใบฝรั่ง

1. การเตรียมสารสกัดจากใบฝรั่ง

เตรียมสารสกัดใบฝรั่งที่บริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีนจำกัด จังหวัดนนทบุรี ตามขั้นตอนที่ดัดแปลงจากวิธีการของ จินดาพร ฐริพัฒน์วณิช และคณะ (2548) โดยสารสกัดแห้งที่ได้ นั้นได้มาจากการนำใบฝรั่งมาทำการหมักโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น แล้วระเหยตัวทำละลาย จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Vacuum oven นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดใบฝรั่งจากพันธุ์ฝรั่งสองสายพันธุ์คือสายพันธุ์พื้นเมืองและสายพันธุ์เวียดนาม ได้เป็นผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งที่มีลักษณะเป็นผงแห้ง สีน้ำตาลเข้ม ซึ่งจากผลการวิจัยนี้พบว่าสารสกัดใบฝรั่งสายพันธุ์พื้นเมืองจะมีปริมาณของสารสำคัญ quercetin มากกว่าสายพันธุ์เวียดนาม และฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันก็ให้ผลการทดลองที่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นสารสกัดที่ได้จากใบฝรั่งสายพันธุ์พื้นเมืองจึงมีคุณภาพดีกว่าใบฝรั่งสายพันธุ์เวียดนาม

เนื่องจากการสกัดสารสกัดจากใบฝรั่งในรายงานข้างต้นนั้นใช้ใบฝรั่งในรูปแบบใบฝรั่งแห้งหมักด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร การศึกษาครั้งนี้ต้องการสกัดสารสกัดจากใบฝรั่งเป็นปริมาณมากทำให้ต้องเสียเวลา และงบประมาณในการทำให้แห้งก่อนนำมาสกัด ต้องการลดขั้นตอนการทำให้แห้ง และหลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิสูงในการอบใบฝรั่งซึ่งอาจทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสลายตัวไปได้ ในการศึกษาจึงดัดแปลงวิธีการสกัดจากการใช้ใบฝรั่งแห้งมาเป็นการใช้ใบฝรั่งสดและทำการหมักด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตรแทน โดยทำการศึกษหาปริมาณน้ำที่มีอยู่แล้วในใบฝรั่งแล้วเติมน้ำส่วนที่เหลือเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำใกล้เคียงกับการใช้ใบฝรั่งแห้งหมักกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร โดยมีรายละเอียดวิธีการสกัดดังต่อไปนี้

- 1.1 นำใบฝรั่งสดพันธุ์พื้นเมือง (ฝรั่งขึ้นก) น้ำหนัก 95 กิโลกรัม หมักกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาณ 160 กิโลกรัม หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรอง แล้วนำกากใบฝรั่งมาทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง โดยนำไปหมักต่อกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาณ 160 กิโลกรัม เป็นเวลานาน 3 วัน ทำเช่นนี้อีก 2 รอบ รวมเป็นการหมักทั้งหมด 3 ครั้ง

1.2 นำสารละลายที่กรองได้จากข้อ 1.1 ไประเหยด้วยวิธีการลดความดัน (rotary evaporation) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 120 มิลลิบาร์ เพื่อระเหยให้ตัวทำละลายออกไปให้มากที่สุด พบว่าได้สารสกัดใบฝรั่งลักษณะเป็นผงแห้ง สีน้ำตาลเข้ม น้ำหนัก 9.38 กิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ของใบฝรั่งสด

1.3 ทำการทดลองเปรียบเทียบการสกัดตามชั้นของ จินดาพร ภูมิพัฒนางษ์ และคณะ (2548) ซึ่งใช้ใบฝรั่งผ่านการอบแห้งน้ำหนัก 800 กรัม หมักด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร พบว่าได้เป็นสารสกัดแห้งน้ำหนัก 104.79 กรัม คิดเป็น % Yield เท่ากับร้อยละ 13.10 ในขณะที่การด้วยวิธีการดัดแปลงเป็นการใช้ใบฝรั่งสดน้ำหนัก 1,000 กรัม หมักด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ได้เป็นสารสกัดแห้งน้ำหนัก 38.87 กรัม คิดเป็น % Yield เท่ากับ 3.89 ตารางที่ 1 แสดงค่าเปรียบเทียบปริมาณ Total phenolic compounds และค่า EC_{50} พบว่าค่าที่ได้แสดงให้เห็นว่าการสกัดใบฝรั่งสดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร มีปริมาณ Total phenolic compounds สูงกว่าเล็กน้อย และมีค่าเฉลี่ยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า (แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ) เมื่อเทียบกับการสกัดใบฝรั่งแห้งด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณ Total Phenolic compounds และ EC_{50} ของสกัดใบฝรั่งที่ได้จากการสกัดใบฝรั่งสดและใบฝรั่งแห้งด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และ 50 โดยปริมาตร ตามลำดับ

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	Total phenolic (gGA/kg)	EC_{50} (μ g/ml)
ใบฝรั่งสด	95% Ethanol	286.94 $\pm$ 3.61	10.70 $\pm$ 1.73
ใบฝรั่งแห้ง	50% Ethanol	247.43 $\pm$ 4.99	15.90 $\pm$ 4.99

2. การเตรียมตำรับสารสกัดจากใบฝรั่ง

ซึ่งลักษณะของสารสกัดใบฝรั่งที่เป็นผงแห้งสีน้ำตาลเข้ม แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้จะดูความชื้นจากอากาศ ทำให้เกิดการเยิ้มเหลว ไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาเพื่อเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไปโดยการเติมสารดูดความชื้นในกระบวนการทำให้แห้ง ดังนี้

2.1 นำสารสกัดใบฝรั่งน้ำหนัก 1.0 กิโลกรัม เพียงอย่างเดียวละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร หลังจากนั้นนำไปทำให้แห้งในขั้นตอนสุดท้ายด้วยการวิธีการพ่นแห้ง (spray dry) ปรับสภาวะการพ่นแห้งจนได้ลักษณะเป็นผงแห้ง โดยใช้อุณหภูมิเข้า 210 องศาเซลเซียส และนำออกที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พบว่าได้ลักษณะสารสกัดใบฝรั่งเป็นผงแห้ง สีน้ำตาลเข้ม

ดูดความชื้นจากอากาศได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการเยิ้มเหลว มีลักษณะเหนียวติดถึงพ่นแห้ง ไม่เหมาะสมในการนำไปใช้

- 2.2 นำสารสกัดใบฝรั่งส่วนที่เหลือน้ำหนัก 8.38 กิโลกรัมผสมกับเบต้าไซโครเดกซ์ทริน (β -cyclodextrin) น้ำหนัก 3.5 กิโลกรัม เติมน้ำประมาณ 10 ลิตร เพื่อให้ได้ลักษณะสารละลาย/แขวนตะกอนที่สามารถพ่นเป็นละอองฝอยได้ หลังจากนั้นนำไปทำให้แห้งในขั้นตอนสุดท้ายด้วยการวิธีการพ่นแห้ง (spray dry) ปรับสภาวะการพ่นแห้งจนได้ลักษณะเป็นผงแห้ง โดยใช้อุณหภูมิเข้า 210 องศาเซลเซียส และนำออกที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดใบฝรั่งรูปพ่นแห้งร่วมกับสารช่วยน้ำหนัก 3.67 กิโลกรัม ได้ลักษณะสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับสารช่วยเป็นผงสีน้ำตาล ร่วน ไม่จับก้อนจากการดูดความชื้น บรรจุในภาชนะกันแสงที่ปิดสนิทแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้รักษาความชื้น เพื่อทำการทดลองต่อไป ได้สารสกัดใบฝรั่งแบบผง (powder) 3.67 กิโลกรัม เมื่อคำนวณ % Yield แล้วพบว่า

Part II. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญและการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

1.1 การหาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง

1.1.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

ชั่ง standard quercetin อย่างถูกต้องแม่นยำมาน้ำหนัก 10.0 มิลลิกรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.1.2 การเตรียม working solution

ปิเปต Reference Standard Stock Solution จากข้อ 1.1.1 มา 5.0, 3.0, 1.0, 0.5, 0.3, 0.05 และ 0.02 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย เมทานอล จะได้ความเข้มข้น 0.5, 0.3, 0.1, 0.05, 0.03, 0.005 และ 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

1.1.3 การเตรียม sample solution ของสารสกัดใบฝรั่ง

ชั่งสารสกัดใบฝรั่งอย่างถูกต้องแม่นยำ 100.0 มิลลิกรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

1.1.4 เครื่อง HPLC และสภาวะที่ใช้

HPLC system	: Shimazu –10AVP (Japan)
HPLC Column	: Phenomenex C-18 4.6mm x 150mm, 5 micron
Mobile Phase	: Acetonitril – 0.1% aq. phosphoric acid ในอัตราส่วน 35:65
Flow Rate	: 1.0 ml/min
Detection	: 255 nm
Injection Volume	: 20 µl
Temperature	: ambient

1.2 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีวิเคราะห์

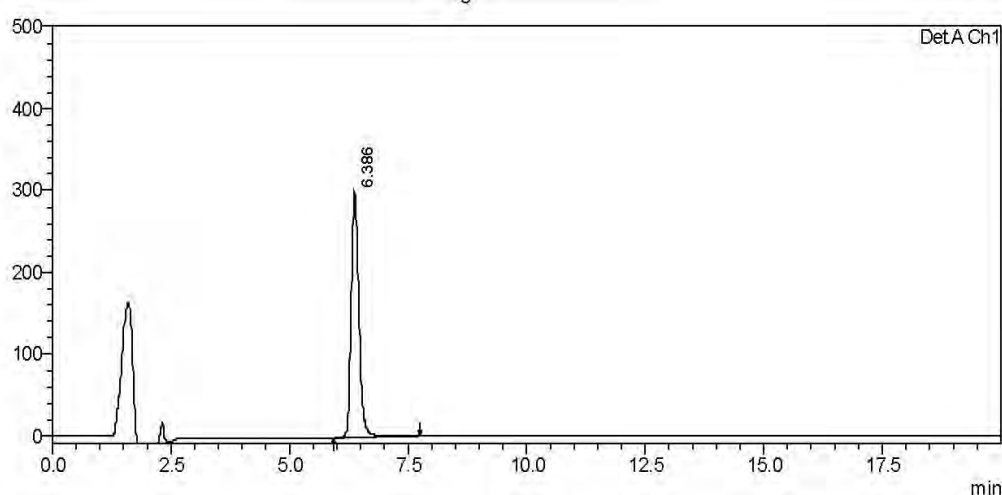
การเตรียม Sample Solution จากสารดูดความชื้นเบต้าไซโคลเด็กซ์ทริน (β -cyclodextrin)

1.2.1 ชั่งสารดูดความชื้นเบต้าไซโคลเด็กซ์ทรินอย่างถูกต้องแม่นยำมา 100 มิลลิกรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10.0 มิลลิลิตร

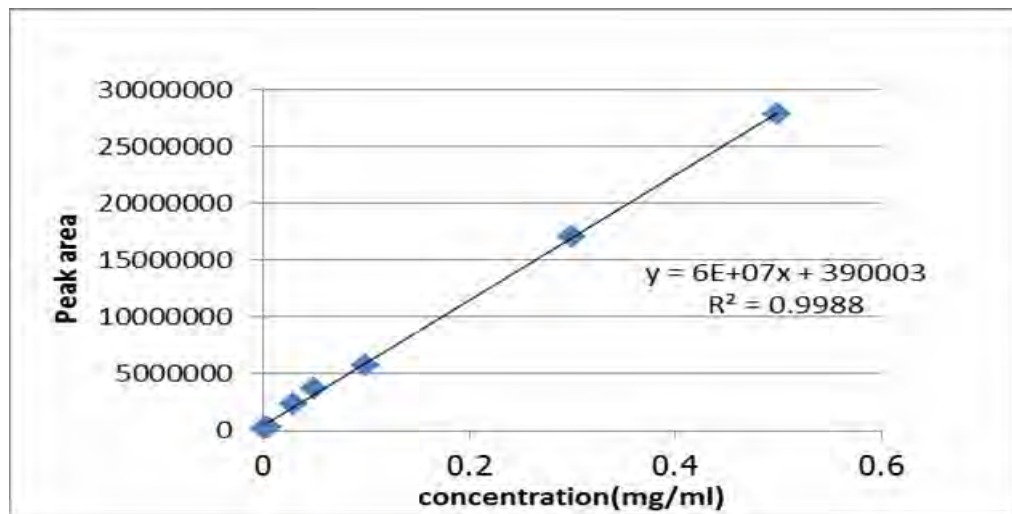
1.2.2 เติมน้ำ และปรับปริมาตรให้ครบด้วยเมทานอล

1.2.3 ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC บันทึก chromatogram นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ และสรุปความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีวิเคราะห์

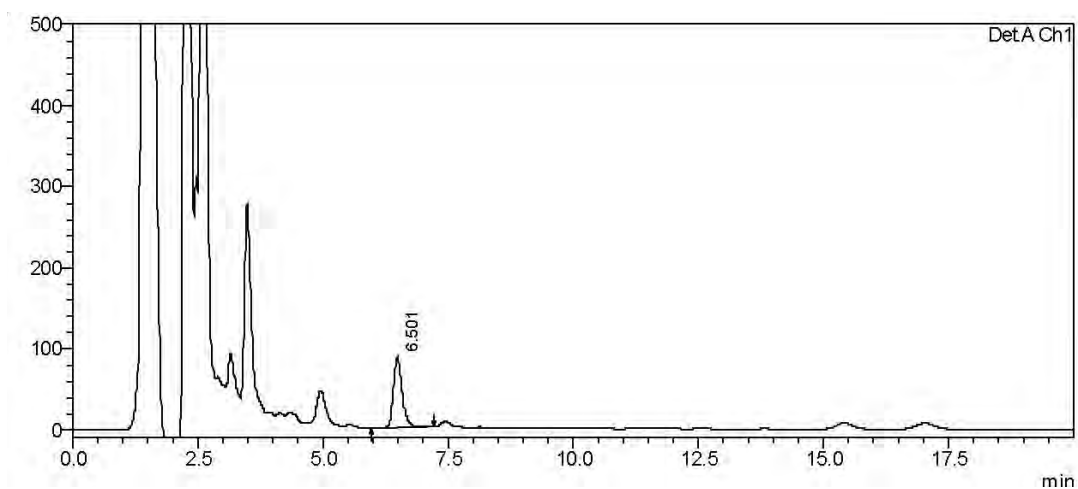
เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ซึ่งเป็นสารสำคัญในใบฝรั่งที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี HPLC พบว่าเกิด peak ที่ 6.4 นาที (รูปที่ 1) จากการทำ standard curve (รูปที่ 2) พบว่าได้ช่วงที่เป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.002–0.5 mg/ml มีค่า R^2 เท่ากับ 0.998 จากการวิเคราะห์ พบว่าตัวอย่างสารสกัดใบฝรั่งแบบผงมีปริมาณสารสำคัญ quercetin ร้อยละ 0.23 ± 0.03 โดยน้ำหนัก ($n=3$) ตัวอย่างโครมาโตแกรมดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 1 HPLC Chromatogram ของสารมาตรฐาน quercetin (ความเข้มข้น 0.05 mg/ml)

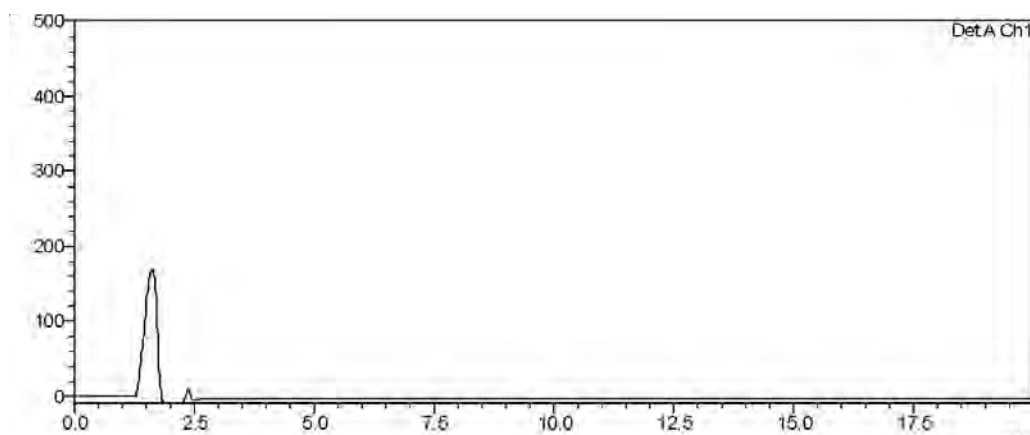


รูปที่ 2 standard curve สาร quercetin



รูปที่ 3 HPLC Chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่ง (ความเข้มข้น 10 mg/ml) peak ของ quercetin มี retention time อยู่ที่ 6.5 นาที

เนื่องจากในการเตรียมสารสกัดใบฝรั่งแบบผง มีการเติมสารเบต้าไซโครเดกซ์ทรีนลงไป เพื่อให้สารสกัดใบฝรั่งเป็นผงแห้ง นำใช้ ไม่ดูความชื้น เพื่อพิสูจน์ว่าเบต้าไซโครเดกซ์ทรีนไม่รบกวนการวิเคราะห์ด้วย HPLC ผู้วิจัยได้ทดลองใช้วิธีเดียวกันในการวิเคราะห์เบต้าไซโครเดกซ์ทรีน ซึ่งไม่ผลสมสารสกัดใบฝรั่ง จากการทดลองพบว่า peak ของเบต้าไซโครเดกซ์ทรีนไม่ซ้อนทับกับ peak ของ quercetin ดังแสดงในรูปที่ 4 ดังนั้น HPLC-condition ที่ได้กำหนดไว้ จึงมีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ที่ดีในการวิเคราะห์ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งแบบผง



รูปที่ 4 HPLC Chromatogram ของสารเบต้าไซโครเดกซ์ทรีน

2. การทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (Yamasaki, *et. al.*, 1994.)

ทำการทดสอบฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ quercetin และสารสกัดใบฝรั่งแบบผง ดังขั้นตอนต่อไปนี้

2.1 วิธีการเตรียมสาร quercetin

2.1.1 ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin 10.0 มิลลิกรัม ใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร

2.1.2 เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วย MeOH ให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.3 เตรียมสารละลาย quercetin โดยปิเปต quercetin stock solution นำมาเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย (เมื่อเติม DPPH แล้ว) ดังนี้ 0.33, 1.00, 1.67, 2.33, 3.33, 10.00, 16.67, 23.33, 33.33, 333.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.2 วิธีการเตรียมสารตัวอย่างสารสกัดใบฝรั่งแบบผง

2.2.1 ชั่งสารสกัดใบฝรั่ง 100 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร

2.2.2 เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.3 ปิเปตสารละลายข้างต้น แล้วนำมาเจือจางเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 0.0003, 0.0010, 0.0017, 0.0033, 0.0100, 0.0166, 0.0333, 0.0333, 0.1000, 0.1667, 0.3333, 1.0000, 1.6667, 2.6667, 3.3333 mg/ml ตามลำดับ

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงใน 96 well plate หลุมละ 75 ไมโครลิตร

2.3.2 ปิเปตสารละลาย 0.2 มิลลิโมล ของ DPPH ในเมทานอล 150 ไมโครลิตร

2.3.3 ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

2.3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

2.3.5 ทำการทดลองในแต่ละตัวอย่าง 3 ซ้ำ

2.3.6 คำนวณ % free radical scavenging ที่ได้ตามสมการข้างล่างนี้

$$\% \text{ free radical scavenging} = \left| 1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right| \times 100$$

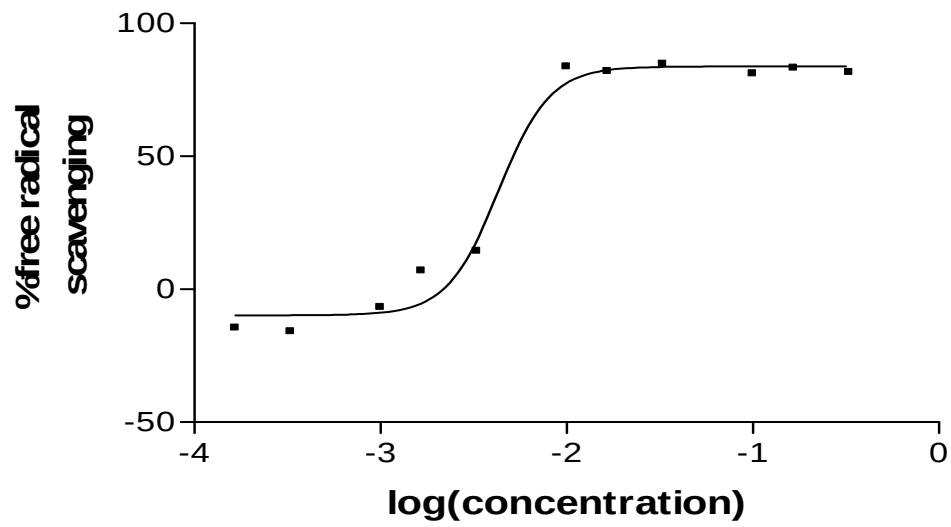
โดย A sample = ค่า absorbance ที่วัดได้ของ ตัวอย่างในเมทานอลเมื่อผสมกับ DPPH
 A control = ค่า absorbance ที่วัดได้ของเมทานอลเมื่อผสมกับ DPPH

2.3.7. นำค่าที่ได้ไปคำนวณ ความเข้มข้นที่จับอนุมูลอิสระ (EC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Prism (Graph Pad Inc, San Diego, USA)

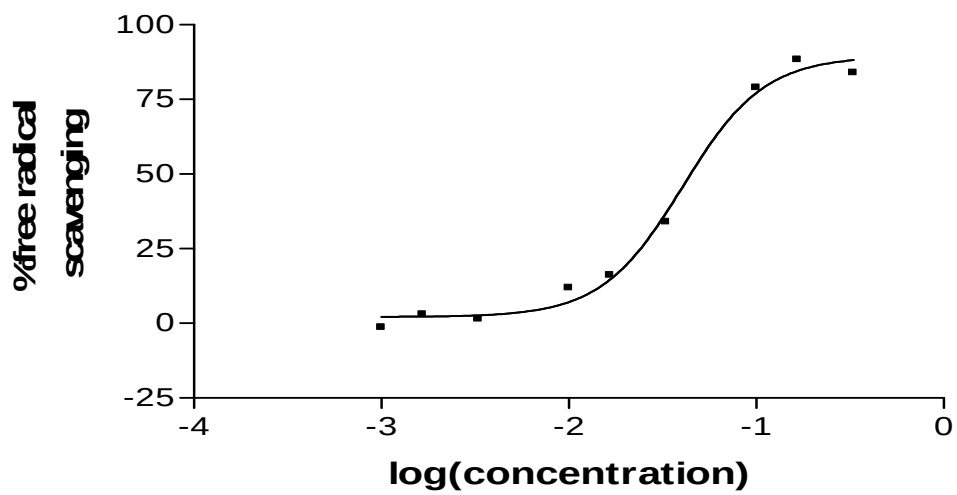
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฝรั่งและ quercetin โดยวิธี DPPH พบว่า quercetin มีค่า EC_{50} ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 4.28 ± 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดใบฝรั่งประมาณ 10 เท่า โดยในสารสกัดใบฝรั่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 40.67 ± 3.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2 และรูปที่ 5 และ 6 ตามลำดับ)

ตารางที่ 2 ค่า EC_{50} ของสารมาตรฐาน quercetin และ สารสกัดใบฝรั่ง

Sample	EC_{50} (ug/ml)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean $\pm$ SD
สารมาตรฐาน Quercetin	4.35	4.40	4.09	4.28 ± 0.17
สารสกัดใบฝรั่ง	38.61	38.64	44.76	40.67 ± 3.54



รูปที่ 5 กราฟที่คำนวณผลอิสระของ quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 6 กราฟที่คำนวณผลอิสระของสารสกัดใบฝรั่งแบบผงที่ความเข้มข้นต่างๆ

3. การวิเคราะห์ total phenolic compound

การวิเคราะห์ total phenolic compound ทำโดยใช้วิธีของ Folin–Ciocalteu ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ค่าที่ได้เป็น total polyphenol เปรียบเทียบกับ gallic acid 1 กรัมใน 1 กิโลกรัม ตัวอย่าง (gGA/kg)

3.1 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

4.1.1 ชั่งสารสกัดใบฝรั่งประมาณ 100 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร

4.1.2 เติมเมทานอล 10 มิลลิลิตร และ sonicate 20 นาที แล้วกรอง จากนั้นสกัดซ้ำอีกครั้ง ด้วยวิธีเดิม แล้วนำสารสกัดที่ได้มาปรับปริมาตร ให้ครบ 10 มิลลิลิตร เตรียมตัวอย่าง 3 ครั้ง เพื่อทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 การทำ calibration curve ของ Gallic acid

เตรียมสาร gallic acid เป็น 10 ความเข้มข้น คือ 0.200, 0.100, 0.070, 0.050, 0.030, 0.010, 0.007, 0.005, 0.003 และ 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในเมทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 70 โดยปริมาตร

3.3 วิธีการวิเคราะห์ Total polyphenol

3.3.1 นำสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.3.2 เติม 2.5 มิลลิลิตร Folin Ciocalteu Reagent

3.3.3 เติม 2.0 มิลลิลิตร Na_2CO_3 (75 g/l in water)

3.3.4 นำไป vortex ให้เข้ากัน

3.3.5 นำหลอดทดลองอุ่นใน water bath 50 °C เป็นเวลา 5 นาที

3.3.6 นำตัวอย่างไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

คำนวณค่า total polyphenol โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ค่าที่ได้เป็น total polyphenol เปรียบเทียบกับ gallic acid 1 กรัมใน 1 กิโลกรัมตัวอย่าง (gGA/kg) โดยคำนวณจาก calibration curve ดังสมการ

$$\text{total polyphenol eq. gallic acid (gGA/kg)} = \left[\frac{y + \text{int}}{\text{slope} \times a} \right] \times 1000$$

เมื่อ $y = A - B$

โดยที่ $A =$ ค่า absorbance ที่วัดได้

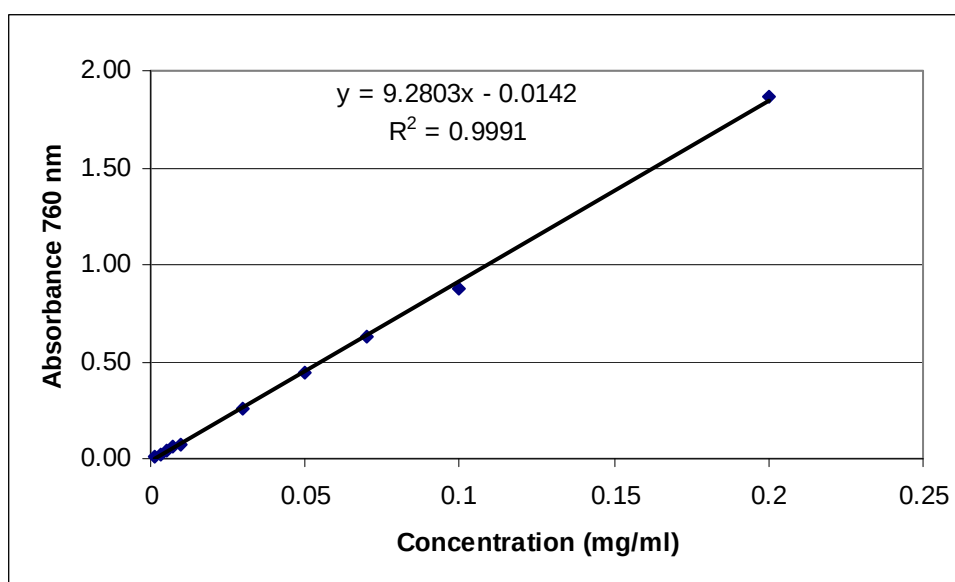
$B =$ ค่า absorbance ของ control

$a =$ ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)

int = intercept

*** control = 0.5 ml 70% MeOH + 2.5 Folin reagent + 2.0 ml Na_2CO_3

จากการวิเคราะห์ total polyphenol ทำโดยใช้วิธีของ Folin–Ciocalteu ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ได้ calibration curve ดังรูปที่ 7 จากการทดลองหาปริมาณ total polyphenol ในสารสกัดใบฝรั่งแบบผง พบว่า สารสกัดใบฝรั่งมีปริมาณ total polyphenol เทียบเท่ากับ gallic acid 84.28 ± 3.05 กรัมในตัวอย่าง 1 กิโลกรัม



รูปที่ 7 standard curve ของสารมาตรฐาน gallic acid

ตาราง 3 ปริมาณ quercetin, EC50 และ total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งที่นำไปวางที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน

เดือนที่ 1			
อุณหภูมิ	quercetin (mg/ml)	EC 50 (μ g/ml)	Total polyphenol(gGA/kg)
4	0.12 $\pm$ 0.005	24.71 $\pm$ 0.43	114.05 $\pm$ 2.79
25	0.12 $\pm$ 0.002	18.48 $\pm$ 0.14	114.36 $\pm$ 3.17
45	0.13 $\pm$ 0.003	29.25 $\pm$ 0.18	111.8 $\pm$ 4.14

ตาราง 4 ปริมาณ quercetin, EC50 และ total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งที่นำไปวางที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน

เดือนที่ 2			
อุณหภูมิ	quercetin (mg/ml)	EC 50 (μ g/ml)	Total polyphenol(gGA/kg)
4	0.13 $\pm$ 0.003	39.63 $\pm$ 0.92	111.00 $\pm$ 0.17
25	0.13 $\pm$ 0.005	36.37 $\pm$ 1.69	112.09 $\pm$ 0.29
45	0.13 $\pm$ 0.002	47.17 $\pm$ 1.14	111.22 $\pm$ 3.54

ตาราง 5 ปริมาณ quercetin, EC50 และ total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งที่นำไปวางที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน

เดือนที่ 3			
อุณหภูมิ	quercetin (mg/ml)	EC 50 (μ g/ml)	Total polyphenol(gGA/kg)
4	0.12 $\pm$ 0.001	68.60 $\pm$ 0.36	85.41 $\pm$ 0.70
25	0.13 $\pm$ 0.002	59.60 $\pm$ 1.72	90.21 $\pm$ 0.75
45	0.13 $\pm$ 0.002	87.10 $\pm$ 2.57	84.76 $\pm$ 1.14

3. การตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Method Validation) ของสาร quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง

3.1 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ ผลเป็นไปตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ความเข้มข้นจริง (mg/ml)	area undercurve at λ 255 nm	ความเข้มข้นที่วัดได้ (mg/ml)	% quercetin (%RSD)
0.007 (1)	343355	0.0070	99.60
0.007 (2)	343553	0.0070	99.63
0.007 (3)	341979	0.0070	99.35
Average 0.007	342962	0.0070	99.53(0.15)
0.05 (1)	3897985	0.0514	102.81
0.05 (2)	3914778	0.0516	103.23
0.05 (3)	3869447	0.0510	102.10
Average 0.05	3894070	0.0513	102.71(0.56)
0.1 (1)	7763218	0.0997	99.72
0.1 (2)	7818181	0.1004	100.41
0.1 (3)	7703980	0.0990	98.98
Average 0.1	7761793	0.0997	99.70(0.72)

จากตารางที่ 6 จะได้ว่าเมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ด้วยการ spike สารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 0.007, 0.05, 0.1 mg/ml ลงในตัวอย่างและวิเคราะห์ % recovery ที่แต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 99.53%, 102.71% และ 99.70% ตามลำดับ มีค่า %Relative Standard Deviation (%RSD) ที่แต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 0.15%, 0.56% และ 0.72% ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าที่ทุกช่วงความเข้มข้น มีค่า % recovery ของสารสำคัญ quercetin อยู่ระหว่าง 90-109 % และมีค่า % RSD น้อยกว่า 2% ซึ่งแสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องแม่นยำตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้

3.2 การตรวจสอบความเที่ยงตรง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

3.2.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

1. ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin 10 มิลลิกรัม อย่างถูกต้องแม่นยำใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

3.2.2 การเตรียม Reference Standard Solution

1. ปิเปิด Reference Standard Stock Solution จากข้อ 3.2.1 มา 0.5, 0.1, และ 0.05 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (จะได้ความเข้มข้น 0.05, 0.01, และ 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

3.2.4 เครื่อง HPLC และสภาวะที่ใช้

HPLC system	: Shimazu –10AVP (Japan)
HPLC Column	: Phenomenex C-18 4.6mm x 150mm, 5 micron
Mobile Phase	: Acetonitril – 0.1% aq. phosphoric acid ในอัตราส่วน 35:65
Flow Rate	: 1.0 ml/min
Detection	: 255 nm
Injection Volume	: 20 µl
Temperature	: ambient

บันทึก chromatogram นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาพื้นที่ของสารสำคัญ quercetin ของการฉีด HPLC ทั้งสองวัน แล้วนำค่าที่ได้ (Observed Conc. ของ Quercetin) มาหาค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ และหาค่า % Relative Standard Deviation (%RSD) ผลการทดลองในการตรวจสอบความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision) เป็นไปตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟ (standard curve) ของสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Concentration of quercetin (mg/ml)	area undercurve at 255 nm (%RSD)	
	Intra-day	Inter-day
0.03	2433766 (0.33)	2351306 (1.25)
0.01	882131 (0.09)	869839 (0.08)
0.005	460434 (0.63)	439581 (1.67)

จากการวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณ ของสารสำคัญ quercetin ซึ่งเป็นสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในใบฝรั่งที่ออกฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชัน ได้ทำการ validate วิธีการวิเคราะห์ โดยทำการทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) ซึ่งค่าที่บ่งบอกว่าในการทำซ้ำที่เที่ยงตรง (repeatability test for precision) จะต้องมามีค่า relative standard deviations (%RSD) ต้องไม่มากกว่า 2 ที่เป็น inter-day และไม่มากกว่า 3 สำหรับการทดลองที่เป็น intra-day ซึ่งในการทดลองได้ค่า relative standard deviations (%RSD) ไม่เกินจากค่าที่กำหนดไว้ จึงสรุปได้ว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นมานี้มีความเที่ยงตรง

3.3 การวิเคราะห์หาค่า LOD และ LOQ

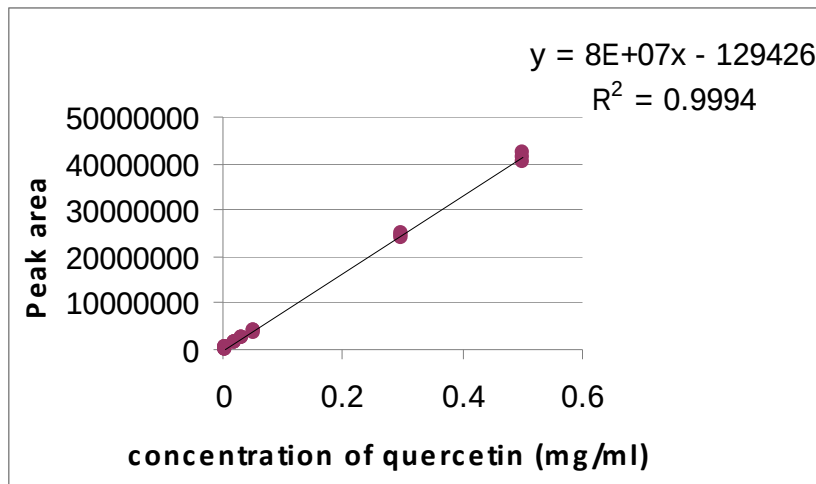
ทำการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) โดยวิเคราะห์สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้ คำนวณค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ของสารแต่ละชนิดจาก $LOD=3 S/N$ และ $LOQ=10S/N$ พบว่าได้ค่า LOD และค่า LOQ ที่ความเข้มข้น 0.0011 mg/ml และ 0.0016 mg/ml ตามลำดับ

3.4 ทดสอบ Linearity Range

ทำการทดสอบ Linearity Range ของสารละลายมาตรฐาน โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน quercetin ระดับความเข้มข้น คือ 0.002, 0.003, 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.2, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่าพื้นที่พีค และค่าความเข้มข้นไปสร้างกราฟ

มาตรฐาน หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์(correlation coefficient) เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง (Linearity)

จากการทดลองพบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2) ที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสาร quercetin มีค่าเท่ากับ 0.9994 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($r^2 = 0.995$) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 0.002–0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของสาร quercetin

Part III. การศึกษาความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งและตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมกับอาหารสัตว์

1. การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษาตำรับสารสกัดใบฝรั่ง

ซึ่งแบ่งตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่ผ่านกระบวนการพ่นแห้งปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงในขวดปิดสนิทจำนวน 120 ขวดตัวอย่าง แล้วนำไปแบ่งเก็บในความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 โดยใช้ภาชนะปิดสนิทบรรจุสารละลายย้อมตัวของเกลือโซเดียมคลอไรด์แบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง โดยนำแต่ละชุดไปเก็บที่อุณหภูมิ 5, 25 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่เวลา 0, 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 เดือน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำการทดลองหาปริมาณความชื้นที่มีอยู่ในตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ ด้วยวิธีการ Loss on drying (LOD) เพื่อเป็นข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติการดูดความชื้นของตำรับสารสกัดใบฝรั่ง การหาความชื้นทำโดยนำผงตำรับสารสกัดใบฝรั่งมาวัดหาปริมาณความชื้นของผงยาด้วยเครื่อง Sartorius moisture analyzers (Sartorius MA 30, New York, USA) โดยใช้ตำรับสารสกัดใบฝรั่งใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียม แล้ววางลงในเครื่อง ตั้งอุณหภูมิที่ 140 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนกระทั่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก คำนวณหาปริมาณความชื้นด้วยวิธี Loss on drying (LOD)

$$\% \text{ Loss on drying (LOD)} = [(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักสุดท้าย}) / \text{น้ำหนักเริ่มต้น}] \times 100$$

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ quercetin ของตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่เวลา 0, 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 เดือนที่อุณหภูมิ 5, 25 และ 45 องศาเซลเซียส แสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 9 พบว่าในช่วง 3 เดือนแรกปริมาณ quercetin ที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณใกล้เคียงกันทั้ง 3 อุณหภูมิที่ทำการศึกษา และจะเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่เดือนที่ 6, 9 และ 12 โดยพบว่าปริมาณ quercetin เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณต่ำกว่าเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองนี้ขัดแย้งกับข้อเท็จจริงที่ว่าสารทั่วไปจะมีการเสื่อมสลายตัวมากขึ้นเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงขึ้น และเมื่อเก็บนานขึ้นจาก 6 เดือนเป็น 9 และ 12 เดือน พบว่าปริมาณ quercetin มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเกิดจากการเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิสูงทำให้ตัวอย่างสูญเสียน้ำหนักจากความชื้นที่ลดลง ส่งผลให้การคำนวณปริมาณร้อยละของ quercetin โดยน้ำหนักมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds ของตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่เวลา 0, 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 เดือนที่อุณหภูมิ 5, 25 และ 45 องศาเซลเซียส แสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 10 พบว่าในช่วง 2 เดือนแรกปริมาณ total phenolic compounds ที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณใกล้เคียง

กัน และจะเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่เดือนที่ 3 และเริ่มมีค่าคงที่ในเดือนที่ 6, 9 และ 12 ตามลำดับ โดยพบว่าปริมาณ total phenolic compounds เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส มีปริมาณไม่ต่างกันมากนักที่เวลา 6, 9 และ 12 เดือน

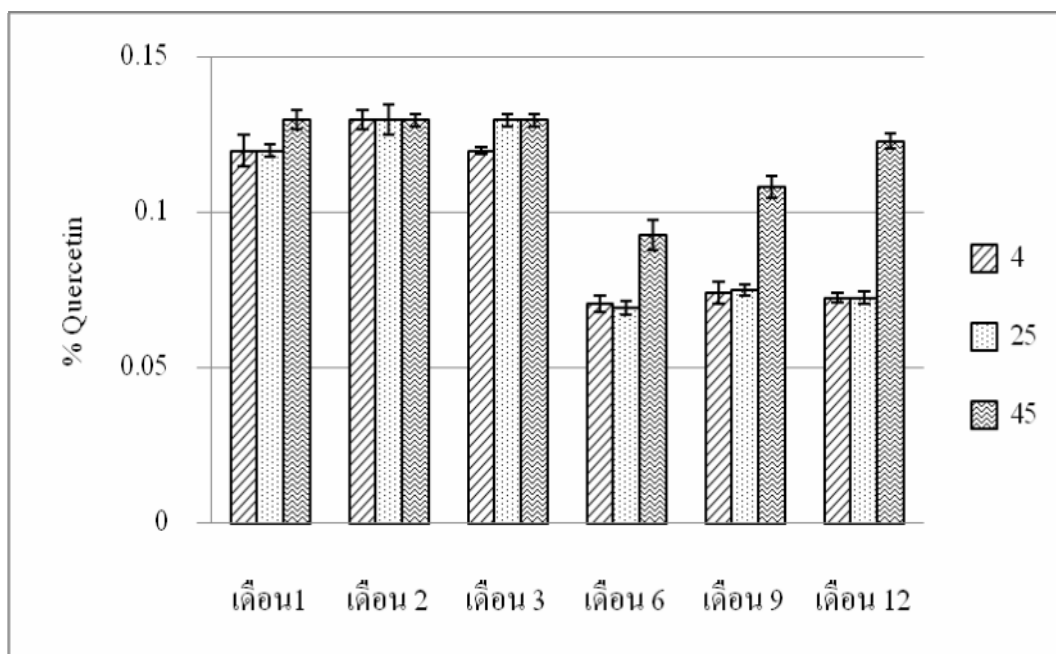
ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่เวลา 0, 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 เดือนที่อุณหภูมิ 5, 25 และ 45 องศาเซลเซียส แสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 11 พบว่าค่า EC_{50} ภายหลัง 1 เดือนแรกจะมีค่าสูงขึ้นในเดือนที่ 2 ถึงเดือนที่ 9 แสดงถึงคุณสมบัติความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ลดลงเมื่อเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยค่าที่ได้จากเดือนที่ 3 นั้นมีค่าสูงกว่าเดือนที่ 6 และเดือนที่ 9 ซึ่งกรณีนี้ไม่สามารถอธิบายผลของเดือนที่ 3 ที่สูงกว่าได้ แต่ภาพรวมสามารถสรุปได้ว่าเดือนที่ 2, 6, 9 และ 12 มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 39.69 (SD 0.92) ถึง 53.14 (SD 2.39) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่อุณหภูมิการเก็บไม่ได้ส่งผลต่อค่า EC_{50} ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

ผลการศึกษาปริมาณความชื้นด้วยวิธี LOD ของตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 12 พบว่าปริมาณความชื้นเริ่มต้นของตำรับสารสกัดใบฝรั่งเท่ากับร้อยละ 3.95 (SD 0.35) โดยน้ำหนัก และจะมีปริมาณมากขึ้นทุกอุณหภูมิ โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะมีผลต่อการเพิ่มความชื้นน้อยที่สุด การเก็บตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มส่งผลให้ความชื้นของตำรับเพิ่มขึ้นมากที่สุดที่เวลา 6 เดือน มีค่าร้อยละ 13.21 (SD 0.12) โดยน้ำหนัก อย่างไรก็ตาม เนื่องจากข้อจำกัดของตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ในเขตที่พงตำรับมีลักษณะซ้อนกันเป็นชั้น ไม่ได้เป็นการแผ่กระจายเป็นแผ่นบาง จึงทำให้การกระจายของความชื้นในแต่ละส่วนเป็นไปได้ไม่สม่ำเสมอ ในการทดลองนี้จึงที่ผลบางส่วนที่มีค่าเบี่ยงเบนค่อนข้างสูง และเนื่องจากปริมาณของสารตัวอย่างที่เก็บมีปริมาณจำกัด จึงไม่สามารถทำการทดลองซ้ำได้ ภาพรวมคำแนะนำทั่วไปสำหรับการเก็บรักษาตำรับสารสกัดใบฝรั่งจึงแนะนำให้เก็บรักษาตำรับสารสกัดใบฝรั่งในภาชนะปิดสนิทป้องกันความชื้น หรือที่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม ปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นนี้ ก็ได้สูงขึ้นจนทำให้ลักษณะทางกายภาพของตำรับสารสกัดใบฝรั่งเปลี่ยนไป กล่าวคือไม่เกิดเป็นสารลักษณะเหนียวขึ้นอย่างที่เกิดขึ้นกับสารสกัดใบฝรั่งที่ไม่ได้ผ่านการพ่นแห้งร่วมกับสารเบต้าไซโครเดกซ์ตริน

สรุปภาพรวมผลการศึกษาความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งโดยศึกษาปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ที่อุณหภูมิ 5, 25 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่ามีแนวโน้มที่ปริมาณสารสำคัญ quercetin, total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เริ่มลดลงในเดือนที่ 6, 9 และ 12 ในขณะที่เดียวกันปริมาณความชื้นก็เพิ่มมากขึ้นในเดือนที่ 6, 9 และ 12 การเก็บในภาชนะปิดสนิทจึงเป็นข้อแนะนำสำคัญสำหรับตำรับสารสกัดใบฝรั่งนี้

ตารางที่ 8 ปริมาณ quercetin ของสารสกัดใบฝรั่งเดือนที่ 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 เก็บที่อุณหภูมิ 4, 25, และ 45 องศาเซลเซียส

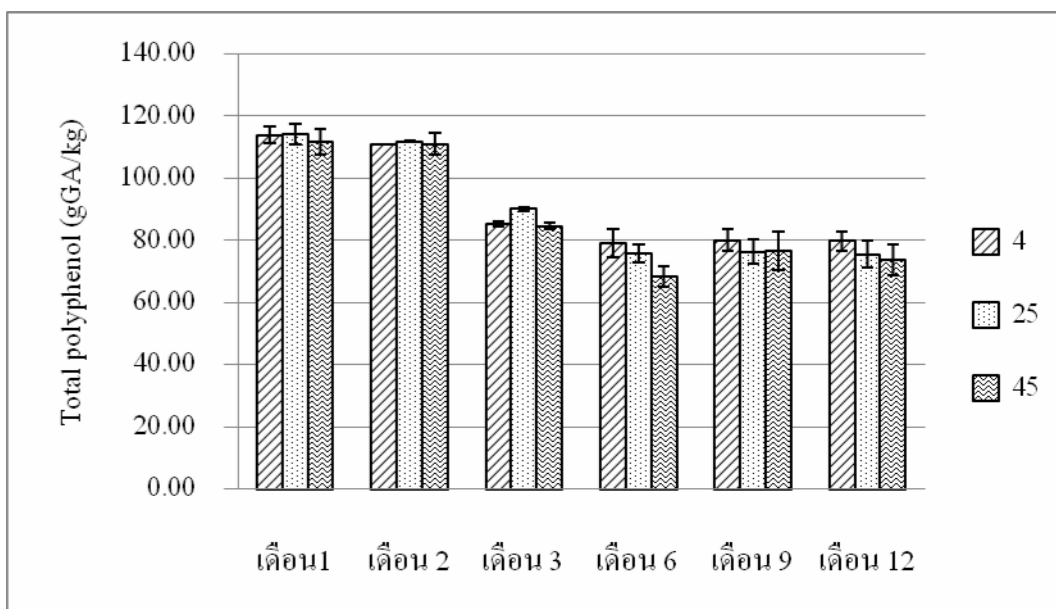
เดือนที่เก็บ ตัวอย่าง	อุณหภูมิที่เก็บ ตัวอย่าง (°C)	% quercetin (SD) (mg/100mg)
1	4	0.12 (0.005)
	25	0.12 (0.002)
	45	0.13 (0.003)
2	4	0.13 (0.003)
	25	0.13 (0.005)
	45	0.13 (0.002)
3	4	0.12 (0.001)
	25	0.13 (0.002)
	45	0.13 (0.002)
6	4	0.07 (0.003)
	25	0.07 (0.002)
	45	0.09 (0.005)
9	4	0.07 (0.004)
	25	0.08 (0.002)
	45	0.11 (0.004)
12	4	0.07 (0.002)
	25	0.02 (0.002)
	45	0.12 (0.002)



รูปที่ 9 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง

ตารางที่ 9 ปริมาณ Total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งเดือนที่ 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 เก็บที่อุณหภูมิ 4, 25, และ 45 องศาเซลเซียส

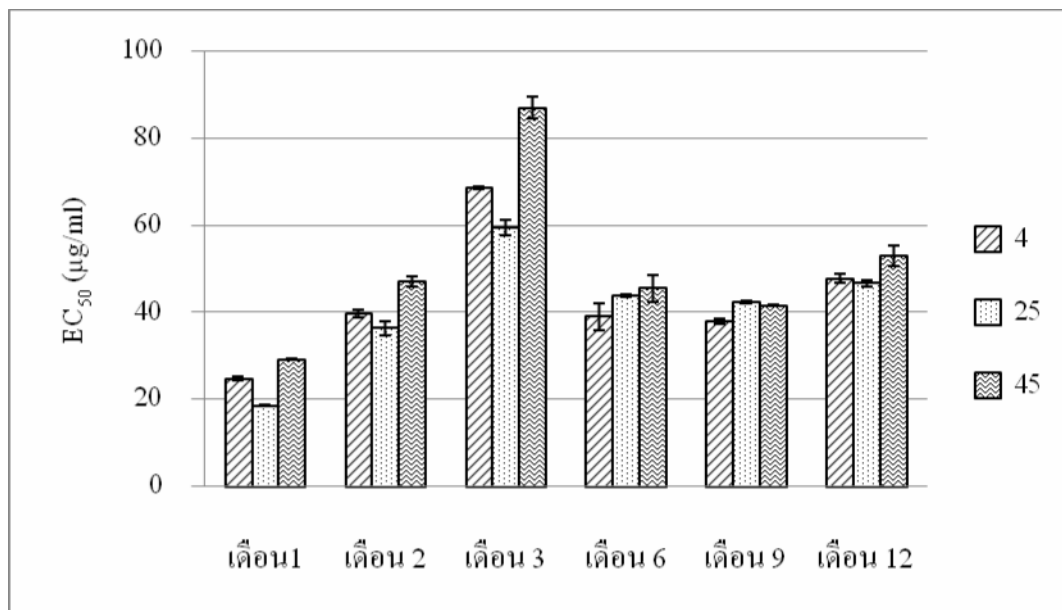
เดือนที่เก็บ ตัวอย่าง	อุณหภูมิที่เก็บ ตัวอย่าง (°C)	Total polyphenol (SD) (gGA/kg)
1	4	114.05 (2.79)
	25	114.36 (3.17)
	45	111.8 (4.14)
2	4	111.00 (0.17)
	25	112.09 (0.29)
	45	111.22 (3.54)
3	4	85.41 (0.70)
	25	90.21 (0.75)
	45	84.76 (1.14)
6	4	79.20 (4.39)
	25	76.01 (2.95)
	45	68.44 (3.13)
9	4	80.25 (3.39)
	25	76.52 (4.04)
	45	76.72 (6.22)
12	4	79.92 (3.03)
	25	75.63 (4.37)
	45	73.73 (5.06)



รูปที่ 10 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ Total polyphenol ในสารสกัดใบฝรั่ง

ตารางที่ 10ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฝรั่งเดือนที่ 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 เก็บที่อุณหภูมิ 4, 25, และ 45 องศาเซลเซียส

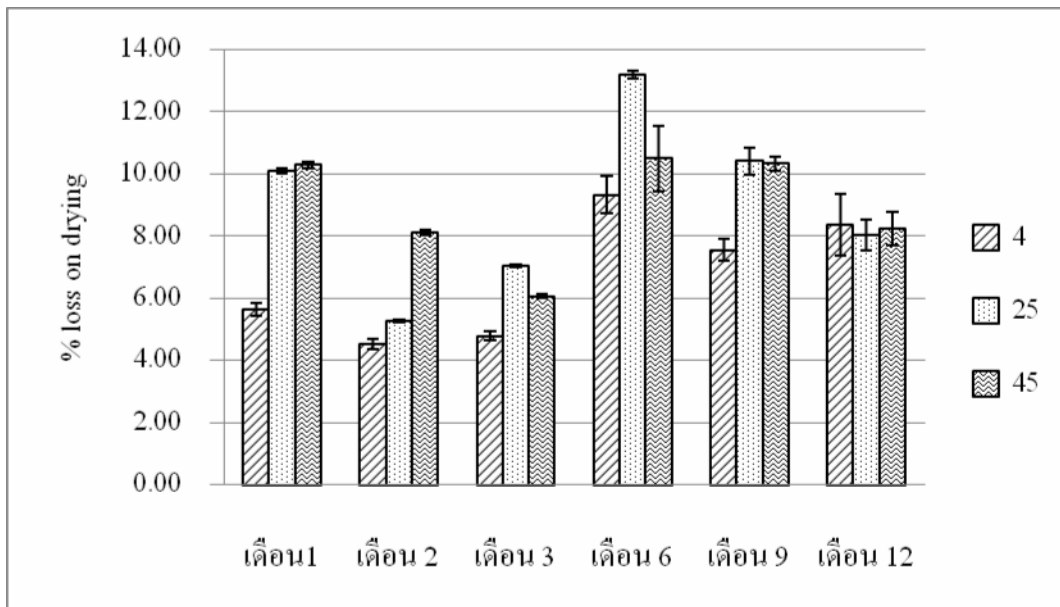
เดือนที่เก็บ ตัวอย่าง	อุณหภูมิที่เก็บ ตัวอย่าง (°C)	EC ₅₀ (SD) (µg/ml)
1	4	24.71 (0.43)
	25	18.48 (0.14)
	45	29.25 (0.18)
2	4	39.63 (0.92)
	25	36.37 (1.69)
	45	47.17 (1.14)
3	4	68.60 (0.36)
	25	59.60 (1.72)
	45	87.10 (2.57)
6	4	39.04 (3.03)
	25	43.79 (0.28)
	45	45.51 (3.17)
9	4	38.03 (0.53)
	25	42.31 (0.33)
	45	41.64 (0.71)
12	4	47.8 (0.94)
	25	46.79 (0.76)
	45	53.14 (2.39)



รูปที่ 11 แผนภูมิแท่งแสดงฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฝรั่ง

ตารางที่ 11 % loss on drying ของสารสกัดใบฝรั่ง day 0 เดือน 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 เก็บที่ อุณหภูมิ 4, 25, และ 45 องศาเซลเซียส

เดือนที่เก็บ ตัวอย่าง	อุณหภูมิที่เก็บ ตัวอย่าง (°C)	% loss on drying (SD)
1	4	5.65 (0.20)
	25	10.12 (0.09)
	45	10.30 (0.10)
2	4	4.52 (0.16)
	25	5.27 (0.06)
	45	8.12 (0.09)
3	4	4.80 (0.13)
	25	7.05 (0.05)
	45	6.07 (0.06)
6	4	9.35 (0.59)
	25	13.21 (0.12)
	45	10.51 (1.07)
9	4	7.55 (0.35)
	25	10.43 (0.43)
	45	10.35 (0.24)
12	4	8.37 (0.97)
	25	8.03 (0.50)
	45	8.24 (0.53)



รูปที่ 12 % loss on drying ของสารสกัดใบฝรั่ง day 0 เดือน 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 เก็บที่อุณหภูมิ 4, 25, และ 45 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมกับอาหารสัตว์

การศึกษาความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งเมื่อผสมกับอาหารสัตว์นี้ทำขึ้นเนื่องจากการนำตำรับสารสกัดใบฝรั่งไปใช้ประโยชน์จำเป็นต้องมีการนำไปผสมกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิสูงในช่วง 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาสั้นๆ ประมาณ 10 นาที โดยอาหารสัตว์ที่ใช้นี้ได้รับความอนุเคราะห์สารตัวอย่างจาก รศ.ดร.นวลจันทร์ พารักษา ภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน การศึกษานี้ศึกษาถึงปัจจัยด้านอุณหภูมิที่ใช้ในการผสม และระยะเวลาที่ใช้ในการผสมจึงเป็นสิ่งสำคัญ นอกจากนี้ยังศึกษาถึงปัจจัยเรื่องความเข้มข้นที่ใช้ในการผสม ในการศึกษาที่ใช้อุณหภูมิในการผสมที่ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการผสมนาน 0, 5, 10 และ 30 นาที และผสมที่ความเข้มข้นของตำรับสารสกัดใบฝรั่งร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก

เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ที่เวลาเริ่มต้นทันทีภายหลังการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจึงแบ่งตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่ผ่านกระบวนการผสมที่ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา และความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงในขวดปิดสนิท จำนวน 120 ขวดตัวอย่าง แล้วนำไปแบ่งเก็บในความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 โดยใช้ภาชนะปิดสนิทบรรจุสารละลายอิมัลชันของเกลียวโซเดียมคลอไรด์แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง โดยนำแต่ละชุดไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่เวลา 0, 3, 6, 9 และ 12 เดือน ตามลำดับ (เก็บตัวอย่างชุดละ 3 ตัวอย่าง) นอกจากนี้ยังทำการทดลองหาปริมาณความชื้นที่มีอยู่ในตำรับสารสกัดใบฝรั่งที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ ด้วยวิธีการ Loss on drying (LOD)

2.1 ความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมกับอาหารสัตว์ที่เวลาเริ่มต้น (ทันทีหลังจากการผสม)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ quercetin ของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 0, 5, 10 และ 30 นาที ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก แสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 13, 14 และ 15 ตามลำดับ และสรุปเปรียบเทียบลงในกราฟเดียวกันในรูปที่ 16 พบว่าการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งและอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ปริมาณ quercetin ที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน และเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณที่ใส่ลง และระยะเวลาที่ใช้ในการผสมจนถึง 30 นาที ไม่มีผลต่อปริมาณ quercetin อย่างมีนัยสำคัญ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds ของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 0, 5, 10 และ 30 นาที ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก แสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 17, 18 และ 19 ตามลำดับ และสรุปเปรียบเทียบลงในกราฟเดียวกันในรูปที่ 20 พบว่าปริมาณ total phenolic compounds ที่วิเคราะห์ได้เมื่อผสมอาหารสัตว์ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก จะมีปริมาณต่ำกว่าเมื่อผสมที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เมื่อผสมอาหารสัตว์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ค่าที่ได้เมื่อผสมใน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกัน ส่วนเมื่อผสมที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก จะมีปริมาณต่ำกว่าในตัวอย่างที่ผสมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

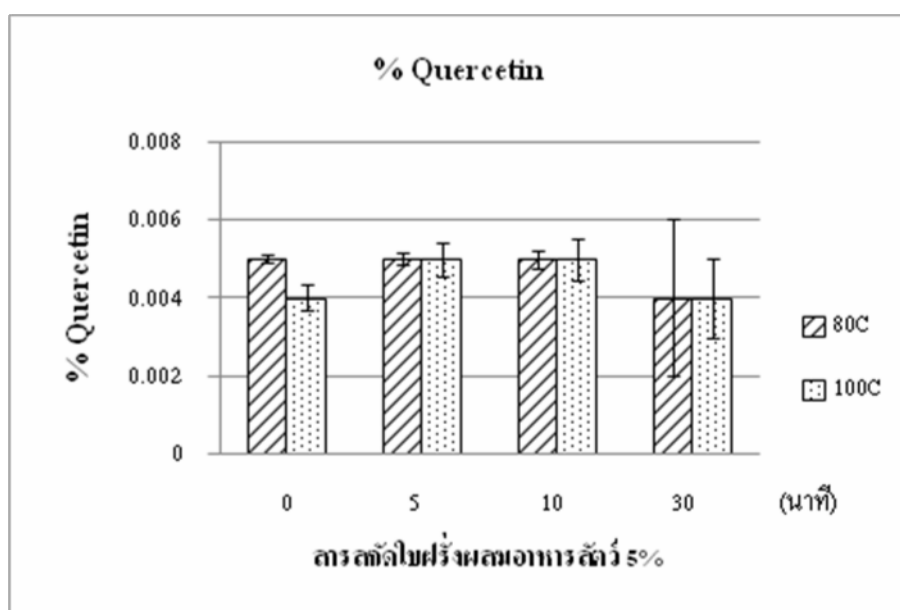
ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 0, 5, 10 และ 30 นาที ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก แสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 21, 22 และ 23 ตามลำดับ และสรุปเปรียบเทียบลงในกราฟเดียวกันในรูปที่ 24 พบว่าค่า EC_{50} มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลาในการผสมนานขึ้นตั้งแต่ 0, 5, 10 และ 30 นาที ตามลำดับ และการใช้อุณหภูมิในการผสมสูงขึ้นที่ 100 องศาเซลเซียส กับความเข้มข้นสูงร้อยละ 10 และ 20 โดยน้ำหนัก จะทำให้ได้ค่า EC_{50} ที่สูงขึ้น แสดงถึงคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ลดลง ดังนั้นการผสมจึงควรใช้ระยะเวลาในการผสมให้น้อยที่สุดเท่าที่เป็นได้ (10 นาที)

ผลการศึกษาปริมาณความชื้นด้วยวิธี LOD ของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 0, 5, 10 และ 30 นาที ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก แสดงในตารางที่ 15 พบว่าปริมาณความชื้นอยู่ในช่วง 3.50 (SD 0.01) ถึง 4.76 (SD 0.27) โดยที่การผสมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นต่ำกว่าการผสมที่ 80 องศาเซลเซียส

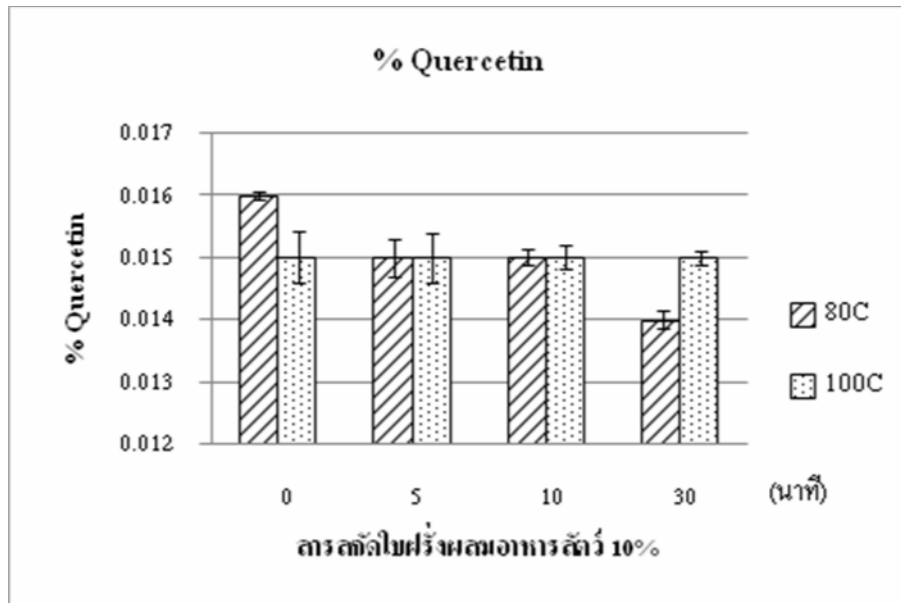
สรุปภาพรวมของการผสมอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลานาน 30 นาที ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่ทำให้ปริมาณ quercetin ต่างกัน ส่วน total phenolic compounds ไม่แตกต่างกันเมื่อผสมในความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 โดยน้ำหนัก แต่จะลดลงเมื่อผสมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่อผสมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (ค่า EC_{50} เพิ่มขึ้น)

ตารางที่ 12 ปริมาณ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งและผลิตภัณฑ์จากใบฝรั่งที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลาต่างๆ

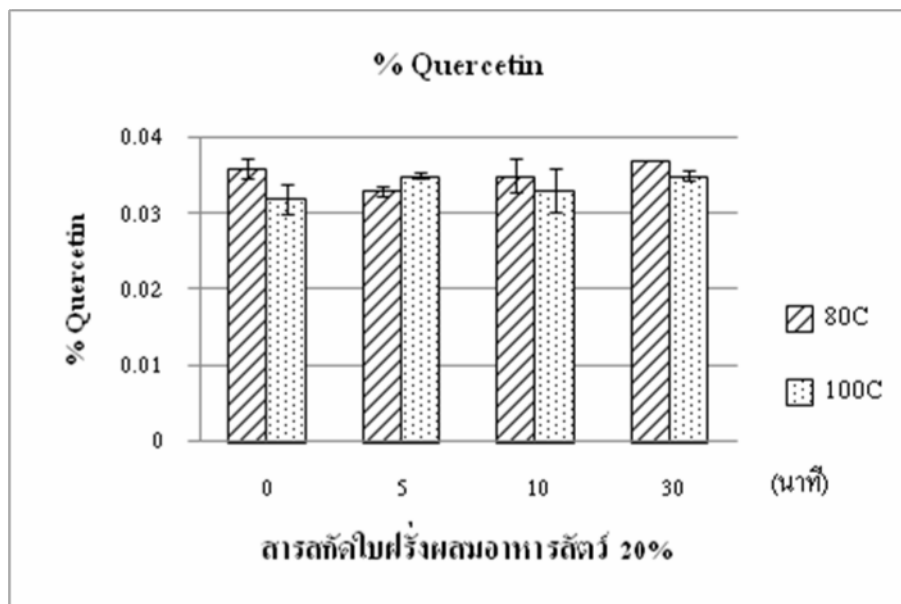
ตัวอย่าง	เวลาที่ให้ความร้อน (นาที)	%quercetin (SD) 80 °C	% quercetin (SD) 100 °C
สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	0	0.005 (0.0001)	0.004 (0.0003)
	5	0.005 (0.0002)	0.005 (0.0004)
	10	0.005 (0.0002)	0.005 (0.0005)
	30	0.004 (0.0020)	0.004 (0.0010)
สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10 %	0	0.016 (0.0001)	0.015 (0.0004)
	5	0.015 (0.0003)	0.015 (0.0004)
	10	0.015 (0.0001)	0.015 (0.0002)
	30	0.014 (0.0002)	0.015 (0.0001)
สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20 %	0	0.036 (0.001)	0.032 (0.002)
	5	0.033 (0.001)	0.035 (0.0005)
	10	0.035 (0.002)	0.033 (0.003)
	30	0.037 (0.0001)	0.035 (0.0007)



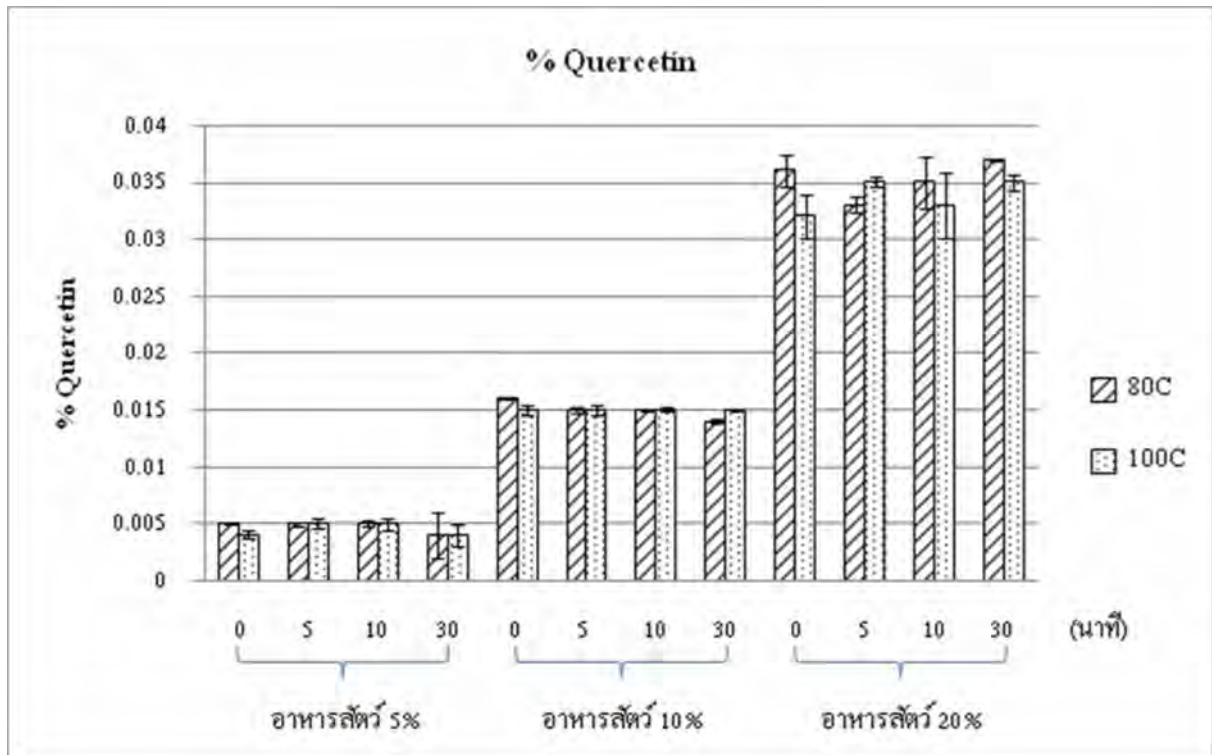
รูปที่ 13 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ % quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5%



รูปที่ 14 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ % quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10%



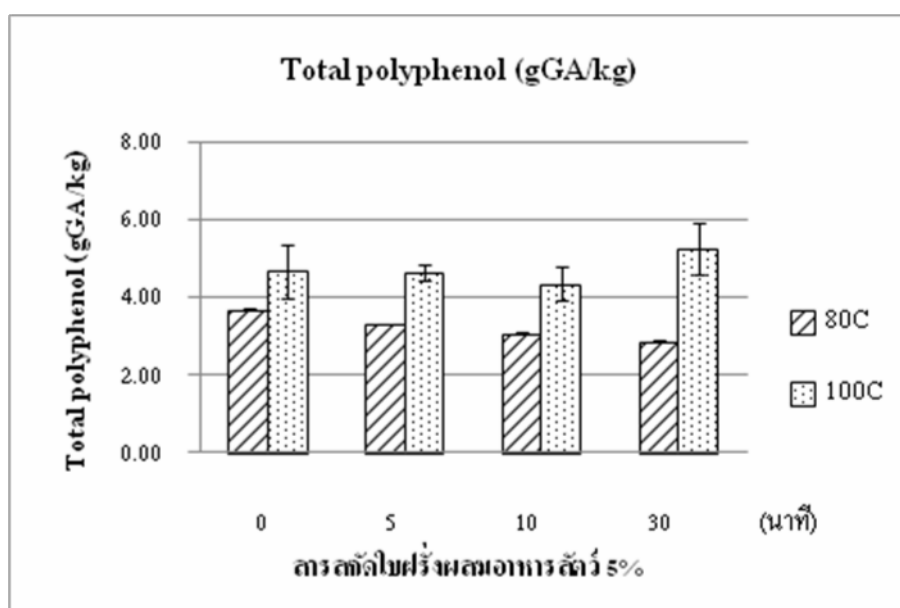
รูปที่ 15 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ % quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20%



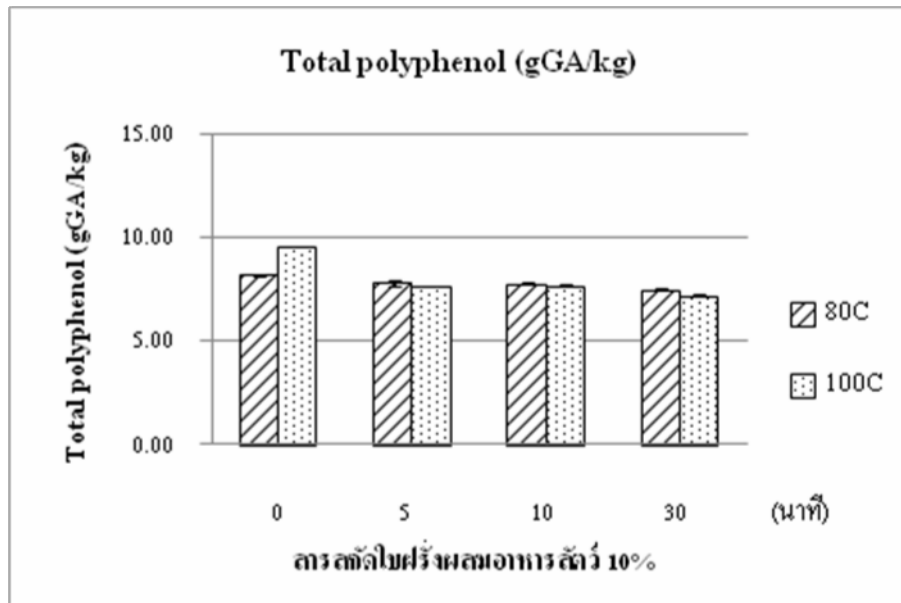
รูปที่ 16 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ % quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20%

ตารางที่ 13 ปริมาณ Total polyphenol ในสารสกัดใบฝรั่งและผลิตภัณฑ์จากใบฝรั่งที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลาต่างๆ

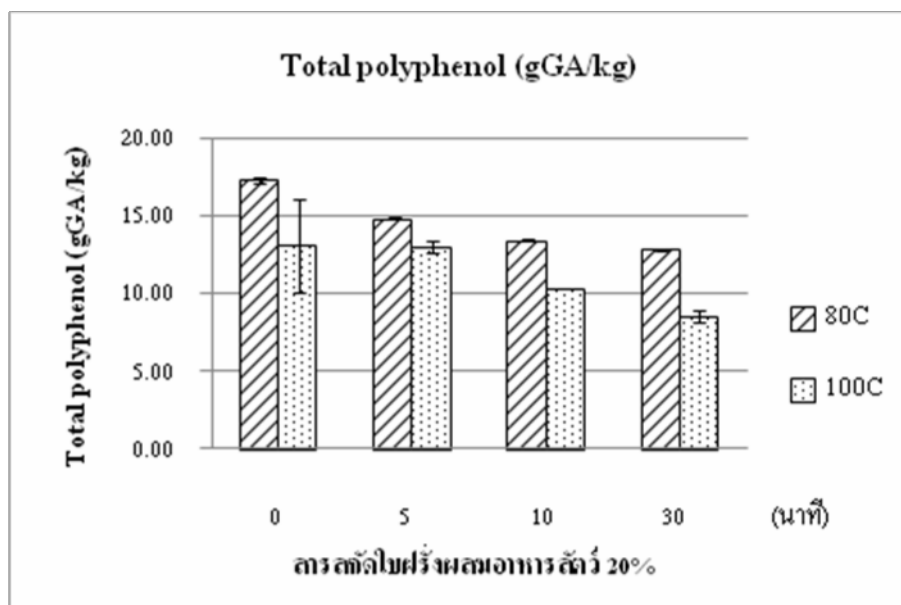
ตัวอย่าง	เวลาที่ให้ความร้อน (นาที)	Total polyphenol (SD) (gGA/kg) 80 °C	Total polyphenol (SD) (gGA/kg) 100 °C
สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	0	3.69 (0.01)	3.69 (0.70)
	5	3.31(0.01)	3.63 (0.18)
	10	3.08 (0.01)	3.23 (0.44)
	30	2.88 (0.03)	2.83 (0.68)
สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10 %	0	8.20 (0.06)	9.56 (0.02)
	5	7.83 (0.15)	7.69 (0.01)
	10	7.79 (0.07)	7.67 (0.06)
	30	7.51(0.07)	7.22 (0.02)
สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20 %	0	17.33 (0.21)	13.11 (3.04)
	5	14.85 (0.05)	13.01 (0.34)
	10	13.46 (0.08)	10.37 (0.01)
	30	12.85 (0.11)	8.58 (0.40)



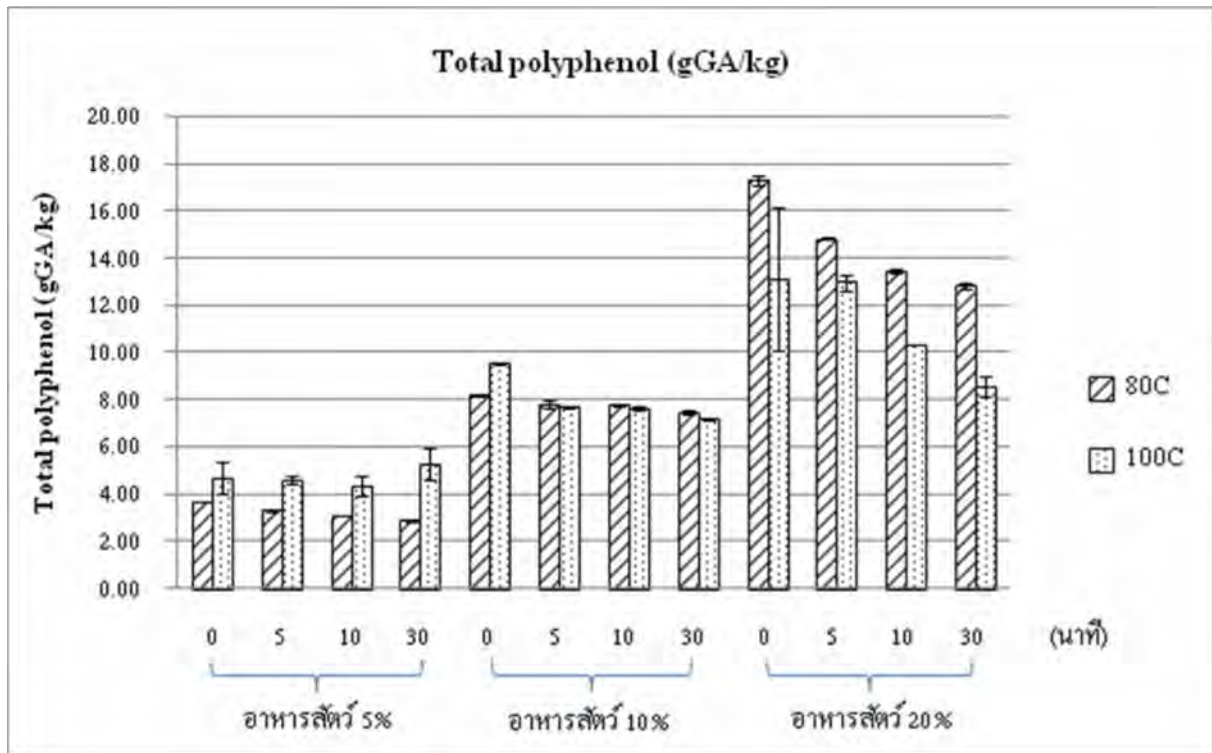
รูปที่ 17 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ Total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5%



รูปที่ 18 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ Total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10%



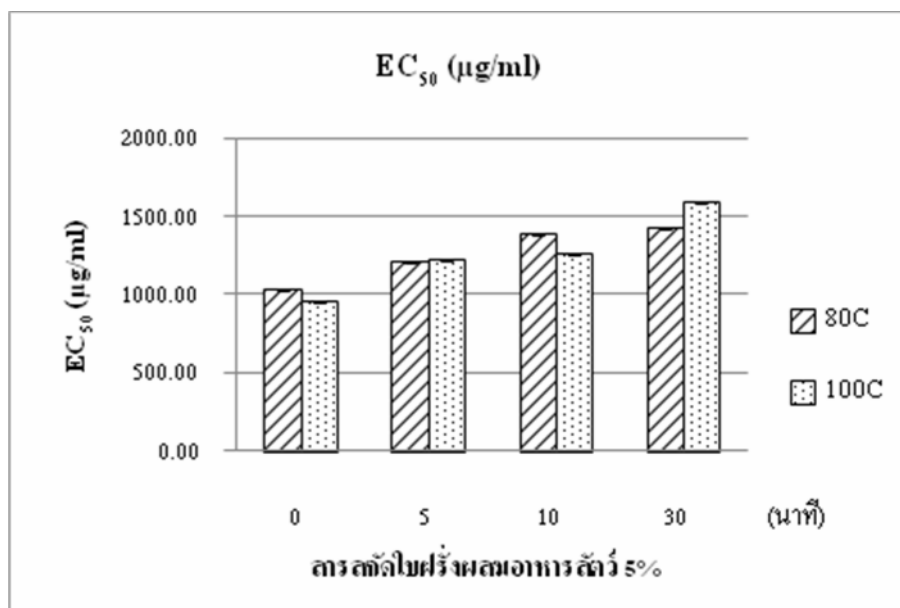
รูปที่ 19 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ Total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20%



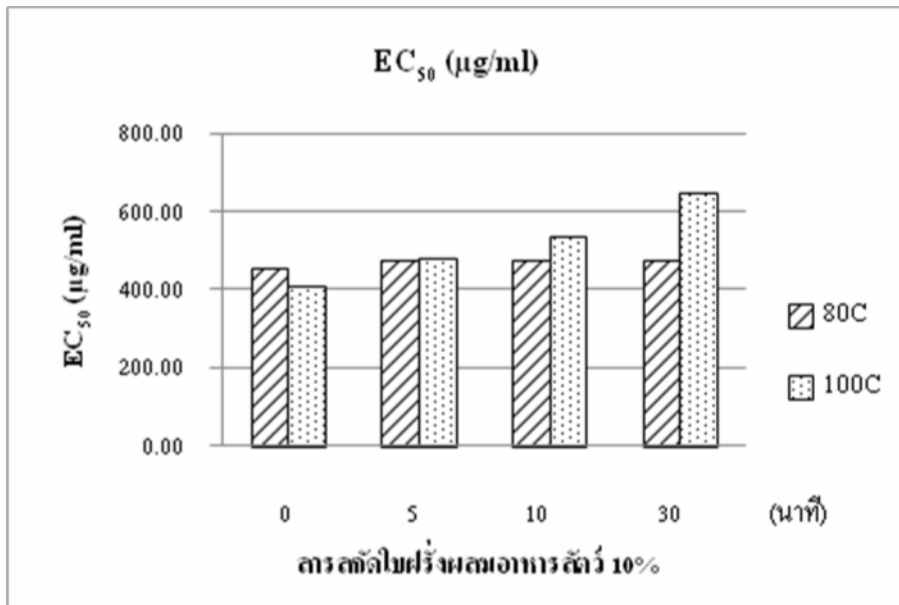
รูปที่ 20 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ Total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20%

ตารางที่ 14ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบฝรั่งและผลิตภัณฑ์จากใบฝรั่งที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลาต่างๆ

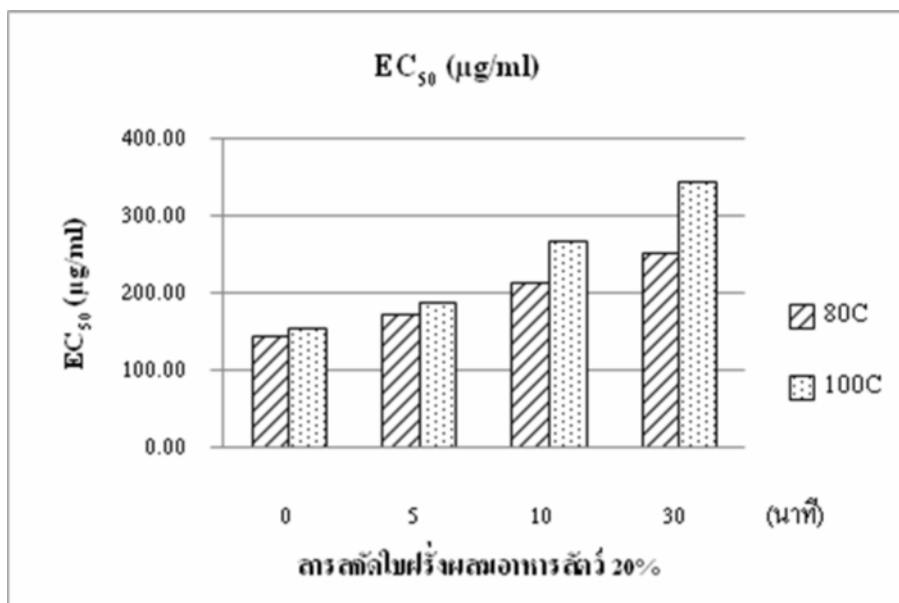
ตัวอย่าง	เวลาที่ให้ความร้อน (นาที)	EC ₅₀ (SD) (µg/ml) 80 °C	EC ₅₀ (SD) (µg/ml) 100 °C
สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	0	1023.00 (0.01)	948.20 (0.003)
	5	1211.00 (0.02)	12150 (0.015)
	10	1386.00 (0.03)	1260.00 (0.041)
	30	1421.00 (0.93)	1581.00 (0.053)
สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10 %	0	457.30 (0.013)	409.20 (0.061)
	5	475.10 (0.036)	484.10 (0.014)
	10	478.70 (0.042)	537.20 (0.025)
	30	478.90 (0.025)	649.90 (0.030)
สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20 %	0	143.70 (0.003)	154.30 (0.004)
	5	174.30 (0.007)	188.40 (0.007)
	10	213.40 (0.024)	267.30 (0.005)
	30	251.50 (0.031)	344.90 (0.006)



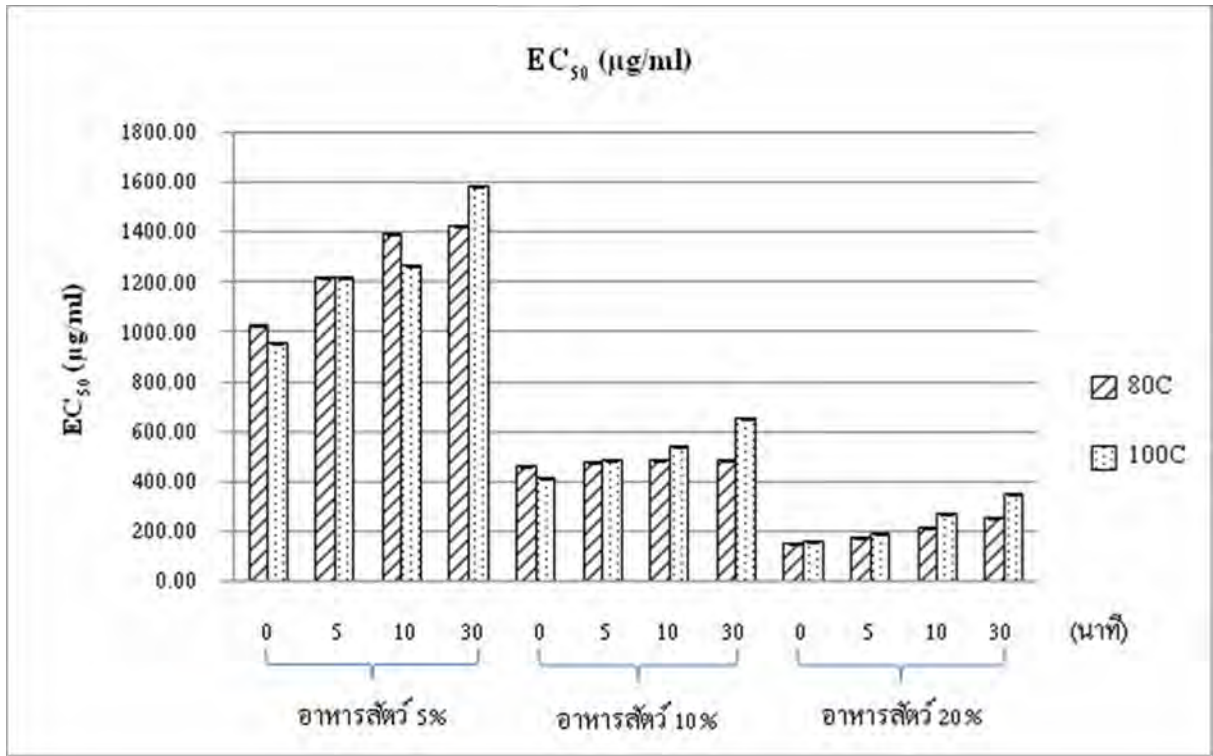
รูปที่ 21 แผนภูมิแท่งแสดง EC₅₀ ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5%



รูปที่ 22 แผนภูมิแท่งแสดง EC_{50} ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10%



รูปที่ 23 แผนภูมิแท่งแสดง EC_{50} ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20%



รูปที่ 24 แผนภูมิแท่งแสดง EC_{50} ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20%

ตารางที่ 15 % loss on drying ของสารสกัดใบฝรั่งและผลิตภัณฑ์จากใบฝรั่ง day 0

อุณหภูมิที่ เก็บตัวอย่าง (°C)	ตัวอย่าง เดือน 3	เวลาที่ให้ความ ร้อน (นาทื)	% loss on drying (SD) 80 °C	% loss on drying (SD) 100 °C
Day 0	สารสกัดใบฝรั่ง ผสมในอาหาร สัตว์ 5 %	0	4.84 (0.17)	3.5 (0.01)
		5	5.88 (0.10)	4.77 (0.19)
		10	5.28 (0.20)	4.07 (0.05)
		30	5.76 (0.10)	3.35 (0.09)
	สารสกัดใบฝรั่ง ผสมในอาหาร สัตว์ 10 %	0	5.07 (0.06)	3.7 (0.16)
		5	5.25 (0.16)	3.54 (0.06)
		10	5.33 (0.11)	4.11 (0.10)
		30	5.89 (0.09)	4.08 (0.06)
	สารสกัดใบฝรั่ง ผสมในอาหาร สัตว์ 20 %	0	5.12 (0.01)	4.76 (0.27)
		5	5.43 (0.13)	4.74 (0.10)
		10	5.88 (0.08)	4.22 (0.08)
		30	6.07 (0.06)	4.28 (0.06)

2.2 ความคงตัวของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมกับอาหารสัตว์ที่เวลา 0, 3, 6 และ 9 เดือน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ quercetin ของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาผสม 30 นาที ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก ภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส แสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 25 และ 26 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ quercetin ภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งและอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ปริมาณ quercetin ที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน และเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ ปริมาณที่ใส่ลง ไม่มีผลต่อปริมาณ quercetin อย่างมีนัยสำคัญ การเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 เดือนมีผลให้ปริมาณ quercetin ลดลงมากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในทุกความเข้มข้นของตำรับสารสกัดใบฝรั่ง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds ของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมอาหาร สัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาผสม 30 นาที ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก ภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส แสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 27 และ 28 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds ภายหลังการเก็บ ที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าปริมาณ total phenolic compounds ค่าที่ ได้เมื่อผสมใน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกันเมื่อผสมที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 โดยน้ำหนัก แต่การเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3, 6 และ 9 เดือนมีผลให้ ปริมาณ total phenolic compounds ลดลงมากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในทุก ความเข้มข้นของตำรับสารสกัดใบฝรั่ง

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมอาหารสัตว์ที่ อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาผสม 30 นาที ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก ภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส แสดงในตารางที่ 18 และรูปที่ 29 และ 30 แสดงผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ได้เมื่อผสมใน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกัน การเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3, 6 และ 9 เดือน มีผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลงมากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในทุกความเข้มข้นของตำรับสารสกัดใบฝรั่ง

ผลการศึกษาปริมาณความชื้นด้วยวิธี LOD ของตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมอาหารสัตว์ที่ อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาผสม 30 นาที ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก ภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 3, 6 และ 9 เดือน แสดง ในตารางที่ 19 และรูปที่ 31 และ 32 ตามลำดับ พบว่าปริมาณความชื้นเมื่อผสมที่อุณหภูมิ 80

และ 100 องศาเซลเซียส อยู่ในช่วงร้อยละ 7.19 (SD 0.71) ถึง 10.86 (SD 1.05) โดยน้ำหนัก เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอยู่ในช่วงร้อยละ 9.64 (SD 1.68) ถึง 15.02 (SD 3.04) โดยน้ำหนัก เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงว่าอุณหภูมิการผสมไม่มีผลต่อปริมาณความชื้น แต่อุณหภูมิที่เก็บรักษามีผล โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นต่ำกว่าการเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 16 ปริมาณ Quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งและผลิตภัณฑ์จากใบฝรั่งที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เดือน 3, 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส

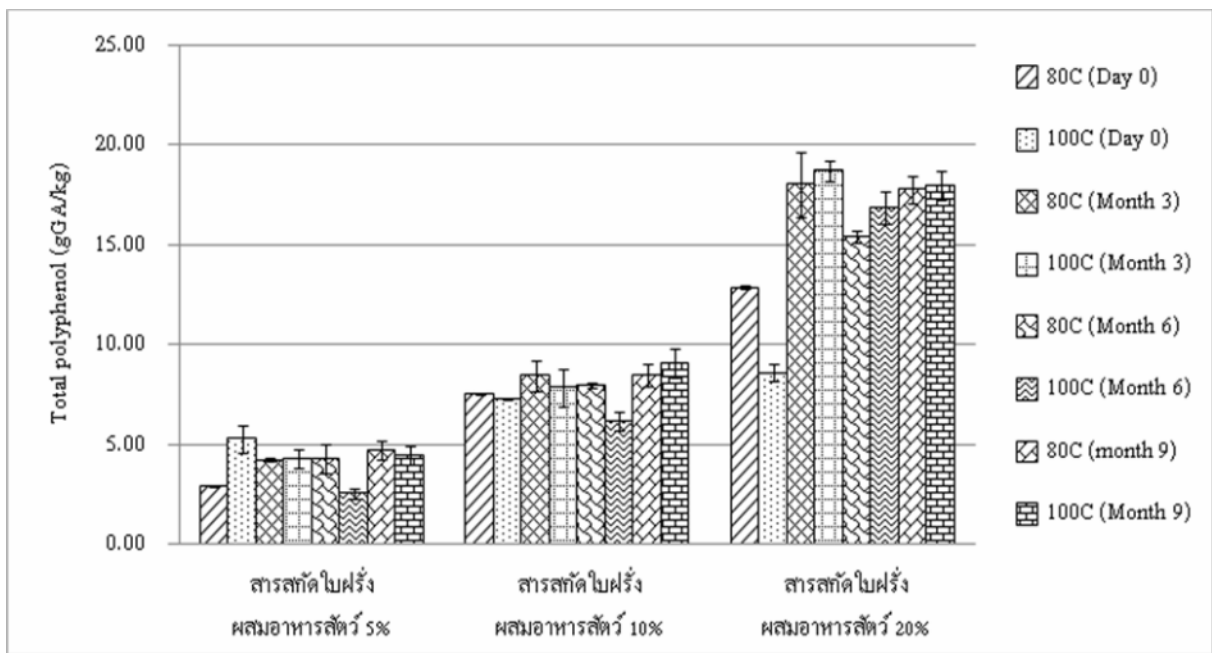
อุณหภูมิที่เก็บ ตัวอย่าง (°C)	ตัวอย่าง	เวลาที่ให้ความ ร้อน (นาที)	% Quercetin (SD) 80°C	% Quercetin (SD) 100°C
เดือนที่ 3				
4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	0.0046 (0.0002)	0.0040 (0.0001)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	0.0072 (0.0003)	0.0071 (0.0008)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	0.0137 (0.0002)	0.0141 (0.0008)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	0.0032 (0.0002)	0.0035 (0.0002)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	0.0055 (0.0002)	0.0066 (0.0003)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	0.0112 (0.0002)	0.0108 (0.0003)
เดือนที่ 6				
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	0.0038 (0.0002)	0.0046 (0.0003)
4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	0.0075 (0.0002)	0.0074 (0.0007)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	0.0151 (0.0008)	0.0140 (0.0012)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	0.0027 (0.0001)	0.0036 (0.0001)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	0.0045 (0.0001)	0.0053 (0.0002)

	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	0.0081 (0.0005)	0.0117 (0.0012)
เดือนที่ 9				
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	0.0048 (0.0001)	0.0051 (0.0001)
4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	0.0085 (0.0003)	0.0085 (0.0006)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	0.0159 (0.0007)	0.0150 (0.0007)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	0.0019 (0.0002)	0.0020 (0.0001)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	0.0033 (0.0003)	0.0035 (0.0002)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	0.0063 (0.0001)	0.0081 (0.0006)

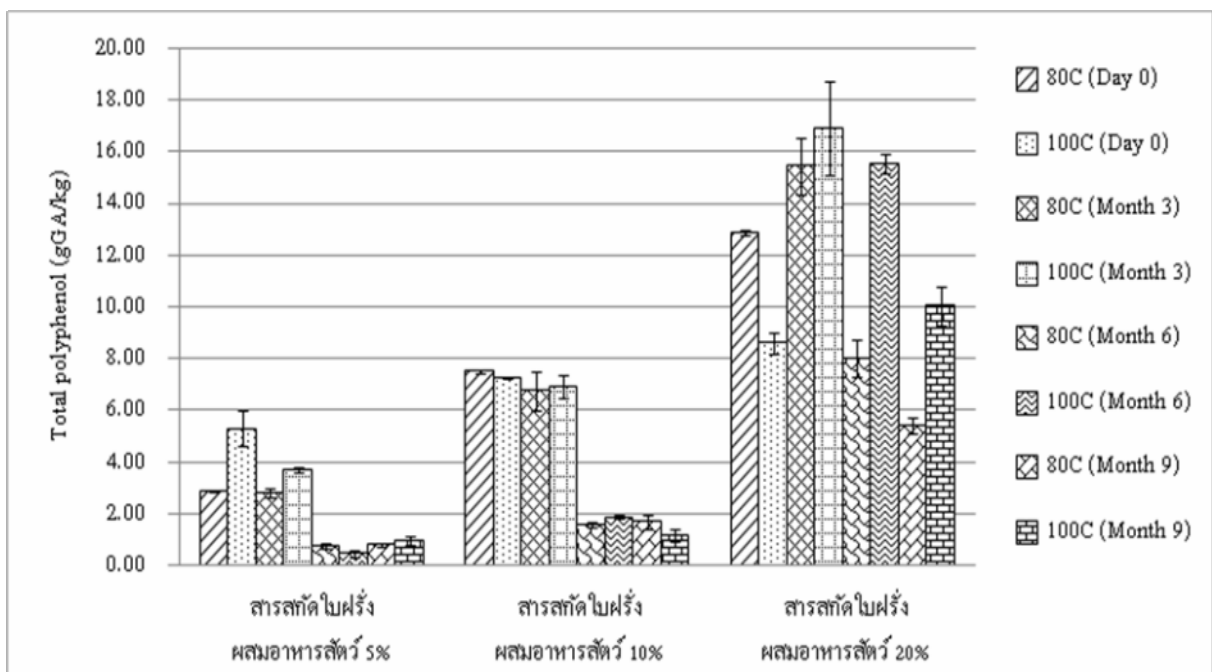
ตารางที่ 17 ปริมาณ Total polyphenol ในสารสกัดใบฝรั่งและผลิตภัณฑ์จากใบฝรั่งที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เดือน 3, 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่เก็บตัวอย่าง (°C)	ตัวอย่าง	เวลาที่ให้ความร้อน (นาที)	Total polyphenol (SD) (gGA/kg) 80 °C	Total polyphenol (SD) (gGA/kg) 100 °C
เดือนที่ 3				
4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	30	4.21 (0.11)	4.26 (0.50)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10 %	30	8.41 (0.76)	7.82 (0.96)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20 %	30	18.02 (1.61)	18.70 (0.52)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	30	2.79 (0.17)	3.69 (0.12)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10 %	30	6.73 (0.77)	6.91 (0.46)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20 %	30	15.43 (1.10)	16.90 (1.80)
เดือนที่ 6				
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	30	4.26 (0.71)	2.51 (0.29)
4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10 %	30	7.97 (0.12)	6.14 (0.49)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20 %	30	15.4 (0.32)	16.83 (0.79)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	30	0.76 (0.12)	0.44 (0.11)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10 %	30	1.56 (0.10)	1.87 (0.05)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20 %	30	8.00 (0.70)	15.53 (0.39)
เดือนที่ 9				
	สารสกัดใบฝรั่งผสม	30	4.68 (0.48)	4.43 (0.50)

	ในอาหารสัตว์ 5 %			
4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	8.42 (0.56)	9.08 (0.74)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	17.74 (0.70)	17.96 (0.70)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	0.78 (0.10)	0.94 (0.16)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	1.68 (0.26)	1.18 (0.24)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	5.42 (0.31)	10.04 (0.74)



รูปที่ 27 ปริมาณ Total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เดือน 3, 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

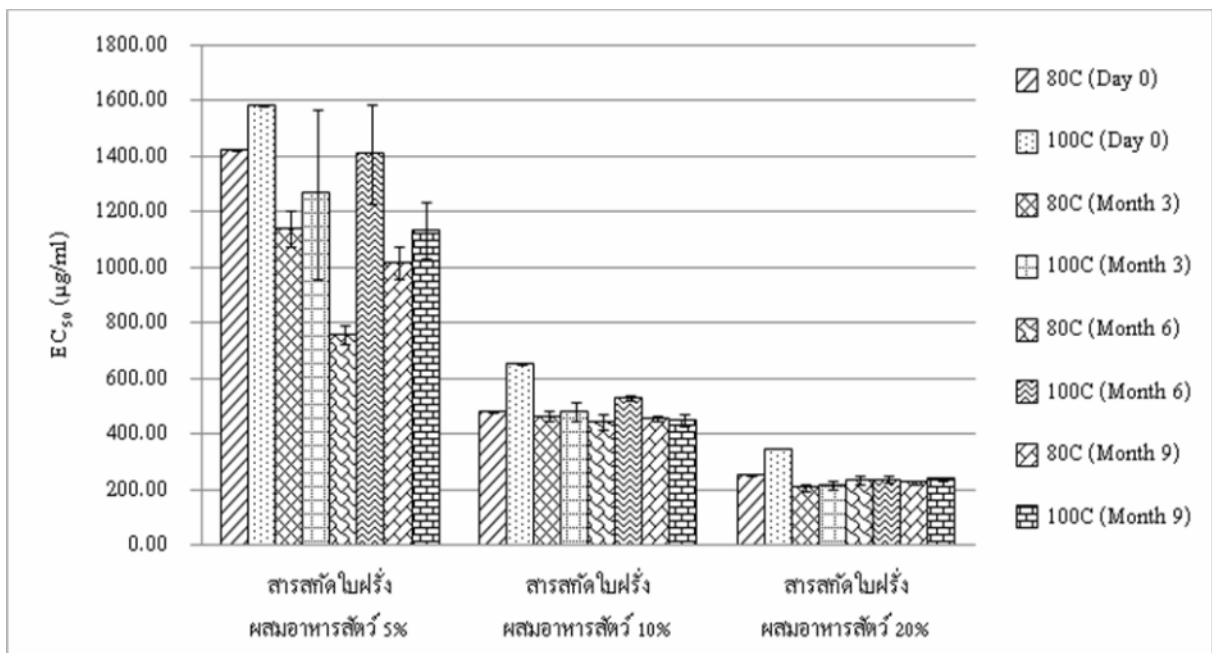


รูปที่ 28 ปริมาณ Total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เดือน 3, 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

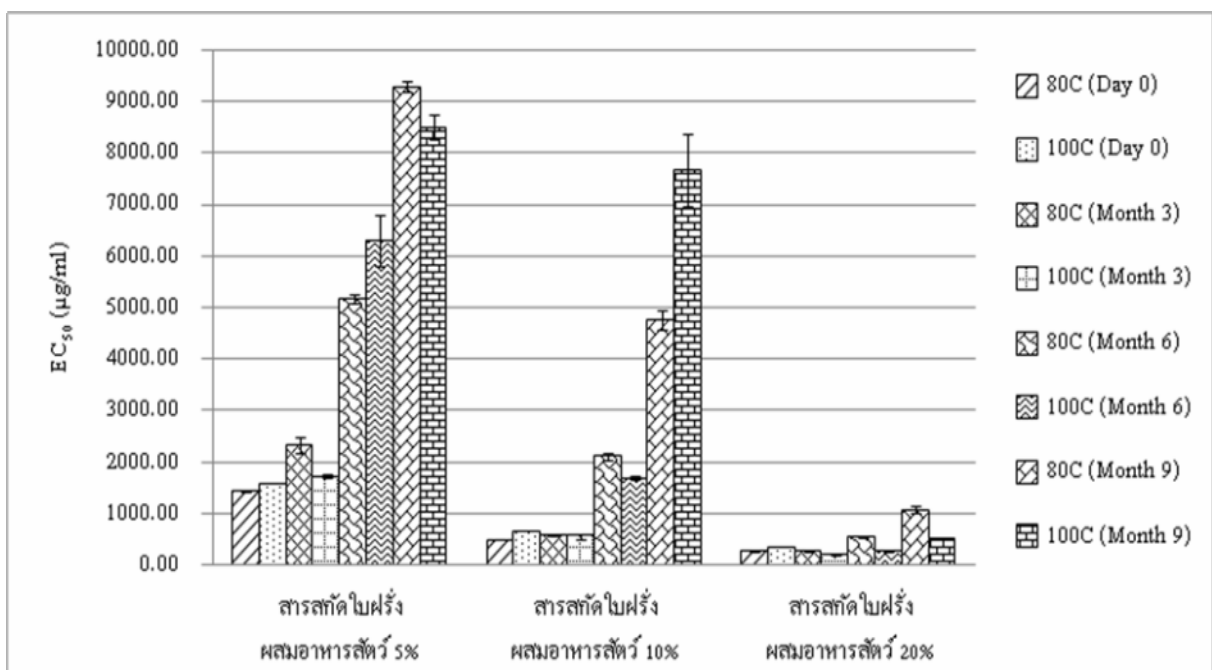
ตารางที่ 18ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบฝรั่งและผลิตภัณฑ์จากใบฝรั่งที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เดือน 3 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่เก็บ ตัวอย่าง (°C)	ตัวอย่าง	เวลาที่ให้ความ ร้อน (นาที)	EC ₅₀ (SD) (µg/ml) 80°C	EC ₅₀ (SD) (µg/ml) 100°C
เดือนที่ 3				
4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	1139.00 (64.26)	1264.40 (304.45)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	461.87 (18.91)	480.80 (35.79)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	207.33 (13.54)	213.17 (15.20)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	2329.67 (161.33)	1720.67 (27.02)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	583.50 (10.71)	558.67 (52.85)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	267.47 (6.72)	213.17 (15.20)
เดือนที่ 6				
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	756.27 (32.09)	1408.67 (178.99)
4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	444.43 (26.81)	529.53 (8.87)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	233.30 (12.50)	235.73 (11.31)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	5168.33 (78.48)	6281.00 (491.05)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	2105.33 (65.06)	1683.00 (29.60)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	547.47 (29.76)	255.67 (3.86)
เดือนที่ 9				
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	1014.70 (58.48)	1131.00 (100.50)

4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	456.23 (8.48)	451.40 (21.28)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	225.73 (6.31)	237.10 (5.02)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	9274.33 (107.70)	8493.67 (244.37)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	4756.00 (179.27)	7659.00 (700.53)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	1070.50 (69.69)	504.80 (13.92)



รูปที่ 29 ภาพที่ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เดือน 3, 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

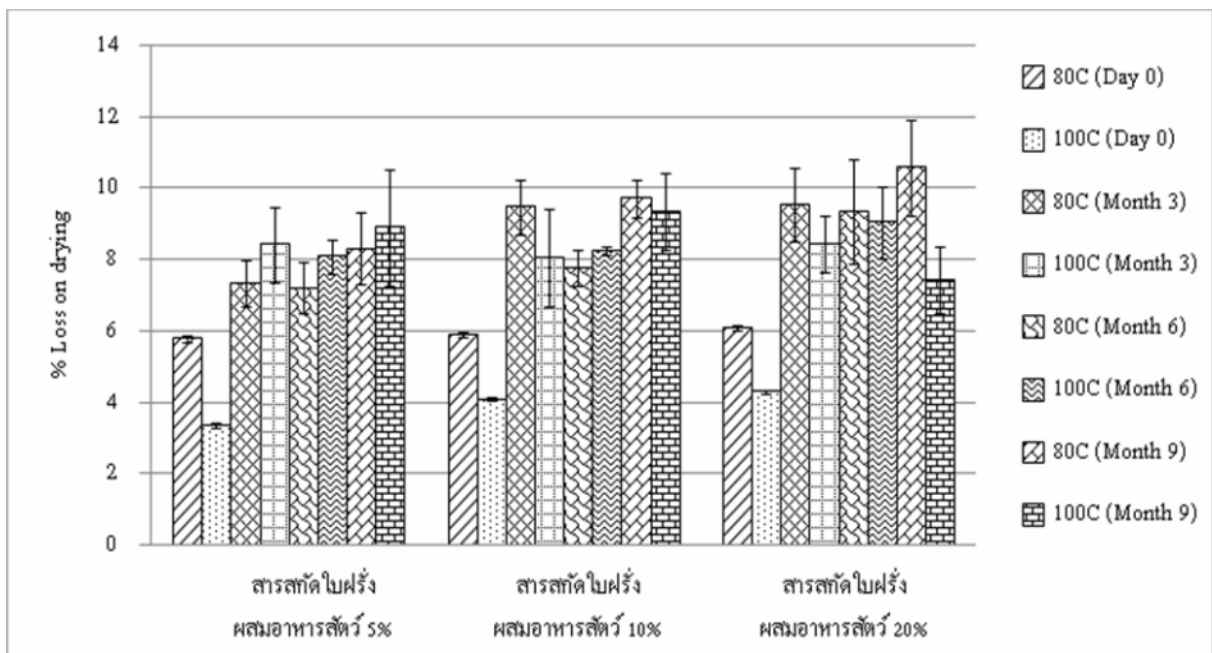


รูปที่ 30 ภาพที่ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เดือน 3, 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

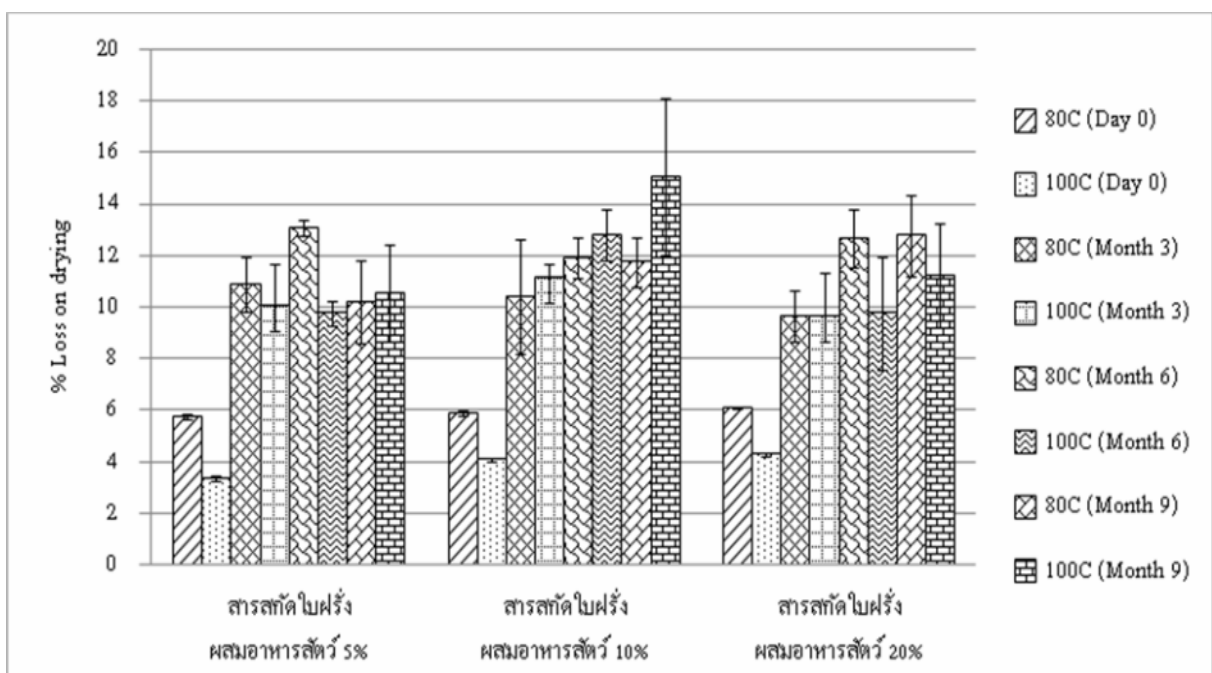
ตารางที่ 19 % loss on drying ของสารสกัดใบฝรั่งและผลิตภัณฑ์จากใบฝรั่งที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เดือน 3 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่เก็บตัวอย่าง (°C)	ตัวอย่าง	เวลาที่ให้ความร้อน (นาที)	% loss on drying (SD) 80 °C	% loss on drying (SD) 100 °C
เดือนที่ 3				
4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	30	7.32 (0.63)	8.4 (1.06)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10 %	30	9.46 (0.78)	8.02 (1.36)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20 %	30	9.52 (1.02)	8.4 (0.79)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	30	10.86 (1.05)	10.08 (1.58)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10 %	30	10.37 (2.21)	11.17 (0.48)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20 %	30	9.63 (1.01)	9.64 (1.68)
เดือนที่ 6				
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	30	7.19 (0.71)	8.08 (0.49)
4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10 %	30	7.73 (0.50)	8.23 (0.11)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20 %	30	9.34 (1.46)	9.03 (1.01)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	30	13.09 (0.31)	9.75 (0.47)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 10 %	30	11.89 (0.81)	12.8 (1.01)
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 20 %	30	12.65 (1.1)	9.74 (2.17)
เดือนที่ 9				
	สารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5 %	30	8.30 (0.99)	8.88 (1.62)

4°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	9.70 (0.52)	9.33 (1.10)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	10.55 (1.34)	7.40 (0.93)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 5 %	30	10.16 (1.61)	10.55 (1.87)
45°C	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 10 %	30	11.74 (0.98)	15.02 (3.04)
	สารสกัดใบฝรั่งผสม ในอาหารสัตว์ 20 %	30	12.76 (1.59)	11.21 (2.01)



รูปที่ 31 % loss on drying ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10 และ 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 32 % loss on drying ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10 และ 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เก็บที่ 45 องศาเซลเซียส

2.2.1 กราฟสรุปภาพรวมผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งและอาหารสัตว์

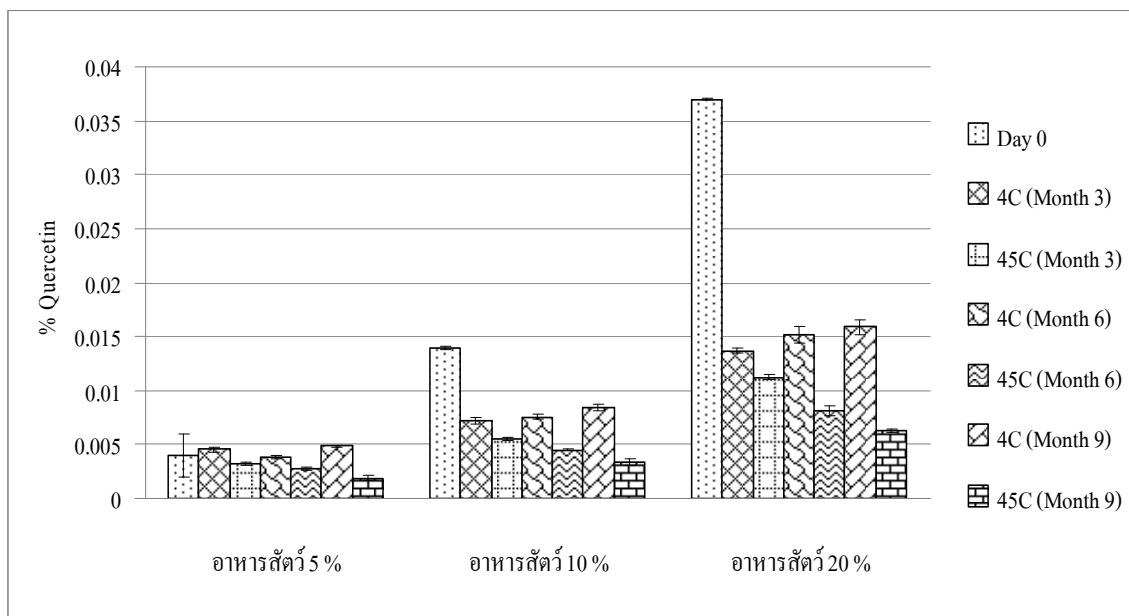
รูปที่ 33 และ 34 แสดงปริมาณ quercetin ในตำรับเมื่อผ่านการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

รูปที่ 35 และ 36 แสดงปริมาณ Total phenolic compounds ในตำรับเมื่อผ่านการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

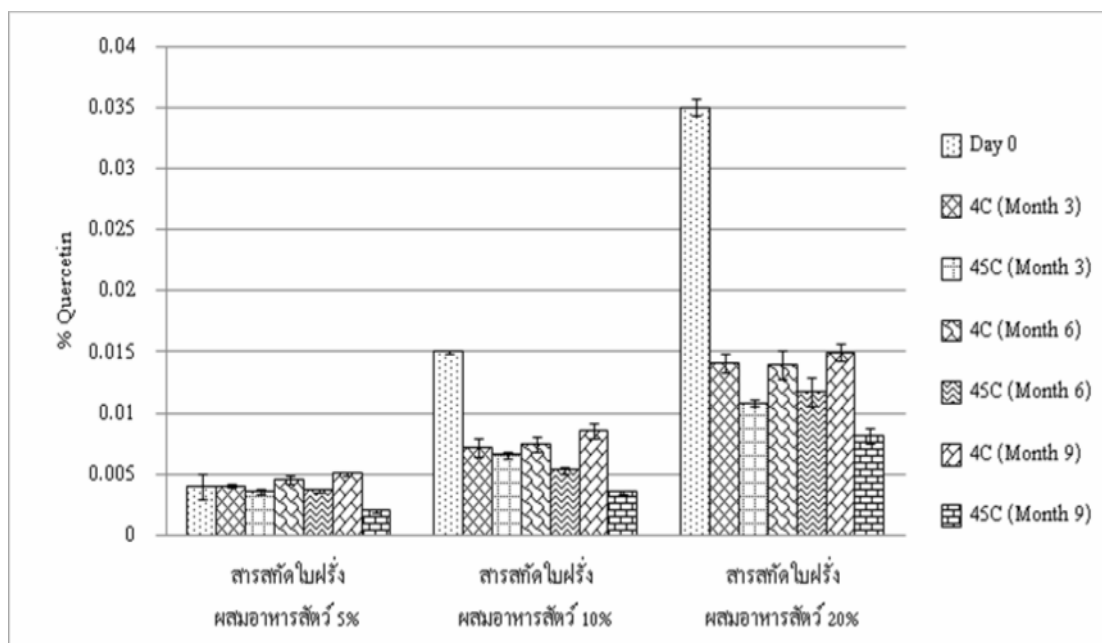
รูปที่ 37 และ 38 แสดงค่า EC_{50} ในตำรับเมื่อผ่านการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

รูปที่ 39 และ 40 แสดงค่า LOD ในตำรับเมื่อผ่านการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

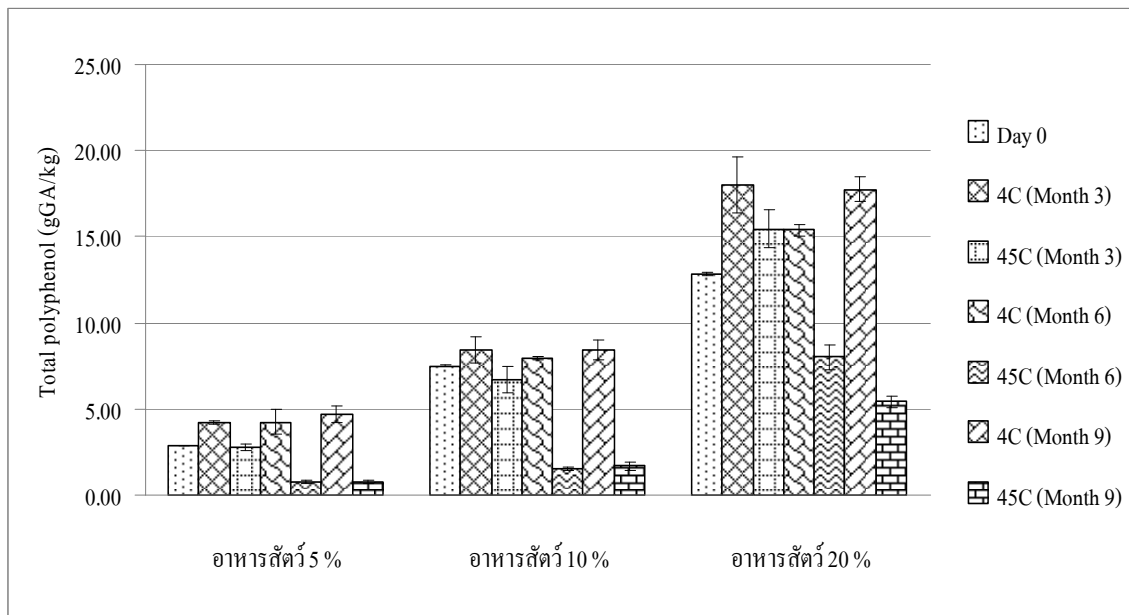
สรุปภาพรวมการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการผสมนาน 30 นาที ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่งร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนักไม่ได้ทำให้ปริมาณ quercetin ต่างกัน แต่มีแนวโน้มทำให้ปริมาณ total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลงเล็กน้อย



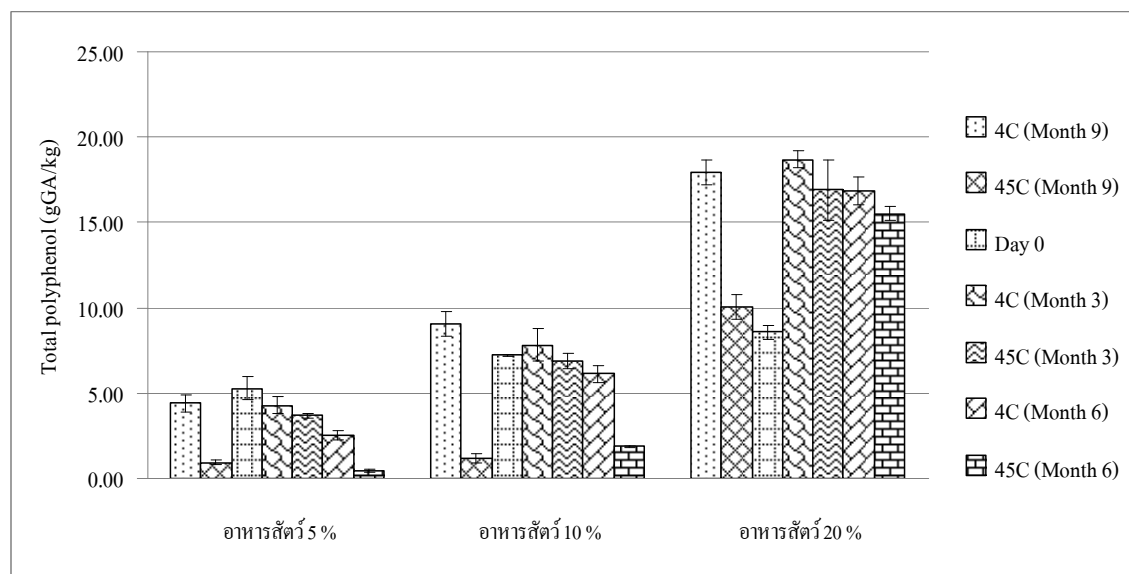
รูปที่ 33 ปริมาณ Quercetin ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส



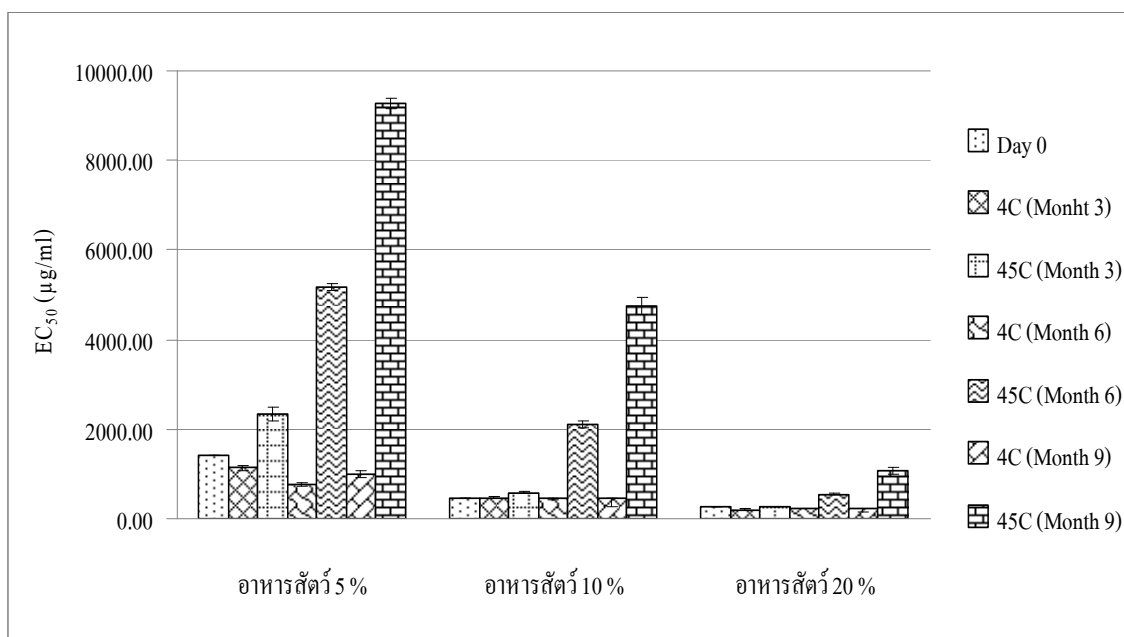
รูปที่ 34 ปริมาณ Quercetin ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส



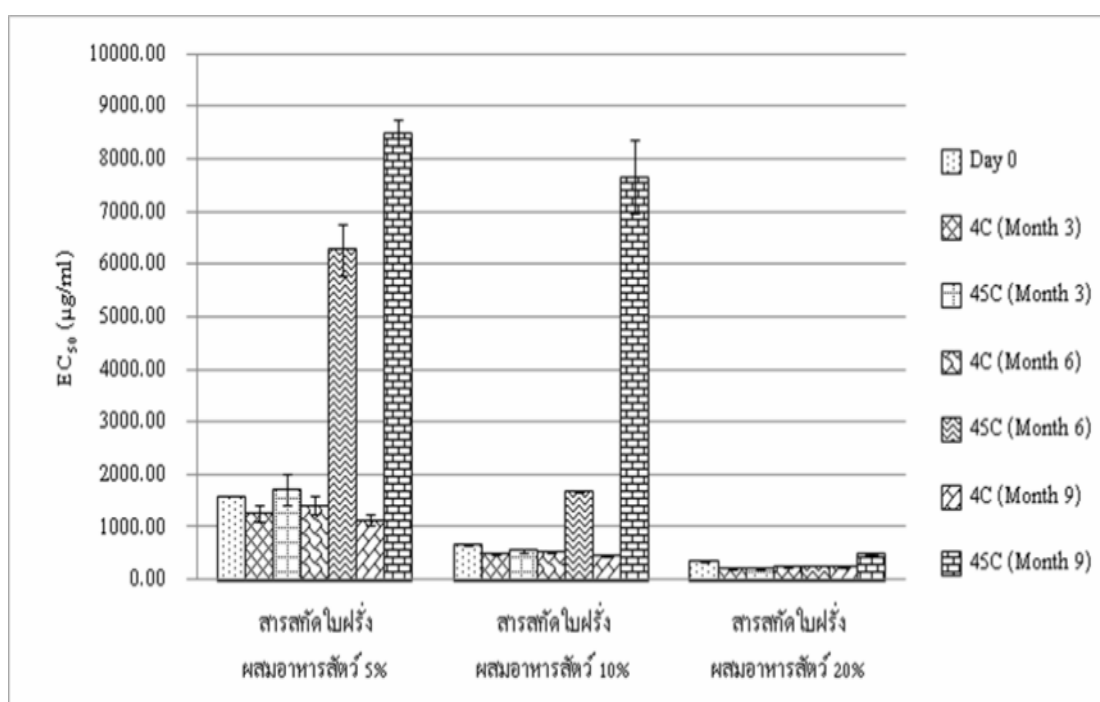
รูปที่ 35 ปริมาณ Total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส



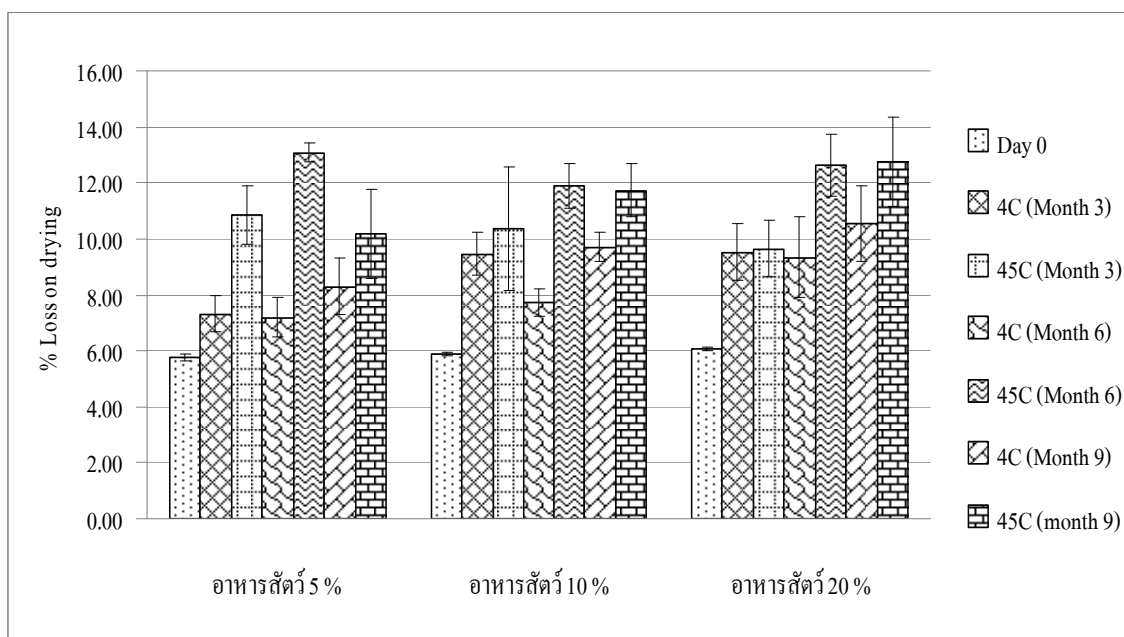
รูปที่ 36 ปริมาณ Total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส



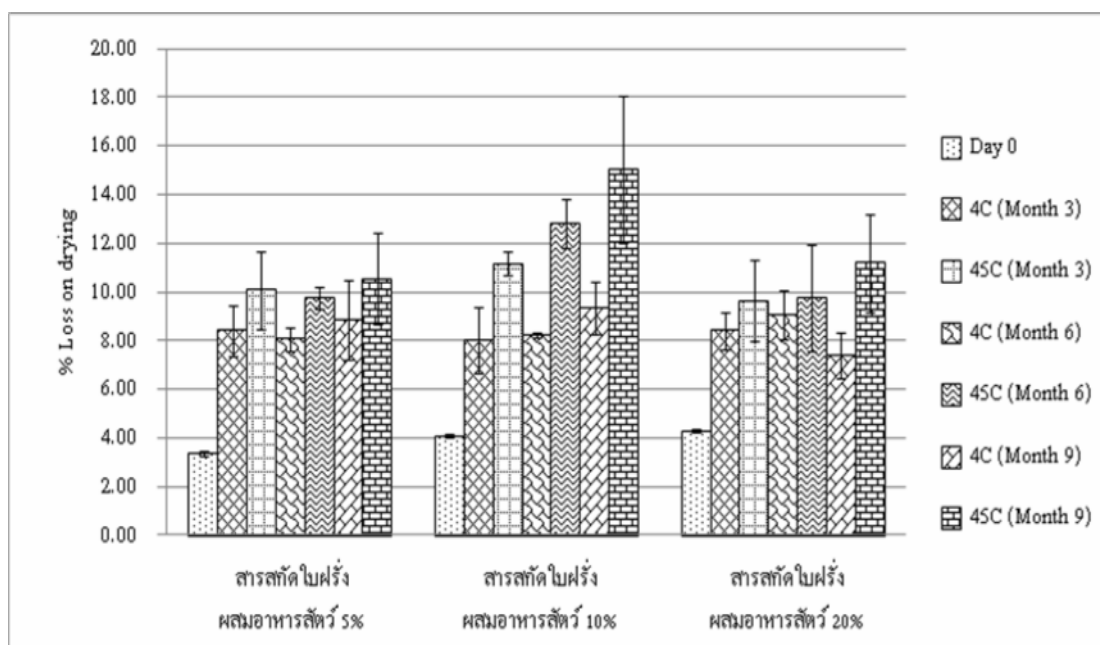
รูปที่ 37 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 38 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 39 ปริมาณ loss on drying ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 40 ปริมาณ loss on drying ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส

2.2.2 กราฟสรุปภาพรวมผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมอาหารสัตว์

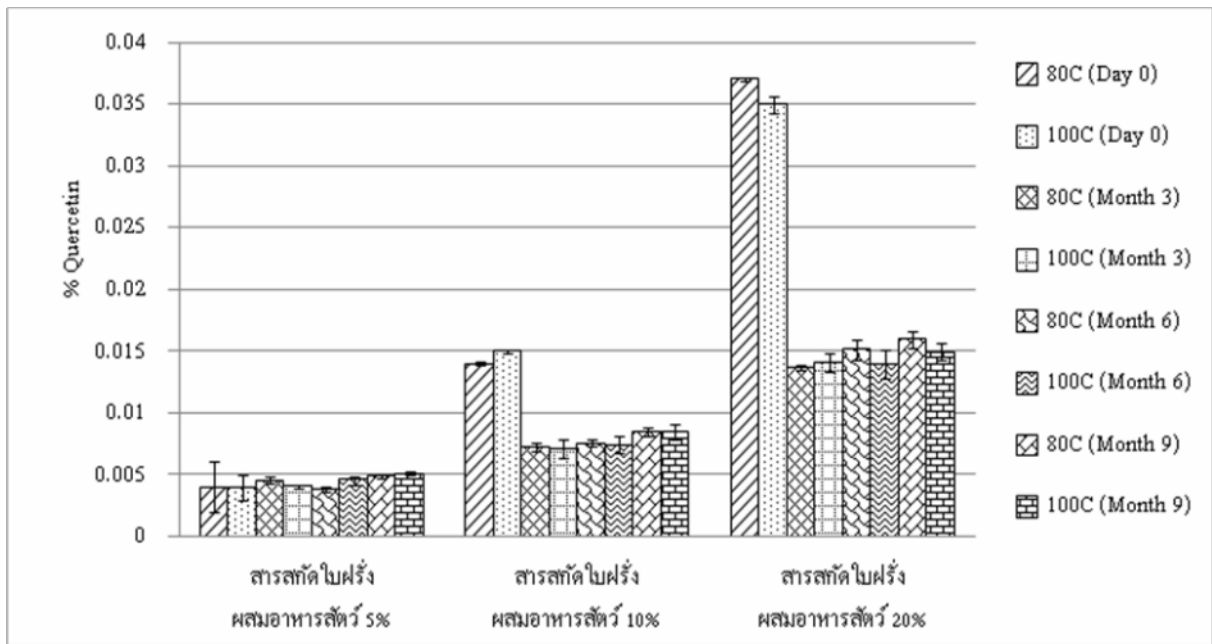
รูปที่ 41 และ 42 แสดงปริมาณ quercetin ในตำรับเมื่อผ่านการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

รูปที่ 43 และ 44 แสดงปริมาณ Total phenolic compounds ในตำรับเมื่อผ่านการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

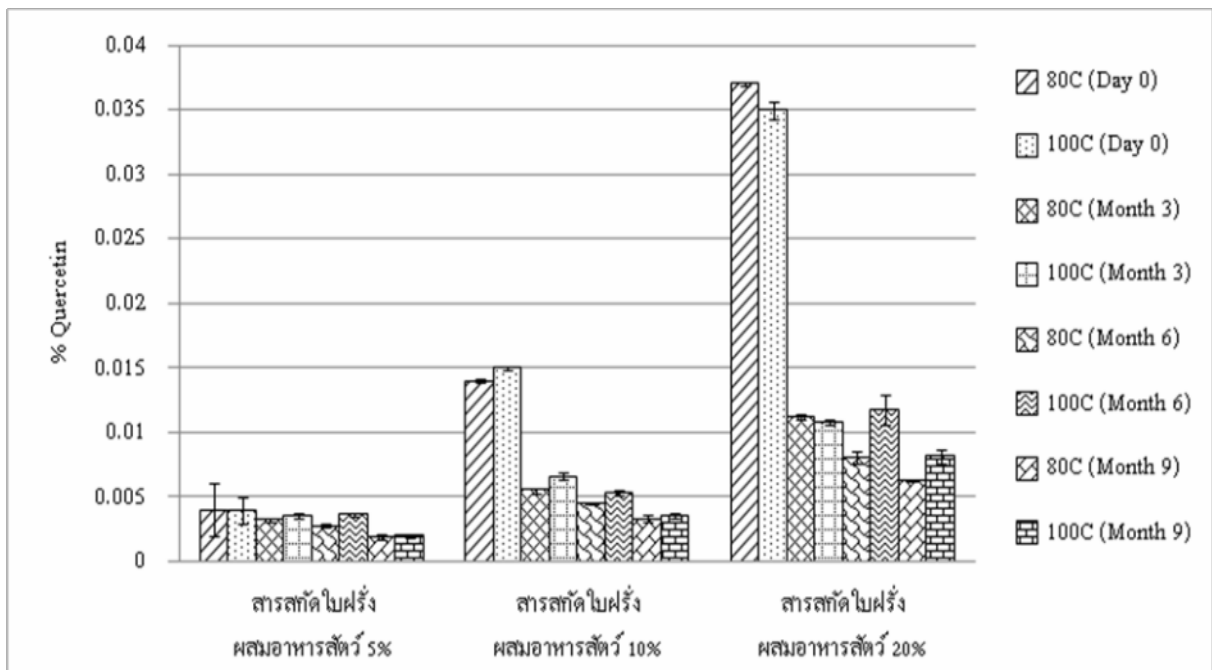
รูปที่ 45 และ 46 แสดงค่า EC_{50} ในตำรับเมื่อผ่านการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

รูปที่ 47 และ 48 แสดงค่า LOD ในตำรับเมื่อผ่านการผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

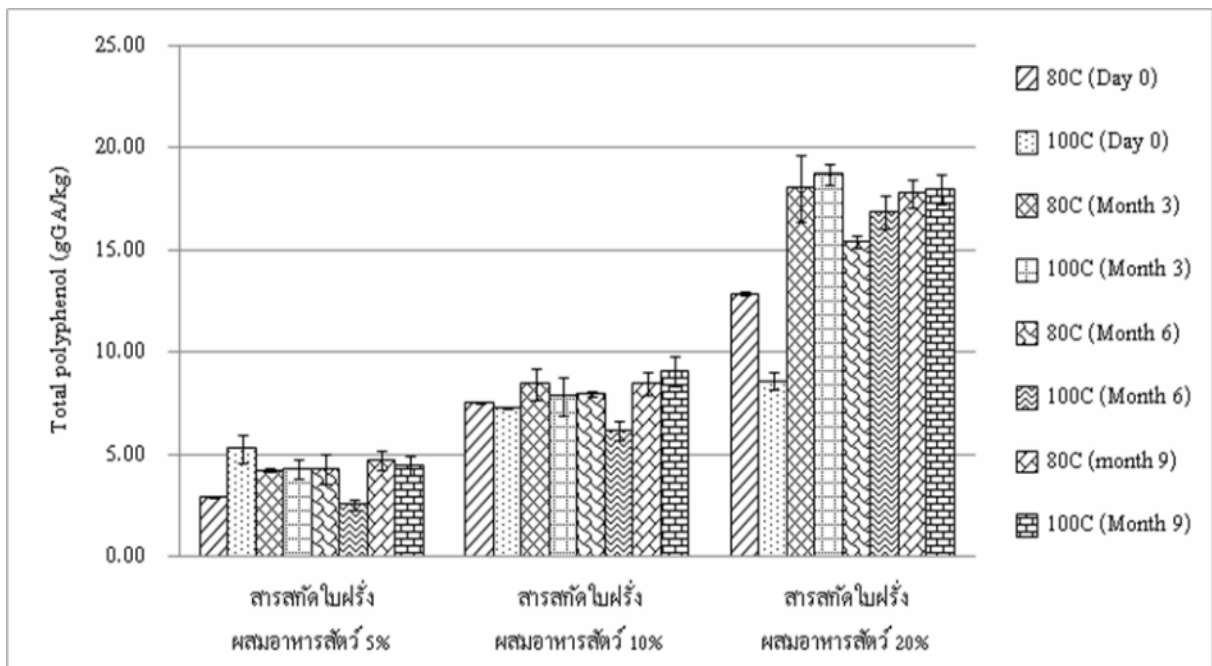
สรุปภาพรวมอุณหภูมิที่ใช้ในเก็บตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์ที่อัตราส่วนต่างๆ กัน ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และค่า EC_{50} และ LOD โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้มีปริมาณ quercetin และ total phenolic compounds มากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่า EC_{50} มีค่าลดลง และปริมาณความชื้นต่ำกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



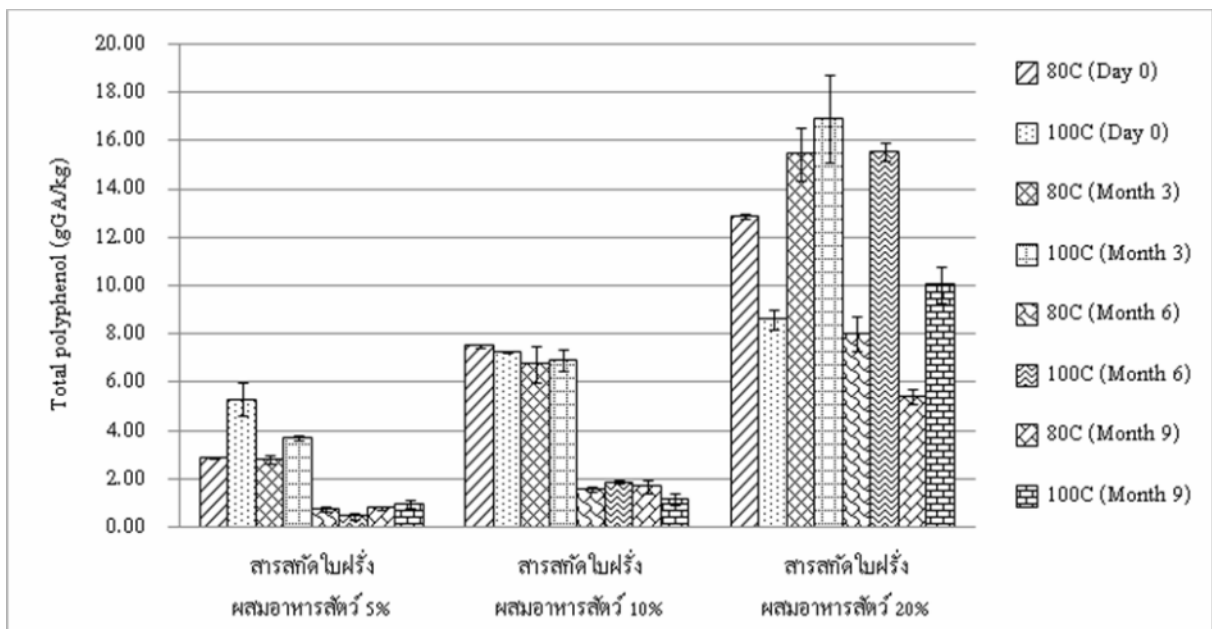
รูปที่ 41 ปริมาณ Quercetin ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



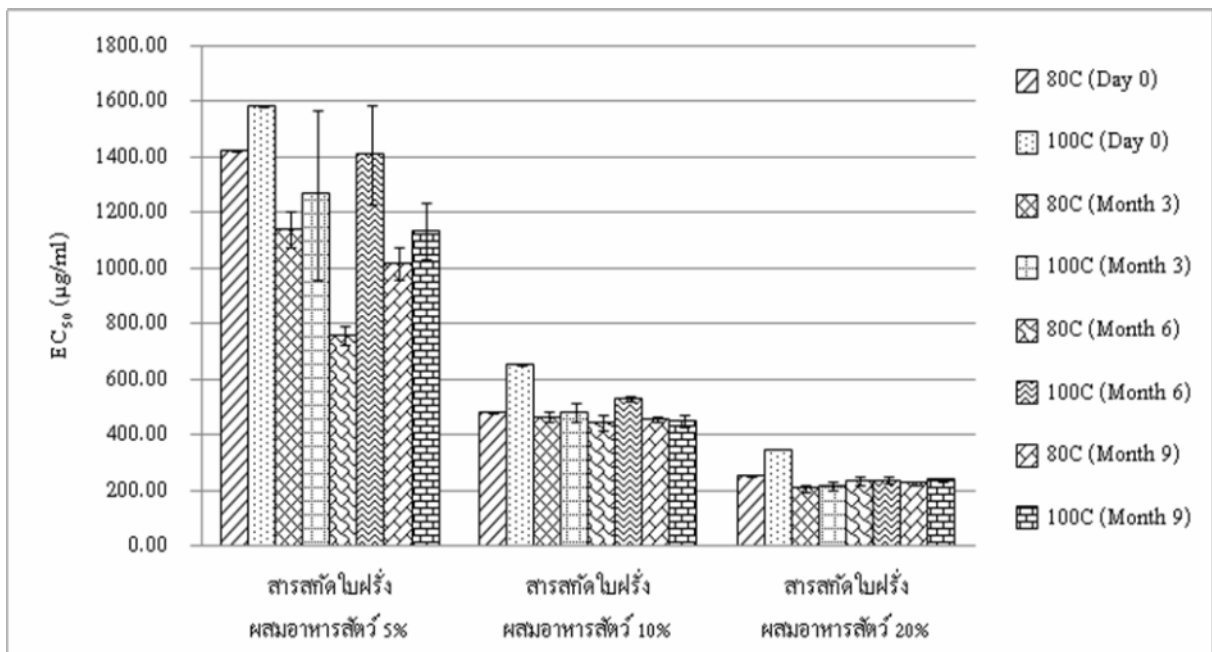
รูปที่ 42 ปริมาณ Quercetin ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



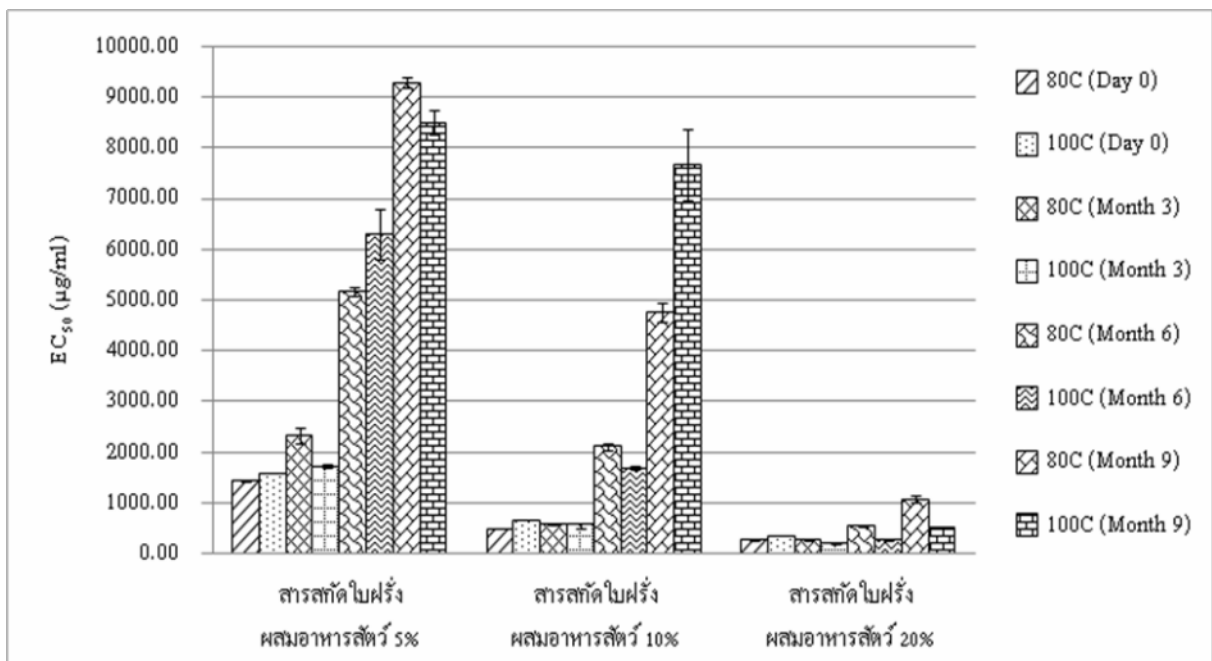
รูปที่ 43 ปริมาณ Total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



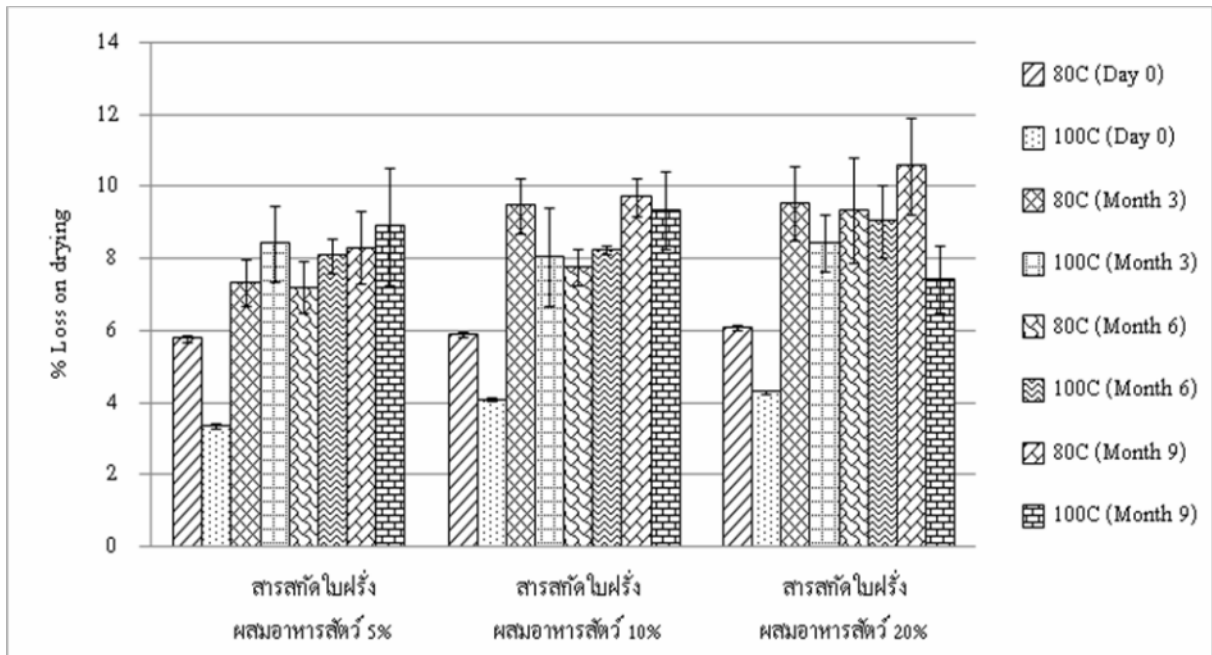
รูปที่ 44 ปริมาณ Total polyphenol ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



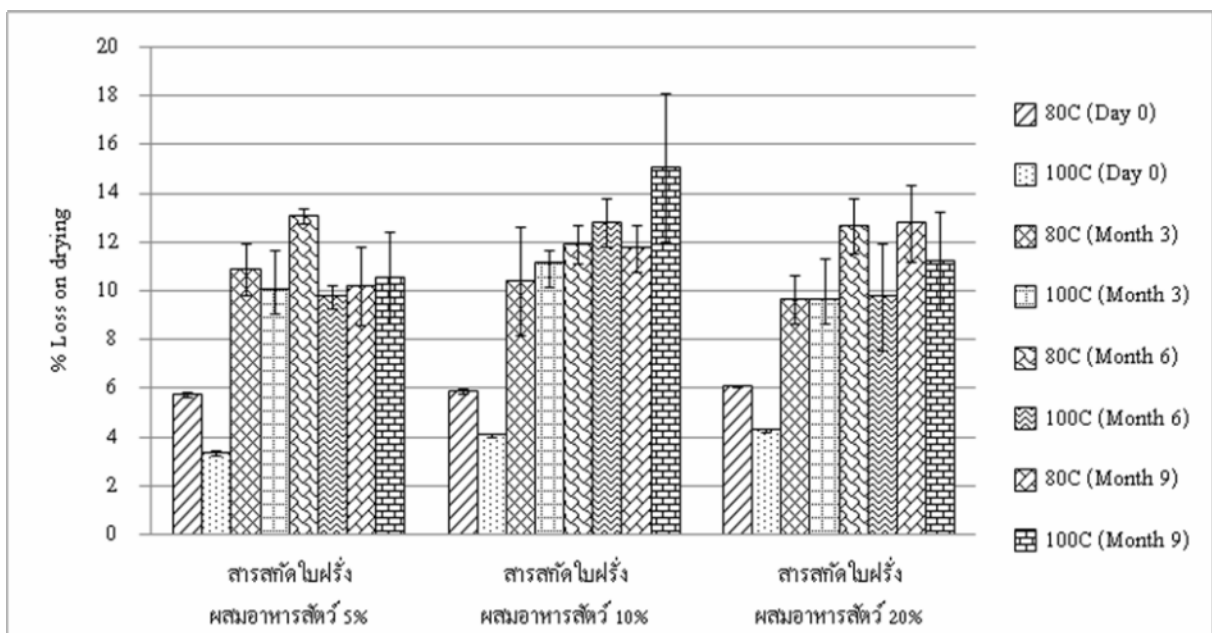
รูปที่ 45 ภาพที่ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 46 ภาพที่ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 47 ปริมาณ loss on drying ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 48 ปริมาณ loss on drying ของสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารสัตว์ 5, 10, 20% ที่ผ่านความร้อน 80 และ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที day 0 เดือน 3 6 และ 9 เก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การสกัดใบฝรั่งสดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ได้สารสกัดใบฝรั่งที่มีปริมาณ total phenolic compounds สูงกว่าและมีค่าเฉลี่ยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า (แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ) เมื่อเทียบกับการสกัดใบฝรั่งแห้งด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร จึงเป็นวิธีที่ควรนำมาใช้ทดแทนการสกัดด้วยวิธีเดิม เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการอบใบฝรั่งให้แห้ง โดยสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 แบบ ได้สารสกัดในรูปของแข็งกึ่งเหลว สีน้ำตาล สามารถดูความชื้นได้อย่างรวดเร็วจนเป็นสารสกัดชั้นหนืด ไม่สามารถนำมาใช้ในการผสมอาหารสัตว์ได้โดยตรง
2. การเตรียมสารสกัดใบฝรั่งด้วยวิธีการพ่นแห้งโดยใช้เบต้าไซโครเด็คทรีนเป็นสารช่วย ทำให้ได้สารสกัดใบฝรั่งที่มีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาล ร่วน ไม่จับก้อนจากการดูความชื้นเมื่อนำไปทดสอบความคงตัวของตำรับที่อุณหภูมิ 5, 25 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 6 เป็นต้นไป แต่จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 6, 9 และ 12
3. การผสมตำรับสารสกัดใบฝรั่งร่วมกับอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการผสมนาน 30 นาที ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่งร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนักไม่ได้ทำให้ปริมาณ quercetin ต่างกัน แต่มีแนวโน้มทำให้ปริมาณ total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลงเล็กน้อย
4. การเก็บตำรับสารสกัดใบฝรั่งผสมกับอาหารสัตว์ที่อัตราส่วนการผสมต่างๆ ในรูปที่ผสมแล้วส่งผลให้เกิดความแตกต่างของปริมาณ quercetin, total phenolic compounds และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณความชื้น โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้มีปริมาณ quercetin และ total phenolic compounds มากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลง และปริมาณความชื้นต่ำกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จึงควรเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อยืดอายุการใช้งาน

เอกสารอ้างอิง

1. จินดาพร ภูมิพัฒน์วงษ์, อรุณพร อธิรัตน์, สิริวัตร ปิ่นสุวรรณ, สุทธิมาลย์ อิงคณาวัฒน์, สุริยา สุขยิ่ง. การเตรียมและการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งเพื่อใช้ในการผลิตสัตว์. รายงานวิจัย สกว. 2548.
2. Abdelrahim, SI, Almagboul, AZ, Omer, MEA, Elegami, A. (2002). Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L., *Fitoterapia*, 73, 713–715.
3. Di Matteo, V, Esposito, E. (2003). Biochemical and therapeutic effects of the antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Drug Targets CNS Neurological Disorder*, 2, 95–107.
4. Halliwell, B, Gutteridge, JM. (1999). Free radicals in biology and medicine, Oxford: Oxford University Press.
5. Iwu, MM. (1993). Handbook of African Medicinal Plants. CRC Press, pp. 786–789.
6. Jimenez, EA, Rincon, M, Pulido, R, Saura, CF. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava*) as a new source of antioxidant dietary fiber, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5489–5493.
7. Kinsella, JE, Frankel, E, German, B, Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 47, 85–89.
8. Kris-Etherton, PM, Hecker, KD, Bonanome, A, Coval, SM, Binkoski, AE, Hilpert, KF, et.al., (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *American Journal of Medicine*, 113, 71S–88S.
9. Li, J, Chen, F, Luo, J. (1999). GC–MS analysis of essential oil from the leaves of *Psidium guajava*, *Zhong Yao Cai*, 22, 78–80.

10. Moskovitz, J, Yim, MB, Chock, PB. (2002). Free radicals and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397, 354–359.
11. Nadkarni, KM, Nadkarni, AK. (1999). Indian Materia Medica with Ayurvedic, Unani–Tibbi, Siddha, allopathic, homeopathic, naturopathic and home remedies, Vol 1. Popular Prakashan Private Ltd., Bombay, India, pp. 142–149.
12. Oliver, BB. (1986). Medicinal Plants in Tropical West Africa. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 457–461.
13. Tachakittirungrod, S, Okonoki, S, Chowwanapoonphon, S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, 103, 381–388.
14. Thaipong, K, Boonprakob, U, Cisneros–Zevallos, L, Byrne, DH. (2005). Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits, *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health*, 36, 254–257.
15. Zakaria, M, Mohd, MA. (1994). Traditional Malay medicinal plants. Penerbit Fajar Bakti Sudan Bernhard, 129–132.