บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

การเตรียมสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดของใบฝรั่งเพื่อใช้สำหรับการผลิตสัตว์นั้น เป็นวิธีการหนึ่งของการสร้างทางเลือกในการนำสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ให้มากที่สุด ซึ่งการใช้ใบฝรั่งเพื่อการเลี้ยงสัตว์นั้นจะใช้เป็นสารเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ ทำให้สัตว์ลดความเครียดที่อยู่รวมกัน ซึ่งจะส่งผลในการลดอัตราการตายของสัตว์ โดยสารที่ช่วยเพิ่มภูมิต้านทานคือ quercetin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม Flavonoids มีฤทธิ์เป็น antioxidant ซึ่งการพัฒนาสมุนไพรเพื่อนำไปใช้นี้จำเป็นที่จะต้องทำการควบคุมคุณภาพเช่นเดียวกัน เพื่อที่จะได้ทราบว่าในแต่ละครั้งที่นำไปใช้นั้นจะได้สมุนไพรที่มีปริมาณสารที่ต้องการนั้นเท่ากันทุกครั้ง และจะต้องหาอายุของผลิตภัณฑ์เพื่อที่จะได้บ่งบอกถึงความคงตัวของสารสำคัญที่อยู่ในผลิตภัณฑ์นั้น

การวิจัยครั้งนี้เป็นการเตรียมสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญของสารสกัดใบฝรั่ง ตลอดจนการหาความคงตัวของสารสกัด และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอน และรายละเอียด ดังนี้

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

ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 0, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 วัน ตามลำดับ) เพื่อหาอายุของสารสกัด

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

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดใบฝรั่ง

1.1 เก็บใบฝรั่ง 2 สายพันธุ์คือพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์เวียดนาม นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ 3 ครั้งจากนั้นนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำเข้าตู้อบ อบที่อุณหภูมิประมาณ 40-45 °C เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

1.2 นำใบฝรั่งที่แห้งดีแล้วไปทำการบดให้เป็นผงหยาบ

1.3 นำผงใบฝรั่งที่ได้ทั้งสองสายพันธุ์ไปทำการหมัก หรือแช่ในตัวทำละลายของ 50% ethanol in DI-water โดยเติมตัวทำละลายให้ท่วมผงของใบฝรั่ง เป็นเวลา 3 วัน

1.4 เมื่อครบกำหนดให้นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง กากของผงใบฝรั่งนำกลับไปหมักซ้ำด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมอีก 3 ครั้ง

1.5 นำสารละลายที่กรองได้จากข้อ 1.4 ไประเหยด้วยวิธีการลดความดัน (rotary evaporation, 40 °C, 120 mbar) พยายามระเหยให้ตัวทำละลายออกไปให้มากที่สุด จากนั้นนำไปทำให้แห้งในขั้นตอนสุดท้ายด้วยเครื่อง centrifugal evaporation (SpeedVac®) หรือเครื่อง vacuum oven ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่ได้

1.6 ชั่งสารสกัดที่ได้นำไปคำนวณหา %yield เมื่อเทียบกับน้ำหนักของใบฝรั่งเริ่มต้น

1.7 รวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมดบรรจุในภาชนะกันแสงที่ปิดสนิท ชั่งน้ำหนัก และหา %yield ของสารสกัดที่ได้ แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้รักษาความชื้น เพื่อทำการทดลองต่อไป

2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Quercetin

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

2.1 ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์

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

2.2 การหา HPLC Chromatographic Condition ที่สามารถแยกสารสำคัญ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง

2.2.1 เตรียม stock solution ของ standard quercetin

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

2.2.2 เตรียม working solution จาก 2.2.1

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

2.2.3 เตรียม stock solution ของสารสกัดใบฝรั่ง

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

2.2.4 เตรียม working solution จาก 2.2.3

ใช้สารที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.3 เป็น working solution สำหรับใช้ฉีด HPLC

2.2.5 ฉีด working solution จาก 2.2.3 และ 2.2.4

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

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

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

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Method Validation) ของ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่ง

3.1 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์การวิเคราะห์

3.1.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

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

3.1.2 การเตรียม Reference Standard Solution

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

3.1.3 การเตรียม Sample Quercetin Solution

1. ชั่งสารมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักแน่นอนของ quercetin ประมาณ 7.0 mg. ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml.
2. เติม และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 0.07 mg/ml)

3. ปิเปตสารละลายจากข้อ 2 มา 1500 และ 800 µl. แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 2000 µl. (ได้ความเข้มข้น 0.0525 และ 0.028 mg/ml ตามลำดับ)
4. คำนวณหาค่าน้ำหนักที่แท้จริงของสาร โดยที่ Quercetin มีค่า %purity = 98% (ค่า Actual Conc. ของ Quercetin)

3.1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

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

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

3.1.5 การคำนวณ

นำค่าที่ได้จากการฉีด HPLC มาคำนวณหาค่าต่าง ๆ ดังนี้

Observed Conc. ของ Quercetin

Actual Conc. ของ Quercetin

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

3.2 การตรวจสอบความเที่ยงตรง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

3.2.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

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

3.2.2 การเตรียม Reference Standard Solution

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

3.2.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

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

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

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

3.2.5 การคำนวณ

นำค่าที่ได้จากการฉีด HPLC มาคำนวณหาค่าต่าง ๆ ดังนี้

Observed Conc. ของ Quercetin

Actual Conc. ของ Quercetin

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

% RSD = [SD / Mean] x 100

3.3 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีวิเคราะห์

3.3.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

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

3.3.2 การเตรียม Reference Standard Solution

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

3.3.3 การเตรียม Sample Solution จาก Aerosil

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

3.3.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

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

บันทึก chromatogram นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ และสรุป ความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีวิเคราะห์

4. การหาปริมาณสารสำคัญ Quercetin และการสลายตัวของสารสำคัญในสารสกัดใบฝรั่ง

4.1 ตรวจดูลักษณะทั่วไปทางกายภาพ (Physical Appearance) ของสารสกัดใบฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์ โดยตรวจดูลักษณะของสารสกัด โดยดูจากสี กลิ่น และลักษณะผงยา บันทึกข้อมูล

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ในสารสกัด

4.2.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

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

4.2.2 การเตรียม Reference Standard Solution

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

4.2.3 การเตรียม Sample Solution จากสารสกัดใบฝรั่ง (ทำ 3 ซ้ำ)

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

4.2.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

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

บันทึก chromatogram นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณของสารสำคัญ Quercetin

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ในสารสกัดที่สลายตัวไปในสภาวะต่าง ๆ

4.3.1 การวิเคราะห์ chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยแสง

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

4.3.2 การวิเคราะห์ chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยความร้อน

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

4.3.3 การวิเคราะห์ chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยความชื้น

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

4.3.4 การวิเคราะห์ chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยกรด

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

4.3.5 การวิเคราะห์ chromatogram ของสารสกัดใบฝรั่งที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยด่าง

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

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

5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Reference Standard Stock Solution ของ DPPH

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

5.2 การเตรียม Reference Standard Solution ของ DPPH

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

5.3 การเตรียม Sample Stock Solution

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

5.4 การเตรียม Sample Solution

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

5.4 วิธีการวัดหาค่า DPPH-radical scavenger

1. ปิเปตสารละลายที่ต้องการวัดค่ามา 500 μl. เติมสารละลายของ 6 X 10^{-5} M DPPH solution ลงไป 500 μl.
2. ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm.
4. นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (EC_{50})ของสารสกัดใบฝรั่ง โดยใช้สารมาตรฐาน quercetin และ BHT เป็น positive control

6. การศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบฝรั่ง

คัดเลือกสารสกัดใบฝรั่งสายพันธุ์ที่มีปริมาณสารสำคัญ Quercetin สูง และมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดีเพื่อมาทำการศึกษาความคงตัวของสารสกัด โดยวิธีการศึกษามีดังต่อไปนี้

6.1 การหาปริมาณสารสำคัญ quercetin

คัดเลือกสารสกัดใบฝรั่งสายพันธุ์ที่มีปริมาณสารสำคัญ Quercetin สูง และมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดีเพื่อมาทำการศึกษาความคงตัวของสารสกัด โดยวิธีการศึกษามีดังต่อไปนี้

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

6.1.2 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

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

6.1.3 การเตรียม Reference Standard Solution

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

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

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

6.1.5 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

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

บันทึก chromatogram นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ที่เวลาต่าง ๆ แล้วนำมาคำนวณหาอายุของสารสกัดใบฝรั่ง

6.2 ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ของสารสกัดใบฝรั่ง

6.2.1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Reference Standard Stock Solution ของ DPPH

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

6.2.2 การเตรียม Reference Standard Solution ของ DPPH

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

6.2.3 การเตรียม Sample Stock Solution

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

6.2.4 การเตรียม Sample Solution

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

6.2.4 วิธีการวัดหาค่า DPPH-radical scavenger

1. ปิเปตสารละลายที่ต้องการวัดค่ามา 500 μl. เติมสารละลายของ 6 X 10^{-5} M DPPH solution ลงไป 500 μl.
2. ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm.

7. การเตรียมสารสกัดใบฝรั่งให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับสัตว์

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

8. การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง

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

8.1 การหาปริมาณสารสำคัญ quercetin

การหาปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งจะทำการทดลอง 2 วิธีการคือ

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

นำตัวอย่างที่ผ่านขบวนการในข้อ 1 และ 2 มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ที่มีอยู่ผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง ตามข้อที่ 8.1.1 – 8.1.4

8.1.1 การเตรียม Reference Standard Stock Solution ของ quercetin

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

8.1.2 การเตรียม Reference Standard Solution

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

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

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

8.1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ฉีดสารละลายเข้าสู่ HPLC system โดยใช้ Chromatographic condition ดังนี้

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

บันทึก chromatogram นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารสำคัญ Quercetin ณ เวลาต่าง ๆ แล้วนำมาคำนวณหาความคงตัว และอายุของผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง

8.2 ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ของผลิตภัณฑ์สารสกัดใบฝรั่ง

8.2.1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Reference Standard Stock Solution ของ DPPH

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

8.2.2 การเตรียม Reference Standard Solution ของ DPPH

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

8.2.3 การเตรียม Sample Stock Solution

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

8.2.4 การเตรียม Sample Solution

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

8.2.4 วิธีการวัดหาค่า DPPH-radical scavenger

1. ปิเปตสารละลายที่ต้องการวัดค่ามา 500 μl เติมสารละลายของ 6 X 10^{-5} M DPPH solution ลงไป 500 μl.
2. ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm.
4. นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (EC_{50})ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่ง โดยใช้สารมาตรฐาน quercetin และ BHT เป็น positive control