บทที่ 4
ผลการทดลอง สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

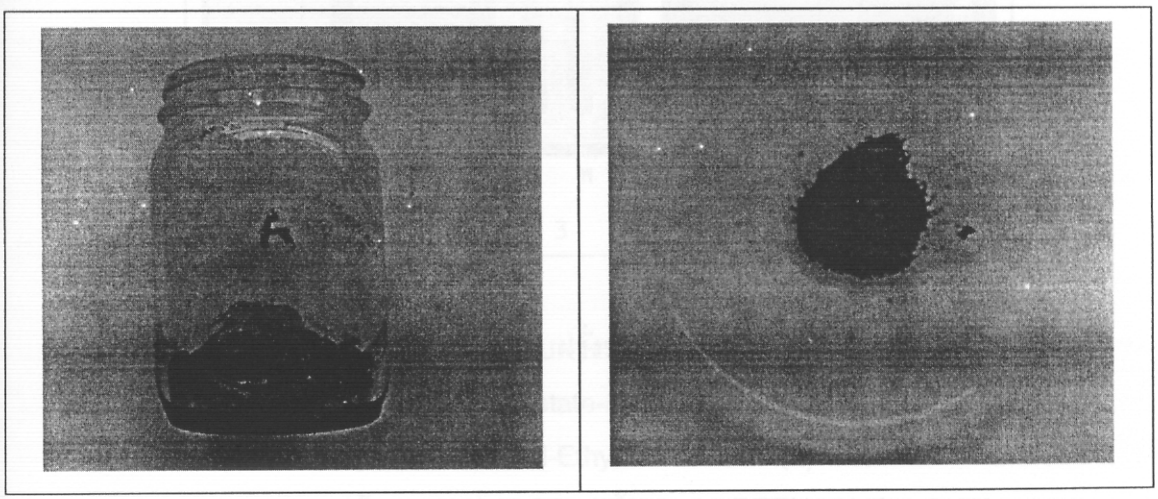
1. การเตรียมสารสกัดใบฝรั่งจากใบฝรั่งสองสายพันธุ์ (พันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์เวียดนาม)

ฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง

- น้ำหนักใบฝรั่งสดที่ใช้	=	20,000.00	กรัม
- น้ำหนักใบฝรั่งแห้งที่ได้	=	2,250.00	กรัม
- น้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้	=	229.33	กรัม
คิดเป็น %yield เทียบกับใบฝรั่งแห้ง	=	10.19	%
คิดเป็น %yield เทียบกับใบฝรั่งสด	=	1.15	%

ฝรั่งพันธุ์เวียดนาม

- น้ำหนักใบฝรั่งสดที่ใช้	=	10,000.00	กรัม
- น้ำหนักใบฝรั่งแห้งที่ได้	=	930.00	กรัม
- น้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้	=	75.19	กรัม
คิดเป็น %yield เทียบกับใบฝรั่งแห้ง	=	8.08	%
คิดเป็น %yield เทียบกับใบฝรั่งสด	=	0.75	%



(A) (B)

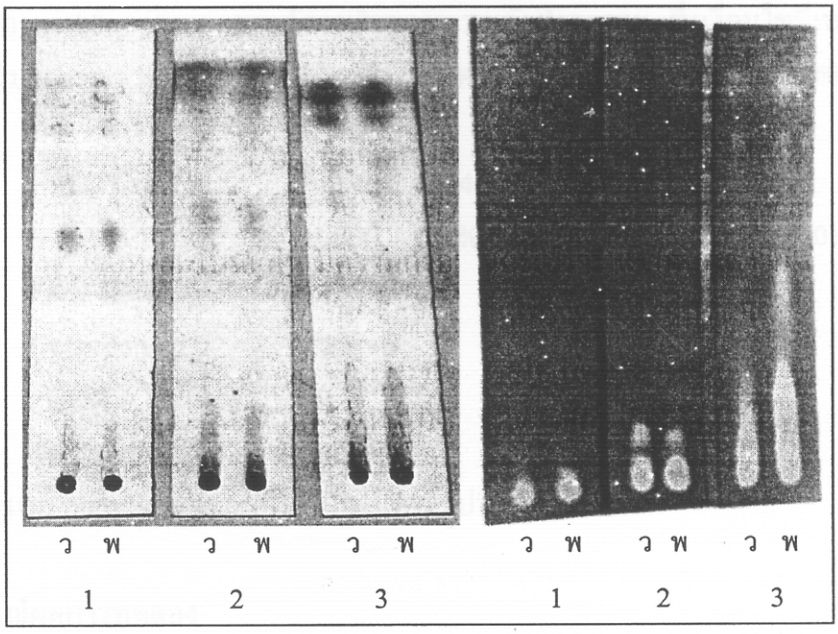
รูปที่ 4-1 ลักษณะของสารสกัดใบฝรั่งเมื่อทำให้แห้งโดยใช้ SpeedVac® (A) และ Vacuum oven (B)

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใบฝรั่งที่ได้จากการทำให้แห้งด้วยเทคนิค centrifugal evaporation ด้วยเครื่อง SpeedVac® สารสกัดใบฝรั่งที่ได้จะมีลักษณะข้น หนืดจับกันเป็นก้อนที่บริเวณก้นภาชนะที่ใส่ (รูปที่ 4-1 A) มีคุณลักษณะ และรูปลักษณ์ไม่ดี ไม่เหมาะสมในการที่จะนำไปใช้ ส่วนลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใบฝรั่งที่ทำให้แห้งจากเครื่อง vacuum oven เมื่อนำออกมาจากเครื่องจะมีลักษณะเป็นแผ่น มีความกรอบ และเปราะ แตกหักได้ง่าย จึงได้นำไปบดในโกร่งแก้วเพื่อลดขนาดอนุภาคของสารสกัดให้เล็กลง นำไปใส่ในภาชนะที่ปิดสนิทและกันแสงได้ และเก็บในที่ควบคุมความชื้น (desiccator) ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดแห้งที่ได้จากเครื่องนี้มีลักษณะที่ดีเป็นผงขนาดเล็กสามารถตัก หรือนำไปใช้งานได้ง่ายกว่าอีกวิธีหนึ่ง (รูปที่ 4-1 B)

2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Quercetin

2.1 ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์บนแผ่น TLC-chromatography (รูปที่ 4-2)



รูปที่ 4-2 TLC-profile ของสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม (ว) และพันธุ์พื้นเมือง (พ)
Mobile phase : Ethyl acetate-*n*-Hexane 3:7 (1), 1:1 (2)
Methanol-Ethyl acetate 1:9 (3)
ตรวจสอบด้วย 50% H_2SO_4 (ซ้าย) และ DPPH-solution (ขวา)

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

TLC-pattern ของสารสกัดใบฝรั่ง ได้เปรียบเทียบจำนวนสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดใบฝรั่งทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยการ spot สารบนแผ่น TLC ใช้ระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่แตกต่างจำนวน 3 ระบบเป็น mobile phase คือ Ethyl acetate - Hexane 3:7, 1:1 และ Methanol-Ethyl acetate 1:9 โดยใช้การตรวจสอบด้วยสายตา ดูภายใต้แสง UV และสเปรย์ด้วย 50% sulphuric acid in ethanol และ DPPH-reagent ซึ่งจะได้ TLC-profile ซึ่งในสารสกัดของใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์มีจำนวน spot ของสารที่เป็นองค์ประกอบเท่ากัน มีลักษณะและสีที่เกิดขึ้นของแต่ละ spot คล้ายกัน แต่ความเข้มไม่เท่ากัน ดังรูปที่ 4-2

2.2 การหา HPLC Chromatographic Condition ที่สามารถแยกสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง

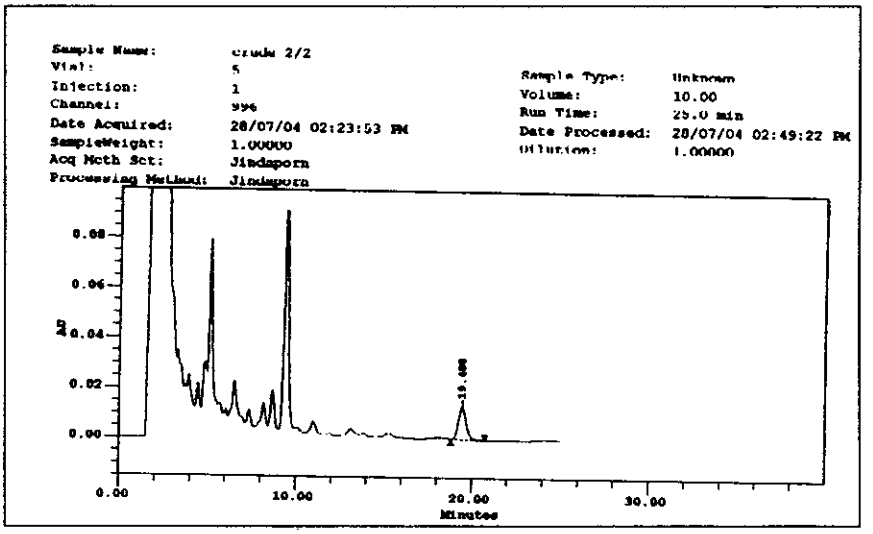
ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ซึ่งเป็นสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในใบฝรั่ง ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยการดัดแปลงจากวิธีการหาสารสำคัญดังกล่าวในสารสกัดใบแปะก๊วย โดย vary สัดส่วนของอัตราส่วนตัวทำละลาย หรือ mobile phase และอัตราเร็วของระบบตัวทำละลาย ซึ่งเงื่อนไขที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดใบฝรั่งด้วยเครื่อง HPLC หรือ HPLC-condition คือ

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	:	20 µl
Temperature	:	ambient

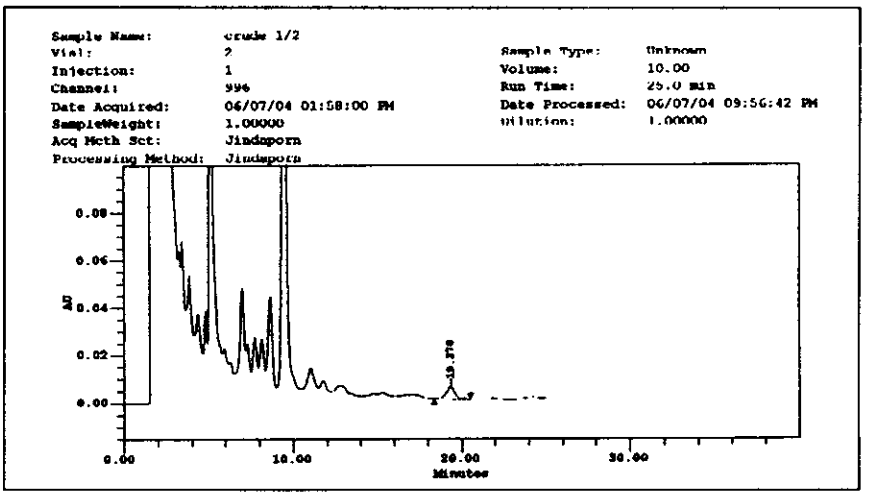
ซึ่งรูปแบบ chromatogram ที่ได้เป็นไปตามรูปที่ 4-3 – 4-5

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

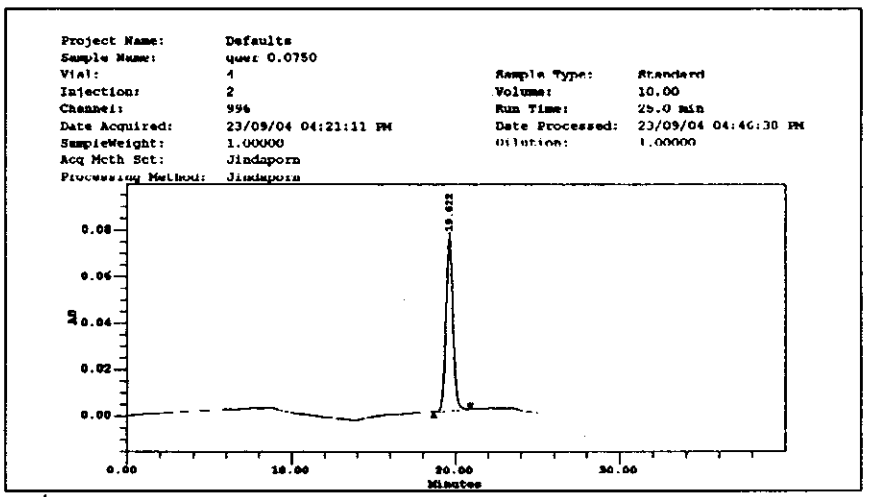
ลักษณะ chromatogram ที่ได้จะแยก peak ของสารสำคัญ quercetin ที่มีอยู่ในสารสกัดใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์ (retention time = 19.48 และ 19.37 min ตามลำดับ) ออกจากองค์ประกอบอื่นได้อย่างชัดเจน โดยนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิง (reference standard quercetin, retention time = 19.62 min) (รูปที่ 4-3 – 4-5) และรูปแบบในการดูดกลืนคลื่นแสง (absorption curve) หรือ PDA ของ peak ณ เวลาเดียวกันทั้งในสารสกัดใบฝรั่ง และสารมาตรฐานอ้างอิงมีรูปแบบที่เหมือนกัน โดยดูดกลืนคลื่นแสง 2 ความยาวคลื่นคือที่ 256.3 และ 368.7 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4-6



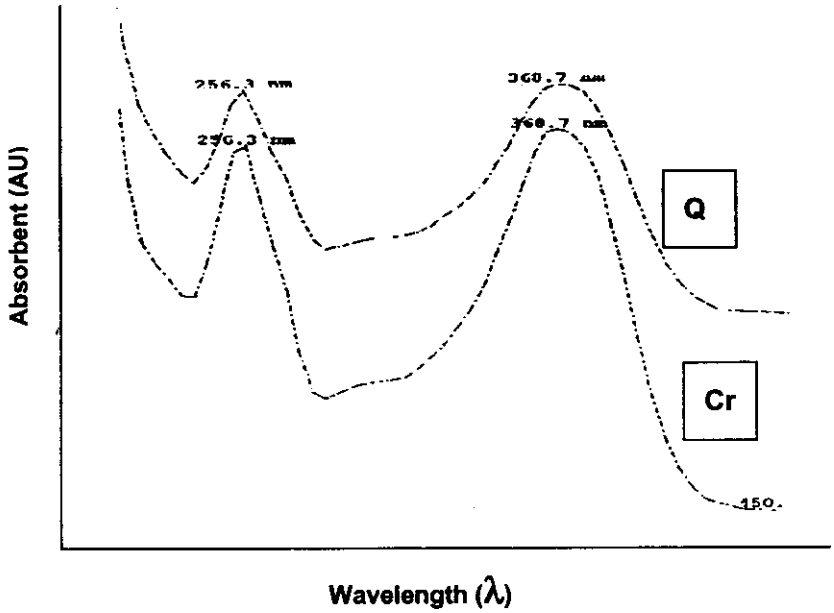
รูปที่ 4-3 Chromatogram (fingerprint) ของสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง



รูปที่ 4-4 Chromatogram (fingerprint) ของสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม



รูปที่ 4-5 Chromatogram (fingerprint) ของสารสำคัญ quercetin



รูปที่ 4-6 PDA-curve ของสารสำคัญ quercetin ในสารมาตรฐานอ้างอิง Quercetin (Q) และ สารสกัดใบฝรั่ง (Cr)

3. การตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Method Validation) ของสาร quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง

3.1 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ ผลเป็นไปตามตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ผลการตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ความเข้มข้นจริง (mg/ml)	area undercurve at λ 255 nm	ความเข้มข้นที่วัดได้ (mg/ml)	% quercetin (%RSD)
0.071 (1)	2159024	0.070651	99.51
0.071 (2)	2172564	0.071111	100.16
0.071 (3)	2223070	0.072827	102.57
Average 0.071	***2184886***	***0.071530***	***100.75 (1.61)***
0.0528 (1)	1661094	0.053737	101.77
0.0528 (2)	1665749	0.053895	102.07
0.0528 (3)	1646105	0.053228	100.81
Average 0.0528	***1657649***	***0.053620***	***101.55 (0.66)***
0.0284 (1)	921566	0.028616	100.76
0.0284 (2)	918378	0.028508	100.38
0.0284 (3)	935024	0.029074	102.37
Average 0.0284	***924989***	***0.028733***	***101.17 (1.06)***

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

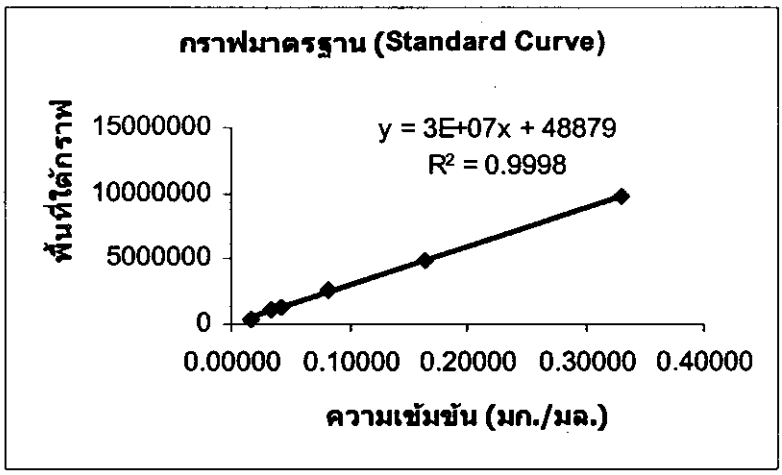
จากตารางที่ 4-1 จะได้ว่าเมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ด้วยวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้น วิเคราะห์หาปริมาณของ quercetin ที่ชั่งน้ำหนักอย่างถูกต้องแม่นยำ 0.071, 0.0520 และ 0.0284 mg/ml ได้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสารสำคัญดังกล่าวเท่ากับ 0.071530, 0.05362 และ 0.028733 mg/ml ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ย % recovery ที่แต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 100.75%, 101.55% และ 101.17% ตามลำดับ มีค่า %Relative Standard Deviation (%RSD) ที่แต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 1.61%, 0.66% และ 1.06% ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าที่ทุกช่วงความเข้มข้น มีค่า % recovery ของสารสำคัญ quercetin อยู่ระหว่าง 98-102 % และมีค่า % RSD น้อยกว่า 2% ซึ่งแสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องแม่นยำตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้

3.2 การตรวจสอบความเที่ยงตรง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

ผลการทดลองในการตรวจสอบความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ เป็นไปตามตารางที่ 4-2 และรูปที่ 4-7

ตารางที่ 4-2 กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟ (standard curve) ของสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin (mg/ml)	area undercurve at λ 255 nm (%RSD)	
	Intra-day	Inter-day
0.33000	9796951 (0.55)	10857647 (1.13)
0.16500	4918204 (0.23)	5180463 (0.59)
0.08250	2544410 (0.71)	2748974 (0.22)
0.04125	1231807 (0.51)	1308685 (0.09)
0.03300	1091115 (0.25)	1153961 (0.03)
0.01650	467439 (0.83)	445669 (2.10)



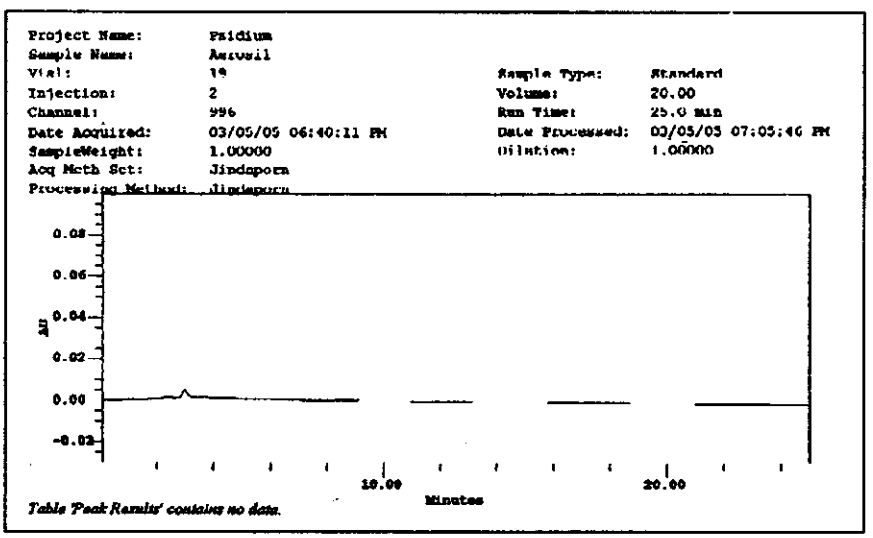
รูปที่ 4-7 กราฟมาตรฐานของ quercetin

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณ ของสารสำคัญ quercetin ซึ่งเป็นสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในใบฝรั่งที่ออกฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยการพัฒนาวิธีวิเคราะห์นี้ได้ทำการ validate วิธีการวิเคราะห์ โดยการทำ standard curve จากสารมาตรฐานอ้างอิง quercetin โดยการวิจัยนี้ได้ทำ 3 ซ้ำ ได้ทำการเปรียบเทียบในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) ซึ่งค่าที่บ่งบอกว่าในการทำซ้ำที่เที่ยงตรง (repeatability test for precision) จะต้องมีค่า relative standard deviations (%RSD) ต้องไม่มากกว่า 2 ที่เป็น inter-day และไม่มากกว่า 3 สำหรับการทดลองที่เป็น intra-day ซึ่งในการทดลองได้ค่า relative standard deviations (%RSD) ไม่เกินจากค่าที่กำหนดไว้ จึงสรุปได้ว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นมานี้มีความเที่ยงตรง

3.3 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีวิเคราะห์

ผลการทดลองการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ แสดงได้ดามรูปที่ 4-8



รูปที่ 4-8 Chromatogram ของสารดูดความชื้น Aerosil®

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

เนื่องจากในการเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง มีการเติมสารดูดความชื้นที่ใช้ทางเภสัชกรรมลงไปเพื่อเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ ทำให้มีลักษณะที่น่าใช้ โดยสารที่เติมลงไปคือ Aerosil® แล้วจึงไปทำให้แห้งโดยการใช้ vacuum oven ดังนั้นจึงจะต้องพิสูจน์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาว่าสาร Aerosil® ไม่รบกวนการวิเคราะห์ ซึ่งจากการทดลองพบว่า peak ของ Aerosil® ไม่ซ้อนทับกับ peak ของสาระสำคัญ quercetin (retention time = 19.62 min., รูปที่ 4-5) ดังแสดงในรูปที่ 4-8 ดังนั้นจาก HPLC-condition ที่ได้กำหนดไว้ แสดงถึงความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีวิเคราะห์สำหรับการวิจัยครั้งนี้

4. การหาปริมาณสารสำคัญ Quercetin และการสลายตัวของสารสำคัญในสารสกัดใบฝรั่ง

4.1 ตรวจดูลักษณะทั่วไปทางกายภาพ (Physical Appearance)

ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใบฝรั่งที่ได้จากการทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง vacuum oven มีลักษณะแห้งกรอบ เมื่อบดเป็นผงแล้วมีสีน้ำตาลเข้ม เมื่อวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องไม่นานเกิดการเยิ้มเหลวได้ง่าย (รูปที่ 4-1 B)

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ในสารสกัด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์โดยใช้วิธีการตามการทดลองในบทที่ 3 หัวข้อที่ 3.2.3 ได้ผลการหาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ quercetin ตามตารางที่ 4-3 และ รูปที่ 4-3 และ 4-4

ตารางที่ 4-3 ปริมาณสารสำคัญ quercetin ที่มีอยู่ในสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์เวียดนาม

สารสกัดใบฝรั่ง (ความเข้มข้น 20 mg/ml)	ความเข้มข้นของ quercetin (mg/ml)	% ของ quercetin ที่พบในสารสกัด
พันธุ์พื้นเมือง	0.00807306	0.000806
พันธุ์เวียดนาม	0.00168698	0.000169

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

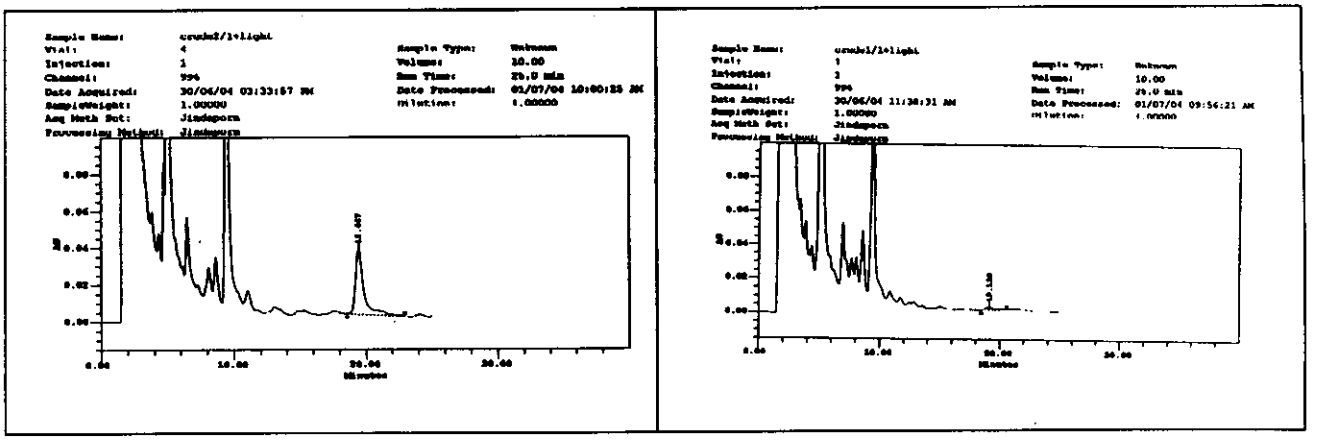
ผลการทดลองการหาปริมาณสารสำคัญ quercetin ในใบฝรั่งสองสายพันธุ์ จะได้ว่าตัวอย่างสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองมีปริมาณสารสำคัญ quercetin มากกว่าพันธุ์เวียดนามประมาณ 4.8 เท่า ดังนั้นจะได้ว่าสารสกัดจากใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองมีความน่าสนใจในการที่จะนำไปพัฒนาต่อมากกว่าสารสกัดจากใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม แต่อย่างไรก็ตามจะต้องดูความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดทั้งสองสายพันธุ์ด้วยในการทดลองข้อต่อไป

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ในสารสกัดที่สลายตัวไปในสภาวะต่าง ๆ

4.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยแสง ผลการทดลองเป็นไปตามตารางที่ 4-4 และ รูปที่ 4-9

ตารางที่ 4-4 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งเมื่อวางให้โดนแสง

สารสกัดใบฝรั่ง (ความเข้มข้น 20 mg/ml)	ความเข้มข้นของ quercetin เมื่อสารสกัดโดนแสง (mg/ml)	% ของ quercetin ในสารสกัด
พันธุ์พื้นเมือง	0.02644092	0.001322
พันธุ์เวียดนาม	0.00034936	0.000017



A B

รูปที่ 4-9 Chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งเมื่อโดนแสง

A = สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง

B = สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม

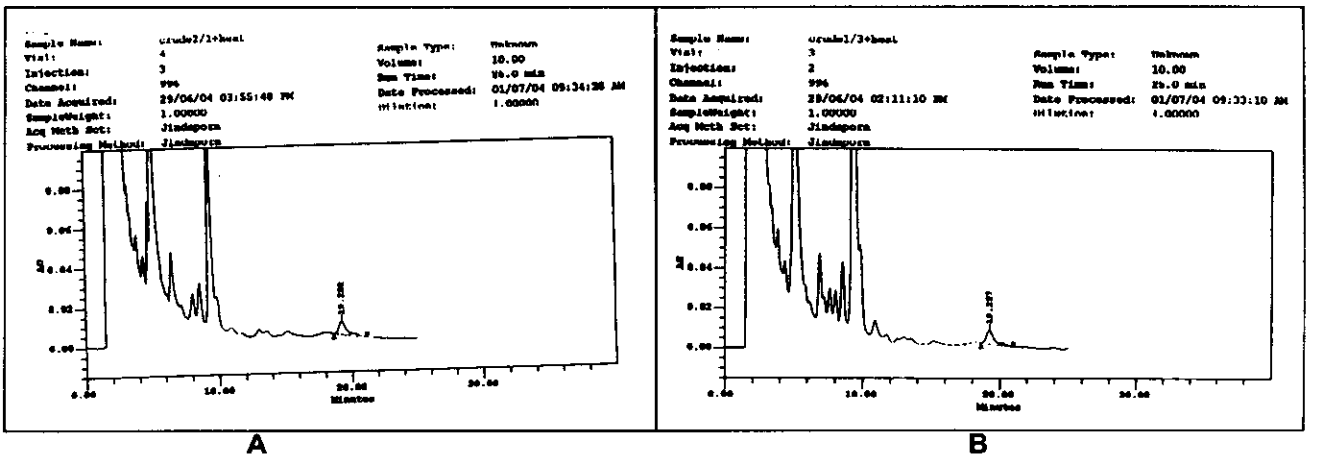
สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองจะได้ว่าสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม (ภาพ B) เมื่อวางให้ถูกแสงโดยตรงแล้วปริมาณของสารสำคัญ quercetin จะมีแนวโน้มลดลง ในขณะที่สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองจะยังคงมีปริมาณของสารสำคัญ quercetin ในปริมาณสูงอยู่ ซึ่งผลสรุปจากการทดลองนี้เป็นไปได้ว่าแสงมีผลต่อสภาพความคงตัวของสารสกัดใบฝรั่ง ดังนั้นถ้าต้องการให้สารสกัดนี้มีความคงตัวที่ดีจะต้องเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทกันแสงได้

4.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยความร้อน ผลการทดลองเป็นไปตามตารางที่ 4-5 และ รูปที่ 4-10

ตารางที่ 4-5 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งเมื่อโดนความร้อน

สารสกัดใบฝรั่ง (ความเข้มข้น 20 mg/ml)	ความเข้มข้นของ quercetin เมื่อสารสกัดโดนความร้อน (mg/ml)	% ของ quercetin ในสารสกัด
พันธุ์พื้นเมือง	0.00766154	0.000383
พันธุ์เวียดนาม	0.00447944	0.000224



A B

รูปที่ 4-10 Chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งเมื่อโดนความร้อน

A = สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง

B = สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม

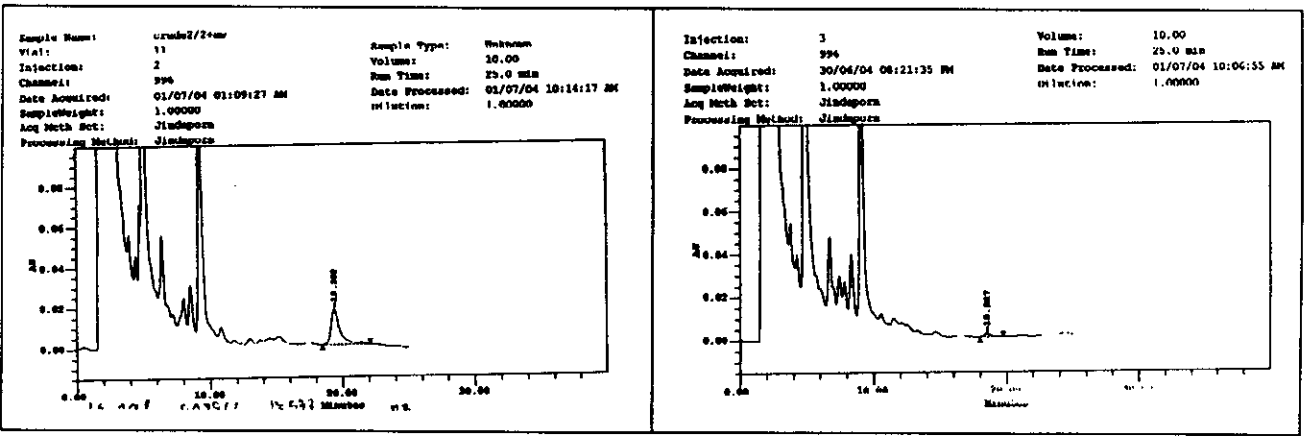
สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าทั้งสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง (ภาพ A) เมื่อโดนความร้อนสูงที่ 100 องศาเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจะเห็นว่าปริมาณของสารสำคัญ quercetin จะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งในสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนามปริมาณของสารสำคัญ quercetin มีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าความร้อนมีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดใบฝรั่ง ดังนั้นในการเก็บรักษาจึงควรจะต้องเก็บสารสกัดนี้ไม่ให้โดนความร้อนโดยตรง

4.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยความชื้น ผลการทดลองเป็นไปตามตารางที่ 4-6 และ รูปที่ 4-11

ตารางที่ 4-6 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งเมื่อวางภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ 75%

สารสกัดใบฝรั่ง (ความเข้มข้น 20 mg/ml)	ความเข้มข้นของ quercetin เมื่อวางสารสกัดในความชื้น (mg/ml)	% ของ quercetin ในสารสกัด
พันธุ์พื้นเมือง	0.01609708	0.000805
พันธุ์เวียดนาม	0.00068855	0.000034



A B

รูปที่ 4-11 Chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งเมื่อวางภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ 75%

A = สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง

B = สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม

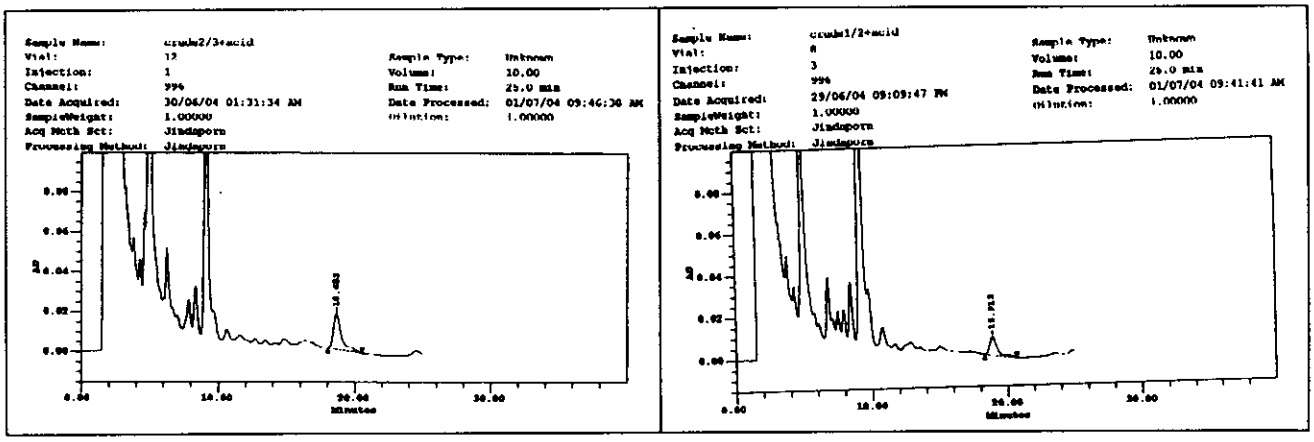
สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลอง จะได้ว่าสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม (ภาพ B) เมื่อวางภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ 75% ปริมาณของสารสำคัญ quercetin จะมีลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน แต่สำหรับสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองมีการเปลี่ยนแปลงมีปริมาณของสารสำคัญ quercetin ไม่มากนัก ดังนั้นความชื้นมีผลต่อสภาพความคงตัวของสารสกัดใบฝรั่ง ดังนั้นในการเก็บสารสกัดใบฝรั่งให้มีความคงตัวที่ดีจะต้องเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทที่สามารถกันความชื้นได้ และเก็บในสถานที่แห้ง หรือเก็บในตู้ควบคุมความชื้น

4.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ของสารสกัดใบฝรั่งใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยกรด ผลการทดลองเป็นไปตามตารางที่ 4-7 และ รูปที่ 4-11

ตารางที่ 4-7 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด

สารสกัดใบฝรั่ง (ความเข้มข้น 20 mg/ml)	ความเข้มข้นของ quercetin เมื่อสารสกัดโดนกรด (mg/ml)	% ของ quercetin ในสารสกัด
พันธุ์พื้นเมือง	0.01571230	0.000786
พันธุ์เวียดนาม	0.00592869	0.000296



A B

รูปที่ 4-12 Chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด

A = สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง

B = สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

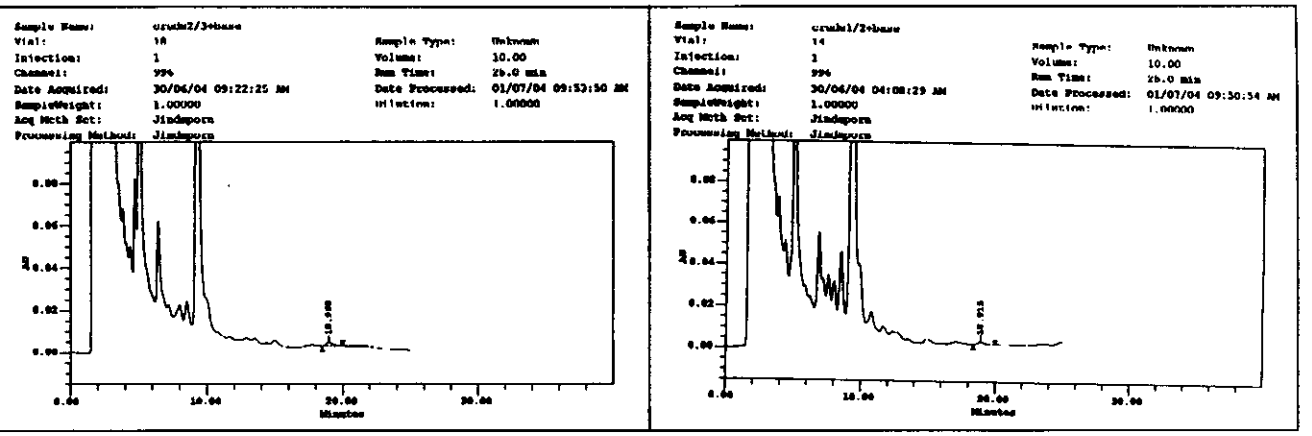
ผลการทดลองเมื่อสารสกัดใบฝรั่งอยู่ในสภาพที่เป็นกรด (0.1 M HCl) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้ว่าสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม (ภาพ B) มีปริมาณของสารสำคัญ quercetin จะมีเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งก็อาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากมีรายงานว่าในใบฝรั่งมีสารสำคัญ quercetin glycoside อยู่ ซึ่งเมื่ออยู่ในสภาพกรดก็อาจเกิดขบวนการ hydrolysis ขึ้นได้ทำให้ปริมาณสารสำคัญ quercetin สูงขึ้น แต่อย่างไรผลดังกล่าวแสดงไม่ชัดในสำหรับสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง อย่างไรก็ตามในการเก็บรักษาเพื่อให้สารสกัดมีความคงตัวที่ดี จะต้องหลีกเลี่ยงในการเก็บสารสกัดร่วมกับสารอื่นที่มีคุณสมบัติเป็นกรด

4.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ของสารสกัดใบฝรั่งใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยด่าง ผลการทดลองเป็นไปตามตารางที่ 4-8 และ รูปที่ 4-12

ตารางที่ 4-8 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง

สารสกัดใบฝรั่ง (ความเข้มข้น 20 mg/ml)	ความเข้มข้นของ quercetin เมื่อสารสกัดโดนด่าง (mg/ml)	% ของ quercetin ในสารสกัด
พันธุ์พื้นเมือง	0.00022992	0.000011
พันธุ์เวียดนาม	N/A	N/A

หมายเหตุ : N/A = ค่าไม่อยู่ในช่วงที่วัดได้



A B

รูปที่ 4-13 Chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง

A = สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง

B = สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนาม

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

สำหรับผลการทดลองเมื่อนำสารสกัดใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์มาอยู่ในสภาพที่เป็นด่าง (0.1 M NaOH) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเช่นเดียวกับในสภาวะที่เป็นกรด พบว่าสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดทั้งสองสายพันธุ์ลดลงไปอย่างชัดเจน โดยที่สารสกัดใบฝรั่งพันธุ์เวียดนามนั้นสารสำคัญได้สลายตัวไปจนไม่สามารถวัดหาปริมาณสารสำคัญ quercetin เนื่องจากพื้นที่ใต้กราฟมีค่าน้อย และไม่อยู่ในช่วงที่วัดได้ สำหรับสารสกัดใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองสารสามารถวัดหาปริมาณสาร quercetin ได้เพียงในปริมาณที่เล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกันในสภาวะปกติ จะได้ว่าในสภาวะที่เป็นด่างจะมีผลต่อการสลายตัวของ quercetin ดังนั้นในการเก็บสารสกัดใบฝรั่งจะต้องไม่เก็บร่วมกับสารอื่นที่มีฤทธิ์ หรือคุณสมบัติเป็นด่าง

เมื่อนำผลการทดลองการทดสอบความคงตัวของสารสกัดในสภาวะต่าง ๆ มาหาปริมาณของสารสำคัญ quercetin ที่มีอยู่สารสกัดใบฝรั่ง แสดงได้ตามตารางที่ 4-9

ตารางที่ 4-9 สรุปผลการทดสอบความคงตัวในสภาวะต่าง ๆ ของสารสกัดใบฝรั่ง

การศึกษาความคงตัวเบื้องต้น ของสารสกัดใบฝรั่ง (ความเข้มข้น 20 mg/ml)	% ของ Quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง	
	พันธุ์พื้นเมือง	พันธุ์เวียดนาม
กลุ่มควบคุม (control group)	0.001612	0.000338
4.1 แสง	0.001322	0.000017
4.2 ความชื้น	0.000805	0.000034
4.3 ความร้อน	0.000383	0.000224
4.4 กรด	0.000786	0.000296
4.5 ด่าง	0.000011	N/A

จากตารางที่ 4-9 ผลการทดสอบความคงตัวในสภาวะต่าง ๆ ของสารสกัดจะได้ว่า แสง ความชื้น ความร้อน ความเป็นกรด – ด่าง มีผลต่อปริมาณของสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งที่เตรียมได้ ดังนั้นในการนำสารสกัดนี้ไปใช้ก็ควรที่จะมีการพัฒนาสูตรตำรับเพื่อผลิตภัณฑ์มีความคงตัวมากขึ้น อันจะส่งผลให้ให้มีปริมาณของสารสำคัญ quercetin อยู่ในผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น

5. ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ของ quercetin และสารสกัดของใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์ ดังตารางที่ 4-10 และ 4-11

ตารางที่ 4-10 ค่า % inhibition และ EC_{50} ของ quercetin

Sample	concentration (µg/ml)	% inhibition			mean ± SD
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
Quercetin	3.00	97.95	101.37	97.26	98.86 ± 2.20
	2.00	91.78	90.41	85.62	89.27 ± 3.24
	1.00	59.59	63.01	57.53	60.05 ± 2.77
	0.50	40.41	40.41	39.90	40.28 ± 0.26
EC_{50} ; r^2	0.78 ; 0.9937				

ตารางที่ 4-11 ค่า % inhibition และ EC_{50} ของสารสกัดใบฝรั่ง 2 สายพันธุ์

ตัวอย่างสารสกัด	concentration (µg/ml)	% inhibition			mean ± SD
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
พันธุ์พื้นเมือง	6.25	68.84	66.78	66.10	67.24 ± 1.43
	3.12	48.97	52.40	45.55	48.97 ± 3.42
	1.56	40.41	40.41	38.36	39.73 ± 1.19
EC_{50} ; r^2	3.31 ; 1				
พันธุ์เวียดนาม	6.40	65.41	72.26	66.10	67.92 ± 3.77
	3.20	37.67	41.78	33.56	37.67 ± 4.11
	1.60	24.32	27.05	21.58	24.32 ± 2.74
EC_{50} ; r^2	4.48 ; 0.9991				

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

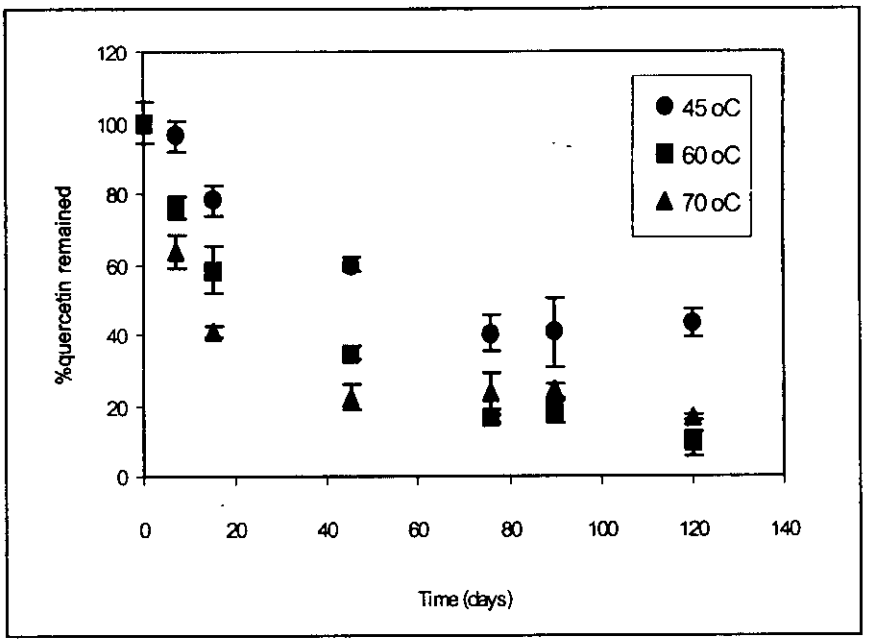
จากผลการทดลองตามตารางที่ 4-10 และ 4-11 จะได้ว่าสารมาตรฐาน quercetin มีค่า EC_{50} ในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยทำปฏิกิริยากับ DPPH เท่ากับ 0.78 µg/ml (r^2 = 0.9937) ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดของใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์พื้นเมืองมีค่า EC_{50} 3.31 µg/ml

และสายพันธุ์เวียดนามมีค่า EC_{50} 4.48 μg/ml ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดใบฝรั่งสายพันธุ์พื้นเมืองมีมากกว่าสายพันธุ์เวียดนาม แต่อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวมีความต่างกันไม่มากนักเพียง 1 μg/ml เท่านั้น

6. การศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบฝรั่ง

6.1 การหาปริมาณสารสำคัญ quercetin

จากผลการทดลองพบว่าการสลายตัวของสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งซึ่งมีสภาพเป็นผงแห้งมีลักษณะเป็น sigmoidal curve ที่อุณหภูมิ 60 และ 70°C ดังแสดงในรูปที่ 4-14 กล่าวคือการสลายตัวของสารสำคัญ quercetin จะเกิดเร็วมากในช่วงต้นของ profiles จากนั้นระดับของสารสำคัญ quercetin จะค่อนข้างคงที่ในช่วงเวลาหนึ่ง และเกิดการสลายตัวอีกครั้งในช่วงหลังด้วยอัตราเร็วที่ช้ากว่า แต่อย่างไรก็ตามลักษณะช่วงหลังของรูปแบบการสลายตัว (profile) ดังกล่าวนี้ จะไม่เห็นที่ อุณหภูมิ 45°C ในระยะเวลา 120 วัน

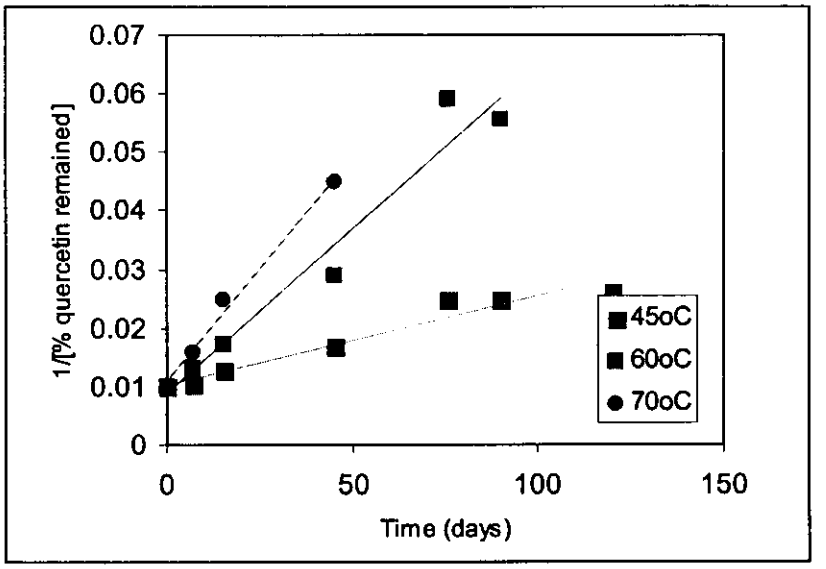


รูปที่ 4-14 Stability profiles ของ quercetin ในผงแห้งของสารสกัดใบฝรั่งซึ่งเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความชื้นสัมพัทธ์ 75%

ลักษณะของ stability profiles ข้างต้น แสดงให้เห็นกลไกการสลายตัวที่ค่อนข้างซับซ้อน ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดใบฝรั่งที่นำมาศึกษามีลักษณะเป็นของแข็ง และเป็น heterogeneous system กล่าวคือประกอบด้วยสารหลายชนิด ซึ่งอาจมีผลต่อการสลายตัวของ quercetin นอกจากนี้ลักษณะการสลายตัวที่แยกเป็น 2 phases ชัดเจน (ที่อุณหภูมิ 60 และ 70°C) อาจแสดงให้เห็นถึงการสลายตัวของสารบนพื้นผิวซึ่งสัมผัสกับความชื้นก่อนที่จะเกิดการสลายตัวของสารซึ่งอยู่ภายใน หรืออาจมีการเปลี่ยนแปลง conformation หรือสถานะของสารที่ศึกษา ในสภาวะที่ศึกษา อย่างไรก็ตาม

จากลักษณะของรูปแบบการสลายตัวหรือ profile ที่คล้ายคลึงกันนี้ อาจทำให้สามารถกำหนดสมมุติฐานในเบื้องต้นได้ว่าสารสำคัญ quercetin มีรูปแบบหรือกลไกการสลายตัวเหมือนกันในทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษานี้

จากข้อมูลข้างต้น หากพิจารณาเฉพาะการสลายตัวในช่วงแรก (initial phase) ก่อนถึงสมดุลของ profiles จะพบว่า จลนศาสตร์ (kinetic) ของการสลายตัวของ quercetin ในผงแห้งของสารสกัดใบฝรั่งสามารถอธิบายได้ด้วยปฏิกิริยาอันดับสอง (apparent second-order kinetics) กล่าวคือเมื่อ plot ระหว่าง เวลา และ ส่วนกลับของเปอร์เซ็นที่เหลืออยู่ของ quercetin ในสารสกัด จะได้เส้นตรงในทุกสภาวะที่ศึกษา (r^2 = 0.95 - 0.99) ดังแสดงในรูปที่ 4-15 และสามารถคำนวณค่าคงที่ของการสลายตัวที่อุณหภูมิต่างๆ ตามค่าที่แสดงในตารางที่ 4-12

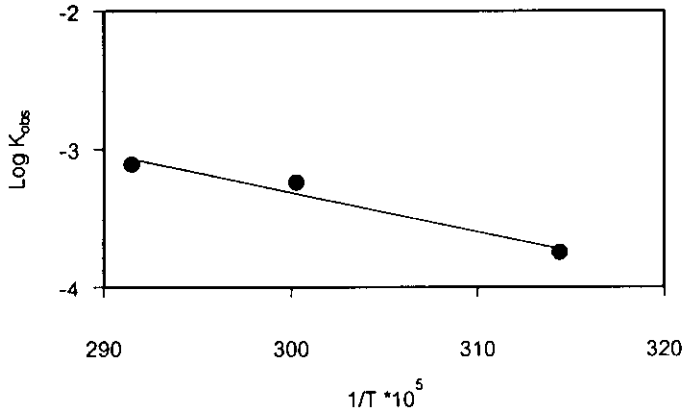


รูปที่ 4-15 Second-order kinetic plots ของการสลายตัวในช่วงแรกของสารสำคัญ quercetin ในผงแห้งของสารสกัดใบฝรั่ง เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความชื้นสัมพัทธ์ 75%

ตารางที่ 4-12 ค่า observed apparent second-order rate constant (k_{obs}) ของการสลายตัวของสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง (คำนวณจาก linear regression fit ของกราฟในรูปที่ 4-15)

อุณหภูมิ (°C)	สารสกัดใบฝรั่ง	
	K_{obs} $(mg\%day)^{-1}$	r^2
45	0.000178	0.9776
60	0.000562	0.9518
70	0.000771	0.9913

ผลของอุณหภูมิต่อค่าคงที่ของการสลายตัวของสารสำคัญ quercetin ในผงแห้งของสารสกัดใบฝรั่งแสดงโดย Arrhenius plot ดังแสดงในรูปที่ 4-16 โดยมี energy of activation เท่ากับ 13.05 kcal/mole



รูปที่ 4-16 ความสัมพันธ์ระหว่าง log K_{obs} และ 1/T ของการสลายตัวในช่วงแรกของ quercetin ในผงแห้งของสารสกัดใบฝรั่ง
(least squares fit: Log k_{obs} = -2853.9(1/T) + 5.2505 , r^2 0.9673)

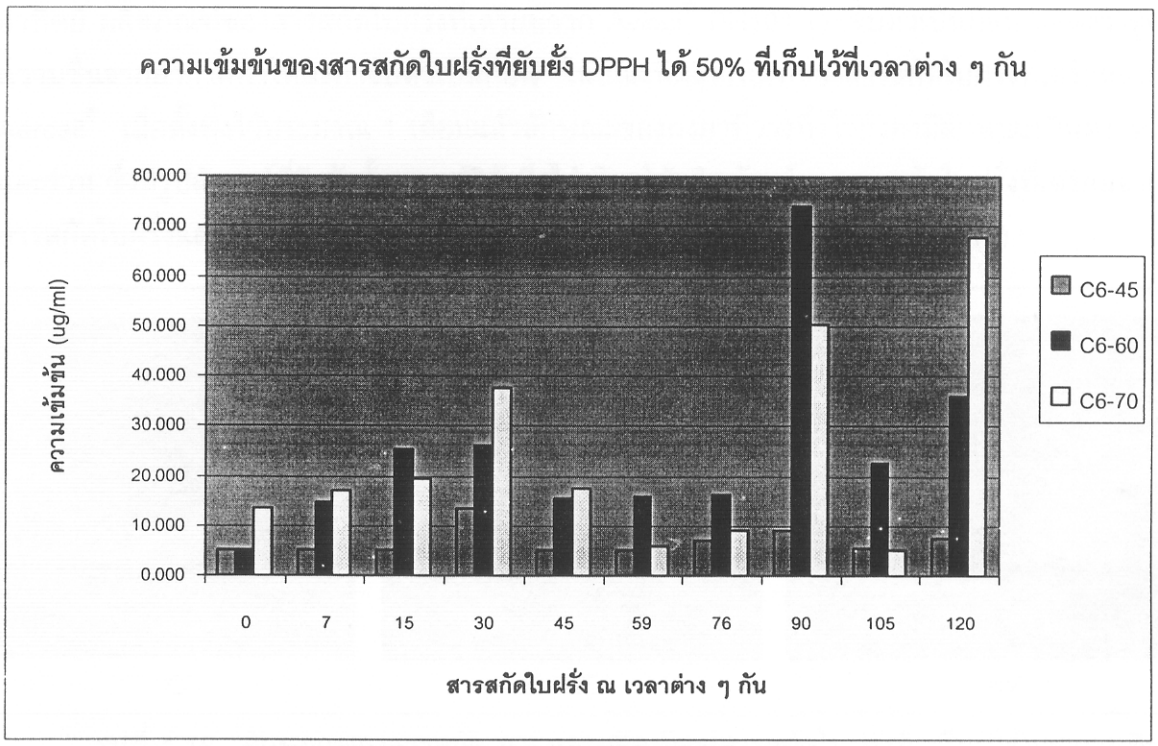
และการ extrapolate จะสามารถคำนวณค่าคงที่การสลายตัวของ quercetin ที่ อุณหภูมิ 25°C ได้เท่ากับ 4.72 x 10^{-5} (mg% day)$^{-1}$ เนื่องจากในกรณีของ apparent second-order kinetics การคำนวณอายุครึ่งชีวิตของสารสำคัญ นอกจากจะขึ้นกับค่าคงที่การสลายตัวที่อุณหภูมินั้นๆ แล้ว ยังขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้น (a) ของสารสำคัญด้วย ($t_{1/2}$ = 1/aK_{obs})

6.2 ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ของสารสกัดใบฝรั่ง
ผลการทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันแสดงตามตารางที่ 4-13 และรูปที่ 4-17

ตารางที่ 4-13 ค่า % inhibition และ EC_{50} ของสารสกัดใบฝรั่งที่นำไปวางที่อุณหภูมิ 45, 60 และ 70 °C ความชื้นสัมพันธ์ 75% ณ เวลาต่าง ๆ กัน

อุณหภูมิ (°C)	ความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่ง (µg/ml) ที่มีค่า EC_{50} เก็บไว้ที่เวลาต่าง ๆ กัน (วัน)									
	0	7	15	30	45	59	76	90	105	120
45	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	7.132	9.031	5.462	7.415
60	5.000	14.791	25.378	26.055	15.509	15.847	16.151	74.170	22.491	35.917
70	13.540	16.849	19.389	37.527	17.433	5.949	9.228	50.230	5.000	67.612

หมายเหตุ : ใช้ BHT เป็น positive control มีค่า EC_{50} เท่ากับ 19.92 (µg/ml)



รูปที่ 4-17 ความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่งที่อุณหภูมิต่างกัน ในเวลาต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ EC_{50}

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

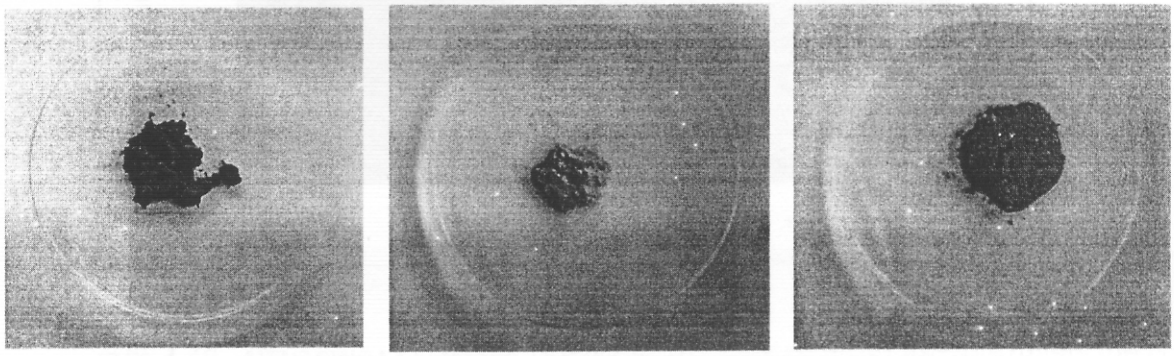
จากผลการทดลองหาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของของสารสกัดใบฝรั่งที่นำไปเก็บไว้ในสภาวะเร่ง (ที่อุณหภูมิ 45, 60 และ 70 °C และมีความชื้นสัมพัทธ์ 75%) เป็นเวลา 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 วัน ตามลำดับ จะได้ว่าที่อุณหภูมิ 45 °C เมื่อวางทิ้งไว้เป็นเวลา 3 เดือน ฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดคงยังคงอยู่ (ซึ่งมีค่า EC_{50} น้อยกว่า 5 μg/ml) และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดใบฝรั่งที่นำไปวางที่อุณหภูมิ 60 และ 70 °C มีแนวโน้มว่าฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4-13 ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจมีการสลายตัวของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในสารสกัดจึงส่งผลให้ฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันลดลง

7. การเตรียมสารสกัดใบฝรั่งให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับสัตว์

7.1 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากสารสกัดใบฝรั่ง

จากการเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง ได้ผลิตภัณฑ์สารสกัดของใบฝรั่ง 2 ผลิตภัณฑ์ ซึ่งเตรียมได้โดยใช้สารดูดความชื้นเพื่อเพิ่มความคงตัวของสารสกัด โดยสารดูดความชื้นที่นำมาใช้คือ Avicel® PH101 และ Aerosil® ซึ่งทั้งสองผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นแผ่นสีน้ำตาล (ใช้เครื่อง vacuum oven) เมื่อแห้งดีแล้วนำมาบดเป็นผง ลักษณะของผงที่ได้มีความละเอียด ร่วน มีสีน้ำตาลไม่เข้มมากเหมือนกับสารสกัดใบฝรั่ง เมื่อนำมาตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 2

อาทิตย์ ผลิตภัณฑ์ของสารสกัดใบฝรั่งที่เตรียมจาก Avicel® PH101 เริ่มจับตัวเป็นก้อน แสดงว่าดูดความชื้นจากอากาศทำให้ผงยาจับตัวเป็นก้อน ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ของสารสกัดใบฝรั่งที่เตรียมจาก Aerosil® เมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 เดือนแล้วลักษณะของผงยาที่วางทิ้งไว้ยังคงมีลักษณะเป็นผงแห้งและร่วน ซึ่งมีรูปลักษณ์ที่ดี ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ผลิตภัณฑ์ของสารสกัดใบฝรั่งที่เตรียมจากสารสกัดใบฝรั่งและสารช่วยดูดความชื้น Aerosil® ในปริมาณ 3.35% w/w (รูปที่ 4-18)



รูปที่ 4-18 ลักษณะของสารสกัด (C) และผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่งที่เตรียมได้จากการเติม Aerosil® (AE) และ Avicel® PH101 (AV)

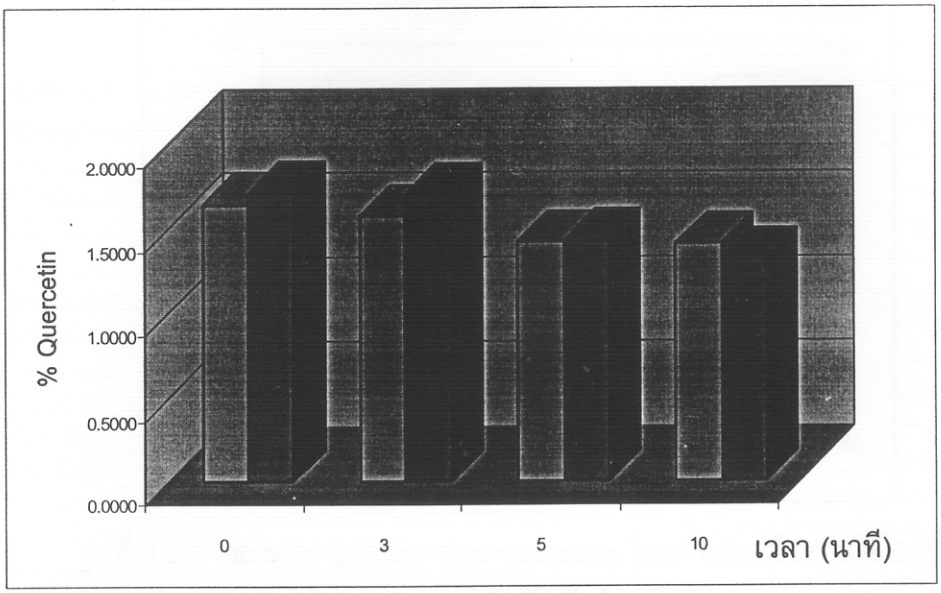
8. การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง

8.1 การหาปริมาณสารสำคัญ quercetin จากผลิตภัณฑ์สารสกัด

1. เมื่อนำผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง ไปผ่านความร้อนสูงประมาณ 100 °C เป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที ตามลำดับ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4-14 และรูปที่ 4-19

ตารางที่ 4-14 ปริมาณของ quercetin ในสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากใบฝรั่งที่ผ่านความร้อน 100 °C ในเวลาต่าง ๆ กัน

ตัวอย่าง	เวลาที่ให้ความร้อน (นาที)	% ของ quercetin ในสารสกัด	คิดเป็น %
สารสกัดใบฝรั่ง (conc. 4 mg/ml)	0	1.64	100.00
	3	1.57	95.54
	5	1.41	86.15
	10	1.40	85.14
ผลิตภัณฑ์จากใบฝรั่ง (conc. 4 mg/ml)	0	1.71	100.00
	3	1.69	99.44
	5	1.42	83.38
	10	1.31	77.06



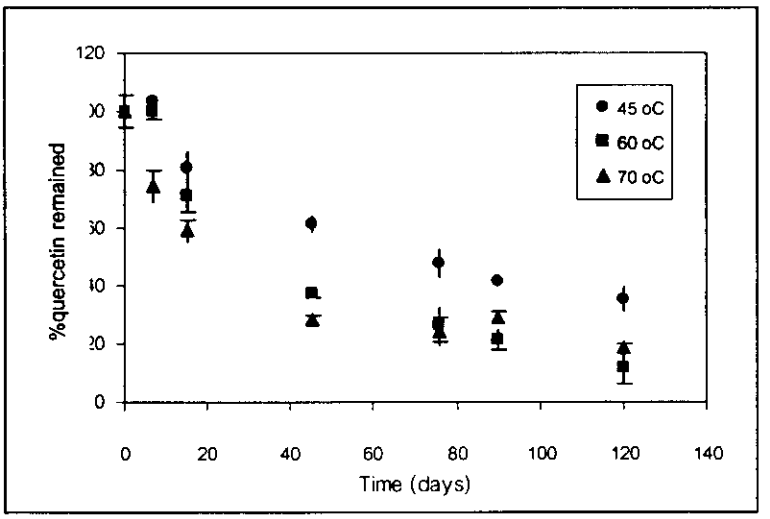
รูปที่ 4-19 ปริมาณของ Quercetin ในสารสกัด (กราฟแท่งซ้ายมือ) และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง (กราฟแท่งขวามือ) เมื่อให้ความร้อนสูงเป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

ในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์สำเร็จรูปจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์ กระบวนการสุดท้ายในการผลิตอาหารสัตว์เป็นเม็ดจะต้องให้ความร้อนสูงเป็นเวลา 3 นาที ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเลียนแบบกระบวนการดังกล่าวโดยนำเอาสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งไปให้ความร้อนสูง (ประมาณ 100 °C) ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน (3, 5 และ 10 นาที ตามลำดับ) แล้วนำไปหาปริมาณของสารสำคัญ quercetin จะได้ว่าปริมาณของสารสำคัญ quercetin จะลดลงเมื่ออยู่ในความร้อนสูงเป็นเวลานาน แต่ในขบวนการผลิตซึ่งใช้ความร้อนเพียง 3 นาทีไม่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญในสารสกัด หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารสกัดใบฝรั่งมากนักจะเห็นว่ามีปริมาณของสารสำคัญเหลืออยู่ 95.54 และ 99.44% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบเวลาเริ่มต้น

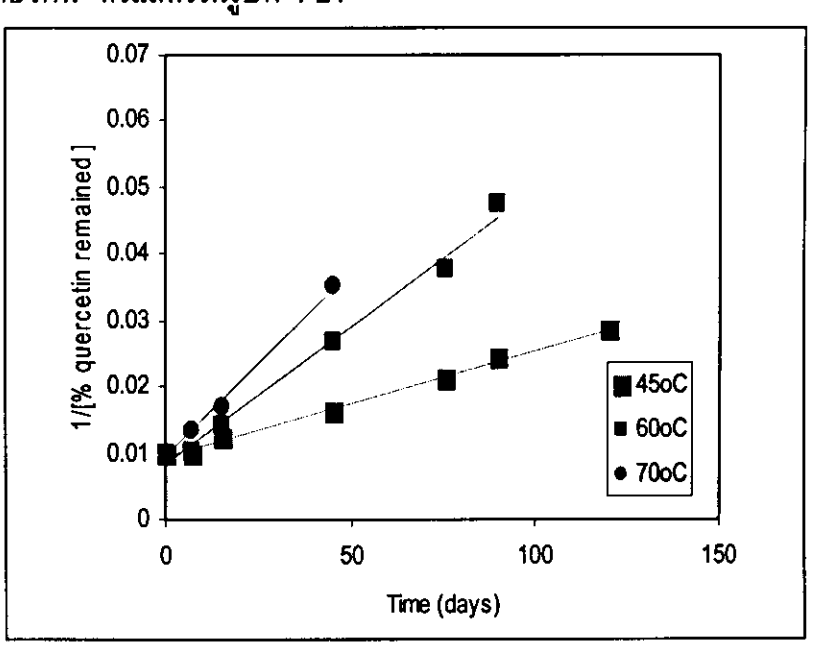
2. ผลของความคงตัวของผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่งเมื่ออยู่ในสภาวะเร่ง (เก็บที่อุณหภูมิ 45, 60 และ 70 °C และมีความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 วัน ตามลำดับ)

ในกรณีของผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง ซึ่งเตรียมในรูปผงแห้งโดยมีสารดูดความชื้นผสมเพื่อ*เพิ่มความคงตัวทางกายภาพของสารสกัด เมื่อทำการศึกษาความคงตัวในสภาวะเดียวกับสารสกัดใบฝรั่ง พบว่าจะได้ stability profiles ที่มีลักษณะคล้ายกัน ดังแสดงในรูปที่ 4-20*



รูปที่ 4-20 stability profiles ของ quercetin ในผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความชื้นสัมพัทธ์ 75%

และเมื่อพิจารณาการสลายตัวในช่วงแรก (initial phase) ของ profiles พบว่า จลนศาสตร์ (kinetic) ของการสลายตัวของ quercetin ในผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง มีลักษณะเป็นปฏิกิริยาอันดับสองเช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4-21



รูปที่ 4-21 Second-order kinetic plots ของการสลายตัวในช่วงแรกของ quercetin ในผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ความชื้นสัมพัทธ์ 75%

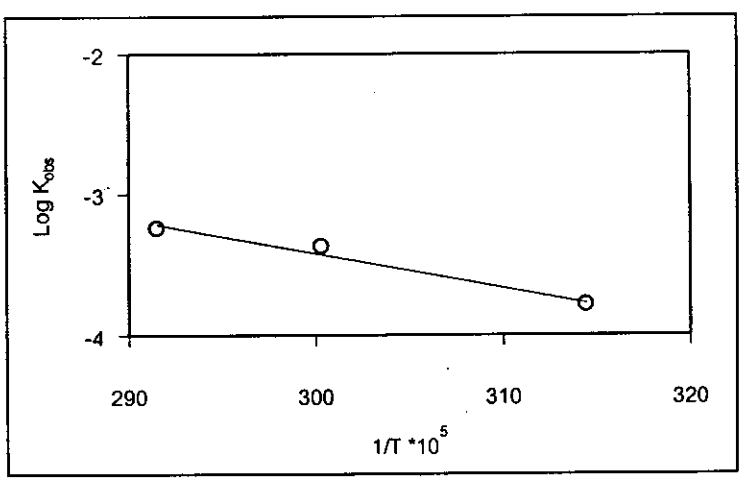
จากกราฟในรูปที่ 4-20 และ 4-21 จะเห็น lag time ของการสลายตัวของ quercetin ในผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง ที่อุณหภูมิ 45 และ 60°C กล่าวคือการสลายตัวจะเกิดขึ้นน้อยมากในช่วง 7 วันแรก แต่จะไม่พบในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (70°C) และไม่พบในกรณีของผงแห้งของสารสกัดใบฝรั่งเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลจากสารดูดความชื้น (Aerosil®) ที่เติมลงในผลิตภัณฑ์ของสาร

สกัดใบฝรั่ง ซึ่งจะสามารถป้องกันการสลายตัวของสารได้ช่วงแรก หรืออาจป้องกันสารสำคัญ quercetin จากสภาวะเร่งภายนอกได้ระดับหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามหลังจากช่วง lag time พบว่าเกิดการสลายตัวของสารสำคัญ quercetin เช่นเดียวกับในของสารสกัดใบฝรั่ง โดยมีค่าคงที่ของการสลายตัวของสารสำคัญที่อุณหภูมิต่างๆ แสดงในตารางที่ 4-15

ตารางที่ 4-15 ค่า observed apparent second-order rate constant (k_{obs}) ของการสลายตัวของ quercetin ในผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง
(คำนวณจาก linear regression fit ของกราฟในรูปที่ 4-21)

อุณหภูมิ (°C)	สารสกัดใบฝรั่ง	
	K_{obs} $(mg\%day)^{-1}$	r^2
45	0.000163	0.9947
60	0.000429	0.9931
70	0.000569	0.9962

ในทำนองเดียวกันผลของอุณหภูมิต่อค่าคงที่ของการสลายตัวของสารสำคัญ quercetin ในผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง โดยการทำ Arrhenius plot แสดงได้ในรูปที่ 4-22 โดยสามารถคำนวณค่า energy of activation เท่ากับ 11.09 kcal/mole



รูปที่ 4-22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log K_{obs} และ 1/T ของการสลายตัวในช่วงแรกของ quercetin ในผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง
(Least squares fit: Log k_{obs} = -2424.3(1/T) + 3.8569, r^2 0.9711)

เมื่อ extrapolate ไปที่ อุณหภูมิ 25°C สามารถคำนวณค่าคงที่การสลายตัวของสารสำคัญ quercetin ได้เท่ากับ 5.27 x 10^{-5} $(mg\%\ day)^{-1}$ และในทำนองเดียวกัน จะอายุครึ่งชีวิตหรือ half-life ของ quercetin ในผลิตภัณฑ์ได้ จะขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสำคัญในผลิตภัณฑ์

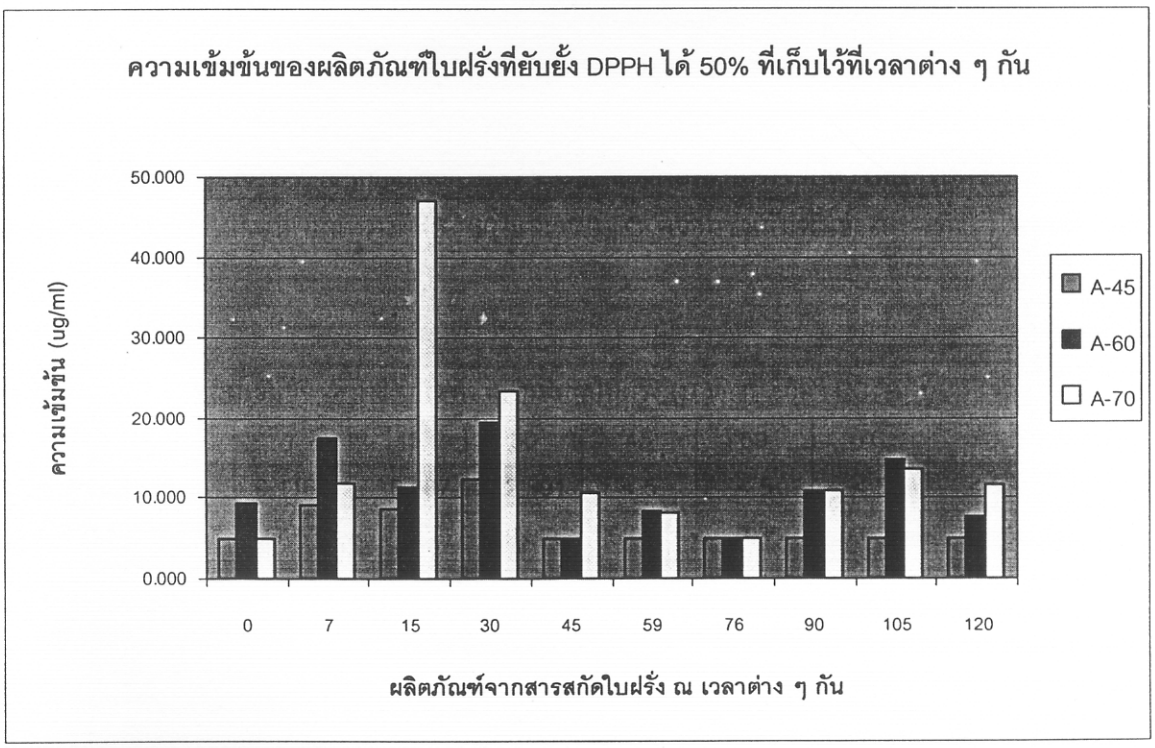
8.2 ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ของผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันแสดงตามตารางที่ 4-16 และรูปที่ 4-23

ตารางที่ 4-16 ค่า % inhibition และ EC_{50} ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งที่นำไปวางไว้ ณ อุณหภูมิ 45, 60 และ 70 °C ความชื้นสัมพันธ์ 75% ทิ้งไว้ในเวลาต่าง ๆ กัน

ผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ (องศา)	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง (μg/ml) ที่มีค่า EC_{50} เก็บไว้ที่เวลาต่าง ๆ กัน (นาที)									
	0	7	15	30	45	59	76	90	105	120
45	< 5	9.1165	8.687	12.391	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
60	9.460	17.539	11.345	19.376	5.000	8.388	5.000	10.958	14.672	7.730
70	< 5	11.900	47.156	23.439	10.527	8.192	5.000	10.919	13.590	11.461

หมายเหตุ : ใช้ BHT เป็น positive control มีค่า EC_{50} เท่ากับ 19.92 (μg/ml)



รูปที่ 4-23 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งที่อุณหภูมิต่างกัน ในเวลาต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ EC_{50}

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

การหาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งที่นำไปเก็บไว้ในสภาวะเร่ง (ที่อุณหภูมิ 45, 60 และ 70 °C และมีความชื้นสัมพัทธ์ 75%) เป็นเวลา 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 วัน ตามลำดับ จะได้ว่าที่สภาวะต่าง ๆ ของการทดลอง ฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่งคงยังคงอยู่ โดยส่วนใหญ่แล้วจะมีค่า EC_{50} น้อยกว่า 5 μg/ml และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันกับสารสกัดใบฝรั่งในข้อ 6.2 แล้วจะได้ว่าผลิตภัณฑ์ของสารสกัดใบฝรั่งที่เตรียมในการวิจัยครั้งนี้เมื่อเก็บไว้ในสภาวะเร่งแล้วยังคงมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันดีกว่าสารสกัดใบฝรั่งที่เก็บในสภาวะเดียวกัน (เปรียบเทียบรูปที่ 4-17 และ 4-22) ซึ่งความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากใบฝรั่งโดยส่วนใหญ่ที่มีค่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันจะอยู่ระหว่าง 10 - 20 μg/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับสารเปรียบเทียบ BHT ซึ่งในการทดลองทั่วไปจัดเป็น positive control มีค่า EC_{50} ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 19.92 μg/ml แสดงให้ทราบว่าถึงแม้ว่าฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ของสารสกัดใบฝรั่งจะลดลงแต่ยังคงมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิชันที่ดีอยู่เมื่อเทียบกับสารเปรียบเทียบ BHT