# บทคัดย่อ

การนำสมุนไพรมาใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพสำหรับสัตว์ ปัญหาที่พบคือความไม่แน่นอนของปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ ซึ่งในพืชจะมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง โดยอาจมาจากชนิดของพันธุ์พืช ฤดูกาล และแหล่งเพาะปลูก ปัจจุบันสมุนไพรที่นำมาใช้ในสัตว์นั้นยังไม่มีกระบวนการในการตรวจสอบมาตรฐาน และควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ หรือปริมาณสารสำคัญ งานวิจัยนี้ได้นำวิธีการทางวิทยาศาสตร์ มาใช้ในการศึกษาเพื่อเตรียมสารสกัดจากใบฝรั่ง พัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพและมาตรฐาน ของสารสกัดใบฝรั่งและผลิตภัณฑ์ที่เตรียมขึ้นมา เพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบในการกำหนดคุณลักษณะ (specification) ที่แน่นอนและเหมาะสมในการนำใบฝรั่งมาเตรียมเป็นสารสกัดและผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสัตว์

งานวิจัยนี้ได้เตรียมสารสกัดจากใบฝรั่งสองสายพันธุ์คือพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์เวียดนาม กระบวนการสกัดสมุนไพรทำโดยการใช้ตัวทำละลายคือ 50% ethanol in DI-water แล้วนำไปประเหยตัวทำละลาย 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 สำหรับการทำ specificity ของการวิเคราะห์พบว่า Aerosil® ใช้เป็นสารดูดความชื้นที่เติมในสารสกัดเพื่อเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ของสารสกัดใบฝรั่ง ไม่รบกวนวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ดังนั้น HPLC-condition ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ทั้งในสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง

ในสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองพบว่ามีปริมาณสารสำคัญ quercetin มากกว่าพันธุ์เวียดนามประมาณ 4.8 เท่า และเมื่อนำไปทดสอบหาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของ

สารสกัดทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์เวียดนามมีค่า $EC_{50}$ เท่ากับ 3.31 μg/ml ($r^2$ = 1) และ 4.48 μg/ml ($r^2$ = 0.9991) ของสารสกัดตามลำดับ ดังนั้นในการพัฒนาเพื่อเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์จะเตรียมจากสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง อย่างไรก็ตามพบว่าสาร สำคัญ 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 μg/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 ซึ่งเป็นเวลาเดียวกันกับที่โรงงานผลิตอาหารสำเร็จรูปใช้ทำอาหารสัตว์ให้แห้งในขั้น ตอนสุดท้าย และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ในสภาวะเร่งไปหาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน พบว่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่มีค่า $EC_{50}$ ประมาณ 10 μg/ml ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเวลาเริ่มต้น แต่พบว่ายังคงมีฤทธิ์ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ BHT ที่ใช้เป็น positive control (19.92 μg/ml)

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าควรจะต้องทำการเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งใหม่ ให้มีความคงตัวที่ดีขึ้น โดยอาจเปลี่ยนสารดูดความชื้น และเพิ่มสารช่วยตัวอื่นลงไปด้วย แต่ปัจจัยหนึ่งที่ผู้วิจัยจะต้องคำนึงถึงคือ ต้นทุนที่ใช้ เพราะหากจะให้มีการนำสมุนไพรมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ต้นทุนจะต้องไม่สูงเกินไปจนผู้ผลิตไม่สามารถนำไปใช้ได้ อย่างไรก็ตามวิธีการสกัด การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ และการหาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในการวิจัยครั้งนี้ สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์สำหรับการนำสมุนไพรมาใช้สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ได้

# 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 μg/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 μg/ml for local type and 4.48 μg/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 μg/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 $EC_{50}$ 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 ($EC_{50}$ 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.