วว.

โครงการวิจัยที่ ภ. 50-02 / ย.1 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ จากสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้าน ผลไม้ และวัสดุเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 50-02
วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากสารต้านอนุมูลอิสระ
จากผักพื้นบ้าน ผลไม้ และวัสดุเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้

โครงการย่อยที่ 1
วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากสารต้านอนุมูลอิสระ
จากผักพื้นบ้าน ผลไม้ และวัสดุเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากสารต้านอนุมูลอิสระ จากผักพื้นบ้าน ผลไม้ และวัสดุเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้

โดย

ประไพภัทร คลังทรัพย์

วิมลศรี พรรธนประเทศ **ภูษิตา วรรณิสสร**
อุบล ฤกษ์อ่ำ **กฤติยา ทิสยากร**
วิภาพร พัฒน์เวช **อมรรัตน์ ขยันการนาวี**
เตือนตา เสมาทอง **สรียา เรืองพัฒนพงศ์**
พงศธร หลิมศิริวงษ์ **วิเชียร เขยนอก**
ประไพศรี ไม้สนธิ์ **สุพจน์ ประทีบถิ่นทอง**
ศรีศักดิ์ ตรังวัชรกุล **วัลลภา อรุณไพโรจน์**

บรรณาธิการ วว. กรุงเทพฯ 2553
นฤมล รื่นไวย์ สงวนลิขิสิทธิ์
ลิขิต หาญจางสิทธิ์
ปฐมสุดา สำเร็จ

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นางเกษมศรี หอมชื่น)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณ ผศ.ดร.รัตติมา จีนาพงษา ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก ที่ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติการทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดของสารสกัดผักเชียงดาและผักหวาน ขอขอบคุณ ดร.บดินทร์ ชิตกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ในการให้คำปรึกษาในการศึกษาทางเคมีของสารสกัดผักพื้นบ้าน และขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิชาการสังกัดฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (ฝภผ.) ได้แก่ นางสาวธัญชนก เมืองมั่น และ นางสาวน้ำทิพย์ เที่ยงตรง ที่ร่วมปฏิบัติงานทางเภสัชวิทยาโดยรับผิดชอบการเตรียมสารสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดาและผักหวานบ้าน, นางสาวศรัญญา เหล่าวิทยางกูร ที่ช่วยในขั้นตอนการทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์, นางสาวชมภู คุณประทุม ที่ช่วยปฏิบัติงานการตรวจทางเคมีของสารสกัดผักเชียงดาและผักหวานบ้าน, นางสาวศจีวรินทร์ ปนศิริวัฒนกุล ที่ช่วยปฏิบัติงานในขั้นตอนการพัฒนาสูตรและการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ และขอบคุณนางสาวรัษฎาประภาสะวัต นักศึกษาปริญญาโท ภายใต้โครงการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโทและเอก ระหว่าง วว. กับมหาวิทยาลัยมหิดล (ปี 2551-2552) ที่มีส่วนร่วมในการปฏิบัติงานทดสอบด้านพันธุพิษวิทยาของสารสกัดจากผักทั้งสองชนิด

ทั้งนี้การดำเนินโครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากการสนับสนุนของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ภายใต้งบประมาณจากกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (วท.) ระหว่างปี 2550 – 2552

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	ช
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	6
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	14
4. สรุปผลการทดลอง	31
5. ข้อเสนอแนะ	62
6. เอกสารอ้างอิง	134
ภาคผนวก	136
ภาคผนวก ก แบบสำรวจความพึงพอใจเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน	136
ภาคผนวก ข การแสดงผลงานวิจัยโครงการในการประชุมวิชาการ	141

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. ปริมาณสารสกัดหยาบ (% yield) ของการสกัดผักเชียงดา *Gynema inodorum* Dence 7

ตารางที่ 2. ปริมาณสารสกัดหยาบ (% yield) ของการสกัดผักหวานบ้าน *Sauropus androgynus* Merr. 9

ตารางที่ 3. ผลการตรวจสาร phytochemicals แสดงในตัวอย่างสารสกัดหยาบของเปลือกเมล็ดมะขาม, ผักเชียงดา และผักหวานบ้าน 21

ตารางที่ 4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic compounds ในตัวอย่างสารสกัดหยาบของเปลือกเมล็ดมะขาม, ผักเชียงดา และผักหวานบ้าน 24

ตารางที่ 5. ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic compounds ในตัวอย่างสารสกัดหยาบของเปลือกเมล็ดมะขาม, ผักเชียงดา และผักหวานบ้าน 24

ตารางที่ 6. ผลของความเข้มข้นของเอทานอลต่อการสกัดสารสำคัญในกลุ่ม Polymeric proanthocyanidins จากเมล็ดองุ่นสายพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) 29

ตารางที่ 7. ผลของอุณหภูมิต่อการสกัดสารสำคัญในกลุ่ม Polymeric proanthocyanidins จากเมล็ดองุ่นสายพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) 30

ตารางที่ 8. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดผักเชียงดา 32

ตารางที่ 9. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในตัวอย่างสารสกัดผักหวานบ้าน 33

ตารางที่ 10. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ในสารมาตรฐาน 37

ตารางที่ 11. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ในสารตัวอย่างของสารสกัดจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน 38

ตารางที่ 12. ปริมาณของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (ACW) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ต่อครั้งต่อตัวอย่าง) 40

ตารางที่ 13. การแบ่งกลุ่มหนูทดลองในการทดสอบฤทธิ์ลดน้ำตาลของสารสกัดผักเชียงดาและสารสกัดผักหวานบ้าน 47

ตารางที่ 14. ระดับน้ำตาลในเลือดก่อนและหลังได้รับสารทดสอบแต่ละชนิด ณ เวลาต่างๆ 49

ตารางที่ 15. ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด Polymeric proanthocyanidins (OPCs) ด้วยวิธี Photochemiluminescence 52

ตารางที่ 16. การยับยั้งการแตกหักของ DNA จากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2^{\bullet}$) ของสาร OPCs ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน 58

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 17. ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารกสัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยวิธี Photochemiluminescence 61

ตารางที่ 18. เปอร์เซ็นต์การละลายน้ำ (% Water Solubility) ของสารสกัดผักพื้นบ้านที่อุณหภูมิห้อง 70

ตารางที่ 19. เปอร์เซ็นต์การละลายน้ำ (% Water Solubility) ของสารสกัดผักพื้นบ้านที่อุณหภูมิต่างๆ 71

ตารางที่ 20. ผลของสภาวะความเป็นกรดเบสต่อคุณสมบัติของสารสกัดผักพื้นบ้าน 71

ตารางที่ 21. ผลของอุณหภูมิต่อคุณสมบัติของสารสกัดผักพื้นบ้าน 73

ตารางที่ 22. ส่วนประกอบของเครื่องดื่มชาผักหวานบ้านภายหลังการปรับสูตร 76

ตารางที่ 23. ผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม 76

ตารางที่ 24. คุณสมบัติกายภาพและเคมีของชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม 77

ตารางที่ 25. การยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักหวานบ้านรสน้ำผึ้งมะนาวปรับสารให้ความหวาน 77

ตารางที่ 26. การยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักหวานบ้านรสธรรมชาติปรับสารให้ความหวาน 78

ตารางที่ 27. ผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักเชียงดาพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม 79

ตารางที่ 28. คุณสมบัติกายภาพและเคมีของชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม 80

ตารางที่ 29. ผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักเชียงดารสน้ำผึ้งมะนาวพร้อมดื่ม (ปรับสารให้ความหวาน) 81

ตารางที่ 30. ผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักเชียงดารสธรรมชาติพร้อมดื่ม (ปรับสารให้ความหวาน) 81

ตารางที่ 31. คุณสมบัติชาผักหวานบ้านรสธรรมชาติพาสเจอไรส์พร้อมดื่มในระหว่างเก็บรักษา 84

ตารางที่ 32. คุณสมบัติชาผักหวานบ้านรสน้ำผึ้งมะนาวพาสเจอไรส์พร้อมดื่มในระหว่างเก็บรักษา 85

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 33. คุณสมบัติชาผักเชียงดารสธรรมชาติพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม ในระหว่างเก็บรักษา 86

ตารางที่ 34. คุณสมบัติชาผักเชียงดารสน้ำผึ้งมะนาวพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม ในระหว่างเก็บรักษา 87

ตารางที่ 35. ค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูในกลุ่มกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) 92

ตารางที่ 36. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกน้ำกลั่น 93

ตารางที่ 37. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) ขนาด 15,000 มก./กก. 93

ตารางที่ 38. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) ขนาด 15,000 มก./กก. 94

ตารางที่ 39. ค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูในกลุ่มกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (SAE-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F2) 96

ตารางที่ 40. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกน้ำกลั่น 97

ตารางที่ 41. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (ASE-F1) ขนาด 15,000 มก./กก. 97

ตารางที่ 42. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (ASE-F2) ขนาด 15,000 มก./กก. 98

ตารางที่ 43. ค่า IC_{50} ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F1) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อ HepG2 ด้วยวิธี MTT 101

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 44.	ค่า IC_{50} ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (SAE-F1), สูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F2) และ สูตรสารสกัดเข้มข้น (SAE-Ex) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อ HepG2 ด้วยวิธี MTT	102
ตารางที่ 45.	คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดา – รสธรรมชาติ	121
ตารางที่ 46.	คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดา – รสน้ำผึ้งมะนาว	122
ตารางที่ 47.	คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักหวานบ้าน – รสธรรมชาติ	123
ตารางที่ 48.	คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักหวานบ้าน – รสน้ำผึ้งมะนาว	124
ตารางที่ 49.	คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักหวานบ้าน – รสผสมสารสกัด	125

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.	ผักเชียงดา Gynema inodorum Dence แสดงใบแก่และยอดอ่อน	7
รูปที่ 2.	ยอดผักหวานบ้าน (sweet leaves) *Sauropus androgynus* Merr	9
รูปที่ 3.	องุ่นแดงพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (หรือ Pok Dum) จ. นครปฐม	10
รูปที่ 4.	เปลือกเมล็ดมะขาม	11
รูปที่ 5.	สารสกัดหยาบจากผักเชียงดา	12
รูปที่ 6.	สารสกัดหยาบผักหวานบ้าน	12
รูปที่ 7.	สารสกัด OPCs จากเมล็ดองุ่นไทย	13
รูปที่ 8.	สารสกัดหยาบจากเปลือกเมล็ดมะขาม	13
รูปที่ 9.	TLC chromatogram ของสารสกัดผักเชียงดาเทียบกับสารมาตรฐาน rutin (R) A) สเปรย์ด้วย NP/PEG, B) ดูภายใต้ UV ที่ 366 นาโนเมตร C) สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH โดยใช้เคลื่อนที่กับ Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water อัตราส่วน 100:11:11:26 (v/v)	22
รูปที่ 10.	TLC chromatogram ของสารสกัดผักหวานบ้าน เทียบกับสารมาตรฐาน rutin (R) A) สเปรย์ด้วย NP/PEG, B) ดูภายใต้ UV ที่ 366 นาโนเมตร C) สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH โดยใช้โมบายเฟส Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water อัตราส่วน 100:11:11:26 (v/v)	22
รูปที่ 11.	TLC chromatogram ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม (Tm) เทียบกับสารมาตรฐาน chlorogenic acid (Ch) และ rutin (R) , A) สเปรย์ด้วย NP/PEG, B) ดูภายใต้ UV ที่ 366 นาโนเมตร, C) สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH โดยใช้เคลื่อนที่กับ Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water อัตราส่วน100:11:11:26 (v/v)	23
รูปที่ 12.	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Polymeric Proanthocyanidins (OPCs) ในสารสกัดเมล็ดองุ่น	25
รูปที่ 13.	Chromatogram ของสาร Polymeric proanthocyanidins (OPCs) ในตัวอย่างเมล็ดองุ่นไทย สายพันธุ์ Vitis vinifera cv. Ribier (Pok Dum)	28
รูปที่ 14.	ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion ($O^{\cdot}_2$) ด้วยวิธี Photochemiluminescence ในสภาวะการละลายด้วยน้ำ (water phase : WCL)	42
รูปที่ 15.	ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion ($O^{\cdot}_2$) ด้วยวิธี Photochemiluminescence	43

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 16. ผลการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Anti-hemolysis assay ได้ค่า 50% Inhibition concentration (IC_{50}) ของสารสกัดน้ำผักเชียงดาส่วนอ่อน (COH) และสารสกัดผักหวานบ้านด้วยน้ำ (WH) มีค่าใกล้เคียงกัน และมีฤทธิ์สูงกว่าของสารสกัดผักหวานบ้านด้วย 50% เอทานอล (WE-50) โดยใช้ Trolox และ vitamin C เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ 45

รูปที่ 17. ระดับน้ำตาลในเลือดก่อนและหลังได้รับสารทดสอบแต่ละชนิด ณ เวลาต่างๆ 50

รูปที่ 18. ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเครื่อง Photochem® โดยวิธี Antioxidant capacity of lipid soluble compound (ACL) ของสารสกัด OPCs จากองุ่นไทย พบว่า OPCs มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion 53

รูปที่ 19. DNA comet image ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ H_2O_2 ของ human lymphoblastoids TK6 cells ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด OPCs จากเมล็ดองุ่นไทย A : กลุ่มTK6 cells ในกลุ่มควบคุม (non-comet cells), B : กลุ่ม TK6 cells ที่ได้รับอนุมูลอิสระ H_2O_2 (comet cells), C, D : กลุ่ม TK6 cells ที่ได้รับผลิตภัณฑ์ H_2O_2 ร่วมกับ OPCs 59

รูปที่ 20. ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเครื่อง Photochem® โดยวิธี antioxidant capacity of lipid soluble compound (ACL) ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอทานอล 95% (TM) เทียบกับ gallic acid และ ellagic acid 61

รูปที่ 21. ผลของ pH ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน (SAE-E50) 72

รูปที่ 22. ผลของ pH ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผักเชียงดา (CD) 72

รูปที่ 23. ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักหวานด้วย 50% เอทานอล 74

รูปที่ 24. ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลิอิสระของสารสกัดน้ำผักเชียงดา 74

รูปที่ 25. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ใน lipid phase 82

รูปที่ 26. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ใน water phase 82

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 27. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวเพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบที่ เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และ สูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) ขนาด 15,000 มก./กก. น้ำหนักตัว 91

รูปที่ 28. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวเพศเมีย ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบที่ เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และ สูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) ขนาด 15,000 มก./กก. น้ำหนักตัว 91

รูปที่ 29. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวเพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (SAE-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F2) 95

รูปที่ 30. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวเพศเมียในกลุ่มควบคุมและ กลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน 96

รูปที่ 31. อัตรารอดชีวิต (survival) ของเซลล์ HepG2 ในการทดสอบความเป็นพิษ ต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจาก ผักเชียงดาสูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F1) 103

รูปที่ 32. อัตรารอดชีวิต (survival) ของเซลล์ HepG2 ในการทดสอบความเป็นพิษ ต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจาก ผักหวานบ้านสูตรธรรมชาติ (SAE-F1), สูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F1) และ สูตรสารสกัดเข้มข้น (SAE-Ex) 103

รูปที่ 33. ร้อยละของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามเพศ 105

รูปที่ 34. ร้อยละของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามอายุ 106

รูปที่ 35. ร้อยละของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามอาชีพ 107

รูปที่ 36. ร้อยละของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามระดับการศึกษา 108

รูปที่ 37. ร้อยละของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามระดับรายได้ 109

รูปที่ 38. ตัวอย่างรูปแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา-รสธรรมชาติ (GY-F1) ที่ใช้สำรวจความพึงพอใจ 110

รูปที่ 39. ตัวอย่างรูปแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา-รสน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) ที่ใช้สำรวจความพึงพอใจ 112

รูปที่ 40. รูปแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน-รสธรรมชาติ (SAE-F1) ที่ใช้สำรวจความพึงพอใจ 114

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 41. ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากสารต้านอนุมูลอิสระในผักพื้นบ้าน 116

รูปที่ 42. ตัวอย่างต้นแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากผักเชียงดา-สูตรธรรมชาติ และสูตรน้ำผึ้งมะนาว 119

รูปที่ 43. ตัวอย่างต้นแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากผักหวานบ้าน-สูตรธรรมชาติ สูตรน้ำผึ้งมะนาว และสูตรสารสกัดเข้มข้น 120

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF HEALTHY FOOD PRODUCTS CONTAINING NATURAL ANTIOXIDANTS FROM THAI LOCAL VEGETABLES AND SPECIFIC SUBSTANCES FROM FRUIT INDUSTRIES

Prapaipat Klungsupya, Wimonsri Phanthanapratet, Bhusita Wannissorn, Ubon Reak-Um, Krittiya Thisayakorn, Wipaporn Phatvej, Amonrat Khayungarnnawee, Tuanta Sematong, Sareeya Reungpattanapong, Pongsatorn Limsiriwong, Vichein Kheuynok, Prapaisri Maison, Supoj Pratheeptinthong, Srisak Trangwacharakul and Vullapa Arunpairojana

ABSTRACT

This project was carried out during 2007-2009 by the Pharmaceutical and Natural Products Department (PNPD) and Food Technology Department with the aim to develop the healthy food & drink derived from Thai indigenous vegetables and fruits. The research activities involved preparation of crude extraction of selected plants, identification of their phytochemical contents, particularly anti-oxidant compounds, determination of antioxidant activities using various *in vivo* and *in vitro* pharmacological methods such as total phenolic content assay, DPPH assay, photochemiluminescence (PCL) assay, anti-hemolytic assay and comet assay (anti-oxidative DNA damage). Results obtained from these assays exhibited potent antioxidant property of "Pak Chiang Da" (*Gynema inodorum* Dence) and "Pak Wan" *(Sauropus androgynus* Merr.). Moreover, crude extracts of these two plants possessed anti hyperglycemic effect on alloxan-induced diabetic rats. Regarding these practical results, five healthy drinks were developed from Pak Chiang Da and Pak Wan. The stability test of these products was conducted as well as their safety tests evaluated in cells and animals followed by the consumer satisfactory test. To maintain their anti-oxidant property, product containers were specifically designed by Thai Packaging Centre of TISTR. These new "Ready-to-Drink" beverages were readily marketed after technology transfer.

วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้าน ผลไม้ และวัสดุเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้

ประไพภัทร คลังทรัพย์, วิมลศรี พรรธนประเทศ, ภูษิตา วรรณิสสร, อุบล ฤกษ์อ่ำ, กฤติยา ทิสยากร, วิภาพร พัฒน์เวช, อมรรัตน์ ขยันการนาวี, สรียา เรืองพัฒนพงศ์, เตือนตา เสมาทอง, พงศธร หลิมศิริวงษ์, วิเชียร เขยนอก, ประไพศรี ไม้สนธิ์, สุพจน์ ประทีบถิ่นทอง, ศรีศักดิ์ ตรังวัชรกุล และ วัลลภา อรุณไพโรจน์

บทคัดย่อ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยความร่วมมือวิจัยของฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (ฝภผ.) และ ฝ่ายเทคโนโลยีอาหาร (ฝทอ.) ได้ดำเนินโครงการวิจัยนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากผักพื้นบ้านและผลไม้ไทยอย่างครบวงจร. เริ่มตั้งแต่กระบวนการสกัดและตรวจควบคุมคุณภาพองค์ประกอบทางเคมี, โดยเน้นกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ. ทำการตรวจพิสูจน์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบต่างๆ ทางเภสัชวิทยาทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง เช่น DPPH assay (ปฏิกิริยาต้านออกซิเดชัน), photochemiluminescence assay (การกำจัดอนุมูลอิสระของออกซิเจนชนิดซูเปอร์ออกไซด์), anti-hemolytic assay (ปฏิกิริยาต้านออกซิเดชันจากการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง) และ comet assay (การต้านฤทธิ์ทำลาย DNA จากอนุมูลอิสระออกซิเจน). ข้อมูลจากผลการทดสอบเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า ผักเชียงดาและผักหวานบ้านมีศักยภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ, นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สัมพันธ์กับภาวการณ์เกิดเบาหวานด้วย. ดังนั้น วว. จึงได้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพในรูปของเครื่องดื่มผักพื้นบ้านจากผักเชียงดาและผักหวาน ซึ่งมีทั้งหมด 5 ผลิตภัณฑ์, โดยผ่านการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์, การประเมินความปลอดภัยในระดับเซลล์และในสัตว์ทดลอง และผ่านการทดสอบประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภคด้วย. ผลิตภัณฑ์ยังได้รับการออกแบบโดยศูนย์การบรรจุหีบห่อไทยให้มีลักษณะจำเพาะเพื่อรักษาความคงตัวของสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์. กระบวนการวิจัยผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักพื้นบ้านดำเนินการเสร็จสมบูรณ์อย่างครบวงจรและพร้อมสำหรับการผลิตจำหน่ายภายหลังการถ่ายทอดเทคโนโลยี.

1. บทนำ

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation reaction) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีตามปกติในเซลล์ของทุกอวัยวะทั่วร่างกาย และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเผาผลาญต่างๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต. กระบวนการดังกล่าวจะก่อให้เกิดของเสียที่เรียกว่า “อนุมูลอิสระ (Free radical)” ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่อยู่ตัว เนื่องจากมีประจุลบซึ่งเกิดจากการสูญเสียอิเล็กตรอนวงนอกของออกซิเจน (Reactive Oxygen Species, ROS) เช่น อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet}$), อนุมูลไฮดรอกซีแรดดิคัล ($^{\bullet}OH$), อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2^{\bullet}$), อนุมูลเปอร์ออกซีแรดดิคัล) $ROO^{\bullet}$ (ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะพยายามแย่งชิงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นๆ เพื่อให้ตัวเองเสถียร). โมเลกุลที่ถูกแย่งอิเล็กตรอนไปก็จะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียร และว่องไวต่อการแย่งชิงอิเล็กตรอนต่อไปเรื่อยๆ จึงเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นลูกโซ่, ปรากฏการณ์นี้ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นมากมายในเซลล์ทั่วร่างกาย.

อนุมูลอิสระก่อให้เกิดทั้งประโยชน์และโทษ. ในด้านที่มีประโยชน์ ได้แก่ ทำให้เกิดพลังงาน การกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยเม็ดเลือดขาว, การเจริญเติบโตของเซลล์, การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ การสร้างสารชีวโมเลกุลต่างๆ เป็นต้น. ในส่วนที่ก่อให้เกิดโทษ คือ อนุมูลอิสระจะไปเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับไขมันที่ผนังเซลล์, ตลอดจนสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโปรตีน, เอนไซม์, คาร์โบไฮเดรต และ DNA, มีผลทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายและทำให้โครงสร้างของโปรตีนและ DNA เกิดการเปลี่ยนแปลง เป็นสาเหตุให้เกิดความเสื่อมชรา (Aging) ของเซลล์และโรคสำคัญหลายชนิด เช่น หัวใจ, เส้นเลือดอุดตัน, ต้อกระจก, เบาหวาน, ความจำเสื่อม และมะเร็ง ซึ่งเป็นโรคร้ายแรงและในปัจจุบันยังไม่มีหนทางรักษา. นอกจากอนุมูลอิสระจะเกิดได้เองเป็นปกติภายในร่างกายแล้ว,ในปัจจุบันมีปัจจัยที่เอื้ออำนวยให้เกิดอนุมูลอิสระได้มากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสภาวะแวดล้อม เช่น ควันบุหรี่, มลพิษในอากาศ, กัมมันตภาพรังสี, การรับประทานอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง, พยาธิสภาพบางชนิด เช่น การอักเสบ, การขาดเลือดไปเลี้ยงอวัยวะนั้นๆ.

ปกติร่างกายของมนุษย์จะมีกระบวนการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระ คือ มีระบบต้านปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน (anti-oxidation) หรือระบบแอนตีออกซิแดนท์ (anti-oxidant) ซึ่งได้จาก 2 ทาง คือ จากที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง ซึ่ง แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione, peroxidase (GPX), glutathione, reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) และกลุ่มที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น glutathione, lipoic

acid, ceruloplasmin, albumin, transferrin, haptoglobin, hemopexin , uric acid, bilirubin, cysteine อย่างไรก็ดีสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นมีปริมาณจำกัด จึงไม่เพียงพอสำหรับป้องกันอนุมูลอิสระซึ่งเกิดขึ้นอย่างมหาศาลต่อวัน, รวมทั้งที่ร่างกายได้รับจากภายนอก. เพื่อลดผลเสียหายที่เกิดจากการทำลาย โดยอนุมูลอิสระที่เกิดเป็นประจำและมีเกือบตลอดช่วงชีวิตคน จึงมีความจำเป็นที่ร่างกายต้องได้สารต้านอนุมูลอิสระจากอาหารที่รับประทานเพิ่มเติม. ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารและไม่จัดเป็นเอนไซม์ เช่น tocopherols, carotenoids, ascorbic acid, steroids, ubiquinones, thiols, inosine, taurine, pyruvate, gallic acid, flavonoids, trolox, BHT. และ BHA สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกในการลดและทำลายอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่างๆ เช่น โดยการจับกับอนุมูลอิสระ, ลดการเกิดปฏิกิริยา ณ จุดตั้งต้น, ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือกระตุ้นให้ร่างกายผลิตเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น เป็นต้น.

การใช้สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามิน A, วิตามิน E, วิตามิน C, เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ชะลอหรือลดความรุนแรงของอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นตัวทำลายสุขภาพของมนุษย์. สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถหาได้จากแหล่งธรรมชาติ เช่น พืช, ผัก, ผลไม้, เนื้อสัตว์. ดังนั้นความตื่นตัวของประชาชนในการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากสารสกัดธรรมชาติกำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในตลาดโลก. ประเทศไทยมีการนำเข้าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากต่างประเทศคิดเป็นมูลค่ากว่า 2- 3 พันล้านบาทต่อปี. โดยเป็นทราบกันดีว่าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทนี้มีประโยชน์ต่อร่างกายและสะดวกต่อการบริโภค. ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพที่ได้รับความนิยมสูงสุด คือ ผลิตภัณฑ์ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant). ปัจจุบันจึงมีการจำหน่ายผลิตภัณฑ์ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระในหลายรูปแบบ เช่น วิตามินสังเคราะห์, อาหารเสริม, เครื่องดื่ม, เป็นต้น.

ประเทศไทยมีความหลายหลากทางพันธุ์พืชสูงมากประเทศหนึ่งในโลก ด้วยปริมาณพืชที่มีมากกว่า 15,000 ชนิด. คนไทยในอดีตรู้จักใช้ประโยชน์จากพืชทั้งผักและผลไม้ที่มีอยู่แล้วทั่วไปรอบถิ่นที่อยู่อาศัย โดยเฉพาะการนำมาใช้กินเป็นอาหารและยารักษาโรค. เนื่องจากผักพื้นบ้านและผลไม้ไทยมีสีสรรค์และรสชาติต่างๆ กัน ซึ่งสีต่างๆ บ่งบอกถึงสารสำคัญที่มีอยู่ต่างชนิดกัน เช่น สีแดง-เหลืองของ beta- carotene ในแครอต และรสชาติต่างๆ เหล่านี้ล้วนเป็นสรรพคุณทางยาทั้งสิ้น. ทั้งหมดนี้เป็นความรู้ที่สืบเนื่องกันมาและถ่ายทอดสู่คนรุ่นหลังและกลายเป็น “**ภูมิปัญญาท้องถิ่น**” และในปัจจุบันกระทรวงสาธารณสุขได้รณรงค์ให้คนไทยรับประทานผักพื้นบ้าน ซึ่งมีคุณประโยชน์ต่อร่างกายหลายอย่าง.

วัตถุประสงค์ของการวิจัยในโครงการนี้ เพื่อส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรพืชผักสมุนไพรไทย ซึ่งเน้นวัตถุดิบที่เป็นพืชผักที่หาได้ง่ายในชีวิตประจำวัน. โดยมุ่งเน้นศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้าน 2 ชนิด คือ ผักเชียงดา *Gymnema inodorum* Dence. ซึ่งเป็นผักพื้นบ้านทางภาคเหนือ และผักหวานบ้าน *Sauropus androgynus* Merr. ซึ่งปลูกได้ทั่วไป แต่มีมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. นอกจากนี้ ยังทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งวัตถุดิบอื่นอีก เช่น ผลไม้ตามฤดูกาลที่ต้องการเพิ่มมูลค่าและแก้ปัญหาผลผลิตล้นตลาด, เช่น ผลของอุ่นที่เหลือตกค้างจากการคั้นน้ำไปทำไวน์ และวัตถุดิบจากวัสดุหรือผลิตผลเหลือใช้จากภาคอุตสาหกรรมผลไม้ ได้แก่ เมล็ดมะขามจากโรงงานผลิตเครื่องแกง เป็นต้น.

พืช-ผักวัตถุดิบที่สนใจดังกล่าว จะผ่านกระบวนการวิจัยและพัฒนา โดยการทดสอบทางวิทยาศาสตร์ที่เริ่มตั้งแต่วิธีการสกัดและตรวจควบคุมสารพืชที่สำคัญ (phytonutrients), โดยเฉพาะกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งทำการพิสูจน์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งในหลอดทดลอง *(in vitro)* และในสัตว์ทดลอง *(in vivo)* ด้วยวิธีการศึกษาทางเภสัชวิทยาที่ยอมรับในระดับนานาชาติ. มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่สามารถพิสูจน์คุณสมบัติทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ว่า มีสรรพคุณต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการเสริมสร้างสุขภาพร่างกาย ในแนวทางของการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะที่เกิดจากอนุมูลอิสระดังกล่าวข้างต้น, โดยพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารจากสารต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบที่ผู้บริโภคยอมรับ และผ่านการทดสอบเรื่องความปลอดภัยตามมาตรฐานการวิจัยระดับสากล, รวมถึงมีการออกแบบบรรจุภัณฑ์เพื่อรักษาคุณภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ด้วย.

2. การพัฒนาวิธีสกัดและเตรียมสารสกัดหยาบ : ผักพื้นบ้าน (ผักเชียงดาและผักหวานบ้าน), ผลไม้ (เมล็ดองุ่น) และวัสดุเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้ (เปลือกเมล็ดมะขาม)

2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบของผักเชียงดา *Gynema inodorum* Dence

2.1.1 ทำการสกัดผักเชียงดาด้วยน้ำ โดยแบ่งผักเชียงดา ออกเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่เป็นยอดอ่อน (ความยาววัดยอดประมาณ 3 นิ้วจากปลายยอด)

น้ำหนักสดของวัตถุดิบคือ 1.7 กิโลกรัม, ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในเครื่องปั่นขนาดเล็ก, โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 ลิตร ปั่นให้เข้ากันจนละเอียด, แล้วนำไปกรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนที่เป็นกากผักออก ได้น้ำสีเขียวเข้มสด, บรรจุลงในภาชนะปลอดเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไปผ่านกระบวนการระเหยแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ได้สารสกัดหยาบสีเขียวปริมาณ 73.21 กรัม, คิดเป็น % yield = 1.22 เก็บใส่ภาชนะสีทึบป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์สารสำคัญ และตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป.

2.1.2 ส่วนที่เป็นยอดแก่ (ความยาวประมาณ 1 ฟุต วัดจากปลายยอด)

นำมาล้างทำความสะอาดและเลือกส่วนที่เหี่ยวทิ้งไป. น้ำหนักสดเริ่มต้นของวัตถุดิบ คือ 1.7 กิโลกรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยมีดก่อนนำใส่ลงในเครื่องปั่นขนาดเล็ก, โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 ลิตร, ปั่นให้เข้ากันจนละเอียด, แล้วนำไปกรองผ่านผ้าขาวบาง เพื่อแยกส่วนที่เป็นกากผักออก, ได้น้ำสีเขียวเข้มสด, บรรจุลงในภาชนะปลอดเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส. เพื่อไปผ่านกระบวนการระเหยแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ได้สารสกัดหยาบสีเขียวปริมาณ 60 กรัม, คิดเป็น % yield = 1.00. เก็บใส่ภาชนะสีทึบป้องกันแสง ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส, เพื่อนำไปวิเคราะห์สารสำคัญ และตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป.

ลักษณะผักเชียงดาใบแก่และยอดอ่อน แสดงดังรูปที่ 1.

ผลการสกัด

การคำนวณข้อมูล % yield ของสารสกัดจากผักเชียวดาและผักหวานบ้าน :

1. ผักเชียงดา (ยอดอ่อน) จากน้ำหนักสด 1.7 กก. สกัดโดยการปั่นรวมกับน้ำได้ปริมาตรรวม 6 ลิตร นำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำด้วยเครื่อง freeze dryer ได้น้ำหนักสารแห้ง 73.21 กรัม ดังนั้นคิดเป็น % yield = 4.31 (ต่อน้ำหนักสด).

2. ผักเชียงดา (ยอดแก่) จากน้ำหนักสด 2 กก. สกัดโดยการปั่นรวมกับน้ำได้ปริมาตรรวม 6 ลิตร นำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำด้วยเครื่อง freeze dryer ได้น้ำหนักสารแห้ง 60 กรัม. ดังนั้นคิดเป็น % yield = 3.0 (ต่อน้ำหนักสด).

ตารางที่ 1. ปริมาณสารสกัดหยาบ (% yield) ของการสกัดผักเชียงดา *Gynema inodorum* Dence

ผักพื้นบ้าน	ส่วนของผัก	วิธีสกัด	ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ (% yield) ต่อน้ำหนักสด
ผักเชียงดา *Gynema inodorum* Dence	ยอดอ่อน	สกัดด้วยน้ำ และระเหยแห้งด้วย freeze dryer	4.31
	ยอดแก่	สกัดด้วยน้ำ และระเหยแห้งด้วย freeze dryer	3.00

รูปที่ 1. ผักเชียงดา *Gynema inodorum* Dence แสดงใบแก่ (ซ้าย) และยอดอ่อน (ขวา).

2.2 การเตรียมสารสกัดหยาบของผักหวานบ้าน *Sauropus androgynus* Merr. (Sweet leaves)

ใช้เฉพาะส่วนที่เป็นยอดอ่อนผักหวานบ้าน (รูปที่ 2) ที่สั่งซื้อจากแหล่งปลูกในจังหวัดอ่างทอง มาล้างทำความสะอาด แบ่งเป็น 2 ส่วน. ส่วนแรก (ผักสด 4 กิโลกรัม) ทำการสกัดสดเช่นเดียวกับผักเชียงดา และระเหยน้ำออกด้วยเครื่อง freeze dryer. ส่วนที่สอง (ผักสด 19 กิโลกรัม) นำไปอบที่อุณหภูมิ 50°ซ. นาน 20 ชั่วโมง และบดเป็นผงแห้ง (ได้ 2 กิโลกรัม). จากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำและเอทิลแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 100, ดังรายละเอียดต่อไปนี้ :

2.2.1 การสกัดผักหวานบ้านด้วยน้ำ

เริ่มต้นจากยอดอ่อนของผักหวานบ้าน น้ำหนักสด 4.5 กิโลกรัม, ตัดเป็นชิ้นเล็กๆด้วยมีดและนำไปสกัดด้วยน้ำในเครื่องปั่นขนาดเล็ก ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 12 ลิตร, แล้วนำไปกรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนที่เป็นกากออกได้น้ำสีเขียวเข้มสด. นำไปผ่านกระบวนการระเหยแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer, เก็บใส่ภาชนะสีทึบป้องกันแสง, เก็บแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป.

2.2.2 การสกัดผักหวานบ้านด้วยเอทิลแอลกอฮอล์

นำยอดผักหวานสดหนัก 19 กิโลกรัม ไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส กระทั่งแห้งและนำไปเข้าเครื่องบดเป็นผงละเอียด 2 กิโลกรัม แบ่งสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ เป็น 2 ส่วน คือที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95. ชั่งผักหวานอบแห้ง 900 กรัม หมักด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 40 ลิตร ที่ความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 50 และ 95. นำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อแยกผงกากของผักหวานออกไป ได้สารละลายที่ผ่านการกรองที่เป็นของเหลวใสสีเขียวสด, นำไปผ่านกระบวนการระเหยแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer.

ผลการสกัด

การคำนวณข้อมูล % yield ของสารสกัดจากผักหวานบ้าน

1. ผักหวานบ้าน (ยอดอ่อน) สกัดสดด้วยน้ำ

จากน้ำหนักสด 4.5 กก. สกัดโดยการปั่นรวมกับน้ำได้ปริมาตรรวม 10 ลิตร นำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำด้วยเครื่อง freeze dryer ได้น้ำหนักสารแห้ง 195.57 กรัม ดังนั้นคิดเป็น % yield = 4.30 (ต่อน้ำหนักสด).

2. ผักหวานบ้าน (ยอดอ่อน) สกัดแห้งสกัดด้วยแอลกอฮอล์ ใช้ผักหวานบ้านสด 19 กก. อบแห้งที่ อุณหภูมิ 50°ซ. แล้วบดเป็นผงละเอียดได้ 2 กก.

3. นำผงผักหวานแห้ง 900 กรัม (คิดเป็นน้ำหนักสด 8.55 กก.) มาสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์ ปริมาตรรวม 40 ลิตร ได้น้ำหนักสารสกัด 145.45 กรัม ดังนั้นคิดเป็น % yield = 17.48 (ต่อน้ำหนักสด).

4. นำผงผักหวานแห้ง 900 กรัม (คิดเป็นน้ำหนักสด 8.55 กก.) มาสกัดด้วย 50% แอลกอฮอล์ ปริมาตรรวม 40 ลิตร ได้น้ำหนักสารสกัด 167.52 กรัม ดังนั้นคิดเป็น % yield = 19.59 (ต่อน้ำหนักสด).

ตารางที่ 2. ปริมาณสารสกัดหยาบ (% yield) ของการสกัดผักหวานบ้าน *Sauropus androgynus* Merr.

ผักพื้นบ้าน	วิธีการสกัด	ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ (% yield)	
		ต่อน้ำหนักสด	ต่อน้ำหนักแห้ง
ผักหวานบ้าน *Sauropus androgynus* Merr.	ผักสดสกัดด้วยน้ำ และ freeze dryer	4.30	-
	50% เอทานอล	17.48	16.16
	90% เอทานอล	19.59	18.61

รูปที่ 2. ยอดผักหวานบ้าน (sweet leaves) *Sauropus androgynus* Merr.

2.3 การเตรียมสารสกัดหยาบของเมล็ดองุ่น

นำส่วนของกากเมล็ดองุ่นแห้ง (dried whole grape seeds) และกากเยื่อหุ้มเมล็ดแห้ง (dried grape skins) ขององุ่นพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (หรือ Pok Dum) จากโรงงานทำน้ำผลไม้ จังหวัดนครปฐม (รูปที่ 3) มาแยกโดยการกรองผ่านตะแกรงขนาด (1 ซม. × 1 ซม., 0.5 ซม. × 0.5 ซม., 0.2 ซม. × 0.2 ซม.) และใช้ลมเป่า เพื่อแยกเฉพาะส่วนของเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ด. จากกากเมล็ดองุ่นแห้งเริ่มต้นหนัก 1374.1 กรัม ได้เป็นส่วนเนื้อเมล็ดองุ่นแห้ง 777.1 กรัม และเป็นส่วนของขั้วและก้านองุ่นแห้ง 528.2 กรัม, ตามลำดับ, เก็บทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิห้อง. จากนั้นชั่งเนื้อเมล็ดองุ่นแห้งมา 30 กรัม ล้างให้สะอาดด้วยน้ำและนำไปสกัดด้วยเอทานอล/น้ำ (40:60 , v/v) ด้วยสัดส่วนของวัตถุดิบต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิ 70°ซ. เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง โดยไม่มีการเขย่า. กรองผ่านตะแกรงขนาด 0.5 ซม. × 0.5 ซม. และล้างผ่านกากเมล็ดองุ่นด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัดอีก 1 ครั้ง. จากนั้นนำส่วนที่กรองผ่าน (extracted solution) และส่วนที่ล้างรวมกันไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator เพื่อระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ระบบความดันที่อุณหภูมิ 60-65 °ซ. กากของของเหลวที่ได้นำไประเหยแห้งด้วยความเย็นต่ำ (freeze-dried) ได้สารสกัดหยาบเมล็ดองุ่นหนัก 3.8 กรัม เรียกสารสกัดหยาบนี้ว่า grape seed extracts หรือ Oligomeric proauthocyanidins (OPCs), เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.

รูปที่ 3. องุ่นแดงพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (หรือ Pok Dum) จ. นครปฐม.

2.4 การเตรียมสารสกัดหยาบของเปลือกเมล็ดมะขาม

นำเปลือกเมล็ดมะขามที่เป็นวัสดุเหลือใช้ (รูปที่ 4) จากอุตสาหรรมผลิตแป้งจากเมล็ดมะขามที่ได้รับอนุเคราะห์จากโรงงาน GMI (Thailand) ที่อยู่เลขที่ 733/705-6 ถนนพหลโยธิน อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี และนำมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบ ดังขั้นตอนต่อไปนี้ :

1. บดเปลือกเมล็ดมะขามให้ละเอียด.

2. เติม Petroleum ether ให้ท่วมและเขย่า และทิ้งไว้ข้ามคืน. ทำเช่นนี้อีกครั้ง และกรองแยกสารละลายที่ได้นำมาระเหยแห้งด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนไว้.

3. ตากกากที่ผ่านการสกัดด้วย Petroleum ether แล้วให้แห้ง, จากนั้นจึงนำมาเติมด้วยเอทานอล 95% จนท่วม และหมักทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง จึงกรองแยกสารละลาย.

4. จากนั้นเติมเอทานอลให้ท่วมอีกครั้งและเขย่า และทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง จึงกรองแยกสารละลาย.

5. นำสารละลายที่ได้ในข้อ 3 และข้อ 4 มารวมกัน และทำให้แห้ง.

6. ตากกากที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลแล้ว เติมด้วยแอซีโตนความเข้มข้นร้อยละ 70 จนท่วม และทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง จึงกรองแยกสารละลาย และนำมาทำให้แห้ง.

รูปที่ 4. เปลือกเมล็ดมะขาม.

2.5 ผลการสกัด

จากวัตถุดิบและวิธีการสกัดดังกล่าวข้างต้น ได้สารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน 2 ชนิด คือ สารสกัดหยาบผักเชียงดาด้วยน้ำ (รูปที่ 5) และสกัดหยาบผักหวานบ้านด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 (รูปที่ 6) , และได้สารสกัด (OPCs) จากเมล็ดองุ่นไทยด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 60 (รูปที่ 7) และสารสกัดหยาบจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (รูปที่ 6).

รูปที่ 5. สารสกัดหยาบจากผักเชียงดา.

รูปที่ 6. สารสกัดหยาบผักหวานบ้าน.

รูปที่ 7. สารสกัด OPCs จากเมล็ดองุ่นไทย.

รูปที่ 8. สารสกัดหยาบจากเปลือกเมล็ดมะขาม.

3. การตรวจควบคุมคุณภาพของสารสกัดหยาบผักเชียงดา-ผักหวานบ้าน, สารสกัด OPCs จากเมล็ดองุ่น และ สารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดมะขาม ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC

3.1 การตรวจควบคุมคุณภาพของสารสกัดหยาบผักเชียงดา-ผักหวานบ้าน และสาร สกัดเปลือกเมล็ดมะขาม ด้วยเทคนิค TLC

เทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นเทคนิคทางเคมีที่ใช้แยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างสารกับเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase). เฟสคงที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว, ถ้าเป็นของแข็งการแยกจะเป็นแบบดูดซับ (adsorption), ถ้าเป็นของเหลวการแยกสารจะเป็นแบบแบ่งละลาย (partition). เฟสเคลื่อนที่อาจจะเป็นของเหลวหรือแก๊ส ทำหน้าที่พาสารแต่ละชนิดในสารผสมให้เคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วแตกต่างกัน, จึงทำให้สารแยกออกจากกันได้. Thin Layer Chromatography (TLC) เป็นโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ Solid-liquid chromatography. ของผสมที่ถูกแยกจะถูกดูดซับโดยเฟสคงที่ที่เป็นของแข็ง, เฟสคงที่ที่นิยมใช้คือ silica gel ($SiO_2.XH_2O$) และ alumina (Al_2O_3). ในขณะเดียวกันเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวจะพาสารให้เคลื่อนที่ไป เนื่องจากสารที่มีโครงสร้างต่างกัน จึงได้รับแรงดึงและแรงผลักดันต่างกันด้วย. ดังนั้นสารแต่ละชนิดจึงเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน. สารที่ถูกดูดซับได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับน้อย จึงทำให้เกิดการแยกของสารขึ้นเป็นแถบๆ เรียกว่า Chromatogram.

นำสารสกัดหยาบของผักเชียงดา, ผักหวานบ้าน และเปลือกเมล็ดมะขาม ที่สกัดได้ดังอธิบายไว้ในบทที่ 2 มาตรวจควบคุมคุณภาพทางเคมี โดยการตรวจวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่ม phenolics และ flavonoid compounds โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) และนำเสนอผลด้วย TLC chromatograph ดังรายละเอียดต่อไปนี้ :

3.1.1 วัสดุ-อุปกรณ์ และสารเคมี

วัสดุ-อุปกรณ์

- เครื่องระเหยแห้งภายใต้การลดความดัน (Rotary evaporator) บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 204 บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
- Erlenmeyer flask ขนาด 100, 250, 2000 และ 5000 มิลลิลิตร.
- Ultrasonic bath บริษัท Astrason จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา.

- TLC developing chamber.
- UV viewing cabinet จำกัด บริษัท Alltect จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- TLC Aluminium sheet-Silica gel_{60} F_{254} บริษัท Merck จำกัด ประเทศเยอรมนี
- PTFE Syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร, บริษัท Chrom Tech จำกัด, Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- กระดาษกรอง.

สารเคมี

- 95% Ethanol, Commercial grade ,บริษัท องค์การสุรามหาชน จำกัด.
- Ethanol, AR grade, บริษัท Merck จำกัด ประเทศเยอรมนี.
- Ethyl aceteta, AR grade, บริษัท Lab Scan จำกัด ประเทศไทย.
- Methanol, MeOH, HPLC grade, บริษัท Lab Scan จำกัด ประเทศไทย.
- Methanol, MeOH, AR grade, บริษัท Lab Scan จำกัด ประเทศไทย.
- Formic acid, AR grade, บริษัท Lab scan ประเทศไทย.
- Acetic acid , AR grade บริษัท Merck จำกัด ประเทศเยอรมนี.
- Cone HCl, บริษัท Merck จำกัด ประเทศเยอรมนี.
- Cone H_2SO_4 , บริษัท Merck จำกัด ประเทศเยอรมนี.
- Rutin hydrate 95% HPLC, บริษัท Sigma Aldrich จำกัด ประเทศเยอรมนี.
- Gallic acid, AR grade, บริษัท Fluka จำกัด ประเทศสเปน.
- 2-aminoethyl diphenylborinate (NP), บริษัท Sigma Aldrich จำกัด ประเทศเยอรมนี.
- Polyethylene glycol (4000), บริษัท BHD จำกัด Laboratory Reagent ประเทศอังกฤษ.
- 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, บริษัท Sigma Aldrich จำกัด ประเทศเยอรมนี.
- $FeCl_3$ บริษัท SIGMA Aldrich จำกัด ประเทศเยอรมนี
- Folin-Ciocalteus Phenol reagent, บริษัท Merck จำกัด ประเทศเยอรมนี.
- Sodium carbonate anhydrous, บริษัท Ajax Finechem จำกัด ประเทศนิวซีแลนด์.
- Bismuth nitrate, บริษัท Fluka จำกัด ประเทศเยอรมนี.
- Potassium iodide, บริษัท Sigma จำกัด ประเทศเยอรมนี.
- Aluminium tricloride.

- Sodium nitrite.
- Magnesium ribbon, บริษัท BHD Laboratory Supplies จำกัด ประเทศอังกฤษ.
- น้ำกลั่น.

3.1.2 วิธีการทดลอง

3.1.2.1 การทดสอบวิเคราะห์หากลุ่มสารโดยวิธีการทางเคมี (Preliminary phytochemical analysis)

เตรียมสารตัวอย่าง นำสารสกัดหยาบ ผักเขียว, ผักหวานบ้าน และเปลือกเมล็ดมะขาม 200 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร กรองด้วย PTFE Syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร.

กลุ่มสาร	วิธีการตรวจและตัวชี้วัด
แทนนิน (tannin)	- นำสารละลายที่ได้ 2 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลาย $FeCl_3$2 มิลลิลิตร. ถ้ามีองค์ประกอบเป็นสารกลุ่มนี้จะได้ตะกอนที่มีสีน้ำเงิน-ดำ (blue-black precipitate).
ฟีโนลิก (phenolics)	- นำสารละลายที่ได้ 2 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลาย $FeCl_3$ 2 มิลลิลิตร. ถ้ามีองค์ประกอบเป็นสารกลุ่มนี้จะได้สารละลายที่มีสีน้ำเงิน-เขียว (blue-green color).
อัลคาลอยด์ (alkaloid)	- นำสารละลายที่ได้ 2 มิลลิลิตร เติม 1 % HCl 5 หยด เขย่า, จากนั้นเติมสารละลาย Dragendorff reagent จำนวน 10 หยด. ถ้ามีองค์ประกอบเป็นสารกลุ่มนี้จะได้ตะกอนที่มีสีส้ม (orange precipitate).
Cardiac glycoside	- นำสารละลายที่ได้ 2 มิลลิลิตร เติม กรดแอซีติก 1 มิลลิลิตร เขย่าเติมด้วยสารละลาย $FeCl_3$ 1 มิลลิลิตร และ กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 หยด. ถ้ามีองค์ประกอบเป็นสารกลุ่มนี้ ลารละลายที่ได้จะมีสีเขียว-น้ำเงิน (green-blue color).
ฟลาโวนอยด์ (flavonoid)	- นำสารสกัด 200 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายเอทานอล 10 มิลลิลิตร กรองด้วย PTFE Syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร, นำสารละลายที่ได้ 2 มิลลิลิตร นำแผ่นลวดโลหะแมกนีเซียมขนาด 0.5 เซนติเมตร ใส่ลงในสารละลายตัวอย่าง. จากนั้นค่อยๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 หยด. ถ้ามีองค์ประกอบเป็นสารกลุ่มนี้จะเห็นฟองฟู่และลารละลายที่ได้มีสีแดง-ชมพู (pink-tomato red color).

3.1.3 วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี TLC

- ชั่งสารสกัดหยาบของผักเชียงดา, ผักหวานบ้าน และเปลือกเมล็ดมะขามอย่างละ 50 มิลลิกรัม, ละลายเอทานอล 0.5 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด, เติมเอทิลแอซีเตต 0.5 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อพาร์ติชัน, นำส่วนของชั้นเอทิลแอซีเทตมา spot ลงบนแผ่น TLC (Aluminum sheet-Silica gel_{60} F_{254}).
- เตรียม mobile phase โดยใช้สารละลายผสมบดเอทิลแอซีเทต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซีติก : น้ำ (Ethyl acetate Formic acid : Acetic acid : Water) อัตราส่วน100 :11:11:26 (v/v), ใส่ลงในภาชนะบรรจุอะลูมิเนียม (Tank), เขย่าให้เข้ากัน, ทิ้งไว้ 30 นาที.
- ใส่แผ่น TLC วางลงใน Tank ที่มี mobile phase ปิดฝาให้สนิท, ปล่อยให้ mobile phase เคลื่อนที่ไปถึง solvent front (8 เซนติเมตร), จึงนำแผ่น TLC ออกจาก Tank. ใช้ไดรเยอร์เป่าแผ่น TLC ให้แห้ง.
- นำไปส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และที่ 366 นาโนเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้ฉีดพ่นด้วย spray reagent NP/PEG และ DPPH, ใช้ไดร์เป่าให้แห้งและให้ความร้อนจนเห็นแถบสีเกิดขึ้น. จากนั้นนำไปดูภายใต้แสง UV ที่ 254 และที่ 366 นาโนเมตร, อีกครั้ง.

การเตรียมสารละลาย Spray reagents (NP/PEG และ DPPH)

- เตรียม Natural product / polyethylene glycol reagent (NP/PEG), โดยชั่งสาร 2-aminoethyl diphenylborinate (NP) จำนวน 1 กรัม, ละลายในสารละลายเมทานอล, โดยปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร. ชั่งสาร Polyethylene glycol-4000 จำนวน 5 กรัม, ละลายในสารละลายเอทานอล แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร.
- เตรียม 0.1% ของ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), โดยชั่งสาร2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl 0.1 กรัม ละลายใน absolute EtOH ปริมาณ 100 มิลลิลิตร.

3.1.4 การวิเคราะห์ Total Phenolic Compounds โดยวิธี Folin-Ciocalteus

3.1.4.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารสกัดหยาบผักผักเชียงดาและผักหวานบ้านจากส่วนต่างๆ และสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม จำนวน 20 มิลลิกรัม ละลายด้วย 99.99 % เอทานอล, ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร, จะได้สารละลายตัวอย่างเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้ในการวิเคราะห์.

3.1.4.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

ใช้โซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร.

3.1.4.3 การเตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid

- ชั่งสารมาตรฐาน Gallic acid 0.20 กรัม โดยละลายด้วย 99.99 % เอทานอล, ปรับปริมาตรให้ครบ 20 มิลลิลิตร, ได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.
- ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐานในข้อ 3.1.4.1 จำนวน 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร, ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ตามลำดับ.

3.1.4.4 การวิเคราะห์หา Total phenolic content ในสารตัวอย่าง และ Standard curve

สารละลายมาตรฐาน

- นำสารละลายมาตรฐาน Gallic acid แต่ละความเข้มข้น จากข้อ 3.1.4.3 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดใหญ่, เติม Milli Q-water ปริมาณ 4,200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน.
- เติม Folin-Ciocalteus phenol reagent 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ประมาณ 1 นาที.
- เติม 20% โซเดียมคาร์บอเนต จำนวน 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน, เก็บในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร.

สารละลายตัวอย่าง

- ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายตัวอย่าง จากข้อ 3.1.4.1 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ขนาดใหญ่, เติม Milli Q-water ปริมาณ 4,200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน.
- เติม Folin-Ciocalteus phenol reagent ปริมาณ 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ประมาณ 1 นาที.
- เติม 20% โซเดียมคาร์บอเนต จำนวน 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน, เก็บในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร.

สารละลาย blank

- ใช้ปิเปตต์ดูดสาร Milli Q-water ปริมาณ 8,500 ไมโครลิตรใส่หลอดทดลองขนาดใหญ่ เติม Folin-Ciocalteus phenol reagent ปริมาณ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ประมาณ 1 นาที
- เติม 20% โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร เขย่า, เก็บในที่มืด 1 ชั่วโมง, นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร.

3.1.4.5 การคำนวณ Total phenolic

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Gallic acid จะได้สมการเส้นตรง. จากค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง นำมาคำนวณในสมการเส้นตรงที่ได้, จะได้ปริมาณของ Total phenolic compound ที่มีในสารตัวอย่างแต่ละชนิด.

3.1.5 การวิเคราะห์ Total flavonoids

3.1.5.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

- ชั่งสารสกัดหยาบผักหวาน, ผักเชียงดา จากส่วนต่างๆ และสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม จำนวน 25 มิลลิกรัม ละลายด้วย 80 % เอทานอล ปรับปริมาตรให้ครบ 5 มิลลิลิตร, จะได้สารละลายตัวอย่างเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, สำหรับใช้ในการวิเคราะห์.
- การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไทรต์ ($NaNO_2$)
  ชั่งสารโซเดียมไนไทรต์ 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร.
- การเตรียมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$)
  ชั่งสารอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร.

3.5.1.2 การเตรียมสารมาตรฐาน rutin

- ชั่งสารมาตรฐาน rutin จำนวน 0.20 กรัม โดยละลายด้วย 99.99 % เอทานอล, ปรับปริมาตรให้ครบ 20 มิลลิลิตร, ได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.
- ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐาน จำนวน 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตร ให้ครบ 10 มิลลิลิตร, จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ตามลำดับ.

3.5.1.3 การวิเคราะห์หา Total Flavonoids ในสารตัวอย่าง และ Standard curve

สารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง

- นำสารละลายมาตรฐาน rutin แต่ละความเข้มข้น และสารสกัด จากข้อ 3.5.1.1 และ 3.5.1.2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร, เติม Milli Q-water ปริมาณ 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน.
- ที่เวลา 0 นาที เติม 5 % $NaNO_2$ ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน.
- ที่เวลา 5 นาที เติม 5 % $AlCl_3$ ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน.
- ที่เวลา 6 นาที เติม 1 M NaOH ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร.
- ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร (ทำซ้ำ 3 ครั้ง).

3.5.1.4 สารละลาย blank

- นำสารละลายมาตรฐาน rutin แต่ละความเข้มข้น และสารสกัด จากข้อ 3.5.1.2 และ 3.5.1.1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร, เติม Milli Q-water ปริมาณ 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน.
- ที่เวลา 0 นาที เติม 5 % $NaNO_2$ ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน.
- ที่เวลา 6 นาที เติม 1 M NaOH ปริมาณ 2 มิลลิลิตร, ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร.
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร.

3.5.1.5 การคำนวณ

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน rutin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน rutin จะได้สมการเส้นตรง. จากค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างนำมาคำนวณในสมการเส้นตรงที่ได้จะได้ปริมาณของ Total flavonoids compound ที่มีในสารตัวอย่างแต่ละชนิด.

3.1.6 ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1.6.1 ผลการทดสอบวิเคราะห์หากลุ่มสารโดยวิธีการทางเคมี (Preliminary phytochemical analysis)

จากตัวอย่างสารสกัดหยาบของวัตถุดิบ 3 ประเภท คือ ผักเชียงดา, ผักหวานบ้าน และเปลือกเมล็ดมะขาม พบว่า มี phytochemicals คือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และฟีโนลิก (phenolics) ในสารสกัดทั้ง 3 กลุ่ม ในปริมาณที่แตกต่างกัน, แต่ไม่พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์

(alkaloid) และ cardiac glycoside ในสารสกัดหยาบทุกกลุ่ม. เป็นที่น่าสนใจว่า ในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีปริมาณแทนนิน (tannin) สูง, ในขณะที่สารสกัดของผักเชียงดาและผักหวานบ้าน ตรวจไม่พบ tannin ดังสรุปแสดงในตารางที่ 3 และผลการวิเคราะห์สาร phytochemical ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ของสารสกัดผักเชียงดา, ผักหวานบ้าน และ สารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม แสดงในรูปที่ 9, 10 และ 11 ตามลำดับ.

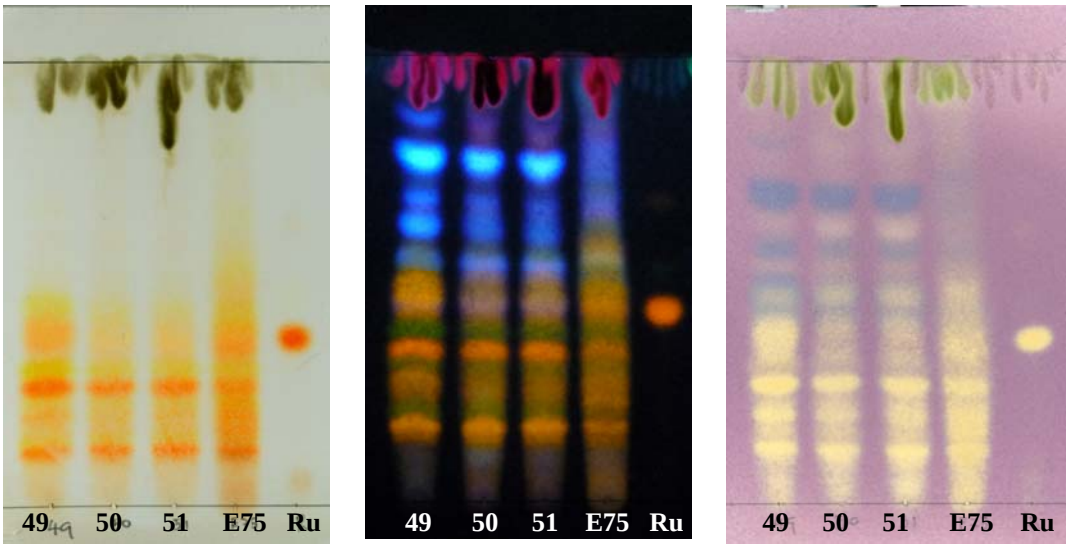
ตารางที่ 3. ผลการตรวจสาร phytochemicals แสดงในตัวอย่างสารสกัดหยาบของเปลือกเมล็ดมะขาม, ผักเชียงดา และผักหวานบ้าน

กลุ่มสาร	ตัวอย่างสารสกัด						
	เปลือกเมล็ดมะขาม	ผักหวาน		ผักเชียงดา			
		SAE-50 (I)	SAE-50 (II)	GYJ/ 49	GYJ/ 50	GYJ/ 51	GYJ/ 75
แทนนิน (Tannin)	++++	-	-	-	-	-	-
อัลคาลอยด์ (alkaloid)	-	-	-	-	-	-	-
Cardiac glycoside	-	-	-	-	-	-	-
ฟลาโวนอยด์ (flavonoid)	++	+	+++	+++	++	+++	+++
ฟีโนลิก (phenolics)	+++	+	++	++	+	++	+++

เครื่องหมาย + , ++, +++ หมายถึง ระดับความเข้มของสีและปริมาณตะกอนที่ได้จากสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ reagent mใช้ทดสอบ

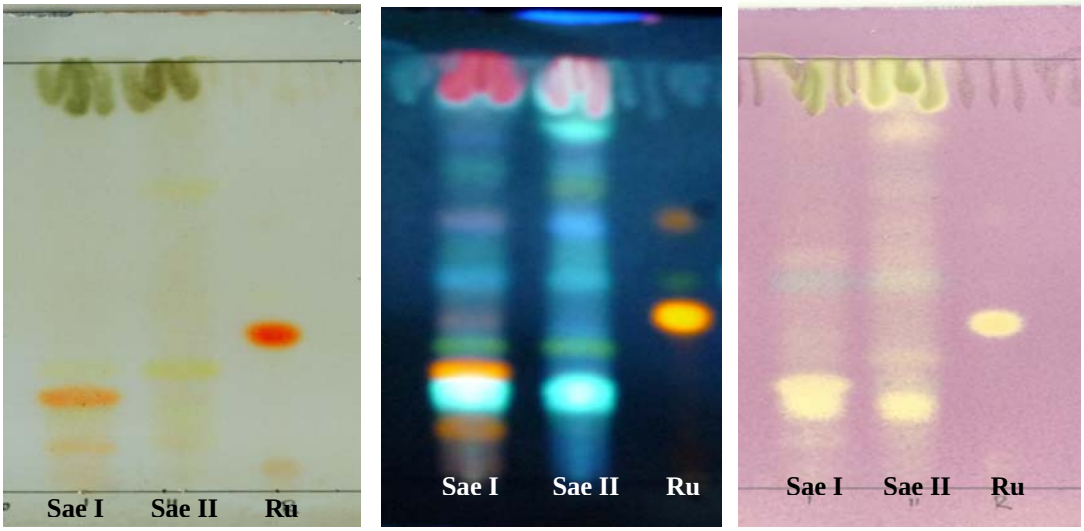
3.1.6.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี TLC

จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC หากลุ่มสาร phytochemical พบว่า ในสารสกัดทั้งสามชนิด ได้แก่ ผักเชียงดา (GYJ, 4 fractions), ผักหวานบ้าน (SAE, 2 fractions) และเปลือกเมล็ดมะขาม ประกอบด้วยสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และมี phenolic compound เป็นองค์ประกอบ. นอกจากนี้ ในเปลือกเมล็ดมะขามยังมีสารในกลุ่มแทนนินด้วย. เมื่อนำสารสกัดที่ได้มา spot ลงบนแผ่น TLC เทียบกับสารมาตรฐาน rutin และ chloroginic acid โดยใช้เคลื่อนที่เป็น Ethyl acetate : formic acid : acetic acid : water อัตราส่วน 100:11:11:26 (v/v) จากนั้นสเปรย์ด้วยสารละลาย NP/PEG ได้ผลดังรูปที่ 9-11, และเมื่อนำแผ่น TLC ที่ได้มาสเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH เพื่อตรวจสอบว่าสารที่มีค่า Rf ใดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.



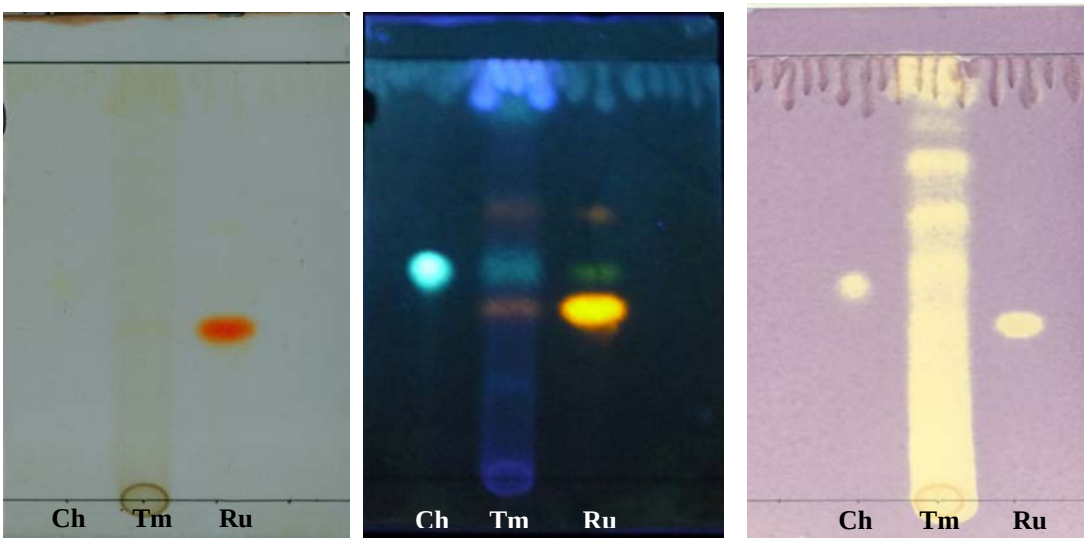
(A) (B) (C)

รูปที่ 9. TLC chromatogram ของสารสกัดผักเชียงดาเทียบกับสารมาตรฐาน rutin (R) A) สเปรย์ด้วย NP/PEG, B) ดูภายใต้ UV ที่ 366 นาโนเมตร C) สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH โดยใช้เคลื่อนที่กับ Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water อัตราส่วน 100:11:11:26 (v/v).



(A) (B) (C)

รูปที่ 10. TLC chromatogram ของสารสกัดผักหวานบ้าน เทียบกับสารมาตรฐาน rutin (R) A) สเปรย์ด้วย NP/PEG, B) ดูภายใต้ UV ที่ 366 นาโนเมตร C) สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH โดยใช้โมบายเฟส Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water อัตราส่วน 100:11:11:26 (v/v).



(A) (B) (C)

รูปที่ 11. TLC chromatogram ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม (Tm) เทียบกับสารมาตรฐาน chlorogenic acid (Ch) และ rutin (R) , A) สเปรย์ด้วย NP/PEG, B) ดูภายใต้ UV ที่ 366 นาโนเมตร, C) สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH โดยใช้เคลื่อนที่กับ Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water อัตราส่วน100:11:11:26 (v/v).

เมื่อนำแผ่น TLC ของสารสกัด สารมาตรฐาน rutin และ chlorogenic acid มาสเปรย์ด้วย NP/PEG สารมาตรฐาน Rutin จะปรากฏขึ้นในตำแหน่ง R_f ที่ 0.36 ซึ่งจะเห็นเป็นสีส้ม และเมื่อดูภายใต้แสง UV ที่ 366 นาโนเมตร จะเห็นเรืองแสงมีสีออกเหลืองส้ม ในขณะที่ สารมาตรฐาน chloroginic acid จะปรากฏขึ้นที่ตำแหน่ง R_f= 0.46 และเห็นเป็นสีออกเขียวเหลือง, และเมื่อดูภายใต้ UV ที่ 366 นาโนเมตร จะเห็นเป็นสีเขียว-น้ำเงิน. จากรูป TLC ของสารสกัดที่ได้ทั้งสามจะเห็นว่าในสารสกัดผักหวานและผักเชียงดา จะมีสาร rutin, สำหรับเปลือกเมล็ดมะขามจะพบ rutin และ chloroginic acid เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.

3.1.6.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic compounds

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักเชียงดา, ผักหวานบ้าน และเปลือกเมล็ดมะขามไปหาปริมาณ Total phenolic compounds โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteus และใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลดังตารางที่ 4.

ตารางที่ 4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic compounds ในตัวอย่างสารสกัดหยาบของเปลือกเมล็ดมะขาม, ผักเชียงดา และ ผักหวานบ้าน

ตัวอย่างสารสกัด	Total phenolic compounds (มิลลิกรัม/1กรัม สารสกัดหยาบ)
เปลือกเมล็ดมะขาม	822.75
ผักหวานบ้าน	
SAE-50(I)	34.17
SAE-50(II)	158.67
ผักเชียงดา	
GYJ/49	82.22
GYJ/50	158.24
GYJ/51	75.07
GYJ/75	168.30

3.1.6.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total flavonoid compounds

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักเชียงดา, ผักหวาน และเปลือกเมล็ดมะขามไปหาปริมาณ Total flavonoids compounds โดยใช้ rutin เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลดังตารางที่ 5.

ตารางที่ 5. ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic compounds ในตัวอย่างสารสกัดหยาบของเปลือกเมล็ดมะขาม, ผักเชียงดา และ ผักหวานบ้าน

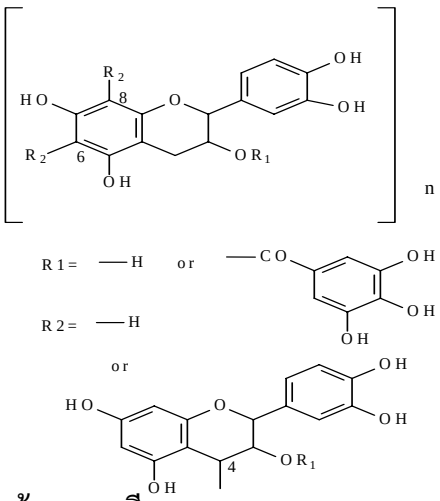
ตัวอย่างสารสกัด	Total flavonoid compounds (มิลลิกรัม/1กรัม สารสกัดหยาบ)
ผักหวานบ้าน	
SAE-50(I)	393.43
SAE-50(II)	313.83
ผักเชียงดา	
GYJ/49	315.14
GYJ/50	252.74
GYJ/51	261.74
GYJ/75	291.68

3.2 การตรวจควบคุมคุณภาพของสารสกัด OPCs จากเมล็ดองุ่น ด้วยเทคนิค HPLC

High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูงแยกสารเคมีภายใต้ความดันของเหลว ใช้ในการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และปริมาณ (quantitative analysis) ที่นิยมใช้มาก, เช่น ในการวิเคราะห์ทางอาหาร, ยา, ยาฆ่าแมลง, ทางด้านการแพทย์, สมุนไพร และทางด้านสิ่งแวดล้อม เป็นต้น, สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณต่ำๆได้ในระดับไมโครกรัม (μg) ถึงพิโคกรัม (pg) เมื่อเลือกใช้เครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม.

HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมแบบใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) สูบตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column). สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้. จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram).

ในการทดสอบนี้ได้ใช้ HPLC เพื่อตรวจควบคุมคุณภาพทางเคมี ของสารสกัดเมล็ดองุ่น grape seed extracts หรือ OPCs ที่เตรียมด้วยวิธีการที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 2.3 ในบทที่ 2, โดยการตรวจหาปริมาณสารสำคัญหลักที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบ โดยใช้เทคนิค HPLC เพื่อหาปริมาณของ (+)-catechin, (-)-epicatechin, และ proanthocyanidins (oligomers and polymers). สูตรโครงสร้างทางเคมีในสารสกัดเมล็ดอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 12.



รูปที่ 12. สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Polymeric Proanthocyanidins (OPCs) ในสารสกัดเมล็ดองุ่น.

3.2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

สารเคมีมาตรฐาน 3 ชนิด คือ (+)-Catechin และ (-)-epicatechin สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldricประเทศสหรัฐอเมริกา และ purified proanthocyanidins (olygomers and polymers) ได้รับอภินันทนาการจากบริษัทผู้จำหน่ายในประเทศญี่ปุ่น.

3.2.2 การทำ proanthocyanidins (olygomers and polymers) ให้บริสุทธิ์

เตรียมสารมาตรฐานของ polymeric proanthocyanidins ประยุกต์ตามวิธีที่อธิบายโดย Peng *et al*. (2001) โดยใช้ commercial grape seeds extract ซึ่งเป็นสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่วางจำหน่ายอยู่แล้ว (จากประเทศญี่ปุ่น), มีปริมาณของสารกลุ่ม proanthocyanidins (olygomers and polymers) 81% และปริมาณฟลาวานอยด์รวม (total flavanol) 90% มาทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกด้วย Sephadex LH20 gel column (บริษัท Pharmacia Biotech AB, Uppsala, ประเทศ Sweden), โดยใช้ Silica gel 60H เป็นตัวดูดซับและใช้ methanol/water (60:40, v/v) เป็นตัวชะ, ใช้ column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.1 ซม. × ความสูง 20 ซม. ทำการปรับปริมาตรสมดุลของ column ด้วย methanol/water (60:40, v/v) ก่อนใส่ตัวอย่างที่เป็นสารสกัดเมล็ดองุ่นที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ลงไป 300 กรัม, ภายหลังการชะด้วย methanol/water (60:40, v/v) สามารถรวม fractions ได้ 5 fractions ปริมาตร 350 มล. โดยใช้ flow rate ที่ 1.1-1.4 มล./นาที. นำมาแยกบริสุทธิ์ต่อเพื่อแยกสารกลุ่ม flavan-3-ol monomers ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและสารอนุภาคขนาดเล็กที่ปนเปื้อนอยู่ออก. สำหรับการแยกสารในกลุ่ม proanthocyanidins (olygomers and polymers) จะใช้การชะ column ด้วย acetone/water (60:40, v/v; around 100 มล.), โดย fraction ของ acetone ที่ได้นำไปปรับให้มีความเข้มข้นขึ้น โดยการลดความดันลงที่อุณหภูมิ 60°ซ. เพื่อระเหย acetone ออกไป. จากนั้น นำสารเข้มข้นที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการระเหิดแห้ง ด้วยเครื่อง Lyophilizer ได้ผงบริสุทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่น (proanthocyanidins) เรียกว่า purified OPCs หนัก 180 มิลลิกรัม.

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ Catechin, Epicatechin Polymeric และ Proanthocyanidins ในสารสกัดเมล็ดองุ่นด้วยเทคนิค HPLC

ใช้เทคนิค HPLC โดยดัดแปลงจากวิธีที่อธิบายโดย Weber *et al*. (2007) ด้วยเครื่อง Waters HPLC/UV system (บริษัท Waters, Milford, MA, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่มีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ 717 plus Autosampler, 600E Multisolvent system, 996 Diode array detector และ Apollo C18 column ที่มีความสูง 250 มิลลิเมตร และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร.

3.2.3.1 การเตรียมการแยกโดยวิธีทางโครมาโทกราฟี (chromotography separations)

ดำเนินการโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีอัตราส่วนคงที่ตลอด โดยเฟสเคลื่อนที่ A คือ กรดฟอสฟอริก 0.3% ในน้ำ และเฟสเคลื่อนที่ B คือแอซิโตไนไทรล์ (acetonitrile). กระบวนการ

ชะล้างสารตัวอย่างออกมาเริ่มต้นโดยการใช้เฟสเคลื่อนที่ B อัตราส่วน 10-15% ภายในเวลา 45นาที, ตามด้วยเฟสเคลื่อนที่ B อัตราส่วน 15-60% ภายในเวลา 15 นาที, แล้วคงที่อยู่เป็นเวลา 20 นาที. จากนั้น ลดอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ B เป็น 60-10% ภายในเวลา 1 นาที, ตามด้วยการปรับสมดุลของคอลัมน์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ B อัตราส่วน 10% เป็นเวลา 20 นาที, ใช้อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที. ตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตรโดยใช้ระบบ Millennium 2010 manager system (Waters, Milford, MA) ตลอดช่วงเวลา 80 นาทีของกระบวนการแยก, กำหนดอุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง, โดยใช้ปริมาณของการฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร.

3.2.3.2 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับ (+)-catechin, (-)-epicatechin และ polymeric proanthocyanidins

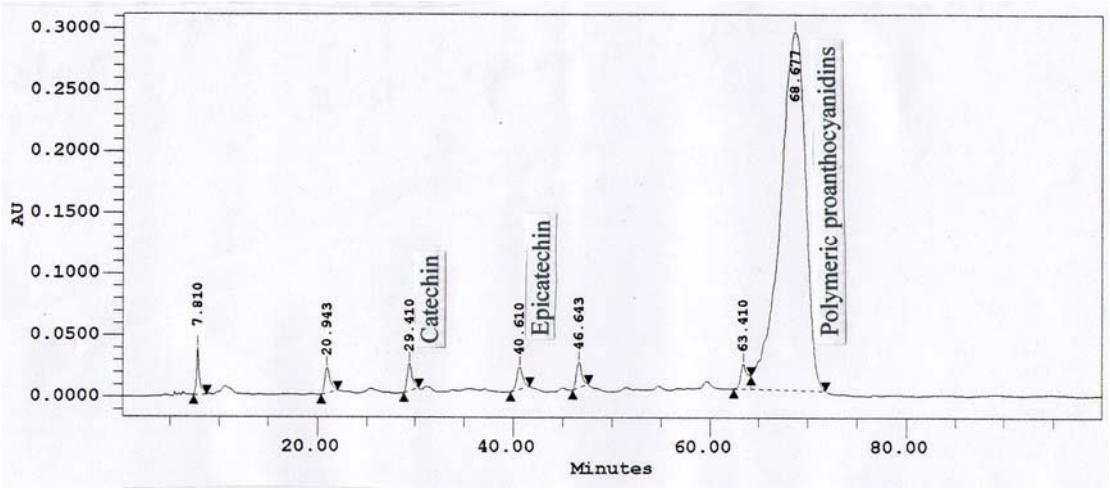
สารกลุ่ม proanthocyanidins (olygomers และ polymers) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการโครมาโทกราฟีโดยใช้ LH20 ถูกนำมาทำการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร. ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น โดยใช้สภาวะที่ระบุในขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี HPLC, เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐาน 5 จุด. ทำการวิเคราะห์โดยวิธีเดียวกันสำหรับสาร (+)-catechin และ (-)-epicatechin ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ได้กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (+)-catechin, (-)-epicatechin และ proanthocyanidins (olygomers และ polymers) กับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดย HPLC ที่มีปริมาตรการฉีด 20 ไมโครลิตร ที่มีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่สูง.

3.2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณของ (+)-catechin, (-)-epicatechin และ polymeric proanthocyanidins

การวิเคราะห์และจำแนกสารโดย HPLC ทำได้โดยการเปรียบเทียบเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (retention time) และหาปริมาณโดยใช้กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน.

3.2.4 ผลการวิเคราะห์ HPLC

ผลจากวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าปริมาณของสารสำคัญหลักในสารสกัดเมล็ดองุ่นหรือ OPCs คือ catechin, epicatechin และ proanthocyanidins (oligomers and polymers) เป็นร้อยละ 1.8, 1.2 และ 67.6, ตามลำดับ, ดังแสดงในรูปที่ 13.



รูปที่ 13. Chromatogram ของสาร Polymeric proanthocyanidins (OPCs) ในตัวอย่างเมล็ดองุ่นไทย สายพันธุ์ vitis vinifera cv. Ribier (Pok Dum).

ตารางที่ 6. ผลของความเข้มข้นของเอทานอลต่อการสกัดสารสำคัญในกลุ่ม Polymeric proanthocyanidins จากเมล็ดองุ่นสายพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum)

Intact or dried	Ethanol (%)	Catechin		Epicatechin		PAs[1]	
		mg/g[2]	(%)[3]	mg/g[2]	(%)[3]	mg/g[2]	(%)[3]
intact	100	3.1±1.1	50.0	2.7±0.6	62.8	34.2±2.6	69.2
	80	5.0±1.4	80.7	4.0±1.3	93.0	44.4±4.0	89.9
	60	6.2±1.9	100.0	4.3±0.6	100.0	49.4±3.5	100.0
	40	2.9±0.3	46.8	2.2±0.2	51.2	35.1±3.2	71.1
	20	1.9±0.3	30.7	1.2±0.2	27.9	24.3±3.5	49.2
	0	1.6±0.2	25.8	1.0±0.1	23.3	9.9±1.9	20.0
dried	100	nd[4]	-	nd[4]	-	1.0±0.1	2.4
	80	0.9±0.2	26.5	0.7±0.3	29.2	13.9±2.0	34.0
	60	1.3±0.2	38.2	1.0±0.1	41.7	29.9±2.8	73.1
	40	3.4±0.6	100.0	2.4±0.3	100.0	40.9±1.8	100.0
	20	2.3±0.3	67.7	1.6±0.2	66.7	27.9±3.2	68.2
	0	1.4±0.2	41.2	1.0±0.2	41.7	9.4±0.8	23.0

[1] Polymeric proanthocyanidins.

[2] Figures (mg/g) in the table mean the flavan-3-ols (mg/g of seeds) eluted in the solvent at 60ºC for 6hr. Averages ± S.D. of three replicates (n=5). [3]Percentages on maximum elution, [4]not detected.

ตารางที่ 7. ผลของอุณหภูมิต่อการสกัดสารสำคัญในกลุ่ม Polymeric proanthocyanidins จากเมล็ดองุ่นสายพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum)

Temperature	Catechin		Epicatechin		PAs[a]	
(°C)	mg/g[b]	(%)[c]	mg/g[b]	(%)[c]	mg/g[b]	(%)[c]
80	8.3±1.1	224	5.5±0.7	189	47.6±3.0	144
70	5.1±1.6	138	3.9±0.3	134	43.4±2.0	131
60	3.7±1.4	100	2.9±0.7	100	32.9±1.9	100
50	2.1±0.7	56	1.8±0.4	62	21.3±2.3	64
40	1.9±0.2	51	1.7±0.2	58	20.9±2.8	63
RT[d] (28°C)	1.7±0.4	46	1.1±0.2	37	12.4±1.8	37

[a]Polymeric proanthocyanidins. [b]Figures in the row mean the averages (five replicates) ± S.D. of the flavan-3-ols (mg/g of seeds) eluted in the solvent at various temperatures for 1h. [c]Percentages on elution at 60°C. [d]room temperature.

4. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผักเชียงดา, ผักหวานบ้าน, เมล็ดองุ่น และ เปลือกเมล็ดมะขาม

4.1 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

4.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดย วิธี Folin-Ciocalteu

สารประกอบฟีนอลิกหรือสารกลุ่มฟีนอลเป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยกลุ่ม hydroxyl group (-OH) จับกับกลุ่มของ aromatic hydrocarbon group. ตัวอย่างพื้นฐานคือ Phenol (C_6H_5OH). สารประกอบฟีนอลิกมีอยู่หลากหลายชนิดตามโครงสร้างทางเคมี และสารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่ที่พบในพืชจะมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น gallic acid, capsaisin, polyphenol, ellagic acid, flavonoid, catechin. การทดสอบหาสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu เป็นวิธีการพื้นฐานที่นิยมใช้ แต่ไม่สามารถบอกถึงชนิดของสารประกอบได้ชัดเจน, เป็นเพียงวิธีการที่ใช้ในการคัดแยกพืชเพื่อทดสอบปริมาณของฟีนอลิกรวม (total phenolic) โดยใช้สารมาตรฐานคือ gallic acid เป็นตัวเปรียบเทียบ และใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานตามที่อธิบายโดย Elizabeth *et al*., (2007) ดังนี้ :

4.1.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบผักเชียงดา (GY)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของตัวอย่างสารสกัดจากผักหวานบ้านจำนวน 2 ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดดังที่อธิบายไว้ในบทที่ 2, ได้แก่ สารสกัดผักเชียงดาอ่อนด้วยน้ำ เรียกว่า GY-Y และสารสกัดผักเชียงดาแก่ด้วยน้ำ เรียกว่า GY-H, ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ตามขั้นตอน ดังนี้ :

- เตรียมสารมาตรฐาน (GAE) ที่ความเข้มข้น 1.5, 1.0, 0.1, 0.05 และ 0.01 มก./มล.
- เตรียมตัวอย่างสารสกัดผักเชียงดา (GY-Y และ GY-H), ที่ความเข้มข้น 5.0,3.0, 1.0 และ 0.5 มก./มล.
- ใส่สารตัวอย่างและสารมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น 50 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง 5 มล.
- เติมสาร Folin-Ciocalteu ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติม Na_2CO_3 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาณให้ถึง 5 มล. ด้วย deionize water.
- ตั้งไว้ในที่มืด ประมาณ 1 ชั่วโมง.
- นำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร.
- คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหน่วยของ gallic acid equivqlent (GAEs)/ g Sample.

ผลการวิเคราะห์

ผลการแสดงในตารางที่ 8 พบว่าสารสกัดหยาบของผักเชียงดาอ่อนที่สกัดด้วยน้ำ (GY-Y) มีปริมาณฟินอลิกรวม = 8.60 ± 0.004 GAEs/100g of extract และของผักเชียงดาแก่ (GY-H) = 8.32 ± 0.016 GAEs/100g of extract, หมายถึงใน 100 กรัม ของสารสกัด GY-Y มีปริมาณฟินอลิกเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน gallic acid 8.60 กรัม, ในขณะที่ใน 100 กรัม ของสารสกัด GY-H มีปริมาณฟินอลิกเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน gallic acid 8.32 กรัม. แสดงว่าผักเชียงดาอ่อนมีปริมาณสารฟินอลิกสูงกว่าผักเชียงดาแก่เล็กน้อย.

ตารางที่ 8. ปริมาณสารประกอบฟินอลิกรวมในสารสกัดผักเชียงดา

ตัวอย่างสารสกัดจากผักพื้นบ้าน	ปริมาณสารประกอบฟินอลิก (Total phenolic content) (g) (GAEs/100g of extract)
ผักเชียงดาอ่อน (GY-Y)	8.60 ± 0.004
ผักเชียงดาแก่ (GY-H)	8.32 ± 0.016

4.1.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟินอลิกในสารสกัดหยาบผักหวานบ้าน (SAE)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟินอลิกของตัวอย่างสารสกัดจากผักหวานบ้านจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่ได้จากการสกัดดังที่อธิบายไว้ในบทที่ 2, ได้แก่ สารสกัดผักหวานบ้านด้วยน้ำ (เรียกว่า SAE-W), สารสกัดผักหวานบ้านด้วยเอทานอลเข้มข้น 50% (เรียกว่า SAE-E50) และสารสกัดผักหวานบ้านบ้านด้วยเอทานอลเข้มข้น 95 (เรียกว่า SAE-E95), ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ตามขั้นตอน ดังนี้ :

วิธีการวิเคราะห์

- เตรียมสารมาตรฐาน (GAE) ที่ความเข้มข้น 1.5, 1.0, 0.1, 0.05 และ 0.01 มก./มล.
- เตรียมตัวอย่างสารสกัดผักหวานบ้าน (SAE-W, SAE-E50 และ SAE-E95) ที่ความเข้มข้น 5.0, 3.0, 1.0 และ 0.5 มก./มล.
- ใส่สารตัวอย่างและสารมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น 50 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง มล.
- เติมสาร Folin-Ciocalteu ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติม Na_2CO_3 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร.

- ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาณให้ถึง 5 มล. ด้วย deionized water.
- ตั้งไว้ในที่มืด ประมาณ 1 ชั่วโมง.
- นำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร.
- คำนวณปริมาณสารประกอบฟินอลิกในหน่วยของ gallic acid equivqlent (GAEs)/ g sample.

4.4.1.3 ผลการวิเคราะห์

ปริมาณฟินอลิก (total phenolic content)ในตัวอย่างสารสกัดผักหวานบ้านมีค่าแตกต่างกัน, โดยพบว่า ผักหวานบ้านที่สกัดด้วยน้ำ (SAE-W) มีปริมาณสารประกอบฟินอลิกต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างสารสกัดน้ำจากผักหวานบ้านที่สกัดด้วยเอทานอลทั้ง 2 ตัวอย่าง. ผล ดังแสดงในตารางที่ 9. โดย ตัวอย่างสารสกัดผักหวานบ้านด้วย 50% เอทานอล (SAE-E50) และสารสกัดผักหวานบ้านด้วย 95% เอทานอล (SAE-E95) ที่น้ำหนัก 100 กรัม มีปริมาณ total phenolic เท่ากัน คือ 4.90 กรัม (4.90 ± 0.002 GAEs/100g extract). ในขณะที่ตัวอย่างผักหวานบ้านที่สกัดด้วยน้ำ (SAE-W) หนัก 100 กรัม มีปริมาณ total phenolic 3.44 กรัม (3.44 ± 0.001GAEs/100g extract).

ตารางที่ 9. ปริมาณสารประกอบฟินอลิกรวมในตัวอย่างสารสกัดผักหวานบ้าน

ตัวอย่างสารสกัดจากผักพื้นบ้าน	ปริมาณสารประกอบฟินอลิก (Total phenolic content) (g) (GAEs/ 100g extract)
ผักหวานบ้านสด (WH)	3.44 ± 0.001
ผักหวานบ้านสกัดด้วยเอทานอล เข้มข้น 50% (SAE-E50)	4.90 ± 0.002
ผักหวานบ้านสกัดด้วยเอทานอล เข้มข้น 95% (SAE-E95)	4.90 ± 0.002

4.2 การตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักหวานบ้านและผักเชียงดา

4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผักหวานบ้าน และผักเชียงดา โดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay

4.2.1.1 วิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดหยาบ % 95 เอทานอลจากผักหวานบ้าน (SAE-E95)

- ชั่งผงแห้ง หนัก 900 มิลลิกรัม ผักหวานบ้าน นำมาหมักด้วย % 95 เอทานอล นาน 1วัน, ไขส่วนของสารละลายที่ได้ออกมา แล้วเติม % 95 เอทานอลใส่เข้าไปใหม่, ทำซ้ำเช่นเดียวกันจนกระทั่งได้สารละลายครั้งสุดท้ายใสไม่มีสี.
- รวมสารสกัดที่กรองได้ทั้งหมดไประเหยแห้งภายใต้การลดความดันที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องระเหยสารภายใต้สุญญากาศ.

2. การเตรียมสารสกัดหยาบ % 50 เอทานอลจากผักหวานบ้าน (SAE-E50)

- ชั่งผักหวานบ้านแห้ง หนัก 2 กิโลกรัม นำมาหมักด้วย %50 เอทานอล ปริมาตร 40 ลิตร นาน 1วัน, ไขส่วนของสารละลายที่ได้ออกมา แล้วเติม %50 เอทานอลใส่เข้าไปใหม่, ทำซ้ำเช่นเดียวกันจนกระทั่งได้สารละลายครั้งสุดท้ายใสไม่มีสี.
- รวมสารสกัดที่กรองได้ทั้งหมดไประเหยแห้งภายใต้การลดความดันที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องระเหยสารภายใต้สุญญากาศ.
- นำสารสกัดที่ได้ซึ่งยังมีน้ำหลงเหลืออยู่ ไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งด้วยระบบความเย็น.

3. การเตรียมสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำจากผักหวานบ้าน

- ชั่งผักหวานบ้าน และผักเชียงดาสดมาปั่นหรือบดให้ละเอียดด้วย blender.
- ชั่ง 1.7 กิโลกรัม ผักเชียงดาสด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 ลิตร และมาปั่นหรือบดให้ละเอียดด้วย blender. รวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมดนำไปกรอง และไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งด้วยความเย็น.

4. การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

- ละลายสารสกัดหยาบจากผักหวานบ้านและผักเชียงดา ที่ได้จากข้อ 1 และ 2 0.05 กรัม ด้วย 99.99% เอทานอล (ปริมาตร 8 มล.) เขย่า 30 นาทีเพื่อช่วยในการละลาย และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้ stock สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร.
- จากนั้นนำมาเจือจางโดยการเติม 99.99 % เอทานอล ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ซึ่งเมื่อเติมสารละลายตัวอย่างดังกล่าว 100 ไมโครลิตร ลงในจานหลายหลุม

และเติมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร จะได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 ไมโครลิตร และมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างเป็น 40, 80,160, 240 และ 320 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร.

5. การเตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน

- นำสารมาตรฐาน Trolox, Rutin และวิตามินซี (ชนิดละ 0.040 กรัม) ด้วย 99.99% เอทานอล (10 มล.) ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องเขย่า 30 นาที จะได้ stock สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร.
- จากนั้นนำมาเจือจางด้วย 99.99% เอทานอลให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ 0.5, 1.0, 5.0 5.0 และ 10ไมโครกรัม/มล.

6. การเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักหวานบ้านและผักเชียงดา

- ละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, 0.0237 กรัม) ด้วย 99.9% เอทานอล (10 มล.) จะได้ stock solution เข้มข้น 6×10^{-3} โมลาร์ เมื่อนำมาใช้ให้เจือจาง 100-fold dilution (เป็น 6×10^{-5} โมลาร์).

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

นำสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Vitamin C, Rutin และ Trolox ตามวิธีที่คิดดัดแปลงจาก Tewtrakul (1998) ดังนี้

- ผสมสารละลายลงในจานหลายหลุม A, B และ C (ทำ 3 ซ้ำ) ได้แก่ :

A (test sample) : สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานใน 99.99% เอทานอล 100 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH 6×10^{-5} โมลาร์ ใน 99.99% เอทานอล 100 ไมโครลิตร.

B (blank of A) : สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานใน 99.99% เอทานอล 100 ไมโครลิตร และ 99.99% เอทานอล 100 ไมโครลิตร.

C (control) : สารละลาย DPPH 6×10^{-5} โมลาร์ ใน 99.99% เอทานอล 100 ไมโครลิตร และ 99.99 % เอทานอล 100 ไมโครลิตร.

- นำจานหลายหลุมวางลงบนถาดของเครื่องวัดการดูดกลืนแสงในจานหลุม (microplate reader).

- ผสมสารทดสอบในแต่ละหลุมให้เข้ากันดี.
- บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ในที่มืด.
- จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร.

8. การคำนวณหาค่าร้อยละของการต้านออกซิเดชันของ DPPH assay

คำนวณหาค่าร้อยละของการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Scavenging} = [C - (A\text{-}B)] / C \times 100$$

โดย A, B และ C เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของ test sample, blank of sample และ control ตามลำดับ.

9. การคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟ

การหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง) ใช้โปรแกรม Excel สร้างกราฟเส้นตรงระหว่างค่า $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (แกน X) กับ %Scavenging (แกนY) คำนวณ โดยแทนค่า y = 50 ลงในสมการกราฟเส้นตรง จะได้ค่า x และ antilog x จะเป็นค่า IC_{50}.

4.2.1.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธีทดสอบความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging assay) ที่มีความเสถียรและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยสารทดสอบให้โปรตอนไปจับกับอนุมูลอิสระ DPPH ได้เป็นสาร DPPH-H ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ลดลง ดังสมการ :

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

จากการทดสอบเมื่อสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างค่า $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของสารสกัด) (แกน x) และกับ %Scavenging (แกนY) คำนวณ โดยแทนค่า y = 50 ลงในสมการกราฟเส้นตรง จะได้ค่า x และ antilog x ได้เป็นค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน และ สารสกัดตัวอย่าง ได้ผลดังตารางที่ 10 และ ตารางที่ 11, ตามลำดับ.

ตารางที่ 10. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ในสารมาตรฐาน

ความเข้มข้น (ppm)	Log Conc.	% Scavenging (ppm)		
		Vitamin C	**Trolox**	**Rutin**
0.5	0.3010-	27.01	21.49	16.55
1	0	37.01	29.77	28.05
2	0.3010	59.54	46.21	66.44
5	0.6990	88.74	84.37	88.97
10	1	95.06	84.83	93.45
สมการเส้นตรง (y = mx+b)		57.153X+42.052	55.497X+34.476	64.934X+36.628
R^2		0.9747	0.9411	0.9401
IC_{50} (ppm)		1.3774	1.9043	1.6067

ตารางที่ 11. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ในสารตัวอย่างของสารสกัดจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

ความเข้มข้น (ppm)	Log Conc.	% Scavenging (ppm)					
		ผักเชียงดาอ่อน สกัดด้วยน้ำ	ผักเชียงดาแก่ สกัดด้วยน้ำ	ผักหวานบ้าน สกัดด้วย 50 % เอทานอล	ผักหวานบ้าน สกัดด้วย 95 % เอทานอล	ผักหวานบ้าน สกัดด้วยน้ำ	ผักหวานบ้าน สกัดด้วยน้ำ
40	1.6021	29.63	35.19	32.94	31.70	27.27	29.91
80	1.9031	41.50	43.36	43.35	39.76	37.81	37.02
160	2.2041	60.46	57.30	64.56	54.79	52.17	50.20
240	2.3802	74.4	69.17	78.79	68.74	62.19	73.52
320	2.5052	84.75	79.63	90.91	82.46	76.15	81.29
สมการเส้นตรง (y = mx+b)		61.384X-1.919	48.59X-46.029	64.662X-74.905	54.808X-60.643	51.1723X-58.4787	58.378X-69.311
R^2		0.9812	0.9616	0.9719	0.9421	0.9628	0.9138
IC_{50} (ppm)		96.8655	94.6917	85.4398	104.4090	125.1087	110.6029
							เฉลี่ย =117.856

* เก็บสารสกัดที่ 4 °ซ. ประมาณ 2 สัปดาห์ ก่อน Freeze dry (สีเขียวเข้มของสารสกัดจางลงเป็นสีเขียวออกน้ำตาล) ** ทำการ freeze dry ทันที

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักเชียงดา และ ผักหวานบ้าน โดยวิธี Photochemiluminescence (PCL) ด้วยเครื่อง Photochem®

หลักการพื้นฐานของเครื่อง Photochem® คือ วัดปฏิกิริยาจากการเรืองแสง (chemiluminescence) ของสารตัวอย่างที่ใช้ในระบบ โดยหลักการสำคัญของ PCL คือ ใช้สารเคมี Luminol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น photosensitizer compound เป็นตัวสร้างอนุมูลอิสระ ชนิด superoxide anion radical ($O_2^{\bullet}$) ขึ้น,โดยผ่านการกระตุ้นจากแสงอัลตราไวโอเลต (UV irradiation) ที่มีแหล่งกำเนิดอยู่แล้วภายในเครื่อง Photochem® ซึ่งมีอัตราการเกิดมากกว่าสถานะปกติถึง 100 เท่า. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ Detector substance และในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาจะมีการปล่อย Photon ในรูปของ chemiluminescence ซึ่งจะถูกตรวจจับสัญญาณและวัดได้โดย Photomultiplier tube (PMT). หากสารมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จะเกิดการยับยั้งจำนวนอนุมูลอิสระ ($O_2^{\bullet}$) ที่เกิดขึ้น. ทั้งนี้ในการประเมินผล ระบบจะทำการตรวจวัดจากปริมาณอนุมูลอิสระที่หลงเหลืออยู่ และแปรค่าเป็นประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant activity, AA) โดยแสดงค่าเป็นประสิทธิภาพเทียบเท่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เช่น วิตามินซี (ascorbic acid) และวิตามินอี (Trolox) ในหน่วยระดับนาโนโมลาร์ (nanomole ; nmole).

4.3.1 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย Photochem®

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบเพื่อประเมินคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion radical ($O_2^{\bullet}$) ของตัวอย่างสารสกัดหยาบของผักเชียงดาและผักหวานบ้าน ด้วยวิธีการสกัดตามที่อธิบายในบทที่ 2. ประเมินผลเทียบกับสารมาตรฐานในหน่วยของ trolox equivalent ใช้สำหรับสารที่ละลายในไขมัน : lipid soluble compound) และ Vit. C equivalent ใช้สำหรับสารที่ละลายในน้ำ (water soluble compound) โดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน 5 ตัวอย่างคือ :

- สารสกัดผักเชียงดาส่วนอ่อนด้วยน้ำ (GYH).
- สารสกัดผักเชียงดาส่วนแก่ด้วยน้ำ (GOH).
- สารสกัดผักหวานบ้านด้วยน้ำ (WH) .
- สารสกัดผักหวานบ้านด้วย 50 %เอทานอล (WE50).
- สารสกัดผักหวานบ้านด้วย 95 %เอทานอล (WE95).

4.3.1.1 การตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ชนิด superoxide anion radical ($O_2^{\bullet}$) ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มสารประกอบที่ละลายน้ำได้ (water soluble compound)

โดยใช้น้ำยาตรวจสำเร็จรูป (ACW antioxidant reagent kit, Analytik Jena, ประเทศเยอรมนี ประกอบด้วย สารละลาย R1 - ตัวทำละลายตัวอย่าง (ACW-Diluent), สารละลาย R2 - บัฟเฟอร์ทำปฏิกิริยา (Reaction buffer), สารละลาย R3 - สารไวแสง (Photo sensitizer and detection reagent) และ สารละลาย R4 - สารมาตรฐานคือ ascorbic acid.

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการทดสอบด้วยเครื่อง Photochem®

ในชุด ACW kit เป็นสารละลายที่สำหรับสารละลาย R3 ก่อนใช้ปล่อยให้ละลายจากสภาพแข็ง (frozen) ให้เป็นของเหลวและเติมสารละลาย R2 ปริมาณ 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน. สารละลายจากการผสมนี้ใช้สำหรับการทดสอบได้ 40 ครั้ง. เตรียมสารละลาย R4 โดยเติมสารละลาย R1 ปริมาณ 490 ไมโครลิตร และเติม 95-97% H_2SO_4 ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน. ลดความเข้มข้นของสารละลาย R4 ในอัตราส่วน 1:100 ด้วยสารละลาย R1. สารละลาย R4 ที่พร้อมใช้งานจะมีความเข้มข้น 1 นาโนโมลาร์ ของ ascorbic acid.

2. การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

ละลายตัวอย่างทดสอบ คือ สารสกัดหยาบผักเชียงดาและผักหวานบ้าน ด้วยสารละลาย R1 และปรับความเข้มข้นให้อยู่ในช่วงของ calibration curve เพื่อที่จะสามารถคำนวณค่าต้านต่ออนุมูลอิสระในหน่วย equivalent of ascorbic acid.

ตารางที่ 12. ปริมาณของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (ACW) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ต่อครั้งต่อตัวอย่าง)

Reagent	ปริมาตรของ Reagent (µl)				ปริมาตรของSample
	1	2	3	4	(µl)
Blank	1500	1000	25	0	0
Calibration	1500-X	1000	25	X	0
Measurement	1500-Y	1000	25	0	Y

3. การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มสารประกอบที่ละลายน้ำได้ด้วย ACW system

อนุมูลอิสระ (superoxide anion radicals) จะถูกสร้างให้เกิดขึ้นในระบบโดยการกระตุ้น (irradiation) สารไวแสง (photosensitizer) เพื่อให้เกิดการเรืองแสง อนุมูลอิสระบางส่วนจะถูกกำจัดโดยสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. อนุมูลส่วนที่เหลือจะถูกวัดโดยตัวจับสัญญาณ, ทำให้เกิดการเรืองแสง, ส่งสัญญาณเข้าสู่ระบบ และคำนวณเป็นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับ ascorbic acid.

การวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นจากสารเรืองแสงนั้นจะดำเนินการอยู่ในช่วง 1-3 นาที ในการวัด ACW ช่วงของ lag phase เป็นช่วงที่ไม่เกิดสัญญาณเป็นช่วงที่อนุมูลอิสระเริ่มถูกจับโดยสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง. เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในตัวอย่างตัวอย่างเริ่มหมดความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระที่เหลือจะทำให้สัญญาณสูงขึ้นจนถึงมากที่สุด. ช่วงระยะเวลาของ lag phase ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง แสดงผลเป็นหน่วย ascorbic acid equivalent.

4. การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มสารประกอบที่ละลายในไขมันได้ Lipid soluble compounds ด้วย ACL system

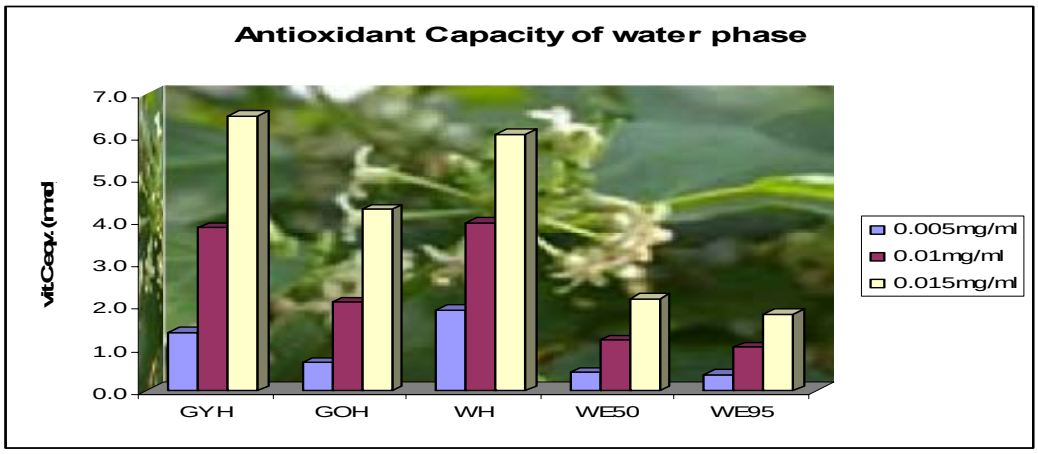
ใช้ reagent kit ชนิด ACL : Antioxidant Capacity Lipid soluble compound (Analytik Jena, ประเทศเยอรมนี) และทำการเตรียมสารละลายเพื่อใช้งานเช่นเดียวกันกับวิธีการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ ACW ดังที่อธิบายในหัวข้อ 3 ข้างต้น. ยกเว้นการเปลี่ยนสารมาตรฐานที่ใช้จาก ascorbic acid (vitamin C) มาเป็น Trolox (vitamine E) และผลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (inhibition) ของตัวอย่างจะถูกเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน และแสดงผลเป็นหน่วย Trolox® equivalent. ทำการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดหยาบของผักเชียงดาและผักหวานบ้าน ในลักษณะเดียวกับที่ปฏิบัติสำหรับการใช้ ACW system ที่อธิบายข้างต้น.

4.3.2 ผลการทดสอบ

4.3.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสำคัญในกลุ่มที่เป็นสารมีขั้ว (polar compounds) ของสารสกัดหยาบผักเชียงดา และ ผักหวานบ้าน

พบว่า ตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดใกล้เคียงกัน คือ สารสกัดน้ำผักเชียงดาส่วนอ่อน (GYH) และสารสกัดน้ำผักหวานบ้าน (WH). ตัวอย่างที่มีฤทธิ์รองลงมาคือ

สารสกัดน้ำผักเชียงดาส่วนแก่ (GOH) และสารสกัดผักหวานบ้านด้วยเอทานอลทั้งที่เข้มข้น 50 % (WE50) และที่ 95% (WE95) มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน และเป็นฤทธิ์ที่ต่ำกว่าตัวอย่างอื่น. แสดงว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์เป็นกลุ่มสารที่มีขั้วและสามารถละลายได้ในน้ำ (water phase) เมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง Photochem® ในระบบ water phase (antioxidant capacity of water soluble ; ACW).



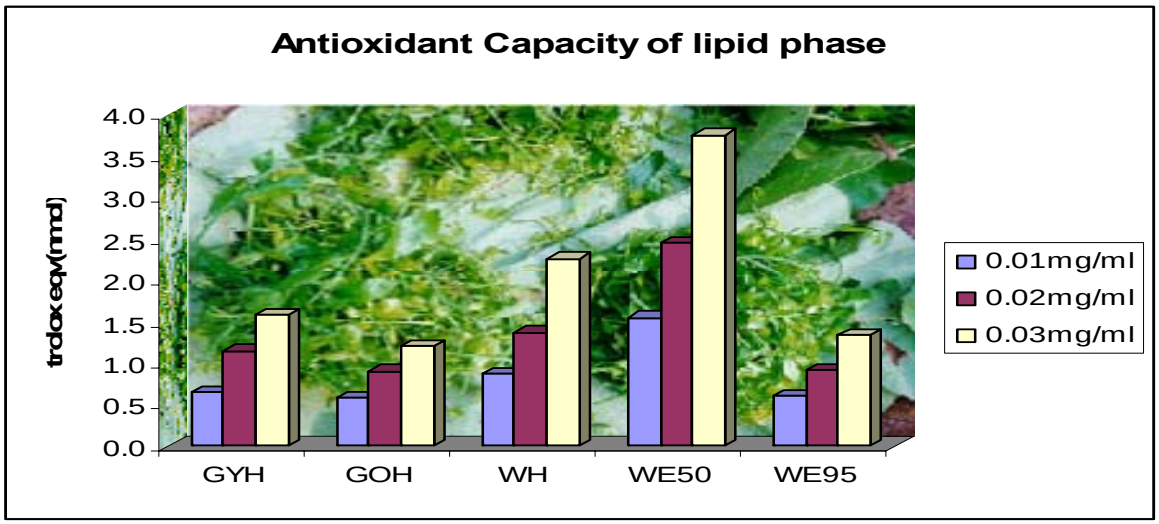
รูปที่ 14. ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion ($O^{\cdot}_2$) ด้วยวิธี Photochemiluminescence ในสภาวะการละลายด้วยน้ำ (water phase : WCL).

จากผลที่แสดงในรูปที่ 14 ข้างต้น พบว่าทุกตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในลักษณะ dose-dependent manner. โดยตัวอย่างของผักเชียงดาที่สกัดด้วยน้ำ พบว่า ส่วนที่อ่อน (GYH) มีฤทธิ์ดีกว่าส่วนแก่ (GOH) สำหรับผักหวานบ้าน (GH) ตัวอย่างที่มีฤทธิ์สูงสุดคือตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำ (WH) ซึ่งมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับตัวอย่างของผักเชียงดาอ่อน (GYH) ในขณะที่ตัวอย่างผักหวานบ้านที่สกัดด้วยเอทานอลทั้งที่ 50%(WE50) และ 95% (WE95) มีฤทธิ์ไม่แตกต่างกันมากนัก และเป็นฤทธิ์ที่ต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ.

4.3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสำคัญในกลุ่มที่ไม่มีขั้ว (non-polar compounds) ของสารสกัดหยาบผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

พบว่าตัวอย่างที่มีฤทธิ์สูงที่สุด คือ สารสกัด%50 เอทานอลผักหวานบ้าน (WE50). ตัวอย่างที่มีฤทธิ์รองลงมาคือ สารสกัดน้ำผักหวานบ้านด้วยน้ำ (WH), ส่วนสารสกัดน้ำผักเชียงดาส่วนอ่อน (GYH) และสารสกัดน้ำผักเชียงดาส่วนแก่ (GOH) มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน และอยู่ใน

ระดับเดียวกันกับสารสกัด %95 เอทานอลของผักหวานบ้าน (WE95). ข้อมูลที่ได้แสดงว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างผักหวานบ้านเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มทั้งที่เป็นสารมีขั้วและไม่มีขั้ว เมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง Photochem® ในระบบ lipid phase (antioxidant capacity of lipid soluble ; ACL) (รูปที่ 15).



รูปที่ 15. ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion ($O^{\cdot}_2$) ด้วยวิธี Photochemiluminescence.

ในสภาวะการละลายด้วยเอทานอล (Lipid phase : ACL) พบว่า สารสกัดผักทั้ง 5 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในลักษณะ dose-dependent. สำหรับผักเชียงดาพบว่าส่วนอ่อน (GYH) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนแก่ (GOH) สำหรับผักหวานบ้าน พบว่า ตัวอย่างที่สกัดด้วย 50% ethanol (WE50) มีฤทธิ์สูงที่สุด, รองลงมา คือ ผักหวานบ้านที่สกัดด้วยน้ำ (WH) และผักหวานบ้านที่สกัดด้วย 95% ethanol (WE95).

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ของสารสกัดหยาบผักเชียงดาและผักหวานบ้าน ด้วยวิธี Anti-hemolytic assay

วัตถุประสงค์ของการทดสอบนี้เพื่อประเมินคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยความสามารถในการป้องกันการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชัน ต่อผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง. โดยใช้สารเคมีมาตรฐาน คือ 2,2-Azo-bis-2-methylpropionamidine (AAPH) เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ

ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน และทำการวัดความเสียหายของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง จากปริมาณความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ที่หลั่งออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดแดงเนื่องจากผนังเซลล์ที่ถูกทำลาย, ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร. โดยทำการศึกษาในสารสกัดหยาบจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน คือ

- สารสกัดผักเชียงดาส่วนอ่อนด้วยน้ำ (COH)
- สารสกัดผักหวานบ้านด้วยน้ำ (WH)
- สารสกัดผักหวานบ้านด้วย 50% เอทานอล (WE-50).

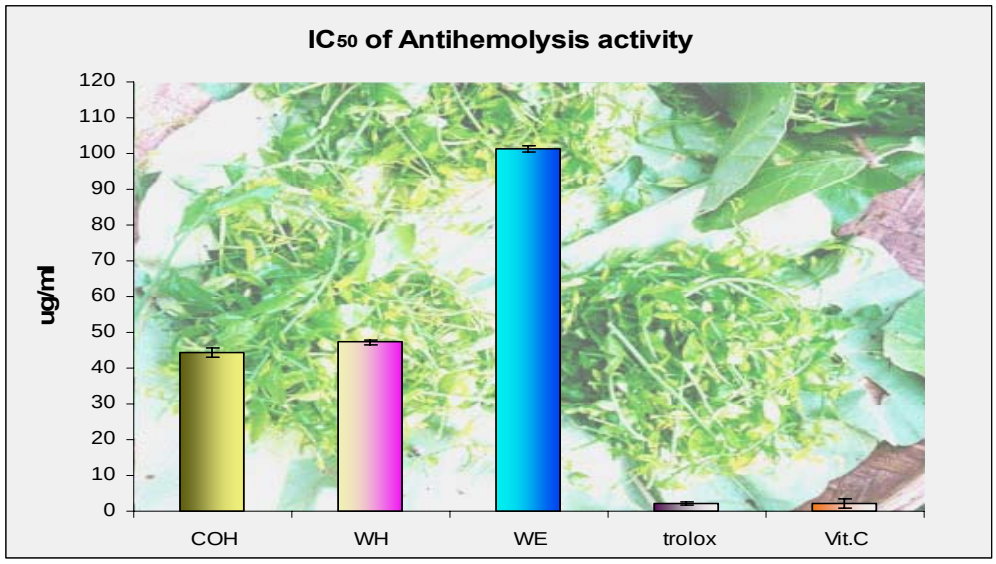
4.4.1 วิธีการทดสอบ

โดยความร่วมมือกับภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของตัวอย่างสารสกัดหยาบผักเชียงดาส่วนอ่อนด้วยน้ำ (COH), สารสกัดผักหวานบ้านด้วยน้ำ (WH) และสารสกัดหยาบผักหวานบ้านสกัดด้วยเอทานอล 50% (WE). เริ่มจากการเตรียมเกล็ดเลือดโดยใช้เลือดจากอาสาสมัคร 2 คน เก็บใส่ในหลอดที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือด (3.2% sodium citrated, 9:1 v/v) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 160g นาน 10 นาที, ใช้ปิเปตต์ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant -1) เรียกว่า platelet-rich plasma (PRP) ซึ่งเป็นส่วนที่มีเกล็ดเลือดเป็นองค์ประกอบ. เลือดที่เหลือในหลอดนำไปปั่นซ้ำที่ความเร็วสูง 4000g เวลา 10 นาที และใช้ปิเปตต์ดูดเก็บของเหลวส่วนบน ครั้งที่ 2 (supernatant - 2) ซึ่งเป็นส่วนของน้ำเลือดหรือ plasma ที่ไม่มีเกล็ดเลือดแล้ว เรียกส่วนนี้ว่า platelet-poor-plasma (PPP) เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมลบ (negative control).

นำ PRP และ PPP มาทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดผักหวานบ้าน (WE) เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ที่ระยะเวลา 30 นาที และ 3 ชั่วโมงภายหลังการเก็บเลือด โดยใช้เครื่อง Aggro-Meter 430 (Coulter Electrics, UK). ใช้ปิเปตต์ดูดสาร PRP ปริมาณ 0.45 มล. PRP ใส่ในหลอด microcentrifuge, นำไป incubate ที่ 37°ซ. นาน 10 นาที, เติม $CaCl_2$ 0.2 มิลลิโมลาร์ ลงไปและเขย่าหลอดก่อนนำไป incubate ที่ 37°ซ. ต่ออีกเป็นเวลานาน 1 นาที. จากนั้นในแต่ละหลอดเติมตัวอย่างสารสกัดทั้ง 3 ตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร ที่เตรียมโดยละลายใน 50% DMSO : NSS ลงไปให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดต่างๆ เป็น 0.003,0.01, 0.03, 0.05, 0.1 มก./มล., ร่วมกับสารเคมีที่กระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด คือ adenosine diphosphate (ADP) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลอดเป็น 0.1 มิลลิโมลาร์, ปล่อยไว้นาน 5 นาทีแล้วทำการวัดผล, โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (% inhibition of platelet aggregation).

4.4.2 ผลการทดสอบ

ผลการทดลองนำเสนอในค่าของ 50% inhibition concentration (IC_{50}) พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดผักเชียงดาส่วนอ่อนด้วยน้ำ (COH) และสารสกัดผักหวานบ้านด้วยน้ำ (WH) มีค่าใกล้เคียงกันคือ 44.50 ± 1.34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 47.17 ± 0.86 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร, ตามลำดับ. ส่วนสารสกัดผักหวานบ้านด้วย 50% เอทานอล (WE-50) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 101.33 ± 0.95 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร. สารมาตรฐานทั้ง 2 ตัวที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบบวกให้ผลในการยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงใกล้เคียงกัน คือ trolox ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.17 ± 0.54 และ vitamin C มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.09 ± 1.36 พบว่า ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่าของสารสกัดหยาบของผักเชียงดาและผักหวานบ้าน เมื่อเทียบเฉพาะสารสกัดหยาบของผักพื้นบ้านทั้ง 3 ตัวอย่างนี้ สามารถเรียงลำดับฤทธิ์ยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงได้ดังนี้ COH ≈ WH > WE-50 (รูปที่ 16).



หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยผลจากการทดสอบ 2 ครั้งที่ไม่ขึ้นต่อกัน

รูปที่ 16. ผลการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Anti-hemolysis assay ได้ค่า 50% Inhibition concentration (IC_{50}) ของสารสกัดน้ำผักเชียงดาส่วนอ่อน (COH) และสารสกัดผักหวานบ้านด้วยน้ำ (WH) มีค่าใกล้เคียงกัน และมีฤทธิ์สูงกว่าของสารสกัดผักหวานบ้านด้วย 50% เอทานอล (WE-50) โดยใช้ Trolox และ vitamin C เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ.

4.5 การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำในเลือดของสารสกัดผักเชียงดาและผักหวานในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงด้วย Alloxan

4.5.1 วิธีการทดสอบ

4.5.1.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวเพศผู้ พันธุ์ Wistar น้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 250-300 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม. นำหนูทดลองมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนการทดสอบนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม ซึ่งมีอุณหภูมิระหว่าง 24±10°ซ. ให้ได้รับน้ำดื่มและอาหารตามปกติ.

4.5.1.2 การกระตุ้นภาวะเบาหวานในสัตว์ทดลอง

เหนี่ยวนำให้หนูขาวมีระดับน้ำตาลสูงด้วยการฉีด Alloxan (Sigma Chemical, ประเทศเยอรมนี) ที่เตรียมโดยละลายใน 0.9% normal saline solution (NSS, บริษัท General Hospital Products Publics Co., Ltd. ประเทศไทย) ให้มีความเข้มข้น 5 % (w/v) และฉีดเข้าหนูทดลองทางช่องท้อง (intraperitoneal injection, IP) ในขนาด 140 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว. หนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดเกิน 120 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ถือว่าเป็นหนูที่มีภาวะเบาหวาน (diabetic rats).

4.5.1.3 การทดสอบฤทธิ์ลดน้ำตาล

ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ :

วันก่อนทำการทดสอบ 1 วัน งดให้อาหารหนูเป็นเวลา 18 ชั่วโมง. ในวันที่ทำการทดสอบ ตรวจระดับน้ำตาลในเลือดของหนูภายหลังการกระตุ้นให้เกิดภาวะเบาหวานดังอธิบายในหัวข้อ 4.5.1.2, โดยใช้การเจาะเลือดที่หางและตรวจด้วยชุดตรวจ Blood Glucose Monitoring Abbott Diabetes Care Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา. เลือกหนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดระหว่าง 130-500 มิลลิกรัม/เดซิลิตร มาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ลดน้ำตาลของสารสกัดหยาบผักเชียงดาและผักหวานบ้าน, โดยแบ่งกลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะเบาหวานออกเป็น 8 กลุ่ม ดังตารางที่ 13.

ตารางที่ 13. การแบ่งกลุ่มหนูทดลองในการทดสอบฤทธิ์ลดน้ำตาลของสารสกัดผักเชียงดาและสารสกัดผักหวานบ้าน

กลุ่ม	ตัวอย่างทดสอบ / ขนาด (มก./กก.)
1	ควบคุม (กรอกน้ำกลั่น)
2	ควบคุมบวก ยา Gibenclamide - ขนาด 5 มก./กก.
3	สารทดสอบ ได้รับสารสกัดผักเชียงดาด้วยน้ำ - ขนาด 50 มก./กก.
4	สารทดสอบ ได้รับสารสกัดผักเชียงดาด้วยน้ำ - ขนาด 100 มก./กก.
5	สารทดสอบ ได้รับสารสกัดผักหวานบ้านด้วย 50% เอทานอล - ขนาด 50 มก./กก.
6	สารทดสอบ ได้รับสารสกัดผักหวานบ้านด้วย 50% เอทานอล - ขนาด 100 มก./กก.
7	สารทดสอบ ได้รับสารสกัดผสมของผักเชียงดา และ ผักหวานบ้าน (อัตราส่วน 1: 1) ขนาด 50 มก./กก.
8	สารทดสอบ ได้รับสารสกัดผสมของผักเชียงดา และ ผักหวานบ้าน (อัตราส่วน 1: 1) ขนาด 100 มก./กก.

ป้อนตัวอย่างทดสอบ คือ สารสกัดหยาบผักเชียงดาและผักหวานบ้านแก่หนูทดลองในแต่ละกลุ่มตามกำหนดข้างต้น. จากนั้นตรวจระดับน้ำตาลในเลือดในชั่วโมงที่ 2, 4, 24, 48 และในวันที่ 5 หลังจากได้รับการป้อน โดยก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบจะตรวจระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทุกตัวภายหลังการอดอาหารหนูข้ามคืนนาน 18 ชั่วโมง. ภายหลังการป้อนตัวอย่างทดสอบทั้งหมดไปแล้ว 5 วัน ทำการเก็บเลือดและตับอ่อนเพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยาต่อไป.

4.5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ลดน้ำตาลของผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำในเลือดของสารสกัดผักเชียงดาและผักหวานในที่ถูกเหนี่ยวนำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงด้วย Alloxan พบว่า สารสกัดทั้ง 2 ชนิด มีผลเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ. เมื่อนำสารสกัดผักเชียงดาและผักหวานมาผสมกัน ไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดและเมื่อป้อนสารทดสอบครบ 5 วัน พบว่ามีผลเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. ขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับ Gibenclamide 5 mg/kg bw ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน มีผลเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือด ในชั่วโมงที่ 2, 4 และ 48 ชั่วโมงและยังมีผลเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลเมื่อได้รับติดต่อกันนาน 5 วัน, ดังแสดงในตารางที่ 14 และ รูปที่ 17.

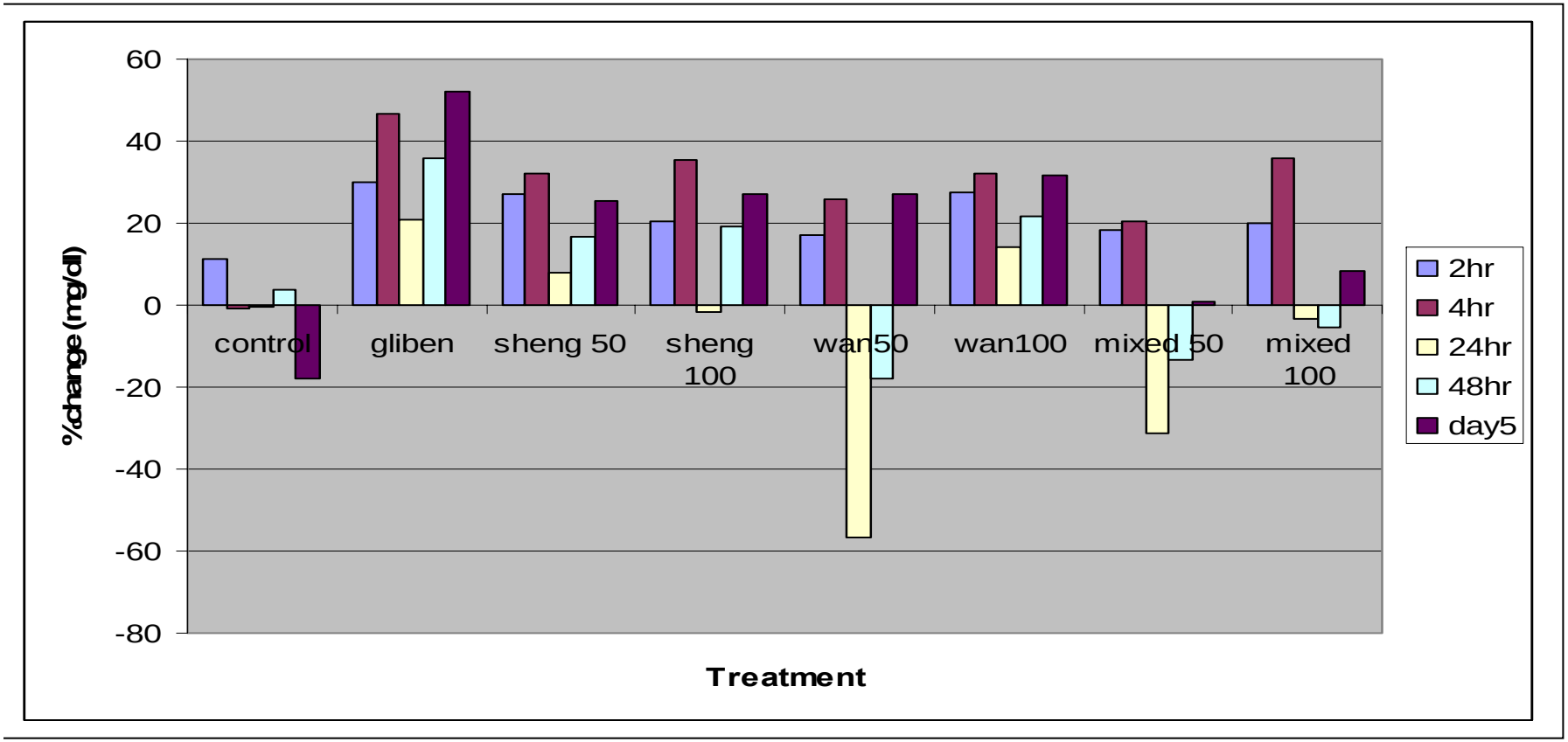
4.5.3 สรุปผลการทดสอบ

การเหนี่ยวนำหนูขาวให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงโดยใช้สาร Alloxan ซึ่งจะออกฤทธิ์ทำลายโดยตรงที่ beta-cell ในตับอ่อนที่ผลิตอินซูลิน ดังนั้นจึงทำให้หนูขาวเกิดภาวะขาดอินซูลินที่ไปควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ส่งผลให้หนูมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น. ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดผักเชียงดาและสารสกัดผักหวาน ซึ่งสารสกัดทั้งสองชนิดให้ผลที่คล้ายกัน คือ สามารถลดระดับน้ำตาลในช่วง 4 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นไม่สามารถลดระดับน้ำตาลได้. แต่เมื่อให้สารสกัดทั้งสองชนิดอย่างต่อเนื่อง 5 วัน จะสามารถลดระดับน้ำตาลได้ ในขณะที่เมื่อนำสารสกัดทั้งสองชนิดมาผสมกัน พบว่า ไม่สามารถลดระดับได้เลยแม้จะป้อนอย่างต่อเนื่อง.

ตารางที่ 14. ระดับน้ำตาลในเลือดก่อนและหลังได้รับสารทดสอบแต่ละชนิด ณ เวลาต่างๆ

กลุ่ม	จำนวน (ตัว)	% การเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือด (มก./เดซิลิตร)				
		หลังได้รับสารทดสอบ 2 ชม.	หลังได้รับสารทดสอบ 4 ชม.	หลังได้รับสารทดสอบ 24 ชม.	หลังได้รับสารทดสอบ 48 ชม.	วันที่ 5หลังได้รับสารทดสอบ
1. กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น)	5	11.45	-1.02	-0.49	3.70	-17.75
2. กลุ่มควบคุมบวก (Gibenclamide 5 มก./กก.)	5	30.11*	46.74*	20.92	35.92*	52.19*
3. กลุ่มผักเชียงดาสกัดน้ำ 50 มก./กก.	5	27.09	31.93	7.91	16.69	25.44*
4. กลุ่มผักเชียงดาสกัดน้ำ 100 มก./กก.	5	20.59	35.41	-1.65	19.15	27.19*
5. กลุ่มผักหวานสกัดเอทานอล 50 มก./กก.	5	17.20	25.91	-56.49	-17.74	27.19*
6. กลุ่มผักหวานสกัดเอทานอล 100 มก./กก.	5	27.60	32.07	14.34	21.69	31.57*
7. กลุ่มผักเชียงดาผสมผักหวานสกัดเอทานอล 50 มก./กก.	5	18.45	20.28	-31.06	-13.13	1.02
8. กลุ่มผักเชียงดาผสมผักหวานสกัดเอทานอล 100 มก./กก.	5	19.87	35.92	-3.43	-5.30	8.18

ระดับน้ำตาลในเลือด แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย (mean) *เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p<0.05)



รูปที่ 17. ระดับน้ำตาลในเลือดก่อนและหลังได้รับสารทดสอบแต่ละชนิด ณ เวลาต่างๆ.

4.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด OPCs จากเมล็ดองุ่นไทย

4.2.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion ($O_2^{\bullet}$) ด้วยวิธี Photochemiluminescence

อนุมูลอิสระ superoxide ($O_2^{\bullet}$) เป็นอนุภาคที่มีขั้วเป็นลบ สามารถเกิดขึ้นได้เองในกระบวนการ metabolism ของทุกเซลล์ภายในร่างกาย หรือในปฏิกิริยาที่มีการใช้ oxygen เช่น ในกระบวนการขนส่ง อิเล็กตรอน (respiratory chain) ในกระบวนการหายใจ, การกำจัดเชื้อโรคของเซลล์เม็ดเลือดขาว (phagocytes) และเมื่อ superoxide รวมตัวกับน้ำที่มีอยู่ในเซลล์ร่างกายจะก่อให้เกิดเป็นโมเลกุลของ อนุมูลอิสระอีกตัวคือ hydrogen peroxide ($H_2O_2^{\bullet}$) ดังปฏิกิริยานี้ :

$$2\ O_2^{\bullet} + 2\ H_2O \longrightarrow O_2 + H_2O_2^{\bullet} + 2\ OH^{\bullet}$$

และเมื่อร่างกายมีปริมาณของอนุมูลอิสระ $H_2O_2^{\bullet}$ ที่มากเกินกว่าร่างกายจะกำจัดออกได้เองก็จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อชีวโมเลกุลต่างๆ โดยเฉพาะต่อสารพันธุกรรม (DNA).

ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ OPCs ที่สกัดจากเมล็ดองุ่น (ดังอธิบายไว้ในบทที่ 2) โดยเน้นศึกษาประสิทธิภาพต่อการกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical) ของออกซิเจนหรือที่เรียกว่า oxidative reactive oxygen species (ROS) ชนิด superoxide anion ($O_2^{\bullet}$) และเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มาตรฐานที่อยู่ในกลุ่ม phenolic compound คือ gallic acid และ ellagic acid.

4.2.2 การเตรียมตัวอย่าง

- ชั่งสารตัวอย่าง OPCs ลักษณะเป็นเกล็ดแห้งสีน้ำตาลม่วง และเตรียมเป็นสารละลายหรือ stock solution ที่ความเข้มข้น 10 มก./มล. ใน absolute methanol (reagent R1) เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°ซ.
- ในวันที่ทำการทดสอบ นำ stock solution ของ OPCs ละลายที่อุณหภูมิห้อง และปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียว และนำไปเข้าเครื่อง sonicator ต่ออีก 15 นาที เพื่อช่วยให้สารสกัดละลายได้หมด.

4.2.3 วิธีการทดสอบ

- นำสารละลายตัวอย่างเจือจางด้วย R1 ที่ความเข้มข้นในช่วงของกราฟมาตรฐาน std curve โดยใช้ Trolox standard curve (OPC=0.01mg/ml, TM=0.05mg/ml).

- ดูดสารละลายมา 10, 20, 30 ไมโครลิตร ผสมกับ PCL reagent Reagent (R2+luminal + สารตัวอย่าง) และทดสอบด้วยวิธี PCL โดยฤทธิ์ของการจับอนุมูลอิสระเปรียบเทียบเป็นค่า Trolox equivalent (nmol).

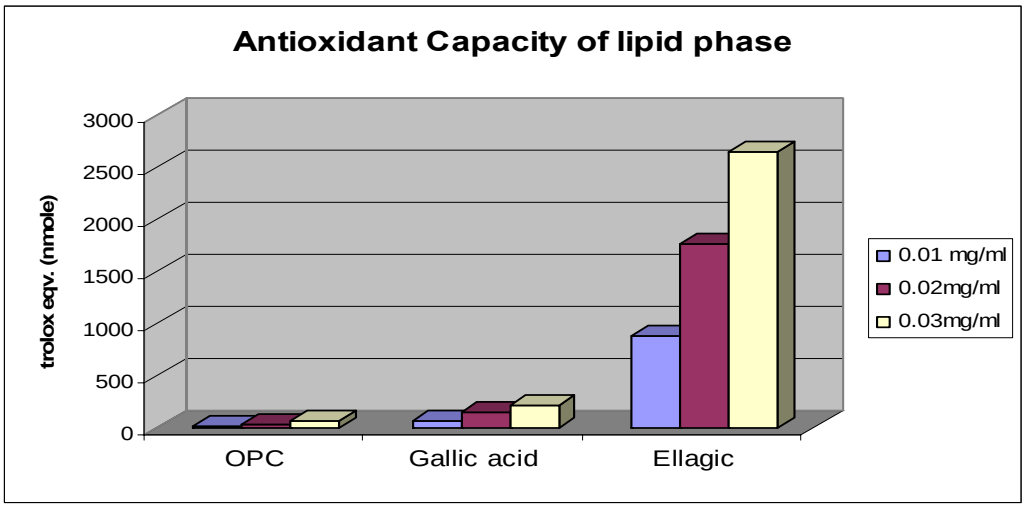
4.2.4 ผลการทดสอบและวิจารณ์

สารสกัด Polymeric Proanthocyanidins (OPCs) จากกากเมล็ดองุ่นไทย พันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) ที่สกัดโดยใช้ ethanol : water (40:60%), ตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion ($O_2^{\bullet}$) ด้วยวิธี Photochemiluminescence โดยเครื่อง Photochem® ด้วยระบบ ACL (Anti-oxidative Capacity of Lipid Soluble Compound) เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) มาตรฐานในกลุ่ม phenolic compound 2 ตัว คือ gallic และ ellagic พบว่าสารสกัด OPCs มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant acticity) ในลักษณะ dose-response คือเมื่อวัดที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.03 mg/ml มีค่า antioxidant capacity (AC) เป็น 20.72745, 41.13445 และ 61.54145 nmole (trolox equivalent) ตารางที่ 15 และ รูปที่ 18.

ในขณะที่สารมาตรฐานคือ gallic acid และ ellagic acid ที่ใช้เป็นสารควบคุมบวก ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.03 มก./มล. มีค่า antioxidant capacity (AC) เท่ากับ 71.8263, 143.4853 และ 215.1443 nmole (trolox equivalent) และ 882.5522, 1764.852 และ 2647.152 nmole (trolox equivalent) ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่า สารสกัดหยาบ OPCs จากเมล็ดองุ่นไทย, ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานทั้ง 2 ตัวดังกล่าวที่เป็นสารเดี่ยวเกิดจากการสังเคราะห์ทางเคมี.

ตารางที่ 15. ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด Polymeric proanthocyanidins (OPCs) ด้วยวิธี Photochemiluminescence

ความเข้มข้น (มก./มล.)	Antioxidant capacity in lipid phase (Trolox eqv. : nmol)		
	*OPC	Gallic	Ellagic
0.01	20.72745	71.8263	882.5522
0.02	41.13445	143.4853	1764.852
0.03	61.54145	215.1443	2647.152



รูปที่ 18. ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเครื่อง Photochem® โดยวิธี Antioxidant capacity of lipid soluble compound (ACL) ของสารสกัด OPCs จากองุ่นไทย พบว่า OPCs มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion.

4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อการทำลายดีเอ็นเอของสารสกัด Oligomeric proanthocyanidins (OPCs) ด้วยวิธี Comet assay

หลักการของวิธีทดสอบด้วยเทคนิค comet assay หรือ single cell gel electrophoresis (SCGE) คือ การตรวจวัดการทำลายต่อสารพันธุกรรมหรือ DNA ในนิวเคลียสในระดับเซลล์เดี่ยวๆ. ความเสียหายหรือการทำลายต่อ DNA ที่เกิดขึ้นจากสารทดสอบ (สารเคมีหรือยา) ที่มีคุณสมบัติเป็น genotoxin ได้แก่ สารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) และสารก่อมะเร็ง (carcinogen). ความเสียหายต่อ DNA จากสารที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ก่อให้เกิดชิ้นส่วนของ DNA ซึ่งสามารถประเมินผลได้ด้วยเทคนิคการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า คือ gel electrophoresis ด้วยการตรึงเซลล์ (ที่เกิด DNA damage)ไว้บนแผ่นสไลด์แก้ว, สลายเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสารละลายที่มีสภาะความเป็นด่างสูงเท่ากับ 13 เพื่อ ให้โครงสร้างของ DNA ที่ปกติจะเป็น double stranded DNA เกิดการคลายเกลียวเป็น single-stranded DNA. เมื่อเข้าสู่ขั้นตอน gel electrophoresis จะแยกชิ้นส่วนที่แตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ออกมาตามขนาดของความรุนแรงต่อ DNA ที่เกิดขึ้น. เมื่อนำไปย้อมด้วยสี DNA-staining dye เช่น Ethidium bromide และส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ จะเห็นการเคลื่อนที่ของ DNA ที่ผิกปกติและเคลื่อนออกจากนิวเคลียสของเซลล์เกิดเป็นลักษณะคล้ายดาวหาง หรือ comet cells ซึ่งเป็นข้อบ่งบอกถึงความเสียหายหรือเกิดการ

ทำลายต่อ DNA ในเซลล์นั้น. โดยเซลล์ที่มี DNA ปกติ (undamaged DNA) จะไม่ปรากฏลักษณะดังกล่าว.

วัตถุประสงค์ของการใช้ comet assay ในการทดสอบครั้งนี้เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านการทำลายต่อ DNA (anti-oxidative DNA damage activity) ของสาร OPCs ที่สกัดได้จากเมล็ดองุ่น โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการทำลาย DNA ด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น genotoxin และอนุมูลอิสระ (free radical) ที่สามารถทำอันตรายต่อ DNA สูงมากเมื่อเทียบกับอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ. หากสาร OPCs จากเม็ดองุ่นสามารถยับยั้งหรือลดการทำลาย DNA จาก H_2O_2 ได้ แสดงว่า OPCs มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant).

4.2.1.1 วิธีการทดสอบ

1. การเตรียมเซลล์ TK6 สำหรับการทดสอบ

นำเซลล์ TK6 ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวมนุษย์ชนิด human lymphoblastoid cells (ATCC CRL 8015) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่เติมซีรัมม้าที่เป็น heat inactivated (ที่ 56° ซ., 30 นาที) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 10 โดยมีปริมาตรสุทธิประมาณ 10 มิลลิลิตร. ปล่อยให้เซลล์เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 15-18 ชั่วโมง ในตู้ incubator ที่มี 5% CO_2. เมื่อเซลล์เจริญเติบโตและมีความเข้มข้นราว 10^6 เซลล์/มล. จึงปั่นเหวี่ยงเซลล์เพื่อเอาอาหารเลี้ยงเก่าออกที่ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และให้เซลล์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่เติมซีรัมม้าร้อยละ 10. จากนั้น นับเซลล์เพื่อหาอัตราการรอดชีวิตและเตรียมเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 2 x 10^5 เซลล์/มล.

2. การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

เตรียมสารละลาย H_2O_2 ที่ใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำการทำลายดีเอ็นเอ ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมล จาก stock ความเข้มข้น 10 โมล (M) โดยการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยง RPMI ไม่ใส่ซีรัม, เก็บสารละลายในกล่องใส่น้ำแข็ง (เตรียมสดก่อนใช้ทดสอบ).

3. การเตรียมสารละลาย Oligomeric proanthocyanidins (OPCs)

เตรียม OPCs stock ให้มีความเข้มข้น 3000 ไมโครกรัม/มล. โดยละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง sonicator แล้วกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง 0.2 ไมครอน, จึงบรรจุใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก เก็บที่ตู้แช่ -25° ซ. เจือจางสารละลาย OPCs จาก

stock ให้มีความเข้มข้นเป็น 1500, 750, 300 ไมโครกรัม/มล. ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI เติมซีรัมร้อยละ 10.

4. การทดสอบเซลล์ด้วยสาร Oligomeric proanthocyanidins (OPCs)

ปิเปตต์ดูดเซลล์แขวนลอยจากข้อ 1 ลงในจานเพาะเลี้ยง (6-wel plate) ที่ปลอดเชื้อ หลุมละ 2.0 มล. จากนั้นเติมสารละลาย OPCs หลุมละ 1000 ไมโครลิตร จากความเข้มข้น 3000, 1500, 750, 300 ไมโครกรัม/มล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1000, 500, 250, 100 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ. สำหรับกลุ่มควบคุมบวกและลบเติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 จากนั้นนำสารละลายทุกหลุมไปบ่มที่ตู้ incubator 37ºซ., 5% CO_2 ระยะเวลา 18 ชั่วโมง.

5. การทดสอบด้วยอนุมูลอิสระชนิด H_2O_2

นำเซลล์ TK6 ไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ในหลอดทดสอบขนาดเล็กเพื่อเอาสารทดสอบออก แล้วกระจายเซลล์ให้แขวนลอยด้วยอาหารที่ผสมสารละลาย H_2O_2 จากข้อ 2 ด้วยความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมล จำนวน 1 มล. สำหรับกลุ่มควบคุมลบใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ไม่ใส่ซีรัมเท่านั้น. บ่มสารละลายกับเซลล์ TK6 ในกล่องใส่น้ำแข็ง ที่ปราศจากแสง เป็นเวลา 5 นาที. จากนั้นปั่นเซลล์ให้ตกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เพื่อเอาสารละลาย H_2O_2 ออก และปั่นล้างเซลล์ด้วย สารละลาย HBSS (1 มล.) ที่แช่เย็น 4°ซ. อย่างน้อย 2 ครั้ง แล้วกระจายเซลล์ TK6 ด้วยอาหารเลี้ยง RPMI ไม่ใส่ซีรัมปริมาตร 150 – 200 ไมโครลิตร.

6. การวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอ ด้วยวิธี comet assay

- **การเคลือบเซลล์ลงบนแผ่นสไลด์ (cell coating)**

ใช้ปิเปตต์ดูดเซลล์แขวนลอยจากขั้นตอนที่ 5 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ 75 ไมโครลิตร ของ low melting point (LMP) agarose ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. แล้วปล่อยลงบนแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบด้วย normal melting point (NMP) agarose ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.75 เตรียมใน PBS ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ (cover slip) และวางไว้บนถาดน้ำแข็ง ผิวหน้าเรียบที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ประมาณ 5 นาทีเพื่อให้ agarose แข็งตัว จากนั้นเคลือบเซลล์-เจลทับอีกครั้งด้วย 0.5% LMP agarose ปริมาตร 95 ไมโครลิตร ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ (cover slip) และทิ้งให้เจลแข็งตัว. บนถาดน้ำแข็งข้างต้น (ประมาณ 20 นาที).

- **การแยกสาย DNA คู่ให้เป็นสาย DNA เดี่ยว (DNA unwinding)**

จากขั้นตอนการเคลือบเซลล์ข้างต้น ค่อยๆ เลื่อน cover slip ออกจากสไลด์ แล้วนำแผ่นสไลด์ที่มีเซลล์ฝังอยู่กับ agarose ไปวางลงในอ่างที่มีสารละลาย lysing solution (ประกอบด้วย 2.5 M NaCl, 100 mM Na_4EDTA, 10 mM Triszabase, 1% Triton-100, 10% DMSO ปรับค่า pH = 10) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการคลายเกลียวของสายคู่ DNA.

- **การเคลื่อนที่ของ DNA บนเจลด้วยกระแสไฟฟ้า (DNA migration)**

นำ DNA ที่อยู่บนแผ่นสไลด์จากขั้นตอน DNA UNUINDING มาแยกด้วยกระแสไฟด้วยเทคนิคที่เรียกว่า gel elctrophoresis ซึ่งบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution) ที่มีส่วนประกอบของ 300 mM NaOH และ 1 mM Na_2EDTA และมีความเป็นด่างสูง (pH มากกว่า 13) ที่ระดับความต่างศักย์ 25 โวลต์ (volt) และกระแสไฟฟ้า 300 มิลลิแอมป์ (mA) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 20 นาที.

- **การปรับสภาพ DNA ในสภาวะเป็นกลาง (DNA neutralisation)**

นำแผ่นสไลด์จากขั้นตอน DNA migration แช่ลงในอ่างที่มีสารละลายที่เป็นกลาง (neutralising solution) ประกอบด้วย 0.4 M Trizma base (pH 7.5) เพื่อปรับให้ DNA กลับสู่สภาพปกติ. โดยแช่ DNA ไว้ในอ่าง neutralising solution ครั้งละ 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง และเปลี่ยน neutralising solution ใหม่ทุกครั้งและควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 °ซ. ตลอดขั้นตอน.

- **ย้อมสี DNA (DNA staining)**

ย้อม DNA ที่อยู่บนแผ่นสไลด์ด้วยสารละลาย ethidium bromide (EtBr, เข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มล.) โดยวางสไลด์ไว้ในถาดพลาสติก ใช้ไมโครปิเปตต์ 100 ไมโครลิตร ดูดสารละลาย EtBr ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ปล่อยลงให้ทั่วบนแผ่นสไลด์, ปิดทับทันทีด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip), นำสไลด์ลงในกล่องที่มีฝาปิดและคลุมทับด้วยถุงพลาสติกสีดำ เพื่อป้องกัน DNA ทำปฏิกิริยากับแสง.

- **วิเคราะห์ผลเสียหายต่อ DNA ในเซลล์ (comet cell analysis)**

ภายหลังจากย้อม DNA ด้วย EtBr แล้ว นำ DNA บนสไลด์ไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscopy) ที่มีกล้อง CCD (charged couple device) ต่อกับระบบคอมพิวเตอร์เพื่อเข้าโปรแกรมวิเคราะห์ผลการทำลาย DNA จากอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2). โดย DNA ที่ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ H_2O_2

จะเคลื่อนตัวออกไปจากนิวเคลียสด้วยกระแสไฟฟ้าในขั้นตอน gel electrophoresis เกิดเป็นปรากฏการณ์คล้ายดาวหาง หรือ comet ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนหัว (comet head) คือ DNA ปกติที่อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ และส่วนหาง (comet tail) คือ DNA ที่ถูกทำลายหรือ DNA ที่ผิดปกติ. ปริมาณ DNA ในส่วนหัวและส่วนหางของ comet cells จะถูกวิเคราะห์เป็นตัวเลข และแสดงผลบนตารางด้วยคอมพิวเตอร์. ทำการวิเคราะห์ผลจาก comet cells ที่เกิดขึ้นในการทดลองแต่ละกลุ่ม โดยตรวจ comet cells จำนวน 50 cells จากแต่ละสไลด์ (เตรียมอย่างน้อย 2 สไลด์ ต่อกลุ่มทดสอบ).

4.2.1.2 ผลการทดสอบและวิจารณ์

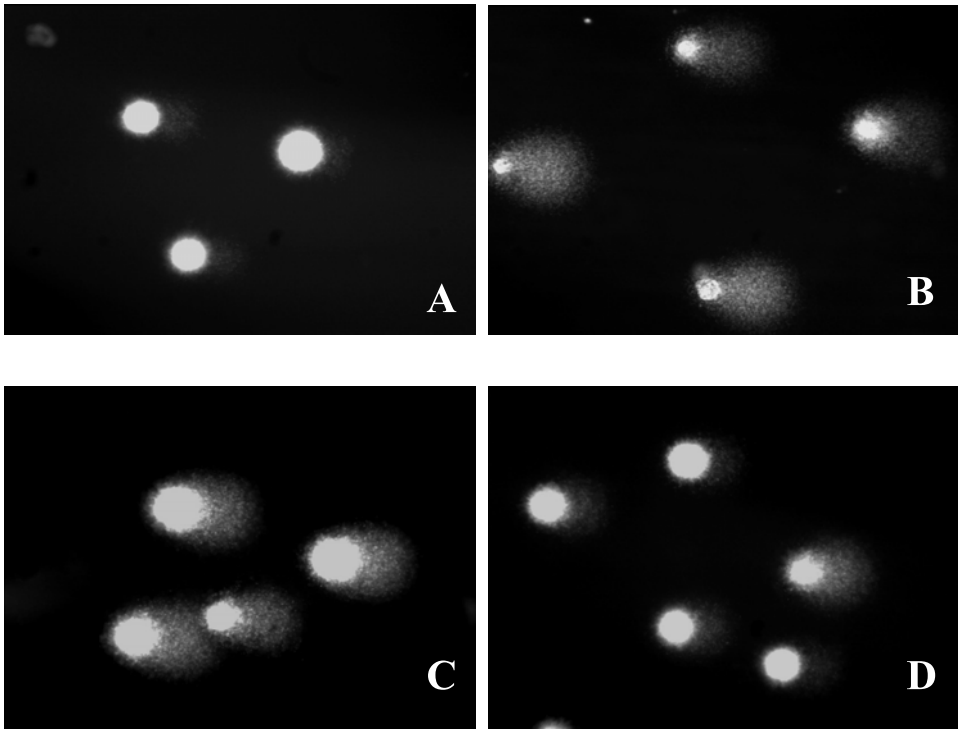
ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ผล Comet Assay III software พบว่า สารสกัด OPCs จากเมล็ดองุ่นไทย ที่ความเข้มข้น 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มล. แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน TK 6 เซลล์ โดยสามารถลดการทำลายต่อ DNA ที่เหนี่ยวนำให้เกิดด้วยอนุมูลอิสระ H_2O_2 ได้ ในลักษณะ dose-response protective effect. โดยเซลล์ TK6 ในกลุ่มควบคุม (control cells) จะปรากฏเฉพาะ DNA ปกติที่อยู่ในส่วนหัว. แต่เนื่องจากในขั้นตอนตามวิธีของ comet assay เซลล์จะสัมผัสกับสารละลายต่างๆ หลายชนิด. ดังนั้น DNA ปกติบางส่วนจะสามารถเกิดเป็น comet cells ได้. ทั้งนี้การเปรียบเทียบผลจะการคำนวณปริมาณ DNA ในส่วนหัว เรียกว่า comet head ซึ่งเป็น undamged DNA ของ comet cells ในทุกกลุ่มทดลอง และคำนวณปริมาณ DNA ในส่วนหางหรือ comet tail ที่เป็น damaged DNA ในลักษณะ DNA fragmentation และค่าเฉลี่ยความยาวของส่วนหาง หรือ Tail length (TL = ระยะทางที่ damaged DNA เคลื่อนที่ออกจากนิวเคลียส). โดยสัดส่วนของ damaged DNA ใน comet tail สัมพันธ์กับความยาวของ comet tail จะให้ค่าพารามิเตอร์ที่เรียกว่า Tail moment.

ในการประเมินผลของ comet assay จะพิจารณาจากค่าของ Tail length (TL) และ Tail moment (TM). หากค่า TL หรือ TM ของ comet cells ในกลุ่มทดสอบ มีค่ามากกว่าค่าเดียวกันในกลุ่มควบคุม (non-comet cells) ตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป ถือว่าให้ผลบวก (positive result) คือสารทดสอบนั้นมีคุณสมบัติเป็นสารพิษต่อ DNA หรือ genotoxin. ในทางกลับกัน หากสารใดสามารถลดหรือยับยั้งการเกิด comet cells ได้ ถือว่าสารนั้นมีฤทธิ์ anti-genotoxin หรือ anti-oxidative DNA damage ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant).

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 16 อนุมูลอิสระ H_2O_2 ก่อให้เกิดการทำลาย DNA ใน TK6 cells (รูปที่ 19) ปรากฏเป็น Comet cells อย่างชัดเจน, มีค่าเฉลี่ย TL = 132.523 ไมครอน และค่าเฉลี่ย TM = 19.735 % ซึ่งสูงกว่าค่า TL และ TM ของเซลล์กลุ่มควบคุม (TL = 60.125μm, TM = 2.355%) มากกว่า 2 เท่า. เมื่อทดสอบร่วมกับสารสกัด OPCs พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการทำลาย DNA จาก H_2O_2 ใน TK6 cells ได้. โดยประเมินผลจากการลดลงของค่า TL และ TM เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 อย่างเดียว ดังตัวเลขที่แสดงในตารางที่ 16. จากแนวโน้มผลการทดลองนี้ สามารถคำนวณค่าดัชนีการยับยั้งการทำลาย DNA เป็น % DNA damage inhibition. จากค่า TM (ปริมาณ DNA intensity x distance of DNA migrationในส่วนหางของ comet cells) พบว่า สารสกัด OPCS จากเมล็ดงุ่นไทยที่ความเข้มข้น 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มล. มีฤทธิ์ยับยั้งการทำลาย DNA ได้ 18.67%, 36.37%, 30.59% และ 60.08%, ตามลำดับ.

ตารางที่ 16. การยับยั้งการแตกหักของ DNA จากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2^{\bullet}$) ของสาร OPCs ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

Treatment / Dose	DNA damage parameter		% DNA damage inhibition	% cell viability
	Tail length (TL) (μm)	Tail moment (TM) (%)		
Control	60.125	2.355	88.07	88.43
H_2O_2 เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล.	132.523	19.735	-	91.80
H_2O_2 + OPC เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล.	109.220	16.050	18.67	89.55
H_2O_2+ OPC เข้มข้น 250 ไมโครกรัม/มล.	113.800	12.558	36.37	90.97
H_2O_2+ OPC เข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มล.	115.880	13.698	30.59	83.24
H_2O_2+ OPC เข้มข้น 1000ไมโครกรัม/มล.	102.543	7.878	60.08	80.21



รูปที่ 19. DNA comet image ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ H_2O_2 ของ human lymphoblastoids TK6 cells ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด OPCs จากเมล็ดองุ่นไทย A : กลุ่มTK6 cells ในกลุ่มควบคุม (non-comet cells), B : กลุ่ม TK6 cells ที่ได้รับอนุมูลอิสระ H_2O_2 (comet cells), C, D : กลุ่ม TK6 cells ที่ได้รับผลิตภัณฑ์ H_2O_2 ร่วมกับ OPCs.

4.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ของเปลือกเมล็ดมะขาม ดังอธิบายไว้ในหัวข้อ 2.4 ของบทที่ 2. โดยเน้นศึกษาประสิทธิภาพต่อการกำจัดอนุมูลอิสระของออกซิเจนหรือที่เรียกว่า oxidative reactive oxygen species (ROS) ชนิด superoxide anion ($O_2^{\bullet}$) และเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มาตรฐานที่อยู่ในกลุ่ม phenolic compound คือ gallic acid. และ ellagic acid หลักการของการทดสอบเช่นเดียวกันกับของการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด OPCs จากเมล็ดองุ่น ตามที่อธิบายใน **หัวข้อ 4.2.1.**

4.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

- ชั่งตัวอย่างสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม และเตรียมเป็นสารละลายหรือ stock solution ที่ความเข้มข้น 10 มก./มล. ใน absolute methanol (reagent R1) เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°ซ.
- ในวันที่ทำการทดสอบ นำ stock solution ของ OPCs กระทั่งละลายที่อุณหภูมิห้อง และปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวด้วย vortex ประมาณ 10 นาที และนำไปเข้าเครื่อง sonicator ต่ออีก 15 นาที เพื่อช่วยให้สารสกัดละลายได้หมด.

4.3.2 วิธีการทดสอบ

- นำสารละลายตัวอย่างเจือจางด้วย R1 ที่ความเข้มข้นในช่วงของ standard curve โดยใช้ trolox เป็น standard antioxidant (TM = 0.05 มก./มล.).
- ดูดสารละลายมา 10, 20, 30 ไมโครลิตร ผสมกับ PCL reagent (R2+luminal + สารตัวอย่าง) และทดสอบด้วยวิธี PCL โดยฤทธิ์ของการจับอนุมูลอิสระเปรียบเทียบเป็นค่า trolox equivalent หน่วยเป็น นาโนโมล (nmol).

4.3.3 ผลการทดสอบและวิจารณ์

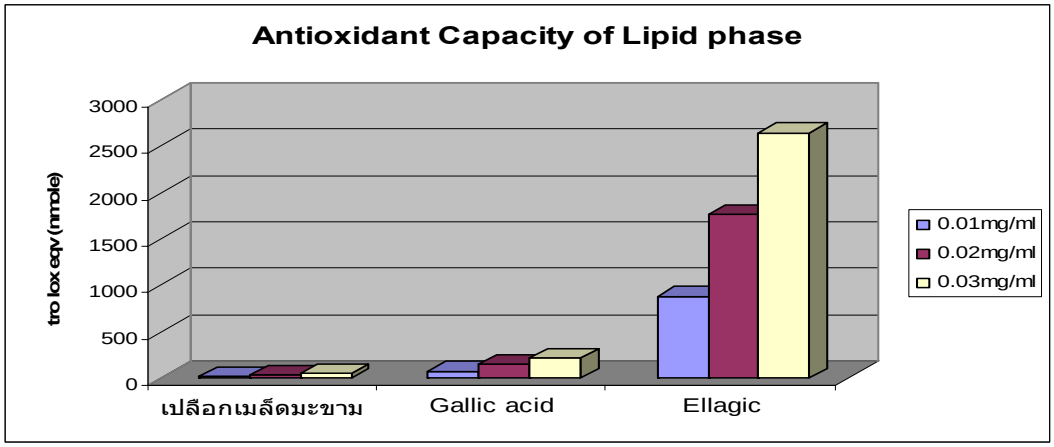
ตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม ที่สกัดโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง Photochem® ด้วยระบบ ACL (Anti-oxidative Capacity of Lipid soluble compound) เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) มาตรฐานในกลุ่ม phenolic compound 2 ตัว คือ gallic และ ellagic พบว่า สารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม (TM) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant acticity) ในลักษณะ dose-response คือ เมื่อวัดที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.03 มก./มล. มีค่า antioxidant capacity (AC) เป็น 15.788, 30.872 และ 45.956 nmole (trolox equivalent) ตามลำดับ, ดังแสดงในตารางที่ 17.

อย่างไรก็ดี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม จะต่ำกว่า gallic acid ประมาณ 5 เท่า และต่ำกว่า ellagic acid ประมาณ 50 เท่า (รูปที่ 20). โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันมากนี้อาจเนื่องมาจาก ตัวอย่างของเปลือกเมล็ดมะขามอยู่ในรูปสารสกัดหยาบซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ หลายชนิด. จากข้อมูลการตรวจควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดหยาบที่อธิบายในหัวข้อ 3.1 ของบทที่ 3 พบว่า สาร phytochemical ที่พบมากในสารสกัดหยาบจากเปลือกเมล็ดมะขามคือ สาร tannin ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีฤทธิ์เด่นทางด้านต้านอนุมูลอิสระ. แม้จะตรวจพบสารกลุ่มต้านอนุมูลอิสระประเภท flavanoids และ phenolics แต่ก็มีปริมาณน้อย จึงไม่แสดงฤทธิ์

ต้านอนุมูลอิสระที่ชัดเจนเหมือนสารเดี่ยวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีคือ gallic และ ellagic ที่นำมาใช้เป็น positive anti-oxidant ในการตรวจวัดครั้งนี้

ตารางที่ 17. ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยวิธี Photochemiluminescence

ระดับความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบ (มก./มล.)	Antioxidant capacity in lipid phase (trolox. eqv. : nmol)		
	สารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม	Gallic acid	Ellagic acid
0.01	15.788	71.8263	882.5522
0.02	30.872	143.4853	1764.852
0.03	45.956	215.1443	2647.152



รูปที่ 20. ผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเครื่อง Photochem® โดยวิธี antioxidant capacity of lipid soluble compound (ACL) ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอทานอล 95% (TM) เทียบกับ gallic acid และ ellagic acid.

5. การพัฒนาผลิตภัณฑ์และ/หรือเครื่องดื่มเสริมสุขภาพด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

จากผลการศึกษาจากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก) โดยวิธี Folin-Ciocalteu และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี photochemiluminescence (PCL) ตามที่อธิบายไว้ในบทที่ 4 โครงการได้พิจารณาคัดเลือกผักเชียงดาและผักหวานบ้าน เพื่อนำมาทำการพัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสุขภาพด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ดังขั้นตอนและรายละเอียดต่อไปนี้ :

5.1 ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

ศึกษาคุณสมบัติการละลายน้ำ (% water solubility) ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านทั้งสอง ชนิด ได้แก่ สารสกัดน้ำผักเชียงดา และสารสกัดน้ำผักหวานบ้าน, แปรปริมาณสารสกัดระดับต่างๆ (0.01, 0.03 และ 0.05%) และที่อุณหภูมิต่างๆ 3 ระดับ 25-30^{O}ซ., 40-50^{O}ซ. และ 80-90^{O}ซ.

5.1.1 ศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดเบส แปรปัจจัย 3 ระดับ (pH 3, pH 5 และ pH 7) ต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผักหวานบ้าน, สารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน และสารสกัดน้ำผักเชียงดา.

5.1.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรส์สำหรับกระบวนการแปรรูปอาหารต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผักหวานบ้าน, สารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน และสารสกัดน้ำผักเชียงดา.

5.2 พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตเครื่องดื่มเสริมสุขภาพด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

5.2.1 พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

5.2.1.1 พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตชาผักหวานบ้านพร้อมดื่ม.

5.2.1.2 วิเคราะห์และทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ, เคมี และจุลชีววิทยา.

5.2.1.3 ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสกับผู้บริโภคจำนวน 50 ตัวอย่าง.

5.2.1.4 ศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เบื้องต้น.

5.2.2 พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ชาผักเชียงดาพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

5.2.2.1 พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตชาผักเชียงดาพร้อมดื่ม.

5.2.2.2 วิเคราะห์และทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ, เคมี, และจุลชีววิทยา.

5.2.2.3 ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสกับผู้บริโภคจำนวน 50 ตัวอย่าง.

5.2.2.4 ศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เบื้องต้น.

5.3 ทดลองตลาดผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสุขภาพด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ

ทดลองตลาดผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม และชาผักเชียงดาพร้อมดื่ม จำนวน 2 สูตรได้แก่ รสธรรมชาติและรสน้ำผึ้งมะนาว กับผู้บริโภคทั่วไป จำนวน 200 ตัวอย่าง.

5.4 วัสดุและอุปกรณ์

5.4.1 วัตถุดิบ ได้แก่ ผักหวานบ้านและผักเชียงดา (ใช้ใบสด).

5.4.2 สารสกัด (crude extract) ได้แก่ สารสกัดน้ำผักเชียงดา, สารสกัดน้ำผักหวานบ้าน และสารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน.

5.4.3 สารปรุงแต่งกลิ่นรส ได้แก่ :

1. น้ำตาลทราย.
2. สารให้ความหวานซูคราโลส (Sucralose).
3. น้ำผึ้ง.
4. กรดซิตริก (Citric acid : food grade).
5. ผงมะนาว (Spray dry – lemon powder : food grade).

5.4.4 เครื่องมือตรวจสอบคุณภาพด้านต่างๆ

1. เครื่องวัดสี (Minolta Chroma Meter) รุ่น CR-310, Konica-Minolta Corporation, Osaka, ญี่ปุ่น.

2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH Meter) รุ่น S20-K Mettler-Toledo Gmb H, สวิตเซอร์แลนด์.

3. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้หมด (Hand Refractometer) รุ่น N-1E (0-32%) Atago Company Limited, ญี่ปุ่น.

5.5 วิธีการ

5.5.1 ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดผักเชียงดาและ ผักหวานบ้าน

5.5.1.1 ศึกษาคุณสมบัติการละลายน้ำ (% water solubility) ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดน้ำผักเชียงดา (สกัดด้วยน้ำ) และ สารสกัดน้ำผักหวานบ้าน (สกัดด้วยน้ำและเอทานอลความเข้มข้น 50%).

1. แปรปัจจัยระดับปริมาณ % สารสกัดผัก มีขั้นตอนดังนี้ :

สารสกัดผัก (ผักเชียงดาและผักหวานบ้าน)

↓

เตรียมสารละลาย (0.01%, 0.03% และ 0.05%) บันทึกน้ำหนักเริ่มต้น

↓

ละลายในน้ำที่อุณหภูมิห้อง 25-30 ^{O}ซ.)

↓

กวนผสมด้วยเครื่องกวนผสม (stirrer) 10 นาที

↓

เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน (centrifuge)

6,000 รอบต่อนาที นาน 10นาที

↓

แยกส่วนใสออก

นำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105^{O}ซ. นาน 3 ชั่วโมง

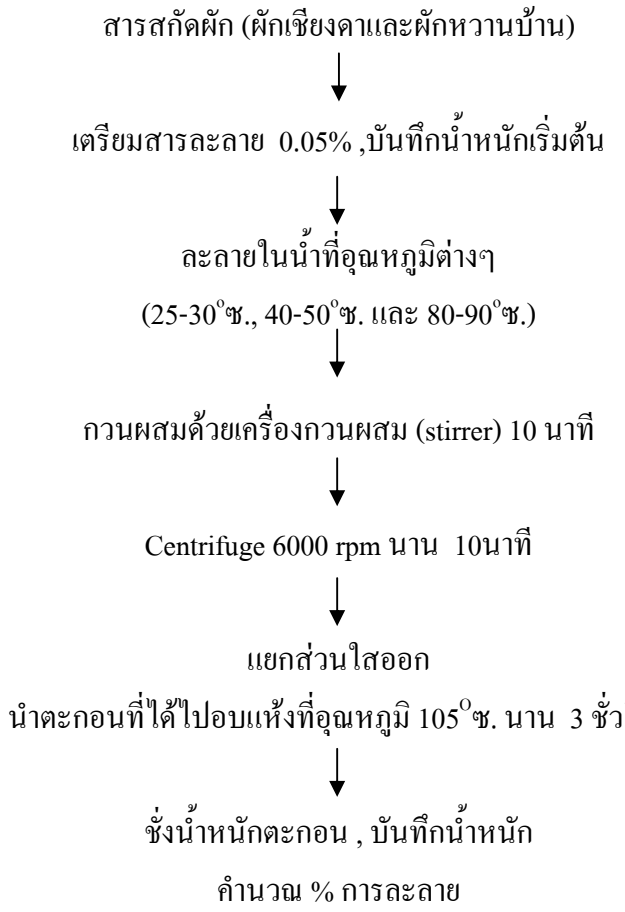
↓

ชั่งน้ำหนักตะกอน บันทึกน้ำหนัก

คำนวณ % การละลาย

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance ; ANOVA), หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี New Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.

2. แปรปัจจัยอุณหภูมิในการละลาย มีขั้นตอน ดังนี้



วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance ; ANOVA), หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี New Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.

3. ทำการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Photochemiluminescence (PCL) ของสารละลายสารสกัดผักพื้นบ้านที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (0.01, 0.03 และ 0.05 %)

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance ; ANOVA), หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี New Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.

5.5.1.2 ศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดเบส แปรปัจจัย 3ระดับ (pH 3, pH 5 และ pH 7) ต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผักหวานบ้าน ,สารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน และสารสกัดน้ำผักเชียงดา มีขั้นตอนดังนี้ :

เตรียมสารละลายสารสกัดผักพื้นบ้าน 0.01%

↓

ปรับความเป็นกรดด่าง (pH 3, pH 5 และ pH 7)
ด้วยกรดซิตริก (Citric acid 10% w /v)

↓

วัดค่าต่างๆ ได้แก่ ค่าสี (L, a, b) และ
ตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Photochemiluminescence (PCL)

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance ; ANOVA), หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี New Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.

5.5.1.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรส์สำหรับกระบวนการแปรรูปอาหารต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผักหวานบ้าน , สารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน และสารสกัดน้ำผักเชียงดา มีขั้นตอนดังนี้ :

เตรียมสารละลายสารสกัดผักพื้นบ้าน 0.01%

↓

แปรปัจจัยอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรส์
ระดับต่างๆ 7 ระดับ ดังนี้ :
(อุณหภูมิห้อง , 65^{O}ซ. - 15 นาที 70 ,^{O}ซ. - 15 นาที 75 ,^{O}ซ. - 15 นาที ,
80 ^{O}ซ. 1-นาที 85 ,^{O}ซ. –1 นาที และ 90^{O}ซ. – 1 นาที)

↓

วัดค่าต่างๆ ได้แก่ ค่าสี (L, a, b) และ
ตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Photochemiluminescence (PCL)

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance ; ANOVA), หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี New Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.

5.5.2 พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตเครื่องดื่มเสริมสุขภาพด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ

5.5.2.1 พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

1. พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตชาผักหวานบ้านพร้อมดื่ม

กระบวนการผลิตใบชาผักหวานบ้านแห้ง มีดังนี้ :

ใบผักหวานบ้าน

↓

ล้างทำความสะอาด หั่นตามขวางเป็นชิ้นประมาณ 1 ซม.

↓

นึ่งด้วยไอน้ำนาน 3- 5 นาที

↓

นวดในกระทะด้วยไฟอ่อน นานประมาณ 1 ชั่วโมง

↓

ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

เก็บในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ถุงพลาสติก PE ชนิดหนา)

เก็บนาน 3-2เดือน

↓

ได้ใบชาผักหวานบ้านแห้ง

(มีกลิ่นและรสชาติที่ดี)

ปรับสูตรเครื่องดื่มชาผักหวานบ้านพร้อมดื่ม โดยแปรปัจจัยสารปรุงแต่งกลิ่นรส ได้แก่ น้ำตาล ,น้ำผึ้ง กรดซิตริก และ ผงมะนาวในสัดส่วนต่างๆ.

2. แปรปัจจัยชนิดของสารให้ความหวาน ได้แก่ น้ำตาลและซูคราโลส.

ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสกับผู้บริโภคจำนวน 30 ตัวอย่าง.

วิธีการทดสอบ : การให้คะแนนความชอบแบบ Hedonic scale 9

1 = ไม่ชอบมากที่สุด	2 = ไม่ชอบมาก	3 = ไม่ชอบปานกลาง
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย	5 = เฉยๆ	6 = ชอบเล็กน้อย
7 = ชอบปานกลาง	8 = ชอบมาก	9= ชอบมากที่สุด

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA), หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี New Duncan Multiple Range test (DMRT).

วิเคราะห์และทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ, เคมี, และจุลชีววิทยา ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TSS : Brix), ความเป็นกรดเบส (pH), ค่าสี (L, a, b) และตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Photochemiluminescence (PCL).

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance ; ANOVA), หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี New Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.

5.5.2.2 พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ชาผักเชียงดาพาสเจอร์ไรซ์พร้อมดื่ม

1. พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตชาผักเชียงดาพร้อมดื่ม

กระบวนการผลิตใบชาผักเชียงดาแห้ง มีดังนี้ :

ใบผักเชียงดาสด

↓

ล้างทำความสะอาด หั่นตามขวางเป็นชิ้นประมาณ 1 ซม.

↓

นึ่งด้วยไอน้ำนาน 5-10 นาที

↓

นวดในกระทะด้วยไฟอ่อน นานประมาณ 1-2 ชั่วโมง

↓

ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

เก็บในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ถุงพลาสติก PE ชนิดหนา)

เก็บนาน 2-3 เดือน

↓

ได้ใบชาผักเชียงดาแห้ง

(มีกลิ่นและรสชาติที่ดี)

ทำการปรับสูตรเครื่องดื่มชาผักเชียงดาพร้อมดื่ม โดยแปรปัจจัยสารปรุงแต่งกลิ่นรส ได้แก่ น้ำตาล ,น้ำผึ้ง กรดซิตริก และผงมะนาว, ในสัดส่วนต่างๆ

2. แปรปัจจัยชนิดของสารให้ความหวาน ได้แก่ น้ำตาล และซูคราโลส ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสกับผู้บริโภคจำนวน 50 ตัวอย่าง.

วิธีการทดสอบ : การให้คะแนนความชอบแบบ Hedonic scale 9 :

1 = ไม่ชอบมากที่สุด 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ไม่ชอบปานกลาง

4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 5 = เฉย ๆ 6 = ชอบเล็กน้อย

7 = ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก 9 = ชอบมากที่สุด

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA), หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี New Duncan Multiple Range test (DMRT).

3. วิเคราะห์จุลและทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพเคมีและจุลินทรีย์ ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TSS : Brix), ความเป็นกรดด่าง (pH), ค่าสี (L, a, b) และตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Photochemiluminescence (PCL)

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance ; ANOVA), หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี New Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.

5.5.2.3 ศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เบื้องต้น

1. ศึกษาอายุการเก็บเครื่องดื่มชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

นำเครื่องดื่มชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม แบบบรรจุขวดพลาสติก (PE) ขนาด 80 ลบ.ซม. จำนวน 2 รสชาติ ได้แก่ รสธรรมชาติและรสน้ำผึ้งมะนาว, เก็บที่อุณหภูมิ 5^{O}ซ. และอุณหภูมิ 25^{O}ซ. วิเคราะห์และทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่เก็บทุก 2สัปดาห์ โดยตรวจคุณสมบัติทางกายภาพ, เคมี และจุลชีววิทยา ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TSS : Brix), ความเป็นกรดเบส (pH), ค่าสี (L, a, b) ,ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Photochemiluminescence (PCL), วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance ; ANOVA), หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี New Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.

2. ศึกษาอายุการเก็บเครื่องดื่มชาผักเชียงดาพาสเจอร์ไรส์พร้อมดื่ม

นำเครื่องดื่มชาผักเชียงดาพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม แบบบรรจุขวดพลาสติก (PE) ขนาด 80 ลบ./ซม. จำนวน 2 รสชาติ ได้แก่ รสธรรมชาติและรสน้ำผึ้งมะนาว, เก็บที่อุณหภูมิ 5^{O}ซ. อุณหภูมิ 25^{O}ซ. วิเคราะห์และทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่เก็บทุก 2 สัปดาห์ โดยตรวจ

คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TSS : Brix), ความเป็นกรดเบส (pH), ค่าสี (L, a, b) ,ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Photochemiluminescence (PCL) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance ; ANOVA), หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี New Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.

5.6 ผลการทดลองและวิจารณ์

5.6.1 ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

5.6.1.1 ศึกษาคุณสมบัติการละลายน้ำ (% water solubility) ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดน้ำผักเชียงดาและสารสกัดน้ำผักหวานบ้าน.

จากผลการทดลอง ค่าเปอร์เซ็นต์การละลายน้ำ (% water solubility) ของสารสกัดน้ำผักหวานบ้านและผักเชียงดา แสดงในตารางที่ 18. และตารางที่ 19, ตามลำดับ. พบว่า สารสกัดผักพื้นบ้านทั้ง 2 ชนิด สามารถละลายน้ำได้ (ในระดับความเข้มข้นของสารละลาย 0.5-0.1%) ที่อุณหภูมิห้อง. สารสกัดจากผักเชียงดาด้วยน้ำ สามารถละลายน้ำได้ดีที่สุดในทุกระดับอุณหภูมิ คุณสมบัติการละลายของสารมีค่าสูงถึง 90-95% โดยประมาณ.แต่สำหรับสารสกัดจากผักหวานบ้านด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดละลายได้เพียงบางส่วน คือ สามารถละลายได้ร้อยละ 70-80%.

ตารางที่ 18. เปอร์เซ็นต์การละลายน้ำ (% water solubility) ของสารสกัดผักพื้นบ้านที่อุณหภูมิห้อง

ชนิดสารสกัด	ปริมาณสารสกัด	% Water solubility
สารสกัดผักหวานบ้าน	0.1	83.98^{ns}
	0.2	80.65^{ns}
	0.3	83.91^{ns}
สารสกัดผักเชียงดา	0.1	95.71^{a}
	0.2	92.74^{b}
	0.3	91.63^{b}

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

ตารางที่ 19. เปอร์เซ็นต์การละลายน้ำ (% water solubility) ของสารสกัดผักพื้นบ้านที่อุณหภูมิต่างๆ

ชนิดสารสกัด	อุณหภูมิ	% Water solubility
สารสกัดผักหวานบ้าน	Room Temp. (25-30^{O}ซ.)	84.79^{a}
	Temp 40-50^{O}ซ.	80.61^{a}
	Temp 80-90^{O}ซ.	71.07^{b}
สารสกัดผักเชียงดา	Room Temp. (25-30^{O}ซ.)	92.97^{ns}
	Temp 40-50^{O}ซ.	90.43^{ns}
	Temp 80-90^{O}ซ.	84.01^{ns}

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

จากผลการทดลองที่แสดงดังตารางที่ 19 พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นสารสกัดผักหวานบ้านละลายน้ำได้น้อยลง นั่นคือสารสกัดผักหวานบ้านจะละลายน้ำได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิห้องนั่นเอง. สำหรับสารสกัดผักเชียงดา พบว่า สารสกัดสามารถละลายน้ำได้ดีใกล้เคียงกันที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ.

5.6.1.2 ศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดเบส แปรปัจจัย 3ระดับ (pH 3, pH 5 และ pH 7) ต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผักหวานบ้าน, สารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน และสารสกัดน้ำผักเชียงดา.

ตารางที่ 20. ผลของสภาวะความเป็นกรดเบสต่อคุณสมบัติของสารสกัดผักพื้นบ้าน

ชนิดสารสกัด	pH	TSS (^{O}Brix)	ค่าสี		
			L	a	b
สารสกัดน้ำ	7.0	0.0	63.36^{ns}	-0.13^{b}	6.50^{a}
ผักหวานบ้าน	5.0	0.0	63.15^{ns}	0.45^{a}	5.96^{b}
	3.0	0.0	63.06^{ns}	0.78^{a}	5.40^{b}
สารสกัด 50%	7.0	0.0	63.73^{ns}	2.18^{ns}	4.40^{ns}
เอทานอลผักหวานบ้าน	5.0	0.0	63.61^{ns}	2.26^{ns}	4.00^{ns}
	3.0	0.0	63.87^{ns}	2.26^{ns}	3.79^{ns}
สารสกัดน้ำผักเชียงดา	7.0	0.0	97.88^{ns}	2.81^{b}	-0.21^{ns}
	5.0	0.0	98.39^{ns}	4.47^{ab}	-3.30^{ns}
	3.0	0.0	97.77^{ns}	6.21^{a}	-4.26^{ns}

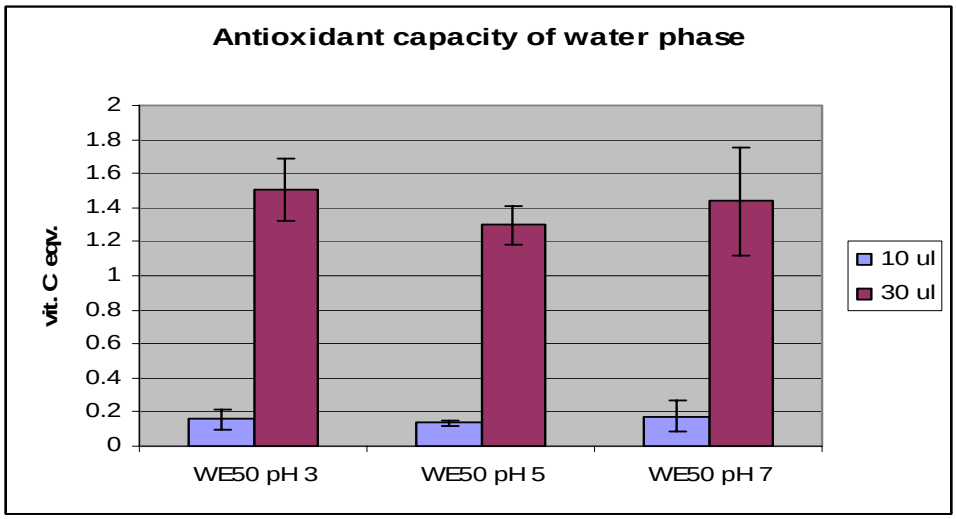
หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

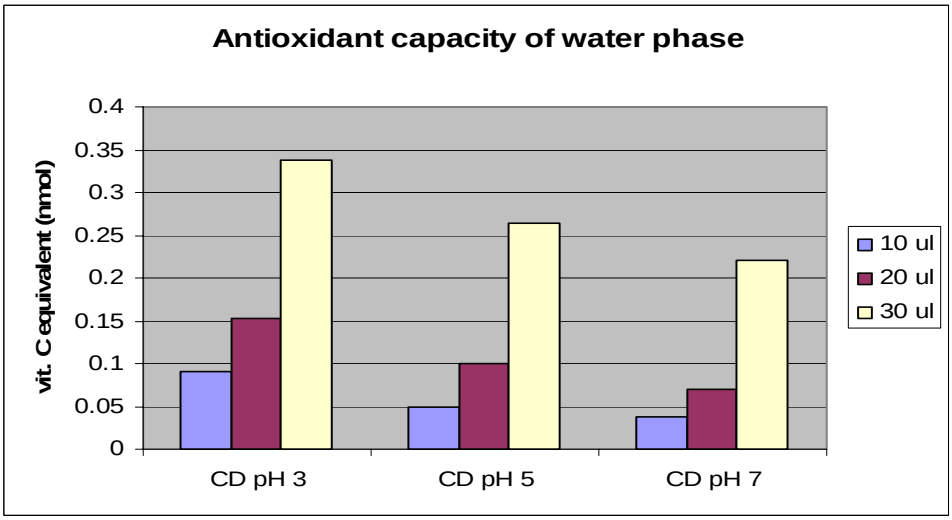
3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

จากข้อมูลแสดงในตารางที่ 20. ข้างต้น พบว่าความเป็นกรดเบส (pH 3-7) ของสารละลายไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า TSS (^{O}Brix) และสำหรับค่าสี (L, a, b) ของสารสกัดผักพื้นบ้านทั้ง 3 ชนิด พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงในส่วนค่าสีแดง (a) เพียงเล็กน้อยเท่านั้น.

รูปที่ 21 และ 22 แสดงผลของสภาวะความเป็นกรดเบสแปรปัจจัย 3 ระดับ (pH 3, pH 5 และ pH 7) ต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักหวานบ้านด้วยเอทานอล 50% และสารสกัดจากผักเชียงดาด้วยน้ำ ตามลำดับ.



รูปที่ 21. ผลของ pH ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด50 % เอทานอผักหวานบ้าน (SAE-E50).



รูปที่ 22. ผลของ pH ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผักเชียงดา (CD).

จากผลการทดลองกรณีสารสกัดผักหวานบ้านด้วยเอทานอล 50% พบว่า pH ระดับต่างๆ ไม่มีผลต่อค่า antioxidant capacity อย่างมีนัยสำคัญ. แต่สำหรับสารสกัดน้ำผักเชียงดาพบว่าช่วง pH 3 ที่เป็นสภาวะกรดสูงจะทำให้ค่า antioxidant capacity มีระดับสูงสุดและค่า antioxidant capacity จะลดลงในลักษณะเป็นปฏิภาคผกผันกับค่า pH ที่เพิ่มขึ้น เช่นจาก pH 5 เป็น pH 7 ที่แสดงค่า antioxidant capacity ต่ำกว่าที่ pH 5 ประมาณ 30-40 % (รูปที่ 22).

5.6.1.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรส์สำหรับกระบวนการแปรรูปอาหารต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผักหวานบ้าน , สารสกัด 50 % เอทานอลผักหวานบ้าน และสารสกัดน้ำผักเชียงดา

ตารางที่ 21 แสดงผลอุณหภูมิต่อคุณสมบัติของสารสกัดผักพื้นบ้านทั้ง 3 วิธี.

ตารางที่ 21. ผลของอุณหภูมิต่อคุณสมบัติของสารสกัดผักพื้นบ้าน

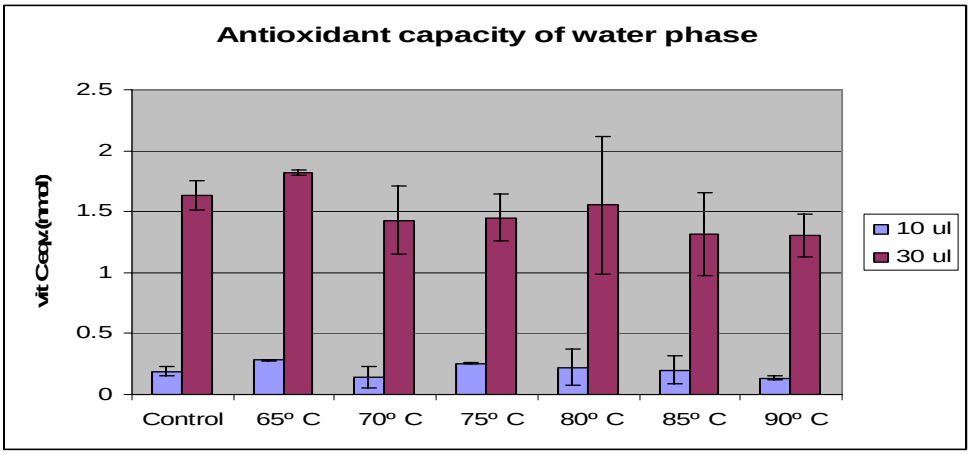
ชนิดสารสกัด	อุณหภูมิ / เวลา ^{O}ซ./นาที	pH	TSS (^{O}Brix)	ค่าสี		
				L	a	b
สารสกัดน้ำผักหวานบ้าน	25/15	7.03^{ns}	0^{ns}	62.94^{ns}	1.06^{ns}	4.49^{ns}
	65/15	7.07^{ns}	0^{ns}	62.57^{ns}	0.86^{ns}	5.47^{ns}
	70/15	7.05^{ns}	0^{ns}	62.55^{ns}	0.95^{ns}	5.74^{ns}
	75/15	7.04^{ns}	0^{ns}	62.85^{ns}	1.11^{ns}	4.91^{ns}
	80/1	7.05^{ns}	0^{ns}	62.61^{ns}	0.46^{ns}	6.32^{ns}
	85/1	7.03^{ns}	0^{ns}	62.64^{ns}	0.82^{ns}	5.15^{ns}
	90/1	7.06^{ns}	0^{ns}	62.55^{ns}	0.72^{ns}	5.32^{ns}
สารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน	25/15	6.37^{a}	0^{ns}	64.40^{ns}	2.05^{a}	3.76^{ns}
	65/15	6.51^{b}	0^{ns}	64.17^{ns}	2.02^{a}	4.34^{ns}
	70/15	6.65^{b}	0^{ns}	64.32^{ns}	1.96^{ab}	3.84^{ns}
	75/15	6.66^{b}	0^{ns}	64.14^{ns}	1.83^{ab}	3.74^{ns}
	80/1	6.56^{ab}	0^{ns}	63.97^{ns}	1.77^{b}	4.07^{ns}
	85/1	6.64^{b}	0^{ns}	64.23^{ns}	1.86^{ab}	3.67^{ns}
	90/1	6.61^{ab}	0^{ns}	64.12^{ns}	1.84^{ab}	3.63^{ns}
สารสกัดน้ำผักเชียงดา	25/15	6.93^{c}	0^{ns}	60.50^{a}	-3.93^{a}	14.63^{a}
	65/15	7.09^{a}	0^{ns}	62.65^{b}	-2.88^{b}	12.37^{b}
	70/15	7.12^{a}	0^{ns}	62.58^{b}	-2.80^{b}	12.12^{b}
	75/15	7.10^{a}	0^{ns}	62.57^{b}	-2.69^{b}	12.05^{b}
	80/1	7.02^{b}	0^{ns}	62.46^{b}	-3.30^{ab}	13.12^{b}
	85/1	7.01^{b}	0^{ns}	62.49^{b}	-3.30^{ab}	13.06^{b}
	90/1	7.00^{b}	0^{ns}	62.45^{b}	-3.34^{ab}	13.14^{b}

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

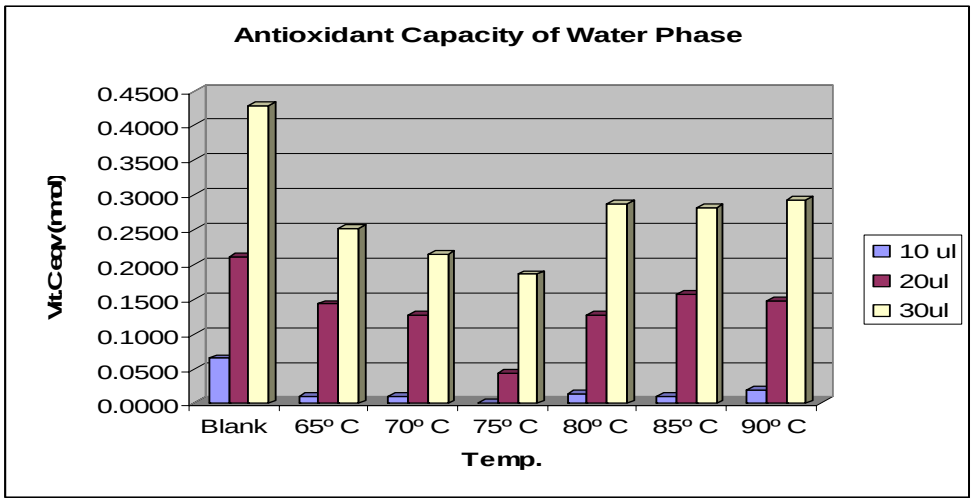
2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

จากตารางแสดงผลคุณสมบัติด้านกายภาพและเคมี พบว่า อุณหภูมิในการฆ่าเชื้อพาสเจอไรส์แบบ HTST (80-90 ^{O}ซ., 1-2 นาที) และแบบ LTLT (65-75 ^{O}ซ., 15 นาที) มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า TSS (^{O}Brix) , pH และค่าสี (L , a, b) ของสารสกัดผักพื้นบ้านทั้ง 3 ชนิด เพียงเล็กน้อยเท่านั้น. รูปที่ 23 และ 24 แสดงผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักหวานและผักเชียงดา.



รูปที่ 23. ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักหวานด้วย 50 % เอทานอล.



รูปที่ 24. ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผักเชียงดา.

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้านนั้น การให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อแบบ HTST (80-90 ^{O}ซ., 1-2 นาที) และการให้ความร้อนแบบ LTLT (65-75 ^{O}ซ., 15 นาที) ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า antioxidant capacity จะลดลงจากสภาวะเริ่มต้นที่ไม่ได้ผ่านความร้อนเพียงเล็กน้อย ประมาณ 10-20%. สำหรับกรณีสารสกัดน้ำผักเชียงดา พบว่า

การฆ่าเชื้อแบบ LTLT (65-75 ^{O}ซ., 15 นาที) มีผลทำให้ค่า antioxidant capacity ลดลงมากกว่าการฆ่าเชื้อแบบ HTST (80-90 ^{O}ซ., 1-2 นาที) อย่างมีนัยสำคัญ. โดยพบว่า การฆ่าเชื้อแบบ HTST ทำให้ค่า antioxidant capacity ลดลงประมาณ 30-20%, ส่วนการฆ่าเชื้อแบบ LTLT มีผลลดลงมากถึงกว่า 50% เมื่อเทียบกับสภาวะเริ่มต้นที่ไม่ได้ผ่านความร้อน.

5.6.2 วิจัยและพัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตเครื่องดื่มเสริมสุขภาพด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ

5.6.2.1 พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

1. เครื่องดื่มชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

ส่วนประกอบ

1. ชาผักหวานบ้านแห้ง
2. น้ำผึ้ง
3. น้ำตาลทรายขาว
4. กรดซิตริก
5. ผงมะนาว
6. น้ำสะอาด
7. สารสกัดผักหวานบ้าน

กรรมวิธีการผลิต

1. ต้มน้ำสะอาดให้เดือด (อุณหภูมิ 100-90^{O}ซ.) เติมใบชาแห้งลงไป ต้มใบชานาน 3-5 นาที.

2. จากนั้นกรองแยกกากใบชาออก เติมน้ำผึ้ง, น้ำตาลทราย ,กรดซิตริก, ผงมะนาว และสารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน ผสมให้ละลายเข้ากัน, ตั้งไฟให้ความร้อน 80-90^{O}ซ. นาน 1-2 นาที.

3. กรองแยกเศษตะกอนต่างๆ อีกครั้ง เพื่อให้ได้น้ำชาที่ใส, บรรจุน้ำชาที่ได้ (ขณะร้อน) ลงในภาชนะบรรจุขวดพลาสติก PE (สะอาดและแห้ง) ที่เตรียมไว้, ปิดฝาขวดให้สนิท, จากนั้น ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและเก็บในตู้เย็น.

2. การปรับสูตรเครื่องดื่มชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

ได้ทำการปรับสูตรเครื่องดื่มชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม และทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสกับผู้บริโภค ดังแสดงในตารางที่ 22 และ 23.

ตารางที่ 22. ส่วนประกอบของเครื่องดื่มชาผักหวานบ้านภายหลังการปรับสูตร

สูตรที่	ส่วนประกอบ (ร้อยละ)						
	ชาแห้ง	น้ำผึ้ง	น้ำตาล	กรดซิตริก	ผงมะนาว	น้ำสะอาด	สารสกัด
1	3-1	2-5	5-8	0.1-0.5	0.1-0.5	90.	0.05-0.1
2	1-3	2-5	3-5	-	-	90	0.05-0.1
3	1-3	2-5	5-8	0.2-0.5	-	90	0.05-0.1

ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสกับผู้บริโภคจำนวน 50 ตัวอย่าง

วิธีการทดสอบ : การให้คะแนนความชอบแบบ Hedonic scale 9

1 = ไม่ชอบมากที่สุด 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ไม่ชอบปานกลาง

4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 5 = เฉย ๆ 6 = ชอบเล็กน้อย

7 = ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก 9 = ชอบมากที่สุด

ตารางที่ 23. ผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

สูตรที่	คะแนนความชอบด้านต่างๆ				
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความชอบรวม
1	6.40^{b}	6.83^{ns}	6.47^{ns}	6.23^{ns}	6.43^{ab}
2	7.10^{a}	7.10^{ns}	6.30^{ns}	6.70^{ns}	6.83^{a}
3	6.47^{ab}	6.67^{ns}	6.00^{ns}	6.17^{ns}	6.10^{b}

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่า สูตรที่ 1 (น้ำตาล 5-8%, น้ำผึ้ง 2-5%, กรดซิตริก 0.1-0.5%, ผงมะนาว 0.1-0.5%, และสารสกัด 0.1-0.5%, และสูตรที่ 2 น้ำตาล 3-5%, น้ำผึ้ง 2-5% และสารสกัด 0.1-0.5%) ได้รับคะแนนความชอบรวมสูงสุด อยู่ในระดับคะแนนที่ชอบเล็กน้อยถึงปานกลาง. ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกสูตรที่ 1 (รสน้ำผึ้งมะนาว) และสูตรที่ 2 (รสธรรมชาติ) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป.

จากการตรวจสอบคุณสมบัติกายภาพและเคมีของชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม ได้แสดงผลไว้ในตารางที่ 24.

ตารางที่ 24. คุณสมบัติกายภาพและเคมีของชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

สูตรที่	TSS (องศาบริกซ์)	pH	ค่าสี		
			L	a	b
1. รสน้ำผึ้งมะนาว	10.8	3.37	80.26	8.65	42.80
2. รสธรรมชาติ	6.0	5.89	75.94	9.85	45.05

หมายเหตุ : ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย

จากตารางที่ 24 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม พบว่ารสน้ำผึ้งมะนาว มีความหวานประมาณ 11 องศาบริกซ์ มี pH 3.37 ใสมีสีน้ำตาลอ่อน และสำหรับรสธรรมชาติ พบว่า มีความหวานประมาณ 6 องศาบริกซ์, มี pH 5.89, เป็นของเหลวใส, มีสีน้ำตาลอ่อนเช่นกัน. ทั้ง 2 รส มีลักษณะใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ชาเขียวพร้อมดื่มที่มีขายทั่วไปในท้องตลาด.

3. แปรปัจจัยชนิดของสารให้ความหวาน

ทั้งนี้เพื่อต้องการให้ผลิตภัณฑ์มีแคลอรีต่ำ โดยสารให้ความหวานที่เลือกใช้แทนน้ำตาล คือ ซูคราโลส (sucralose) (มีความหวานมากกว่าน้ำตาลทราย 600เท่า แต่มีแคลอรีเท่ากับศูนย์) .

แปรปัจจัยชนิดและปริมาณสารให้ความหวาน ดังนี้ :

- รสน้ำผึ้งมะนาว สูตรที่ 1 สารให้ความหวานคือน้ำตาลทรายขาว ร้อยละ 5-8.
  สูตรที่ 2 สารให้ความหวาน คือ ซูคราโลส ร้อยละ 0.01-0.02.
- รสธรรมชาติ สูตรที่ 1 สารให้ความหวานคือน้ำตาลทรายขาว ร้อยละ 3-5.
  สูตรที่ 2 สารให้ความหวาน คือ ซูคราโลส ร้อยละ 0.005-0.008.

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัส แสดงผลไว้ในตารางที่ 25 และ 26.

ตารางที่ 25. การยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักหวานบ้านรสน้ำผึ้งมะนาวปรับสารให้ความหวาน

สูตรที่	คะแนนความชอบด้านต่างๆ				
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความชอบรวม
1	7.21^{ns}	7.10^{ns}	6.54^{ns}	6.83^{ns}	6.94^{ns}
2	7.34^{ns}	7.04^{ns}	6.67^{ns}	6.96^{ns}	6.75^{ns}

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

ตารางที่ 26. การยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักหวานบ้านรสธรรมชาติ ปรับสารให้ความหวาน

สูตรที่	คะแนนความชอบด้านต่างๆ				
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความชอบรวม
1	7.03^{ns}	6.80^{ns}	6.93^{ns}	7.33^{ns}	7.24^{ns}
2	6.98^{ns}	6.86^{ns}	6.87^{ns}	7.46^{ns}	7.52^{ns}

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่แสดงดังตารางที่ 25 และ 26 พบว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาผักหวานพร้อมดื่มที่ใช้สารให้ความหวานซูคราโลสแทนน้ำตาล ทั้ง 2 รสชาติ (รสชาติธรรมชาติและรสน้ำผึ้งมะนาว) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ, นั่นคือ ผู้ทดสอบยอมรับสารซูคราโลสได้เช่นเดียวกับน้ำตาลทราย.

5.6.2.2 พัฒนาสูตรและกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ชาผักเชียงดาพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

1. เครื่องดื่มชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

ส่วนประกอบ

1. ชาผักเชียงดาบ้านแห้ง
2. น้ำผึ้ง
3. น้ำตาลทรายขาว
4. กรดซิตริก
5. ผงมะนาว
6. น้ำสะอาด
7. สารสกัดผักเชียงดา

กรรมวิธีการผลิต

1. ต้มน้ำสะอาดให้เดือด (อุณหภูมิ 90-100^{O}ซ.) เติมใบชาแห้งลงไป ต้มใบชานาน 5-3 นาที.

2. จากนั้นกรองแยกกากใบชาออก เติมน้ำผึ้ง, น้ำตาลทราย, กรดซิตริก, ผงมะนาว และสารสกัดน้ำผักเชียงดา, ผสมให้ละลายเข้ากัน, ตั้งไฟให้ความร้อน 80-90^{O}ซ. นาน 1-2 นาที.

3. กรองแยกเศษตะกอนต่างๆ อีกครั้ง เพื่อให้ได้น้ำชาที่ใส, บรรจุน้ำชาที่ได้ (ขณะร้อน) ลงในภาชนะบรรจุขวดพลาสติก PE (สะอาดและแห้ง) ที่เตรียมไว้, ปิดฝาขวดให้สนิท, จากนั้น ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและเก็บในตู้เย็น.

2. การปรับสูตรเครื่องดื่มชาผักเชียงดาพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

สูตรที่	ส่วนประกอบ (%)						
	ชาแห้ง	น้ำผึ้ง	น้ำตาล	กรดซิตริก	ผงมะนาว	น้ำสะอาด	สารสกัด
1	3-1	2-5	5-8	0.1-0.5	0.1-0.5	90.	0.05-0.1
2	1-3	2-5	3-5	-	-	90	0.05-0.1
3	1-3	2-5	5-8	0.2-0.5	-	90	0.05-0.1

ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสกับผู้บริโภคจำนวน 50 ตัวอย่าง.

วิธีการทดสอบ : การให้คะแนนความชอบแบบ Hedonic scale 9

1 = ไม่ชอบมากที่สุด 2= ไม่ชอบมาก 3= ไม่ชอบปานกลาง
4= ไม่ชอบเล็กน้อย 5= เฉยๆ 6 = ชอบเล็กน้อย
7= ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก 9= ชอบมากที่สุด

ตารางที่ 27. ผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักเชียงดาพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

สูตรที่	คะแนนความชอบด้านต่างๆ				
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความชอบรวม
1	6.63^{ns}	6.80^{ns}	6.00^{ns}	6.57^{a}	6.53^{a}
2	6.70^{ns}	6.76^{ns}	6.10^{ns}	$6.53^{ฟ}$	6.26^{ab}
3	6.53^{ns}	6.67^{ns}	5.83^{ns}	6.00^{b}	6.12^{b}

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

จากผลการทดลองดังตารางที่ 27. พบว่า สูตรที่ 1 (น้ำตาล 5-8%, น้ำผึ้ง 2-5%, กรดซิตริก 0.1-0.5%, ผงมะนาว 0.1-0.5% และสารสกัด 0.1-0.5%) และสูตรที่ 2 (น้ำตาล 3-5%, น้ำผึ้ง 2-5% และสารสกัด 0.1-0.05%) ได้รับคะแนนความชอบรวมสูงสุด อยู่ในระดับคะแนนที่ชอบเล็กน้อยถึงปานกลาง. ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกสูตรที่ 1 (รสน้ำผึ้งมะนาว) และสูตรที่ 2 (รสธรรมชาติ) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป.

ตารางที่ 28. คุณสมบัติกายภาพและเคมีของชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

สูตรที่	TSS (องศาบริกซ์)	pH	ค่าสี		
			L	a	b
1. รสน้ำผึ้งมะนาว	11.0	3.16	77.35	11.20	42.81
2. รสธรรมชาติ	6.5	5.89	80.20	13.78	55.10

หมายเหตุ : ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 28 แสดงลักษณะของผลิตภัณฑ์ชาผักเชียงดาพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม พบว่า รสน้ำผึ้งมะนาว มีความหวานประมาณ 11 องศาบริกซ์, pH 3.16, ใส มีสีน้ำตาลอ่อน. สำหรับ รสธรรมชาติ พบว่า มีความหวาน 6.5 องศาบริกซ์, pH 5.89, ใส มีสีน้ำตาลอ่อนเช่นกัน, ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ชาเขียวพร้อมดื่มที่มีขายทั่วไปในท้องตลาด.

3. แปรปัจจัยชนิดของสารให้ความหวาน

ทั้งนี้เพื่อต้องการให้ผลิตภัณฑ์มีแคลอรีต่ำ โดยสารให้ความหวานที่เลือกใช้แทนน้ำตาล คือ ซูคราโลส) มีความหวานมากกว่าน้ำตาลทราย 600 เท่า แต่มีแคลอรีเท่ากับศูนย์) แปรปัจจัยชนิดและปริมาณสารให้ความหวาน ดังนี้ :

- **รสน้ำผึ้งมะนาว**
  สูตรที่ 1 สารให้ความหวาน คือ น้ำตาลทรายขาว ร้อยละ 5-8.
  สูตรที่ 2 สารให้ความหวาน คือ ซูคราโลส ร้อยละ 0.01-0.02.
- **รสธรรมชาติ**
  สูตรที่ 1 สารให้ความหวาน คือ น้ำตาลทรายขาว ร้อยละ 3-5.
  สูตรที่ 2 สารให้ความหวาน คือ ซูคราโลส ร้อยละ 0.005-0.008.

ตารางที่ 29. ผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักเชียงดารสน้ำผึ้งมะนาวพร้อมดื่ม (ปรับสารให้ความหวาน)

สูตรที่	คะแนนความชอบด้านต่างๆ				
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความชอบรวม
1	6.23^{ns}	6.13^{ns}	6.05^{a}	5.91^{b}	6.15^{ns}
2	6.33^{ns}	6.43^{ns}	5.67^{b}	6.43^{a}	6.62^{ns}

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

ตารางที่ 30. ผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสชาผักเชียงดารสธรรมชาติพร้อมดื่ม (ปรับสารให้ความหวาน)

สูตรที่	คะแนนความชอบด้านต่างๆ				
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความชอบรวม
1	6.42^{ns}	6.57^{ns}	5.95^{ns}	5.95^{ns}	6.00^{ns}
2	6.05^{ns}	6.52^{ns}	5.95^{ns}	5.81^{ns}	6.20^{ns}

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

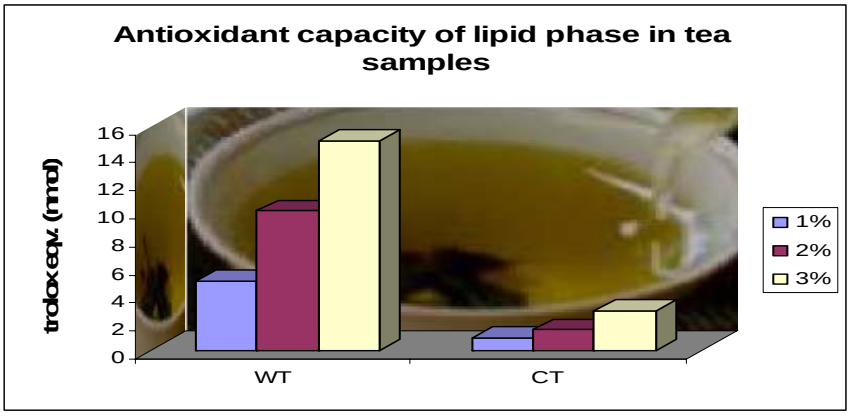
จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่แสดงดังตารางที่ 29 และตารางที่ 30 พบว่าผลิตภัณฑ์ชาผักเชียงดาพร้อมดื่มที่ใช้สารให้ความหวานซูคราโลสแทนน้ำตาล ทั้ง 2 รสชาติ (รสชาติธรรมชาติและรสน้ำผึ้งมะนาว) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ, นั่นคือผู้ทดสอบยอมรับสารซูคราโลสได้เช่นเดียวกับน้ำตาลทราย.

5.6.2.3 การตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นแบบผลิตภัณฑ์ชาพร้อมดื่ม

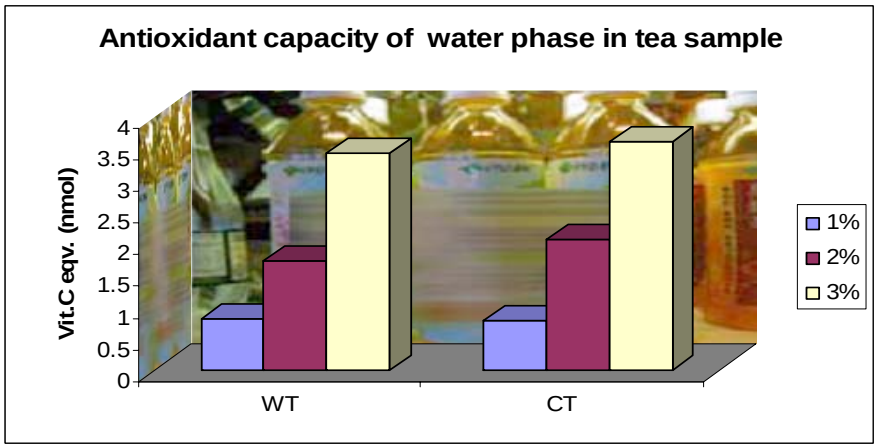
จากตัวอย่างต้นแบบผลิตภัณฑ์ชาพร้อมดื่ม ได้นำมาตรวจควบคุมคุณภาพ (quality control) โดยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ โดยใช้เครื่อง Photochem ® ด้วยวิธี Chemiluminesence assay, พบว่า ในระบบที่เป็น lipid phase (สำหรับสารกลุ่มที่ไม่ละลายน้ำ

เทียบกับสารมาตรฐานคือ Trolox) พบว่า ชาผักหวานบ้าน มีฤทธิ์สูงกว่าชาผักเชียงดา ในทุกระดับความเข้มข้น คือ 1%, 2% และ 3%. แต่ในระบบที่เป็น water phase (สำหรับสารกลุ่มที่ละลายน้ำ เทียบกับสารมาตรฐานคือ Vitamin C) พบว่า ชาผักหวานบ้านมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับชาผักเชียงดา ทั้งใน 3 ระดับความเข้มข้น (1%, 2% และ 3%) แสดงว่า สารออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งของผักหวานบ้านอยู่ในกลุ่ม lipid soluble ในขณะที่สารออกฤทธิ์หลักของผักเชียงดาอยู่ในกลุ่มของ water soluble.

จากรูปที่ 25. พบว่า ชาผักหวาน (WT) มีฤทธิ์สูงกว่าชาผักเชียงดา (CT) ทั้งในตัวอย่างชาที่ 1%, 2% และ 3% แสดงว่า สารออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งของผักหวานบ้านอยู่ในกลุ่ม lipid soluble compounds และรูปที่ 26 พบว่า ชาผักหวาน (WT) มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับชาผักเชียงดา (CT) ทั้งในตัวอย่างชาที่ 1%, 2% และ 3% เป็นการยืนยันผลว่า สารออกฤทธิ์หลักของทั้งผักเชียงดาและผักหวานบ้านอยู่ในกลุ่มของที่ละลายน้ำได้ (แต่สูตรชาที่เตรียมมีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ของผักหวานบ้านอย่างมาก).



รูปที่ 25. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ใน lipid phase.



รูปที่ 26. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ใน water phase.

5.6.2.4 ศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เบื้องต้น

1. อายุการเก็บเครื่องดื่มชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

จากผลการศึกษาอายุการเก็บเครื่องดื่มชาผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่มแบบบรรจุขวดพลาสติก (PE) ขนาด 80 ลบ.ซม. จำนวน 2 รสชาติ ได้แก่ รสธรรมชาติและรสน้ำผึ้งมะนาว, พบว่า เครื่องดื่มชาผักหวานบ้านรสธรรมชาติเก็บได้นาน 6 สัปดาห์ และรสน้ำผึ้งมะนาวเก็บได้นาน 8 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 5^{O}ซ. และอุณหภูมิห้อง 25 ^{O}ซ. ในระยะเวลาการเก็บดังกล่าว ลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ค่าที่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ คือ ความเป็นกรด (acidity). นั่นคือเมื่อเกิดการเสื่อมเสีย ระดับปริมาณจุลินทรีย์สูงมากกว่ามาตรฐานกำหนด, ค่าความเป็นกรดจะลดต่ำลงมาก. สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ตลอดอายุการเก็บดังกล่าว สารต้านอนุมูลอิสระยังคงออกฤทธิ์ได้ดี และมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่าช่วงสัปดาห์แรกของการเก็บอย่างมีนัยสำคัญ. ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่อเก็บนานขึ้น สารสกัดผักหวานบ้านที่เติมเกิดการละลายมากยิ่งขึ้น ทำให้ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นนั่นเอง ผลดังสรุปในตาราง 31 และ ตาราง 32.

2. ศึกษาอายุการเก็บเครื่องดื่มชาผักเชียงดาพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม

สำหรับเครื่องดื่มชาผักเชียงดาจากผลการทดลอง พบว่า รสธรรมชาติเก็บได้นาน 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนชารสน้ำผึ้งมะนาวเก็บได้นาน 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 5^{O}ซ. และที่อุณหภูมิห้อง 25^{O}ซ. ในระยะเวลาการเก็บดังกล่าว ลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก. ค่าที่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ คือ ความเป็นกรด นั่นคือ เมื่อเกิดการเสื่อมเสีย,ระดับปริมาณจุลินทรีย์สูงมากกว่ามาตรฐานกำหนด, ค่าความเป็นกรดจะลดต่ำลงมาก. สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ตลอดอายุการเก็บดังกล่าวข้างต้น สารต้านอนุมูลอิสระยังคงออกฤทธิ์ได้ดี และมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่าช่วงสัปดาห์แรกของการเก็บอย่างมีนัยสำคัญ. ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่อเก็บนานขึ้น สารสกัดผักเชียงดาที่เติมเกิดการละลายมากยิ่งขึ้น ทำให้ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นเช่นเดียวกัน ผลดังสรุปในตารางที่ 33 -34.

ตารางที่ 31. คุณสมบัติชาผักหวานบ้านรสธรรมชาติพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม ในระหว่างเก็บรักษา

Week	อุณหภูมิ (^{O}ซ.)	TSS	pH	L	a	b	% Acidity	Anti activity (vit C equ.: u mole)	TPC (PCA)
0	5	1.87	5.80	51.89	+2.19	+22.90	0.032	215.14	$3.0 * 10^{1}$
	25	1.87	5.80	51.89	+2.19	+22.90	0.032	215.14	$3.0 * 10^{1}$
2	5	1.80	6.10	48.86	+3.14	+23.44	0.032	-	0
	25	1.70	5.64	49.09	+2.82	+23.74	0.032	-	0
4	5	2.10	5.77	52.32	+1.82	+21.25	0.032	-	0
	25	2.00	5.46	52.63	+1.31	+21.69	0.032	-	$9.0 * 10^{4}$
6	5	2.10	6.10	51.34	+2.28	+21.17	0.032	-	0
	25	1.90	5.45	52.65	+1.19	+22.04	0.032	-	$4.0 * 10^{6}$
8	5	2.00	6.13	50.86	+2.36	+21.47	0.006	513.85	$1.0 * 10^{5}$
	25	-	-	-	-	-	-	508.79	

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

ตารางที่ 32. คุณสมบัติชาผักหวานบ้านรสน้ำผึ้งมะนาวพาสเจอไรส์พร้อมดื่มในระหว่างเก็บรักษา

Week	อุณหภูมิ (^{O}ซ.)	TSS	pH	L	a	b	%Acidity	Anti activity (vit C equ.: u mole)	TPC (PCA)
0	5	1.96	3.16	52.56	+1.81	+22.27	0.128	252.19	$5 * 10^{1}$
	25	1.96	3.16	52.56	+1.81	+22.27	0.128	252.19	$5 * 10^{1}$
2	5	2.00	3.18	57.87	+0.38	+22.49	0.128	-	$1 * 10^{2}$
	25	1.90	3.18	56.80	+1.28	+25.01	0.128	-	0
4	5	2.20	3.12	55.46	+0.71	+20.22	0.128	-	0
	25	2.17	3.08	53.88	+1.64	+20.56	0.128	-	0
6	5	2.20	3.02	54.52	+1.02	+20.14	0.128	-	0
	25	2.00	3.04	54.07	+1.57	+20.97	0.128	-	0
8	5	2.10	3.08	55.51	+0.79	+20.55	0.064	688.92	$3.7 * 10^{5}$
	25	2.20	3.07	56.39	-1.61	+21.90	0.096	632.24	$1.09 * 10^{6}$

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

ตารางที่ 33. คุณสมบัติชาผักเชียงดารสธรรมชาติพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม ในระหว่างเก็บรักษา

Week	อุณหภูมิ (^{O}ซ.)	TSS	pH	L	a	b	%Acidity	Anti activity (vit C equ.: u mole)	TPC (PCA)
0	5	1.60	6.92	44.02	+6.60	+21.25	0.032	133.53	$1.0 * 10^{1}$
	25	1.60	6.92	44.02	+6.60	+21.25	0.032	133.53	$1.0 * 10^{1}$
2	5	2.10	6.73	47.61	+4.80	+23.53	0.032	-	0
	25	1.90	5.47	46.74	+4.59	+23.20	0.032	-	0
4	5	2.00	6.47	46.72	+5.29	+23.42	0.032	-	$1.0 * 10^{3}$
	25	1.90	5.33	46.11	+4.75	+22.82	0.032	-	$3.8 * 10^{6}$
6	5	2.10	6.79	46.80	+5.31	+24.92	0.032	183.38	$9.6 * 10^{5}$
	25	-	-	-	-	-	-	236.85	

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

ตารางที่ 34. คุณสมบัติชาผักเชียงดารสน้ำผึ้งมะนาวพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม ในระหว่างเก็บรักษา

Week	อุณหภูมิ (^{O}ซ.)	TSS	pH	L	a	b	%Acidity	Anti activity (vit C equ.: u mole)	TPC (PCA)
0	5	1.76	3.36	41.00	+8.36	+19.23	0.128	110.79	$1.6 * 10^{1}$
	25	1.76	3.36	41.00	+8.36	+19.23	0.128	110.79	$1.6 * 10^{1}$
2	5	2.20	3.27	46.25	+6.26	+20.86	0.128	-	0
	25	2.10	3.26	45.10	+6.44	+19.90	0.128	-	0
4	5	2.10	3.19	45.35	+6.52	+20.97	0.128	-	$1.3 * 10^{3}$
	25	2.10	3.23	46.04	+6.56	+21.58	0.128	-	0
6	5	2.20	3.27	45.58	+6.40	+21.20	0.096	181.58	$6.0 * 10^{5}$
	25	2.20	3.27	47.72	+6.61	+24.00	0.096	162.45	$3.6 * 10^{5}$

หมายเหตุ : 1) ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย.

2) ค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับแสดงความแตกต่างในแนวตั้งของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).

3) ns คือ ไม่มีความแตกต่าง ($P \leq 0.05$).

สรุปผล

จากการทดสอบสารสกัดผักพื้นบ้านที่สกัดได้ 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดน้ำผักหวานบ้าน, สารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน และสารสกัดน้ำผักเชียงดา จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน และสารสกัดน้ำผักเชียงดา สามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิห้อง (ที่ระดับความเข้มข้น 0.5–1 %) และที่สภาวะ pH ต่ำ (ความเป็นกรดสูง (สารจะออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น. ส่วนการพาสเจอไรส์โดยการใช้ความร้อนสูง 80-90 ^{O}ซ., 1 นาที จะมีผลให้ antioxidant activity ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น.

ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสุขภาพด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ เครื่องดื่มสกัดผักหวานบ้านพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม 2 รสชาติ คือ รสธรรมชาติ (ประกอบด้วย ชาแห้ง 1-3%, น้ำตาล 3-5%, น้ำผึ้ง 2-5% และสารสกัด 50% เอทานอลผักหวานบ้าน 0.05-0.1%), (รสน้ำผึ้งมะนาว) ประกอบด้วย ชาแห้ง 1-3%, น้ำตาล 5-8%, น้ำผึ้ง 2-5%, กรดซิตริก 0.1-0.5%, ผงมะนาว 0.1-0.5% และสารสกัดน้ำผักเชียงดา 0.05-0.1%) และเครื่องดื่มสกัดผักเชียงดาพาสเจอไรส์พร้อมดื่ม 2 รสชาติ คือ รสธรรมชาติ (ประกอบด้วย ชาแห้ง 1-3%, น้ำตาล 3-5%, น้ำผึ้ง 2-5% และสารสกัด 0.05-0.1% รสน้ำผึ้งมะนาว (ประกอบด้วย ชาแห้ง 1-3%, น้ำตาล 5-8%, น้ำผึ้ง 2-5%, กรดซิตริก 0.1-0.5%, ผงมะนาว 0.1-0.5% และสารสกัด 0.05-0.1%) เช่นเดียวกัน ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บประมาณ 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง, ผลิตภัณฑ์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ลักษณะเดียวกัน (ชาพร้อมดื่ม) ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดทั่วไป.

ข้อเสนอแนะ

เมื่อพิจารณาผลการศึกษาอายุการเก็บ พบว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มทั้ง 2 ชนิด มีอายุการเก็บค่อนข้างสั้น คือ 6-8 สัปดาห์เท่านั้น, การเสื่อมเสียที่เกิดขึ้นพิจารณาได้จากเกณฑ์ของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่สูงมากเกินค่ามาตรฐานกำหนด. ดังนั้นปัจจัยสำคัญของการเสื่อมเสียอาจเนื่องมาจากสุขาภิบาลของกระบวนการผลิต, การปนเปื้อนในระหว่างการผลิต และข้อจำกัดของเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ฆ่าเชื้อ. ถ้าได้มีการทดลองผลิตในเชิงพาณิชย์ที่มีการฆ่าเชื้อและบรรจุในระบบปิดแล้ว คาดว่าผลิตภัณฑ์น่าจะมีอายุการเก็บได้นานมากกว่า 6 เดือน (24 สัปดาห์) ที่อุณหภูมิห้อง, โดยที่สารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ยังคงออกฤทธิ์ได้ดี.

6. การประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดา และผักหวานบ้าน

6.1 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการกิน

6.1.1 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการกินของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดา

6.1.1.1 วัสดุ สารเคมี และอุปกรณ์

1. ตัวอย่างทดสอบ คือ ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และ สูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2).
2. สัตว์ทดลอง : หนูขาวพันธุ์ Wistar ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม, แบ่งสัตว์ทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบ. แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนูเพศผู้และเพศเมีย เพศละ 5 ตัว. น้ำหนักตัวเริ่มต้นของหนูที่ใช้ในการทดสอบสำหรับหนูเพศผู้อยู่ระหว่าง 251-279 กรัม, สำหรับหนูเพศเมียอยู่ระหว่าง 182-220 กรัม.
3. อาหารสัตว์ บริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ ประเทศไทย จำกัด.
4. น้ำดื่มเป็นน้ำกรอง.
5. น้ำกลั่น.
6. เครื่องชั่ง OHAUS รุ่น E 02140, สวิตเซอร์แลนด์.
7. กรรไกรผ่าตัด, สำลี, แอลกอฮอล์.
8. กระบอกฉีดยาขนาด 1-5 มิลลิลิตร.
9. หลอดเหล็กกล้าไม่เป็นสนิม (stomach tube) สำหรับป้อนอาหารสัตว์ทดลอง.

6.1.2 วิธีการ

ดำเนินการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก ตามวิธีการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก : Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Method (Limit test); วิธีทดสอบหมายเลข 420 ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2001). ก่อนทำการทดสอบนำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24 ± 1 องศาเซลเซียส. จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (กรอกตัวอย่างทดสอบ) และทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง, งดให้อาหารหนู 16 ชั่วโมงข้ามคืนก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ, แต่ให้น้ำดื่มตามปกติ.

หนูในกลุ่มทดลองได้รับการป้อนผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และ สูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) ขนาด 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (มก./กก.). ส่วนหนูในกลุ่มควบคุมได้รับการกรอกน้ำกลั่น ในปริมาตรเทียบเท่ากับปริมาตรของตัวอย่างทดสอบที่กรอกให้กับหนูในกลุ่มทดลอง. ภายหลังป้อนตัวอย่างทดสอบและน้ำกลั่น งดให้อาหารหนูแก่หนูทั้งสองกลุ่มนาน 4 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการดูดซึมของสารทดสอบ (ผลิตภัณฑ์ GY-F1 และ GY-F2) ที่ป้อนเข้าสู่ทางเดินอาหารหนูทดลอง. เมื่อครบเวลาให้อาหารและน้ำดื่มตามปกติ สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูหลังป้อนตัวอย่างทดสอบที่เวลา 1/2, 1 และ 3 ชั่วโมง. จากนั้น สังเกตอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน ชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวในวันที่ 1, 8 และ 15 (วันสิ้นสุดการทดลอง).

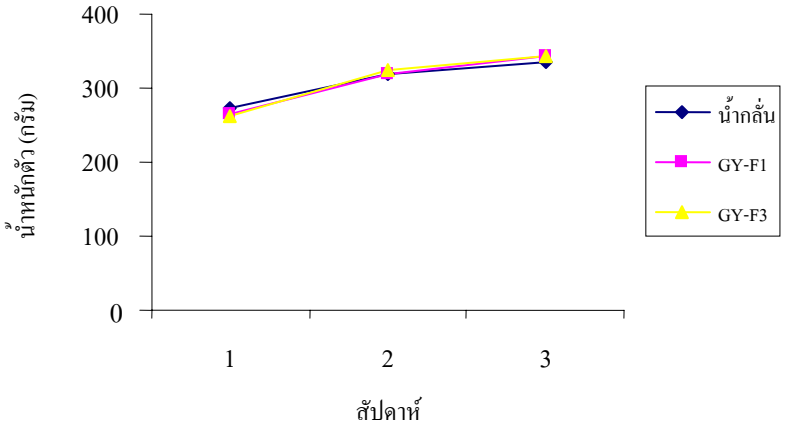
ก่อนการทดสอบ หนูทุกตัวจะถูกเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่หางสำหรับตรวจทางชีวเคมีเลือด (blood chemistry) เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อการทำงานของอวัยวะภายในที่สำคัญ คือ ความผิดปกติของตับจากการตรวจระดับของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST or SGOT), alanine aminotransferase (ALT or SGPT), ความผิดปกติของไตจากการตรวจระดับของเอนไซม์creatinine และความผิดปกติของตับอ่อนจากการตรวจระดับของ glucose และตรวจภายหลังการกรอก ผลิตภัณฑ์ GY-F1 และ GY-F2 โดยทำการเก็บเลือดหนูเพื่อตรวจติดตามค่า blood chemistry ดังกล่าวเป็นระยะๆ ที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง และครั้งสุดท้ายในวันที่ 15 ซึ่งเป็นระยะเวลาสิ้นสุดการทดสอบ.

หากมีหนูที่แสดงอาการผิดปกติอย่างรุนแรง หรือหนูที่มีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดลองครบ 14 วันจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบโดยการให้สูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อตรวจสอบดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน (gross pathology). เปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม, โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Student's t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เพื่อดูผลของตัวอย่างทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนู.

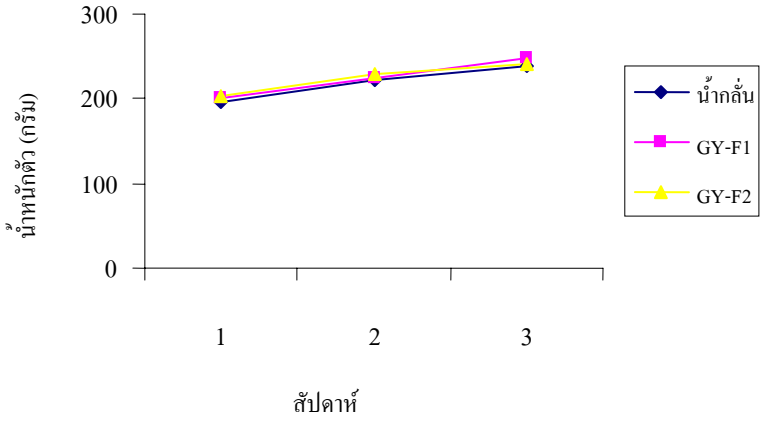
6.1.1.3 ผลการทดสอบ

1. ผลต่อการเจริญเติบโต (การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว)

รูปที่ 27 และ 28 แสดงอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวเพศผู้และเพศเมีย, ตามลำดับ. ส่วนค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนู แสดงในตารางที่ 35.



รูปที่ 27. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวเพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบที่เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) ขนาด 15,000 มก./กก. น้ำหนักตัว.



รูปที่ 28. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวเพศเมีย ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบที่เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) ขนาด 15,000 มก./กก. น้ำหนักตัว.

ตารางที่ 35. ค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูในกลุ่มกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2)

เพศ	ตัวอย่างทดสอบ / ขนาด	*ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	
		วันที่ 8	วันที่ 15
ผู้	น้ำกลั่นปริมาตรเทียบเท่าในกลุ่มทดลอง	46.20 ± 4.57	63.00 ± 5.95
	ผลิตภัณฑ์ “GY-F1” 15,000 มก./กก.	53.60 ± 3.04	77.60 ± 3.90
	ผลิตภัณฑ์ “GY-F2” 15,000 มก./กก.	60.00 ± 2.78	81.00 ± 3.53
เมีย	น้ำกลั่นปริมาตรเทียบเท่าในกลุ่มทดลอง	24.60 ± 0.75	41.00 ± 1.38
	ผลิตภัณฑ์ “GY-F1” 15,000 มก./กก.	29.40 ± 2.90	46.80 ± 2.87
	ผลิตภัณฑ์ “GY-F2” 15,000 มก./กก.	27.00 ± 2.30	37.80 ± 2.39

* น้ำหนักหนูที่เพิ่มขึ้น Mean ± SEM

2. ผลต่อค่าพารามิเตอร์ทางชีวเคมีของเลือด (blood chemistry)

การตรวจทางชีวเคมีของเลือดทำให้ทราบความผิดปกติของอวัยวะต่างๆ ได้ ภายหลังจากป้อนผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) ที่ขนาด 15,000 มก./กก. และทำการตรวจวัดค่าชีวเคมีต่างๆ ของเลือดระหว่างการทดสอบทั้งหมด 5 ครั้ง ดังนี้ ก่อนวันป้อนตัวอย่างทดสอบ, วันที่ 1, 2, 3 และ 15 หลังป้อนตัวอย่างทดสอบ. ผลการตรวจวัดค่าชีวเคมีของเลือดในหนูขาวเพศผู้และเพศเมียทุกกลุ่ม แสดงในตารางที่ 36, 37, และ 38.

ตารางที่ 36. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกน้ำกลั่น

วันที่เจาะเลือด	เพศ	GOT	GPT	Creatinine	Glucose
ก่อนป้อน	ผู้	87.02 ± 8.11	24.54 ± 1.47	0.5 ± 0.00	152.8 ± 2.01
ตัวอย่าง	เมีย	81.56 ± 3.18	21.46 ± 1.91	0.5 ± 0.00	143.4 ± 3.21
1	ผู้	80.26 ± 2.85	*19.04 ± 1.32	0.5 ± 0.00	147.2 ± 3.51
	เมีย	77.12 ± 4.89	18.04 ± 2.17	0.5 ± 0.00	138.6 ± 9.21
2	ผู้	73.02 ± 2.36	*19.08 ± 0.93	0.5 ± 0.00	*140 ± 3.07
	เมีย	68.12 ± 9.38	*13.40 ± 1.47	0.5 ± 0.00	141.8 ± 7.61
3	ผู้	87.36 ± 3.31	21.28 ± 1.26	0.5 ± 0.00	159 ± 3.96
	เมีย	80.54 ± 4.87	21.00 ± 0.88	0.5 ± 0.00	142.8 ± 3.43
15	ผู้	62.46 ± 13.78	*18.98 ± 2.12	0.5 ± 0.00	*138.2 ± 5.50
	เมีย	83.58 ± 4.01	20.82 ± 3.14	0.5 ± 0.00	136.4 ± 6.69

* แตกต่างจาก Before (ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.

ตารางที่ 37. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) ขนาด 15,000 มก./กก.

วันที่เจาะเลือด	เพศ	GOT	GPT	Creatinine	Glucose
ก่อนป้อน	ผู้	97.94 ± 8.12	22.24 ± 1.84	0.5 ± 0.00	146.6 ± 7.33
ตัวอย่าง	เมีย	104.04 ± 3.97	23.96 ± 1.70	0.5 ± 0.00	141.8 ± 4.18
1	ผู้	*75.16 ± 6.59	22.30 ± 2.28	0.5 ± 0.00	146.8 ± 6.59
	เมีย	*90.98 ± 4.14	23.20 ± 2.59	0.5 ± 0.00	134.8 ± 4.91
2	ผู้	*70.34 ± 6.87	*15.58 ± 1.70	0.5 ± 0.00	142.6 ± 6.20
	เมีย	*77.24 ± 5.55	*16.76 ± 1.98	0.5 ± 0.00	*128.6 ± 3.29
3	ผู้	86.42 ± 2.71	23.88 ± 1.53	0.5 ± 0.00	*128.4 ± 3.36
	เมีย	93.44 ± 7.79	23.02 ± 1.16	0.5 ± 0.00	143.6 ± 1.16
15	ผู้	102.72 ± 11.18	*27.24 ± 4.65	0.5 ± 0.00	141.8 ± 12.22
	เมีย	95.72 ± 4.76	*19.90 ± 0.76	0.5 ± 0.00	140.6 ± 3.41

* แตกต่างจาก Before (ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.

ตารางที่ 38. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) ขนาด 15,000 มก./กก.

วันที่เจาะเลือด	เพศ	GOT	GPT	Creatinine	Glucose
ก่อนป้อนสาร	ผู้	95.18 ± 3.83	23.98 ± 1.13	0.5 ± 0.00	141.0 ± 1.26
	เมีย	102.42 ± 13.29	21.54 ± 1.62	0.54 ± 0.04	128.0 ± 6.24
1	ผู้	83.02 ± 7.86	24.64 ± 1.01	0.5 ± 0.00	127.6 ± 6.16
	เมีย	93.04 ± 4.52	20.48 ± 1.94	0.5 ± 0.00	130.0 ± 8.70
2	ผู้	*70.88 ± 4.80	*19.74 ± 0.96	0.5 ± 0.00	*121.6 ± 6.96
	เมีย	77.94 ± 2.96	18.16 ± 1.06	0.5 ± 0.00	129.6 ± 2.50
3	ผู้	89.88 ± 12.64	28.10 ± 5.48	0.5 ± 0.00	*127.6 ± 5.54
	เมีย	87.42 ± 4.13	26.72 ± 1.42	0.5 ± 0.00	119.8 ± 3.49
15	ผู้	94.74 ± 4.24	26.26 ± 1.89	0.5 ± 0.00	*122.3 ± 6.90
	เมีย	106.58 ± 10.14	26.92 ± 1.18	0.5 ± 0.00	*107.7 ± 3.00

* แตกต่างจาก Before (ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.

6.1.1.4 สรุปผลการทดสอบ

- ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) ขนาด 15,000 มก./กก. ไม่ก่อให้เกิดการตายหรืออาการผิดปกติใดๆ แก่หนูทดลอง เมื่อสังเกตผลต่อเนื่อง 14 วัน.
- ข้อมูลการเจริญเติบโตของหนูทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) มีอัตราการเจริญเติบโตเช่นเดียวกันกับหนูในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 27, รูปที่ 28, และตารางที่ 35).
- ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือด เกี่ยวกับความผิดปกติของการทำงานของตับ โดยดูจากระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST หรือ SGOT), alanine aminotransferase (ALT หรือ SGPT) ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ที่สูงเกินไปกว่าในหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ. เมื่อติดตามผลทั้งก่อนการทดสอบ ในระหว่างการทดสอบ และภายหลังการทดสอบ ครบ 14 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) (ตารางที่ 37) และ สูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) (ตารางที่ 38) ไม่ก่อความเป็นพิษต่อตับ รวมทั้งไม่พบความผิดปกติของการทำงานของไตและตับอ่อน, โดยพิจารณาจากค่าของระดับของเอนไซม์ creatinine และระดับน้ำตาลกลูโคส ที่ไม่มีความแตกต่างในทางที่สูงไปกว่าค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวของหนูในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 35) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย.

- ผลการชันสูตรซาก (gross pathology) เมื่อสิ้นสุดการทดสอบ ตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในของหนูทุกตัว ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาทั้ง 2 สูตร.
- สรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาสูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) มีค่าเป็นพิษเฉียบพลันทางการกินที่เรียกว่า lethal dose (LD_{50}) ในหนูขาวพันธุ์ Wistar มากกว่า 15,000 มก./กก.

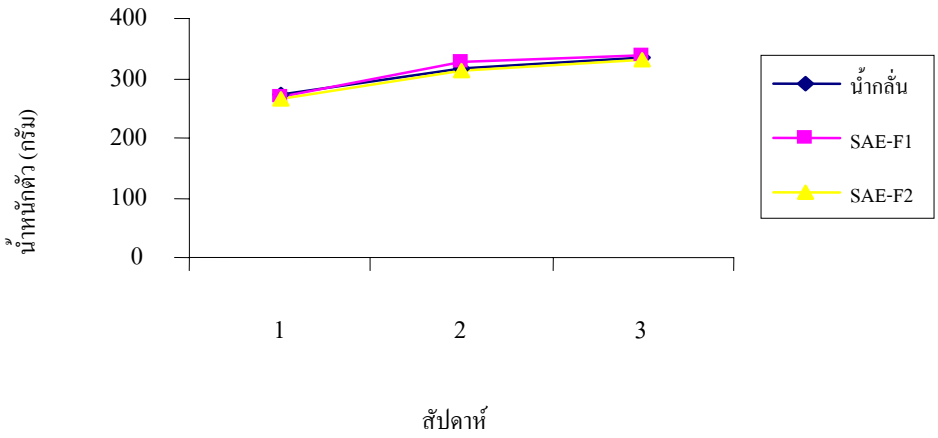
6.1.2 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการกินของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน

ดำเนินการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้านสูตรธรรมชาติ (SAE-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F2) ตามวิธีการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก : Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Method (Limit test); วิธีทดสอบหมายเลข 420 ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2001) ในลักษณะเดียวกันกับการทดสอบของของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา ที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 6.1.1.

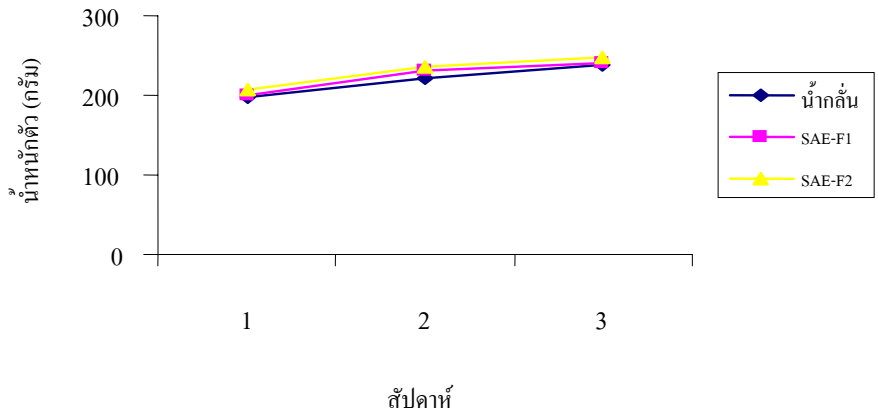
6.1.2.1 ผลการทดสอบ

1. ผลต่อการเจริญเติบโต (วัดจากการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว)

รูปที่ 29 และ 30 แสดงอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวเพศผู้และเพศเมีย, ตามลำดับ. ส่วนค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวแสดงในตารางที่ 3 และผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูแสดงในตารางที่ 40, 41 และ 42.



รูปที่ 29. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวเพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้านสูตรธรรมชาติ (SAE-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F2).



รูปที่ 30. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวเพศเมีย ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน.

ตารางที่ 39. ค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูในกลุ่มกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (SAE-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F2)

เพศ	ตัวอย่างทดสอบ / ขนาด	*ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	
		วันที่ 8	วันที่ 15
ผู้	น้ำกลั่นปริมาตรเทียบเท่าในกลุ่มทดลอง	46.20 ± 4.57	63.00 ± 5.95
	ผลิตภัณฑ์ “SAE -F1”15,000 มก./กก.	58.20 ± 3.10	70.00 ± 2.40
	ผลิตภัณฑ์ “SAE -F2” 15,000 มก./กก.	46.20 ± 0.80	64.80 ± 1.85
เมีย	น้ำกลั่นปริมาตรเทียบเท่าในกลุ่มทดลอง	24.60 ± 0.75	41.00 ± 1.38
	ผลิตภัณฑ์ “SAE -F1” 15,000 มก./กก.	30.20 ± 3.85	40.80 ± 4.87
	ผลิตภัณฑ์ “SAE -F2” 15,000 มก./กก.	29.20 ± 1.88	41.40 ± 1.50

*น้ำหนักหนูที่เพิ่มขึ้น Mean ± SEM

ตารางที่ 40. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกน้ำกลั่น

วันที่เจาะเลือด	เพศ	GOT	GPT	Creatinine	Glucose
ก่อนป้อนสาร	ผู้	87.02 ± 8.11	24.54 ± 1.47	0.5 ± 0.00	152.8 ± 2.01
	เมีย	81.56 ± 3.18	21.46 ± 1.91	0.5 ± 0.00	143.4 ± 3.21
1	ผู้	80.26 ± 2.85	*19.04 ± 1.32	0.5 ± 0.00	147.2 ± 3.51
	เมีย	77.12 ± 4.89	18.04 ± 2.17	0.5 ± 0.00	138.6 ± 9.21
2	ผู้	73.02 ± 2.36	*19.08 ± 0.93	0.5 ± 0.00	*140 ± 3.07
	เมีย	68.12 ± 9.38	*13.40 ± 1.47	0.5 ± 0.00	141.8 ± 7.61
3	ผู้	87.36 ± 3.31	21.28 ± 1.26	0.5 ± 0.00	159 ± 3.96
	เมีย	80.54 ± 4.87	21.00 ± 0.88	0.5 ± 0.00	142.8 ± 3.43
15	ผู้	62.46 ± 13.78	*18.98 ± 2.12	0.5 ± 0.00	*138.2 ± 5.50
	เมีย	83.58 ± 4.01	20.82 ± 3.14	0.5 ± 0.00	136.4 ± 6.69

ตารางที่ 41. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (ASE-F1) ขนาด 15,000 มก./กก.

วันที่เจาะเลือด	เพศ	GOT	GPT	Creatinine	Glucose
ก่อนป้อนสาร	ผู้	97.26 ± 3.00	23.66 ± 2.90	0.5 ± 0.00	121.4 ± 6.33
	เมีย	111.50 ± 11.66	24.62 ± 2.46	0.54 ± 0.04	121.28 ± 11.21
1	ผู้	90.18 ± 4.06	*17.22 ± 1.14	0.5 ± 0.00	127.80 ± 2.74
	เมีย	98.54 ± 4.18	*18.42 ± 1.97	0.5 ± 0.00	131.2 ± 3.96
2	ผู้	*85.24 ± 5.31	*16.44 ± 1.40	0.5 ± 0.00	123.4 ± 3.07
	เมีย	*82.98 ± 5.54	28.18 ± 4.71	0.5 ± 0.00	152.0 ± 5.72
3	ผู้	*84.54 ± 3.76	25.94 ± 3.45	0.52 ± 0.02	128.2 ± 2.83
	เมีย	*84.56 ± 6.28	24.00 ± 2.70	0.5 ± 0.00	132.8 ± 1.77
15	ผู้	133.30 ± 20.27	34.26 ± 6.33	0.5 ± 0.00	107.22 ± 8.00
	เมีย	114.00 ± 3.41	31.30 ± 3.06	0.5 ± 0.00	116.2 ± 2.85

* แตกต่างจาก Before อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 42. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกรอกผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (ASE-F2) ขนาด 15,000 มก./กก.

วันที่เจาะเลือด	เพศ	GOT	GPT	CREA	GLU
ก่อนป้อนสาร	ผู้	115.32 ± 9.19	29.52 ± 1.70	0.54 ± 0.04	144.28 ± 24.96
	เมีย	107.86 ± 16.59	28.40 ± 2.40	0.54 ± 0.04	135.20 ± 24.64
1	ผู้	*84.70 ± 3.28	27.22 ± 4.18	0.5 ± 0.00	140.40 ± 7.26
	เมีย	87.00 ± 6.57	26.26 ± 3.66	0.5 ± 0.00	140.2 ± 9.87
2	ผู้	*88.08 ± 3.72	*20.80 ± 2.02	0.5 ± 0.00	132.2 ± 2.22
	เมีย	89.66 ± 6.29	*18.44 ± 1.69	0.54 ± 0.04	127.6 ± 4.90
3	ผู้	*90.14 ± 4.75	28.16 ± 3.67	0.5 ± 0.00	128.0 ± 4.45
	เมีย	98.08 ± 4.83	29.76 ± 3.19	0.5 ± 0.00	119.6 ± 3.96
15	ผู้	109.46 ± 5.19	*40.40 ± 1.56	0.5 ± 0.00	100.00 ± 4.53
	เมีย	106.82 ± 4.62	31.42 ± 4.36	0.5 ± 0.00	101.96 ± 4.75

* แตกต่างจาก Before อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

6.1.2.2 สรุปผลการทดสอบและวิจารณ์

- ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (SAE-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE -F2) ขนาด 15,000 มก./กก. ไม่ก่อให้เกิดการตายหรืออาการผิดปกติใดๆแก่หนูทดลอง เมื่อสังเกตผลต่อเนื่อง 14 วัน.
- ข้อมูลการเจริญเติบโตของหนูทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (SAE-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE -F2) มีอัตราการเจริญเติบโตเช่นเดียวกันกับหนูในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 29, รูปที่ 30 และ ตารางที่ 39).
- ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือด เกี่ยวกับความผิดปกติของการทำงานของตับ โดยดูจากระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST หรือ SGOT), alanine aminotransferase (ALT หรือ SGPT) ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ที่สูงเกินไปกว่าในหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อติดตามผลทั้งก่อนการทดสอบ, ในระหว่างการทดสอบ และภายหลังการทดสอบ ครบ 14 วัน. แสดงว่าผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (SAE-F1) (ตารางที่ 41) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE -F2) (ตารางที่ 42) ไม่ก่อความเป็น

พิษต่อตับ, รวมทั้งไม่พบความผิดปกติของการทำงานของไตและตับอ่อน โดยพิจารณาจากค่าของระดับของเอนไซม์ creatinine และระดับน้ำตาลกลูโคสที่ไม่มีความแตกต่างในทางที่สูงไปกว่าค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวของหนูในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 39) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย.

- ผลการชันสูตรซาก (gross pathology) เมื่อสิ้นสุดการทดสอบ ตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในของหนูทุกตัวทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับ ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาทั้ง 2 สูตร.
- สรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ (SAE-F1) และ สูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F2) มีค่าเป็นพิษเฉียบพลันทางการกิน ที่เรียกว่า lethal dose (LD_{50}) ในหนูขาวพันธุ์ Wistar มากกว่า 15,000 มก./กก.

6.1.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาและผักหวานบ้านด้วยวิธี MTT

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์วัตถุประสงค์ เพื่อประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดาและผักหวานบ้านต่อเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร โดยศึกษากับเซลล์ตับชนิด HepG2 cell line ใช้วิธีการทดสอบ MTT ซึ่งเป็นการตรวจสอบการมีชีวิตและการแบ่งตัวของเซลล์. พิจารณาผลทดลองจากการใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase จาก mitochondria ในการย่อยสลายสาร tetrazodium salt MTT [3-(4,5) dimethylthiozol-2-yl-)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ที่มีสีเหลือง ได้เป็นสาร formazan ซึ่งมีสีฟ้า และผลจากการดูดกลืนของแสงโดยใช้ automatic plate reader สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น. เซลล์ที่มีชีวิตและเจริญเติบโตจะสามารถย่อยสลายสาร tetrazodium salt MTT ได้อย่างมีประสิทธิภาพ. ในทางตรงกันข้าม เซลล์ที่เกิดความเป็นพิษหรือเซลล์ที่ตายจะไม่สามารถย่อยสลายสารนี้ได้ วิธีทดสอบดังกล่าวประยุกต์จากวิธีทดสอบดั้งเดิมที่ระบุไว้ใน BS-EN30993-5 และ ISO10993-5.

6.1.3.1 การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

ก่อนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ทำการเตรียมตัวอย่างของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากผักเชียงดา 2 ผลิตภัณฑ์คือ สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) และผักหวานบ้าน 3 ผลิตภัณฑ์คือ สูตรธรรมชาติ (SAE-F1), สูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE -F2) และ สูตรสารสกัดเข้มข้น (SAE-Ex). ตัวอย่างทั้ง 5 ผลิตภัณฑ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. และป้องกันจากแสงตลอดระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ.

6.1.3.2 การทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ HepG2

1. การเตรียมตัวอย่างทดสอบแบบปลอดเชื้อ

เตรียมตัวอย่างทดสอบโดยนำผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มทั้ง 5 ผลิตภัณฑ์ที่กล่าวในข้อ 6.13.1 คือ GY-F1, GY-F2, SAE-F1, SAE-F1 และ SAE-Ex มากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน. จากนั้น ทำการเจือจางให้ได้ 8 ระดับความเข้มข้น (ปริมาตรต่อปริมาตร; v/v) คือ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 และ 0.39% ด้วยวิธี 2-fold serial dilution และทุกขั้นตอนเป็นระบบปลอดเชื้อ.

2. การเลี้ยงเซลล์ HepG2 เพื่อการทดสอบ

นำเซลล์ HepG2 cell line (human liver hepatocarcinoman) ATCC HB-8065 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimal Essential Medium (MEM). ก่อนใช้ทำการเติม fetal bovine serum (FBS) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 10 และเติมองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ 0.1mM MEM non-essential amino acid, 1.0 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine และ 100 unit/ml penicillin and streptomycin. นำเซลล์เลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flasks) ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (5% CO_2- incubator) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. การปฏิบัติงานทุกขั้นตอนของการเลี้ยงเซลล์เป็นระบบปลอดเชื้อ.

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ด้วยวิธี MTT

เลี้ยงเซลล์ HepG2 ในถาดหลุมชนิด 96-well plate โดยมีความเข้มข้นของเซลล์ที่ 5000 cells/well นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ใน 5% CO_2- incubator นาน 48 ชั่วโมง. จากนั้น นำตัวอย่างสารทดสอบของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดาและผักหวานบ้านที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามที่อธิบายในข้อ 1 ใส่ลงไปผสมกับ เซลล์ HepG2 ในแต่ละ well และนำเซลล์ไปเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง. เมื่อครบกำหนดเวลาใช้ autopipette ดูดสารทดสอบออก ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ (MEM) ลงไป และนำเซลล์กลับไปเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง.

เตรียมสารละลาย MTT ใน phosphate buffer saline (PBS) ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ autopipette ดูดสารละลาย MMT ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well ที่มีเซลล์ HepG2 อยู่, ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาโดยการนำเซลล์ HepG2 ไปเลี้ยงต่ออีก 4 ชั่วโมง ตามสภาวะการเลี้ยงที่อธิบายข้างต้น. จากนั้น ดูด MMT และ MEM medium ออกจากเซลล์ นำสาร formazan ที่เกิดขึ้นจากเซลล์ไปละลายใน dimethlysulfoxide (DMSO) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ Sorrensen's glycine buffer (pH 10.5) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร. ผสมให้เข้ากันดีโดยใช้ autopipette ดูดขึ้น-ลงในแต่ละ well และดูดสารละลายทั้งหมดลงใน microplate reader (Molecular Devices) เพื่อวัดการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร. ผลที่ได้แสดงใน

ค่าของ optical density (OD) โดยแต่ละตัวอย่างทดสอบจะทำการตรวจวัดค่า OD จำนวน 4 wells เพื่อนำมาคำนวณค่าเฉลี่ย (mean). การประเมินผลข้อมูลจะใช้โปรแกรม SoftMax Program ที่ออกแบบมากับเครื่อง microplate reader ซึ่งจะสร้าง calibration curve จากแต่ละตัวอย่างทดสอบที่มี 8 ระดับความเข้มข้น คือ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 และ 0.39% โดยแต่ละความเข้มข้นจะเตรียมไว้ 4 wells เพื่อให้เครื่องคำนวณจากค่าเฉลี่ยของ OD จากแต่ละ well และแสดงผลอัตโนมัติในรูปของค่า IC_{50} (% ของจำนวนเซลล์ที่ตายต่อจำนวนเซลล์ที่ใช้ทดสอบ)ของแต่ละตัวอย่างทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ เซลล์ HepG2 ปกติ (untreated cells).

เกณฑ์การพิจารณาผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ด้วยวิธี MTT พิจารณาได้จากค่า IC_{50} ที่ได้จากแต่ละความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่างทดสอบ. หากมีค่า IC_{50} มากกว่าร้อยละ 50 ถือว่าตัวอย่างทดสอบนั้นไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ (non-toxic) ต่อเซลล์, แต่หากค่า IC_{50} ที่ได้น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 พร้อมตัวอย่างทดสอบนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์.

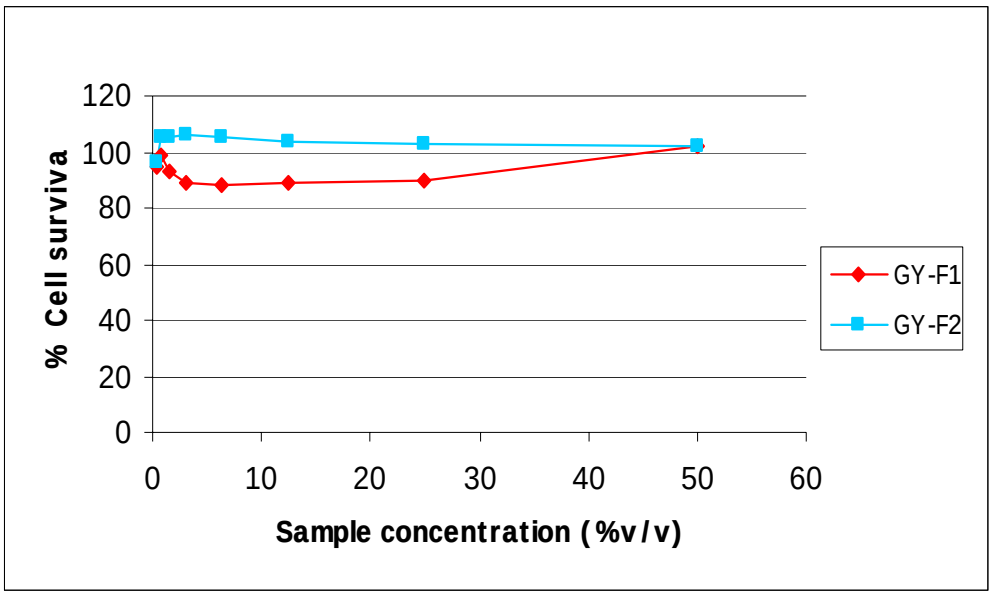
6.1.3.3 ผลการทดสอบ

ตารางที่ 43. ค่า IC_{50} ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาสูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F1) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อ HepG2 ด้วยวิธี MTT

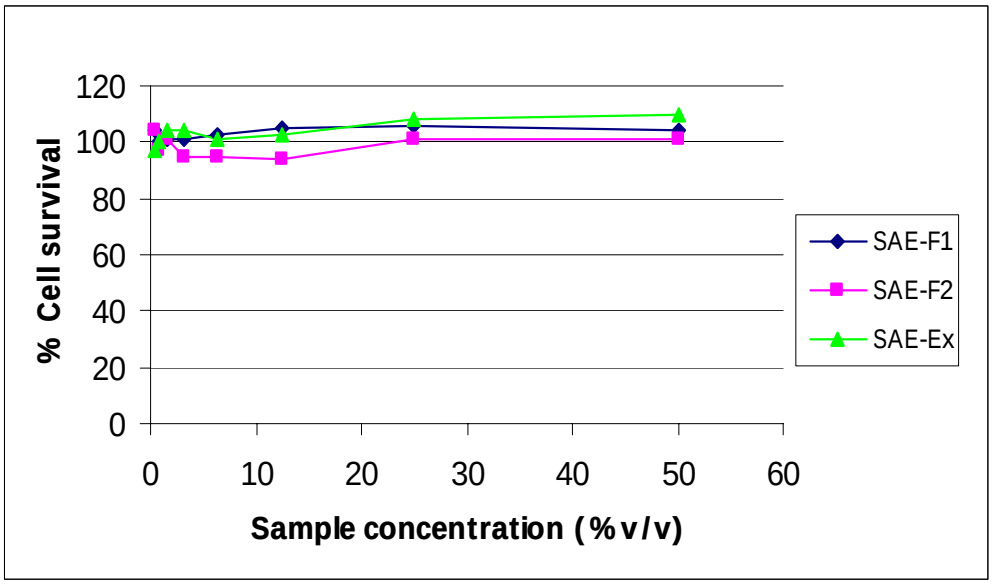
ตัวอย่างทดสอบ	ระดับความเข้มข้น (% v/v)	% Cell survival non-toxic (mean ±SD)	IC_{50} (% v/v)
ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดาสูตรธรรมชาติ (GY-F1)	50	102	มากกว่า 50%
	25	90	มากกว่า 50%
	12.5	89	มากกว่า 50%
	6.25	88	มากกว่า 50%
	3.125	89	มากกว่า 50%
	1.56	93	มากกว่า 50%
	0.78	99	มากกว่า 50%
	0.39	95	มากกว่า 50%
ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดาสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2)	50	102	มากกว่า 50%
	25	103	มากกว่า 50%
	12.5	104	มากกว่า 50%
	6.25	105	มากกว่า 50%
	3.125	106	มากกว่า 50%
	1.56	105	มากกว่า 50%
	0.78	105	มากกว่า 50%
	0.39	105	มากกว่า 50%
	50	96	มากกว่า 50%

ตารางที่ 44. ค่า IC_{50} ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้านสูตรธรรมชาติ (SAE-F1), สูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F2) และสูตรสารสกัดเข้มข้น (SAE-Ex) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อ HepG2 ด้วยวิธี MTT

ตัวอย่างทดสอบ	ระดับความเข้มข้น (% v/v)	% Cell survival non-toxic (mean ±SD)	IC_{50} (% v/v)
ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักหวานบ้านสูตรธรรมชาติ (SAE-F1)	50	104	มากกว่า 50%
	25	106	”
	12.5	105	”
	6.25	103	”
	3.125	101	”
	1.56	101	”
	0.78	100	”
	0.39	104	”
ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักหวานบ้านสูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F2)	50	101	มากกว่า 50%
	25	101	”
	12.5	94	”
	6.25	95	”
	3.125	95	”
	1.56	101	”
	0.78	97	”
	0.39	104	”
ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักหวานบ้านสูตรสารสกัดเข้มข้น (SAE-Ex)	50	110	มากกว่า 50%
	25	108	”
	12.5	103	”
	6.25	101	”
	3.125	104	”
	1.56	104	”
	0.78	100	”
	0.39	97	”



รูปที่ 31. อัตรารอดชีวิต (survival) ของเซลล์ HepG2 ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F1).



รูปที่ 32. อัตรารอดชีวิต (survival) ของเซลล์ HepG2 ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้านสูตรธรรมชาติ (SAE-F1), สูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F1) และสูตรสารสกัดเข้มข้น (SAE-Ex).

6.1.3.4 สรุปผลการทดสอบและวิจารณ์

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ HepG2 ด้วยวิธี MTT ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระ 5 ผลิตภัณฑ์ คือ ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา 2 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สูตรธรรมชาติ (GY-F1) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (GY-F1) และผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน 3 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สูตรธรรมชาติ (SAE-F1), สูตรน้ำผึ้งมะนาว (SAE-F1) และสูตรสารสกัดเข้มข้น (SAE-Ex) ที่ระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ร้อยละ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 และ 0.39 ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ (non-toxic) ต่อเซลล์ตับ HepG2.

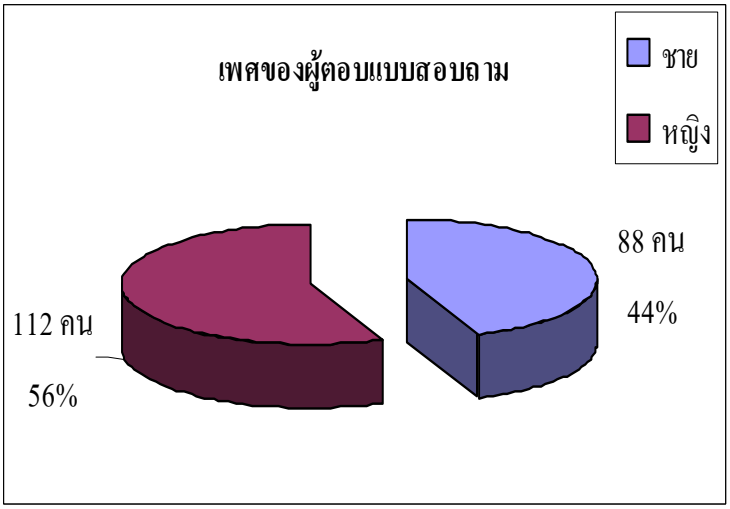
7. การทดลองตลาดและประเมินความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ทำการสำรวจความพึงพอใจของผู้บริโภคเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาและผักหวานบ้านโดยทำการสำรวจด้วยแบบสอบถาม ในพื้นที่เขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล กับผู้ตอบแบบสอบถาม จำนวน 200 คน ปรากฏผลการสำรวจ ดังนี้

ส่วนที่ 1 : รายละเอียดของผู้ตอบแบบสอบถาม

1. ด้านเพศ

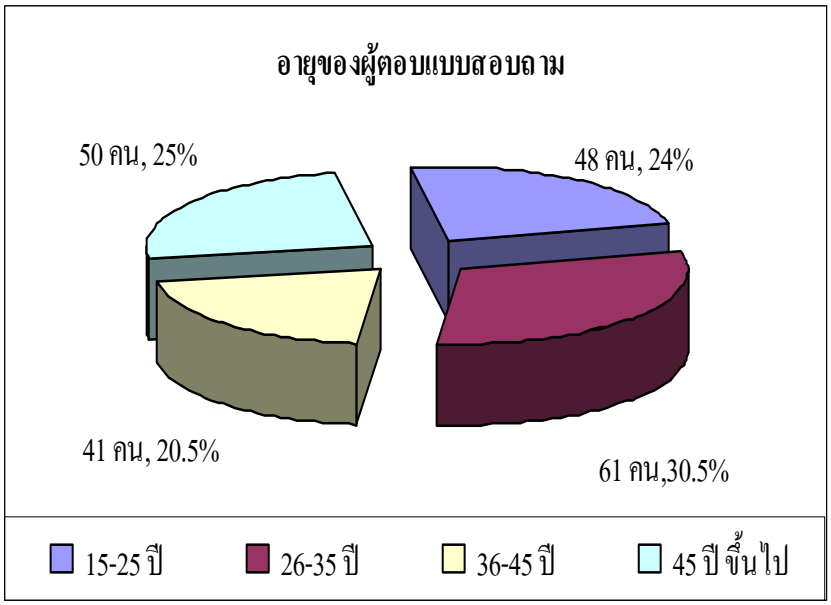
ผลการสำรวจในส่วนที่ 1 แสดงถึงข้อมูลส่วนตัวของผู้ตอบแบบสอบถาม ซึ่งจากรูปที่ 33 พบว่า ผู้ตอบแบบสอบถามทั้งหมดจำนวน 200 คน แบ่งเป็นเพศชาย 88 คน คิดเป็นร้อยละ 44 และเพศหญิง 112 คน คิดเป็นร้อยละ 56.



รูปที่ 33. ร้อยละของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามเพศ.

2. ด้านอายุ

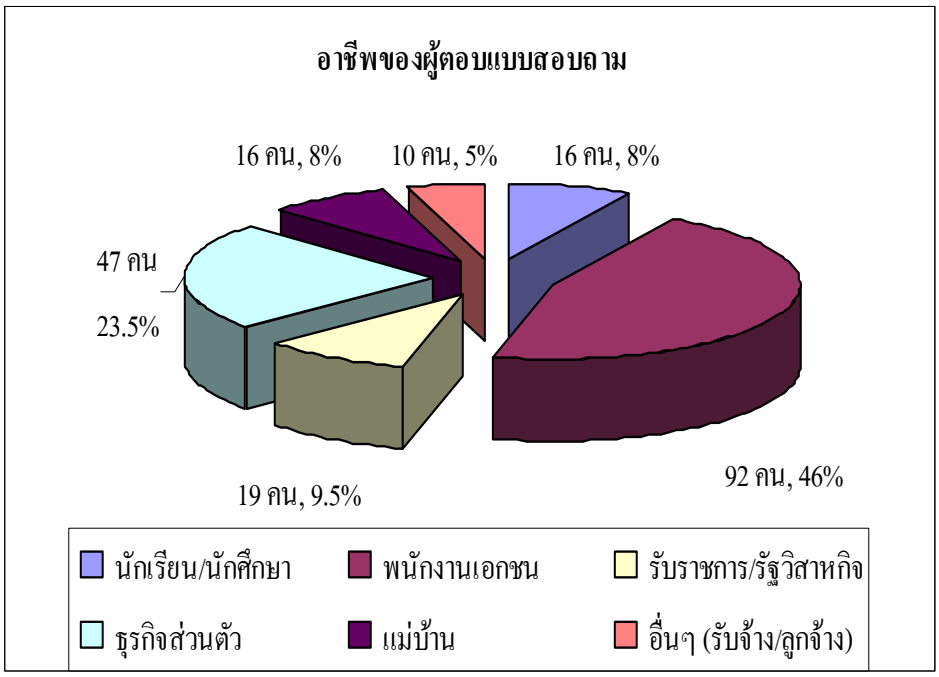
จากรูปที่ 34 แสดงข้อมูลของผู้ตอบแบบสอบถามเมื่อแบ่งตามกลุ่มอายุ ซึ่งพบว่า ผู้ตอบแบบสอบถามมีอายุ 26-35 ปี มีจำนวน 61 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 30.5, อันดับที่ 2 คือ ผู้ตอบแบบสอบถามที่มีอายุ 45 ปี ขึ้นไป มีจำนวน 50 คน คิดเป็นร้อยละ 25, อันดับที่ 3 คือ ผู้ตอบแบบสอบถามที่มีอายุ 15-25 ปี มีจำนวน 48 คน คิดเป็นร้อยละ 24 และผู้ตอบแบบสอบถามที่มีอายุ 36-45 ปี มีจำนวน 41 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 20.5.



รูปที่ 34. ร้อยละของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามอายุ.

3. ด้านอาชีพ

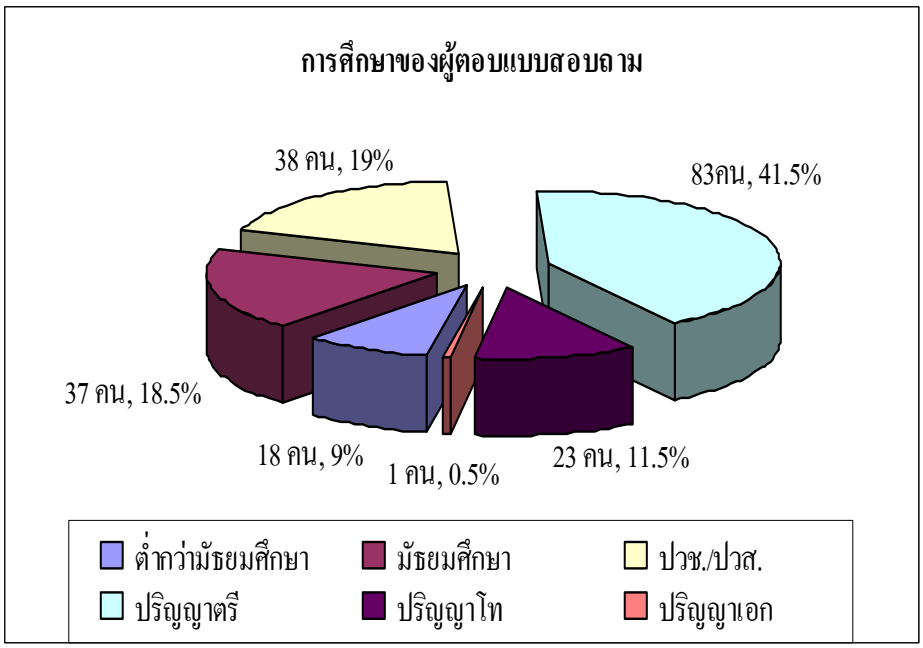
จากรูปที่ 35 แสดงข้อมูลของผู้ตอบแบบสอบถามเมื่อแบ่งตามกลุ่มอาชีพ ซึ่งพบว่าผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่เป็นพนักงานบริษัทเอกชน มีจำนวน 92 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 46, รองลงมา คือ กลุ่มที่ประกอบธุรกิจส่วนตัว มีจำนวน 47 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 23.5, รับราชการ/รัฐวิสาหกิจ จำนวน 19 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 9.5, เป็นแม่บ้านและนักเรียน/นักศึกษา กลุ่มตัวอย่างละ 16 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 8 และร้อยละ 5 (10 คน) อยู่ในกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ อาชีพค้าขายหรือรับจ้างอิสระ.



รูปที่ 35. ร้อยละของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามอาชีพ.

4. ด้านการศึกษา

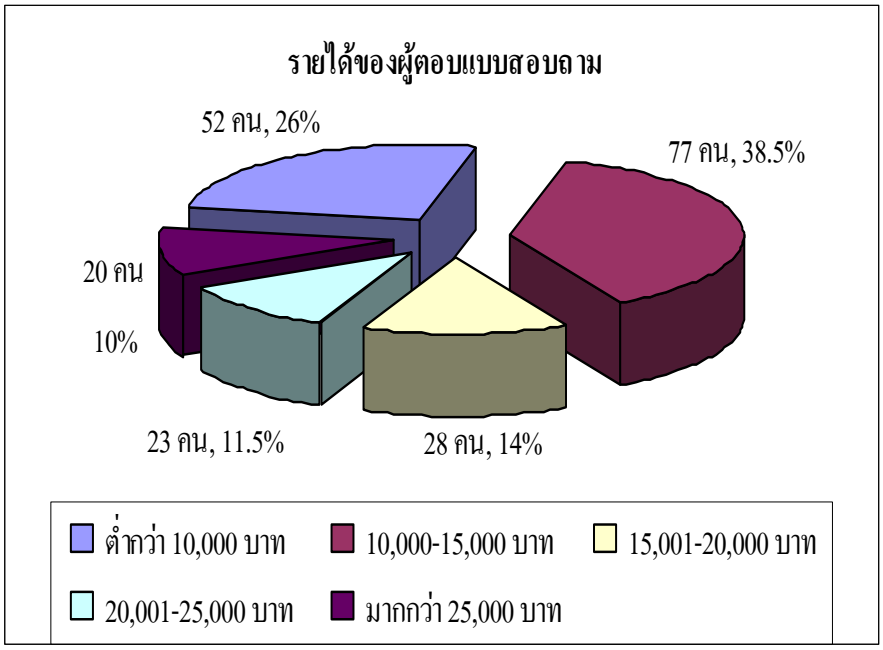
จากรูปที่ 36 แสดงข้อมูลของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามระดับการศึกษาของผู้ตอบแบบสอบถาม ซึ่งพบว่า ผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่มีการศึกษาอยู่ในระดับปริญญาตรี ถึงร้อยละ 41.5 (83 คน), รองลงมา คือ กลุ่มที่มีการศึกษาอยู่ในระดับปวช./ปวส. คิดเป็นร้อยละ 19 (38 คน) และกลุ่มที่มีการศึกษาอยู่ในระดับมัธยมศึกษา คิดเป็นร้อยละ 18.5 (37 คน). นอกจากนี้ กลุ่มที่มีการศึกษาในระดับปริญญาโท คิดเป็นร้อยละ 11.5 (23 คน), กลุ่มที่มีการศึกษาต่ำกว่าระดับมัธยมศึกษา คิดเป็นร้อยละ 9 (18 คน) และอีกร้อยละ 0.5 (1คน) มีการศึกษาอยู่ในระดับปริญญาเอก.



รูปที่ 36. ร้อยละของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามระดับการศึกษา.

5. ด้านรายได้

จากรูปที่ 37. แสดงข้อมูลของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามระดับรายได้ของผู้ตอบแบบสอบถาม ซึ่งพบว่า ผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่มีรายได้อยู่ในช่วง 10,000-15,000 บาท คิดเป็นร้อยละ 38.5 (77 คน), รองลงมา คือ กลุ่มที่มีรายได้อยู่ในช่วงต่ำกว่า 10,000 บาท คิดเป็นร้อยละ 26 (52 คน), กลุ่มที่มีรายได้อยู่ในช่วง 15,001-20,000 บาท คิดเป็นร้อยละ 14 (28 คน), กลุ่มที่มีรายได้อยู่ในช่วง 20,001-25,000 บาท คิดเป็นร้อยละ 11.5 (23 คน) และกลุ่มที่มีรายได้มากกว่า 25,000 บาท คิดเป็นร้อยละ 10 (20 คน).



รูปที่ 37. ร้อยละของผู้ตอบแบบสอบถามแบ่งตามระดับรายได้.

ส่วนที่ 2 : ความพึงพอใจของผู้ตอบแบบสอบถามต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

2.1 ผลการทดสอบ<u>ความพึงพอใจ</u>ที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา-รสธรรมชาติ (GY-F1)

รูปที่ 38. ตัวอย่างรูปแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา-รสธรรมชาติ (GY-F1) ที่ใช้สำรวจความพึงพอใจ.

2.1.1 ความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดารสธรรมชาติในช่วง <u>ก่อนดื่ม</u>

ผลความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มจากผักเชียงดารสธรรมชาติในช่วงก่อนดื่ม พบว่า ผู้ตอบแบบสอบถามให้ความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับชอบปานกลางทั้งในด้านสี, กลิ่น และการยอมรับโดยรวม, โดยให้คะแนนเฉลี่ย เท่ากับ 3.12 3.07 และ 3.12, คะแนนตามลำดับ.

ข้อเสนอแนะ

- ผลิตภัณฑ์มีสีอ่อนเกินไป, ไม่ชวนดื่ม และเสนอให้พัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีสีเขียวอ่อนแบบธรรมชาติ.

- เสนอแนะให้ปรับปรุงในด้านกลิ่น เนื่องจากผลิตภัณฑ์มีกลิ่นฉุนเกินไป ควรเพิ่มกลิ่นหอมแบบกลิ่นชาให้เข้มข้น.

2.1.2 ความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดารสธรรมชาติในช่วงหลังดื่ม

ผลความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มจากผักเชียงดารสธรรมชาติในช่วงหลังดื่ม พบว่า ผู้ตอบแบบสอบถามให้ความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับชอบปานกลางเช่นเดียวกัน. โดยให้คะแนนเฉลี่ยในด้านกลิ่น, รสชาติ, การยอมรับในความขม และการยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวม, เท่ากับ 3.17, 3.08, 3.20 และ 3.11 คะแนน, ตามลำดับ.

ข้อเสนอแนะ

- ผลิตภัณฑ์มีรสชาติจืดเกินไป และบางส่วนรู้สึกได้ถึงรสขมเฝื่อนเล็กน้อย, จึงเสนอแนะให้เพิ่มความเข้มข้นหรือเพิ่มความหวานอีกเล็กน้อย ซึ่งน่าจะช่วยเพิ่มความกลมกล่อมของผลิตภัณฑ์ได้.
- ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นฉุนเกินไป เสนอแนะให้ปรับปรุงด้านกลิ่น ให้มีกลิ่นหอมกว่านี้.

2.1.3 การตัดสินใจซื้อ

หากเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดารสธรรมชาติที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ออกวางจำหน่าย ผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่มีความสนใจซื้อ คิดเป็นร้อยละ 62.0

เหตุผลที่จะตัดสินใจซื้อ

- ความถูกใจในด้านรสชาติของผลิตภัณฑ์.
- สรรพคุณของผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อสุขภาพที่ได้รับการรับรองจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ.
- ราคาที่เหมาะสม.

ส่วนผู้ที่ตัดสินใจไม่ซื้อคิดเป็นร้อยละ 32.5 โดยให้เหตุผลว่า ไม่ถูกใจในรสชาติของผลิตภัณฑ์, ไม่สนใจในสรรพคุณของผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อสุขภาพร่างกาย. นอกจากนี้ มีผู้ที่ยังไม่แน่ใจในการตัดสินใจซื้อ เพียงร้อยละ 5.5, ซึ่งให้เหตุผลว่า อาจเนื่องจากไม่รู้จักผลิตภัณฑ์ดีพอจึงไม่ทราบสรรพคุณของสินค้า และยังไม่ชอบในรสชาติของผลิตภัณฑ์, หรืออาจเนื่องจากไม่ชอบดื่มชา และต้องการการรับรองจาก อย. ก่อนเพื่อประกอบการตัดสินใจ.

2.1.4 ความเหมาะสมด้านราคาขาย

ผลการสอบถามในด้านราคาขาย หากมีการจำหน่ายเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดารสธรรมชาติในราคา 20 บาท ต่อปริมาณ 200-250 กรัม ผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่ให้ความคิดเห็นว่า ราคาดังกล่าวมีความเหมาะสม คิดเป็นร้อยละ 50.5, ใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ตอบแบบสอบถามร้อยละ 49.5 (99 คน) ซึ่งคิดเห็นว่า ราคาดังกล่าวไม่เหมาะสม (แพงเกินไป). มีข้อเสนอแนะให้จำหน่ายผลิตภัณฑ์ดังกล่าวในราคา 10-18 บาท, โดยมีจำนวนถึง 56 คน เสนอให้ขาย 15 บาท,

จำนวน 22 คน เสนอให้ขาย 10 บาท, จำนวน 16 คน เสนอให้ขาย 12-14 บาท และจำนวน 5 คน เสนอให้ขาย 17-18 บาท, แต่ไม่มีผู้ใดเห็นว่าราคาดังกล่าวถูกเกินไป.

2.2 ผลการทดสอบความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา-รสน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2)

รูปที่ 39. ตัวอย่างรูปแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา-รสน้ำผึ้งมะนาว (GY-F2) ที่ใช้สำรวจความพึงพอใจ.

2.2.1 ความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดารสน้ำผึ้งมะนาวในช่วง<u>ก่อนดื่ม</u>

ความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดารสน้ำผึ้งมะนาวในช่วงก่อนดื่ม พบว่า ผู้ตอบแบบสอบถามให้ความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับชอบปานกลางเช่นเดียวกับความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดารสธรรมชาติ, โดยให้คะแนนเฉลี่ยในด้านสี, กลิ่น และการยอมรับโดยรวม, เท่ากับ 3.14, 3.06 และ 3.16 คะแนน, ตามลำดับ.

ข้อเสนอแนะ

- ให้พัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีสีเขียวอ่อนแบบธรรมชาติหรือเพิ่มความเข้มสีให้ดูชวนดื่มกว่านี้.
- ให้ปรับปรุงในด้านกลิ่นเนื่องจากผลิตภัณฑ์มีกลิ่นฉุนเกินไป บางส่วนพบว่ามีกลิ่นคาว จึงเสนอแนะให้เพิ่มกลิ่นหอมธรรมชาติให้เข้มข้นขึ้น.

2.2.2 ความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดารสน้ำผึ้งมะนาวในช่วงหลังดื่ม

ผู้ตอบแบบสอบถามให้ความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับชอบปานกลาง โดยมีระดับคะแนนใกล้เคียงกับก่อนดื่ม กล่าวคือ คะแนนความพึงพอใจในด้านกลิ่น, รสชาติ, การยอมรับในความขม และการยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวม, เท่ากับ 3.13, 3.10, 3.22 และ 3.25 คะแนน, ตามลำดับ.

ข้อเสนอแนะ

- ผลิตภัณฑ์มีรสชาติจืดเกินไป.
- ผลิตภัณฑ์ขาดความกลมกล่อม จึงเสนอแนะให้เพิ่มความเข้มข้น/เพิ่มความหวาน/ความเปรี้ยวอีกเล็กน้อย.

2.2.3 การตัดสินใจซื้อ

ผู้ตอบแบบสอบถามมีความสนใจซื้อผลิตภัณฑ์ดังกล่าว คิดเป็นร้อยละ 61.0.

เหตุผลที่จะตัดสินใจซื้อ

- ความพอใจในรสชาติของผลิตภัณฑ์.
- สรรพคุณของผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อสุขภาพที่ได้รับการรับรองจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ.
- ราคาที่เหมาะสม.

ส่วนกลุ่มผู้ตอบแบบสอบถามที่ตัดสินใจไม่ซื้อผลิตภัณฑ์มีร้อยละ 35.5, โดยให้เหตุผลว่าไม่ถูกใจในรสชาติของผลิตภัณฑ์, ราคาของผลิตภัณฑ์แพงเกินไป, และการไม่สนใจในสรรพคุณของผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อสุขภาพร่างกาย. อีกร้อยละ 3.5 ยังไม่แน่ใจในการตัดสินใจ, โดยให้เหตุผลว่า อาจเนื่องจากไม่ชอบดื่มชา/ไม่ชอบรสน้ำผึ้งมะนาว. นอกจากนี้ บางส่วนยังไม่ทราบสรรพคุณของผลิตภัณฑ์ จึงยังไม่สามารถตัดสินใจได้.

2.2.4. ความเหมาะสมด้านราคาขาย

หากมีการจำหน่ายเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดารสน้ำผึ้งมะนาวที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ในราคา 20 บาท ต่อปริมาณ 200-250 กรัม พบว่า ผู้ตอบแบบสอบถามคิดว่าราคาขายดังกล่าวมีความเหมาะสมเพียงร้อยละ 46.0 (92 คน). แต่มีผู้ตอบแบบสอบถามถึง 108 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 54 ให้ความเห็นว่าราคาดังกล่าวไม่เหมาะสม (แพงเกินไป) และได้เสนอแนะให้จำหน่ายในราคา 10-18 บาท.

2.3 ผลการทดสอบความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน (SAE)

รูปที่ 40. รูปแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน-รสธรรมชาติ (SAE-F1) ที่ใช้สำรวจความพึงพอใจ.

2.3.1 ความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน ในช่วง ก่อนดื่ม

ความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มสารสกัดจากผักหวานบ้านในช่วงก่อนดื่ม พบว่า ผู้ตอบแบบสอบถามให้ความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับชอบปานกลาง เช่นเดียวกับความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มจากผักเชียงดา, แต่มีระดับคะแนนต่ำกว่า, โดยให้คะแนนเฉลี่ยในด้านสี, กลิ่น และการยอมรับโดยรวม เท่ากับ 2.92, 2.97 และ 2.94, คะแนน ตามลำดับ.

ข้อเสนอแนะ

- เสนอให้พัฒนาผลิตภัณฑ์ด้วยการปรับปรุงด้านสี โดยเสนอให้เพิ่มความเข้มสี.
- ให้ปรับปรุงในด้านกลิ่นเนื่องจากผลิตภัณฑ์มีกลิ่นฉุนเกินไป ควรเพิ่มกลิ่นหอมแบบกลิ่นชาให้เข้มข้นขึ้น.

2.3.2 ความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้านในช่วงหลังดื่ม

ความพึงพอใจที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มสารสกัดจากผักหวานบ้านในช่วงหลังดื่ม พบว่า ผู้ตอบแบบสอบถามให้ความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับชอบปานกลาง. โดยมีคะแนนความพึงพอใจใกล้เคียงกับก่อนดื่ม ทั้งนี้ได้รับคะแนนเฉลี่ยในด้านกลิ่น, รสชาติ, การยอมรับในความขม และการยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวม เท่ากับ 3.02, 2.91, 3.19 และ 3.01 คะแนน, ตามลำดับ.

ข้อเสนอแนะ

- ผลิตภัณฑ์มีรสชาติเปรี้ยวเกินไป ควรมีการเพิ่มความหวานอีกเล็กน้อย ผลิตภัณฑ์จึงจะมีความกลมกล่อม.

2.3.3 การตัดสินใจซื้อ

ผลการสอบถามเกี่ยวกับการตัดสินใจซื้อของผู้ตอบแบบสอบถามที่มีต่อเครื่องดื่มสารสกัดจากผักหวานบ้าน พบว่า หากผลิตภัณฑ์ที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ออกวางจำหน่าย ผู้ตอบแบบสอบถามมีความสนใจซื้อผลิตภัณฑ์ดังกล่าว คิดเป็นร้อยละ 50.5.

เหตุผลที่จะตัดสินใจซื้อ

- ถูกใจในด้านรสชาติของผลิตภัณฑ์.
- ตัดสินใจเลือกซื้อเพราะสรรพคุณของผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อสุขภาพที่ได้รับการรับรองจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ.

ส่วนกลุ่มผู้ตอบแบบสอบถามที่ตัดสินใจไม่ซื้อผลิตภัณฑ์มีร้อยละ 42.0, โดยให้เหตุผลว่าไม่ถูกใจในรสชาติของผลิตภัณฑ์, ราคาของผลิตภัณฑ์แพง.

2.3.4 ความเหมาะสมด้านราคาขาย

ผลการสอบถามเกี่ยวกับราคาขายที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อเครื่องดื่มสารสกัดจากผักหวานบ้าน พบว่า หากมีการจำหน่ายผลิตภัณฑ์ที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ ในราคา 20 บาท ต่อปริมาณ 200-250 กรัม พบว่า ผู้ตอบแบบสอบถามคิดว่าราคาขายดังกล่าวมีความเหมาะสมเพียงร้อยละ 47.0 (94 คน) แต่มีผู้ตอบแบบสอบถามถึง 106 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 53 ให้ความเห็นว่าราคาดังกล่าวไม่เหมาะสม (แพงเกินไป) และได้เสนอแนะให้จำหน่ายในราคา 10-18 บาท, โดยผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่ (จำนวน 62 คน) เสนอให้ขาย 15 บาท, จำนวน 21 คน เสนอให้ขาย 10 บาท, จำนวน 12 คน เสนอให้ขาย 12 บาท, จำนวน 3 คน เสนอให้ขาย 13-14 บาท และ 8 คน เสนอให้ขาย 17-18 บาท. อย่างไรก็ตาม ไม่มีผู้ตอบแบบสอบถามคนใดเห็นว่าราคาที่นำเสนอถูกเกินไป.

<u>ส่วนที่ 3</u> เปรียบเทียบความพึงพอใจด้านต่างๆ ในผลิตภัณฑ์ที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา (GY) และผักหวานบ้าน (SAE)

รูปที่ 41. ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากสารต้านอนุมูลอิสระในผักพื้นบ้าน (เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา) : GY-F1 = เครื่องดื่มผักเชียงดา สูตรธรรมชาติ, GY-F2 = เครื่องดื่มผักเชียงดา สูตรน้ำผึ้งมะนาว, SAE-E50 = เครื่องดื่มผักหวานบ้าน สูตรสารสกัด, SAE-F1 เครื่องดื่มผักหวานบ้าน สูตรธรรมชาติ, SAE-F2 = เครื่องดื่มผักหวานบ้าน สูตรน้ำผึ้งมะนาว.

จากการเปรียบเทียบระดับความพึงพอใจในคุณลักษณะด้านต่างๆ ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา (GY) รสธรรมชาติ, รสน้ำผึ้งมะนาว และและเครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน (SAE) ที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อผลิตภัณฑ์ดังกล่าวทั้งก่อนและหลังดื่ม โดยการประเมินเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ในคุณลักษณะด้านสี, กลิ่น, รสชาติ, การยอมรับในความขม และการยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวม พบว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา ทั้งรสธรรมชาติและรสน้ำผึ้งมะนาว และผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน ผู้ตอบแบบสอบถามให้ความพึงพอใจผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ตัวอย่างไม่แตกต่างกัน ในด้านกลิ่นและการยอมรับโดยรวมก่อนทดสอบโดยการดื่ม และหลังการดื่มในด้านกลิ่น, รสชาติ และการยอมรับในความขม. แต่ในด้านสีก่อนดื่มและการยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวมหลังดื่มผู้ตอบแบบสอบถามให้ความพึงพอใจผลิตภัณฑ์แตกต่างกันเล็กน้อย, โดยให้คะแนนความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้านน้อยที่สุด.

อย่างไรก็ตาม ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ ได้รับคะแนนความพึงพอใจอยู่ในระดับชอบปานกลางเช่นเดียวกัน และมีค่าคะแนนใกล้เคียงกันทั้งก่อนและหลังดื่ม.

<u>ส่วนที่ 4</u> การเปรียบเทียบความพึงพอใจด้านการยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวมที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา (GY) และผักหวานบ้าน (SAE) ในช่วงการทดสอบที่แตกต่างกัน (ก่อนดื่มกับหลังดื่ม)

ทำการเปรียบเทียบระดับความพึงพอใจในด้านการยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวมที่ผู้ตอบแบบสอบถามมีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา (GY) และ ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน (SAE) โดยการประเมินเปรียบเทียบในช่วงก่อนดื่มกับช่วงหลังดื่ม, ในคุณลักษณะด้านสี, กลิ่น, รสชาติ, การยอมรับในความขม และประเมินเป็นการยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวม, พบว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักหวานบ้าน ผู้ตอบแบบสอบถามให้ความพึงพอใจทั้ง 2 ช่วงการทดสอบ ไม่แตกต่างกัน, โดยผู้ตอบแบบสอบถามให้คะแนนความพึงพอใจอยู่ในระดับชอบปานกลาง และมีค่าคะแนนใกล้เคียงกันทั้งก่อนและหลังดื่ม.

8. การพัฒนาบรรจุภัณฑ์ต้นแบบ : ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา และผักหวานบ้าน

8.1 การพัฒนาบรรจุภัณฑ์ต้นแบบ

แนวคิดในการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ต้นแบบสำหรับเครื่องดื่มผสมสารสกัดมีสารต้านอนุมูลอิสระที่เลือกใช้สำหรับการบรรจุครั้งนี้ ประกอบด้วยการพิจารณาดังนี้ :

8.1.1 รูปลักษณ์และขนาดของผลิตภัณฑ์

- ความต้องการของกลุ่มผู้บริโภคเครื่องดื่มที่มีผลต่อการดูแลรักษาสุขภาพ.
- ความสะดวกสบาย.
- สามารถบริโภคครั้งเดียวหมด.

จึงเลือกบรรจุภัณฑ์ที่มีความจุน้อยกว่า 200 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นขนาดที่ไม่มีปริมาณมากจนเกินไป และวัสดุบรรจุภัณฑ์เป็นแก้ว เนื่องจากความใสของแก้วเป็นจุดเด่น.

8.1.2 การแสดงตัวสินค้า

ในด้านการแสดงตัวสินค้า ได้เลือกใช้ขวดแก้ว ด้วยเหตุผลดังนี้ :

- ทำให้ผู้บริโภคสามารถมองเห็นสินค้าที่บรรจุภายใน.
- ความแวววาวของแก้วทำให้สินค้ามีคุณค่า.
- เนื้อแก้วทำจากแก้วสีเขียวเพื่อป้องกันการกระตุ้นปฏิกิริยาจากแสง/รังสียูวี, ช่วยลดการเสื่อมสภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นต้นเหตุของการเปลี่ยนสีของเครื่องดื่ม.
- นำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหลังการปิดผนึก เนื่องจากแก้วมีความทนทานต่ออุณหภูมิได้สูงเป็นเวลานาน.
- ในแง่การขนส่ง ขวดแก้วมีสมบัติด้านความต้านแรงกด สามารถรับแรงกดทับขณะเรียงซ้อนได้สูงเช่นเดียวกับบรรจุภัณฑ์โลหะและสูงกว่าบรรจุภัณฑ์พลาสติก.

8.1.3 ต้นแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักพื้นบ้าน

ฉลากต้นแบบที่พัฒนาขึ้นสำหรับสินค้า ได้แนวคิดผสมผสานระหว่างรูปลักษณ์ของวัตถุดิบและสมบัติของสารสกัดในแง่ของการส่งเสริมสุขภาพให้แก่ผู้บริโภค, กราฟิกบนบรรจุภัณฑ์จึงมีลักษณะดังนี้ :

- รูปภาพลายเส้นของใบไม้ที่สื่อถึงที่มาของวัตถุดิบ.
- ในเครื่องดื่มสูตรที่มีน้ำผึ้งและมะนาวผสมอยู่ จะมีภาพกราฟิกรูปรวงผึ้งและผลมะนาวเป็นองค์ประกอบเพื่อแยกความแตกต่าง.
- ใช้ลายเส้นสร้างเป็นกรอบคล้ายรูปหัวใจในบริเวณกลางภาพเพื่อสื่อถึงความห่วงใยในสุขภาพ ซึ่งสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในเครื่องดื่มมีส่วนในการดูแลสุขภาพ.
- โทนสีของฉลากเป็นสีเขียวเพื่อสื่อความเป็นธรรมชาติและสอดคล้องกับสีของบรรจุภัณฑ์.

รูปที่ 42. ตัวอย่างต้นแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากผักเชียงดา –สูตรธรรมชาติ (ซ้าย) และสูตรน้ำผึ้งมะนาว (ขวา).

รูปที่ 43. ตัวอย่างต้นแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากผักหวานบ้าน – สูตรธรรมชาติ (ซ้าย), สูตรน้ำผึ้งมะนาว (กลาง) และสูตรสารสกัดเข้มข้น (ขวา).

8.1.4 ข้อมูลโภชนาการของผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดาและจากผักหวานแต่ละตัว จะมีฉลากติดอยู่บนผลิตภัณฑ์โดยประกอบด้วยข้อมูลโภชนาการของผลิตภัณฑ์นั้นๆ เพื่อให้ผู้บริโภคได้ทราบข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของฉลากผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องดื่มของสำนักงานอาหารและยา (อย.) กระทรวงสาธารณสุข โดยมีรายละเอียดข้อมูลทางโภชนาการที่ส่งวิเคราะห์โดยสถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ของแต่ละผลิตภัณฑ์ดังแสดงในตารางที่ 45 – ตารางที่ 49 ต่อไปนี้.

ตารางที่ 45. คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดา – รสธรรมชาติ

	ต่อ 100 มิลลิลิตร (101.7 กรัม)	ต่อหน่วยบริโภค (200 มิลลิลิตร)	% ปริมาณที่แนะนำต่อวัน
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	8	15	
พลังงานจากไขมัน (กิโลแคลอรี)	-	0	
ไขมันทั้งหมด (กรัม)	-	0	0
ไขมันอิ่มตัว (กรัม)	-	0	0
คอเลสเตอรอล (มิลลิกรัม)	-	0	0
โปรตีน (กรัม)	-	0	
คาร์โบไฮเดรต (รวมใยอาหาร) (กรัม)	2.0	4	1
ใยอาหาร (กรัม)	-	0	0
น้ำตาล (กรัม)	2.6	5	
โซเดียม (มิลลิกรัม)	4	10	0
วิตามินเอ (ไมโครกรัม)	-	(-)	0
วิตามิน บี1 (มิลลิกรัม)	0.01	(0.02)	0
วิตามิน บี2 (มิลลิกรัม)	-	(-)	0
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	-	(-)	0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.04	(0.08)	0
เถ้า (กรัม)	0.04		
ความชื้น (กรัม)	99.7		

ตารางที่ 46. คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักเชียงดา - รสน้ำผึ้งมะนาว

	ต่อ 100 มิลลิลิตร (102.2 กรัม)	ต่อหน่วยบริโภค (200 มิลลิลิตร)	% ปริมาณที่แนะนำต่อวัน
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	9	20	
พลังงานจากไขมัน (กิโลแคลอรี)	-	0	
ไขมันทั้งหมด (กรัม)	-	0	0
ไขมันอิ่มตัว (กรัม)	-	0	0
คอเลสเตอรอล (มิลลิกรัม)	-	0	0
โปรตีน (กรัม)	-	0	
คาร์โบไฮเดรต (รวมใยอาหาร) (กรัม)	2.3	5	2
ใยอาหาร (กรัม)	-	0	0
น้ำตาล (กรัม)	2.6	5	
โซเดียม (มิลลิกรัม)	2.2	0	0
วิตามินเอ (ไมโครกรัม)	-	(-)	0
วิตามิน บี1 (มิลลิกรัม)	0.01	(0.02)	0
วิตามิน บี2 (มิลลิกรัม)	-	(-)	0
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	-	(-)	0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.1	(0.2)	0
เถ้า (กรัม)	0.1		
ความชื้น (กรัม)	99.8		

ตารางที่ 47. คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักหวานบ้าน - รสธรรมชาติ

	ต่อ 100 มิลลิลิตร (101.4 กรัม)	ต่อหน่วยบริโภค (200 มิลลิลิตร)	% ปริมาณที่แนะนำต่อวัน
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	8	15	
พลังงานจากไขมัน (กิโลแคลอรี)	-	0	
ไขมันทั้งหมด (กรัม)	-	0	0
ไขมันอิ่มตัว (กรัม)	-	0	0
คอเลสเตอรอล (มิลลิกรัม)	-	0	0
โปรตีน (กรัม)	-	0	
คาร์โบไฮเดรต (รวมใยอาหาร) (กรัม)	1.9	4	1
ใยอาหาร (กรัม)	0.1	0	0
น้ำตาล (กรัม)	2.4	5	
โซเดียม (มิลลิกรัม)	2.9	5	0
วิตามินเอ (ไมโครกรัม)	-	(-)	0
วิตามิน บี1 (มิลลิกรัม)	0.01	(0.02)	0
วิตามิน บี2 (มิลลิกรัม)	0.01	(0.02)	0
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	-	(-)	0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.1	(0.2)	0
เถ้า (กรัม)	0.1		
ความชื้น (กรัม)	99.4		

ตารางที่ 48. คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักหวานบ้าน - รสน้ำผึ้งมะนาว

	ต่อ 100 มิลลิลิตร (101.7 กรัม)	ต่อหน่วยบริโภค (200 มิลลิลิตร)	% ปริมาณที่แนะนำต่อวัน
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	8	15	
พลังงานจากไขมัน (กิโลแคลอรี)	-	0	
ไขมันทั้งหมด (กรัม)	-	0	0
ไขมันอิ่มตัว (กรัม)	-	0	0
คอเลสเตอรอล (มิลลิกรัม)	-	0	0
โปรตีน (กรัม)	-	0	
คาร์โบไฮเดรต (รวมใยอาหาร) (กรัม)	2.0	4	1
ใยอาหาร (กรัม)	-	0	0
น้ำตาล (กรัม)	2.2	4	
โซเดียม (มิลลิกรัม)	2.6	5	0
วิตามินเอ (ไมโครกรัม)	-	(-)	0
วิตามิน บี1 (มิลลิกรัม)	0.01	(0.02)	0
วิตามิน บี2 (มิลลิกรัม)	0.01	(0.02)	0
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	-	(-)	0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.02	(0.04)	0
เถ้า (กรัม)	0.1		
ความชื้น (กรัม)	99.6		

ตารางที่ 49. คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผักหวานบ้าน - รสผสมสารสกัด

	ต่อ 100 มิลลิลิตร (101.4 กรัม)	ต่อหน่วยบริโภค (200 มิลลิลิตร)	% ปริมาณที่แนะนำต่อวัน
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	8	15	
พลังงานจากไขมัน (กิโลแคลอรี)	-	0	
ไขมันทั้งหมด (กรัม)	-	0	0
ไขมันอิ่มตัว (กรัม)	-	0	0
คอเลสเตอรอล (มิลลิกรัม)	-	0	0
โปรตีน (กรัม)	-	0	
คาร์โบไฮเดรต (รวมใยอาหาร) (กรัม)	2.1	4	1
ใยอาหาร (กรัม)	-	0	0
น้ำตาล (กรัม)	2.4	5	
โซเดียม (มิลลิกรัม)	3.5	5	0
วิตามินเอ (ไมโครกรัม)	-	(-)	0
วิตามิน บี1 (มิลลิกรัม)	0.01	(0.02)	0
วิตามิน บี2 (มิลลิกรัม)	0.01	(0.02)	0
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	1	(2)	0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.02	(0.04)	0
เถ้า (กรัม)	0.1		
ความชื้น (กรัม)	99.2		

9. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัยโครงการ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารและ/หรือเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากสารต้านอนุมูลอิสระ จากวัตถุดิบที่มีอยู่ในประเทศ คือผักพื้นบ้านไทย 2 ชนิด คือ ผักเชียงดา (*Gymnema inodorum* Dence.) และผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus* Merr.) ผลการวิจัยครั้งนี้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ที่สามารถพิสูจน์สรรพคุณทางเภสัชวิทยาโดยเน้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ด้วยเทคนิคการทดสอบที่ยอมรับในงานวิจัยระดับสากล และยังได้ทำการศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาล, ในภาวะเบาหวานหรือจากการที่ร่างกายมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเกินไป ซึ่งมีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ เนื่องจากอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจากสภาวะเครียด (oxidative stress)ในเซลล์ และไปรบกวนการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินที่ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมระดับน้ำตาล, อีกทั้งยังเป็นสาเหตุของความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรังอื่นๆ ตามมา เช่น ความดันโลหิตสูง, ไขมันอุดตันในเส้นเลือด และโรคหัวใจ เป็นต้น. นอกจากนี้ ขั้นตอนงานวิจัยยังครอบคลุมถึงการการตรวจสอบความเป็นพิษของผักพื้นบ้านทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว เพื่อให้ผู้บริโภคเกิดความมั่นใจในการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและมีความปลอดภัย.

ผลจากการดำเนินงานที่แล้วเสร็จในระยะเวลาโครงการวิจัยปีงบประมาณ 2550-2552 ก่อให้เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติของผักเชียงดา และผักหวานบ้าน สรุปดังนี้ :

1. กรรมวิธีของการสกัดผักเชียงดาและผักหวานบ้านมีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (total phenolic content)

ผลการวิจัยเบื้องต้นพบว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักเชียงดา คือ น้ำ เนื่องจากเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารที่มีขั้ว. เมื่อวิจัยเพิ่มเติมในโครงการนี้ได้เลือกส่วนที่เป็นยอดอ่อนและแก่ของผักเชียงดา เพื่อเปรียบเทียบผลในส่วนที่แตกต่างกันของพืชที่สกัดด้วยน้ำและระเหยแห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง พบว่า ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic) ในตัวอย่างสารสกัดด้วยน้ำของผักเชียงดายอดอ่อนและยอดแก่ มีค่าสารประกอบฟีนอลิกรวมที่ใกล้เคียงกัน คือ 8.60 ± 0.004 และ 8.32 ± 0.016 (GAEs/100g extract), ตามลำดับ. นั่นคือสารสกัด 100 กรัมของผักเชียงดามีปริมาณฟีนอลิกเทียบเท่ากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ gallic acid ปริมาณ 8.60 กรัม. สำหรับผักหวานบ้านที่เลือกเฉพาะส่วนที่นำมาบริโภคคือยอดอ่อน ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ, เอทานอลเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีความแตกต่างกันของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน คือ น้ำ (3.44 ± 0.001 GAEs/100g extract)

ผักหวานสกัดด้วย เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ (4.90 ± 0.002 GAEs/ 100g extract) และผักหวานสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (3.55 ± 0.003 GAEs/ 100g extract). แม้ว่าในตัวอย่างสารสกัดจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มาก-น้อยแตกต่างกัน แต่มิได้บ่งบอกถึงคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ, จึงจำเป็นต้องทำการพิสูจน์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ, ด้วยวิธีการทดสอบอื่นๆ อีก.

2. ผักเชียงดาและผักหวานบ้านมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (DPPH radical scavenging activity)

DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นสารเคมีที่มีความเสถียรและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และมีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระได้. จากการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เพื่อตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันหรือการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยประเมินผลจากปริมาณของ DPPH ที่ลดลงด้วยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และแสดงผลสุดท้ายในรูปของค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าของความเข้มข้นของสารมาตรฐานและ/หรือสารสกัดตัวอย่าง ที่สามารถกำจัด DPPH ลดลงได้ร้อยละ 50 ผลของการทดสอบด้วยวิธีนี้พบว่า สารสกัดต่างๆ ของผักเชียงดาและผักหวานบ้านมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน, โดยผักเชียงดาอ่อน- สกัดด้วยน้ำมีค่า IC_{50} = 96.86 ppm ซึ่งใกล้เคียงกับสารสกัดผักเชียงดาแก่ – สกัดด้วยน้ำ ที่มีค่า IC_{50} = 94.69 ppm, สำหรับสารสกัดของผักหวานบ้านพบว่า ค่า IC_{50} ของตัวอย่างที่สกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 85.44 ppm, มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่าผักหวานบ้านที่สกัดด้วยน้ำ (IC_{50}= 125.11 ppm) และด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}= 104.41 ppm).

จากค่า IC_{50} ที่ได้บ่งบอกได้ว่า สารสกัดผักหวานบ้านด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันดีที่สุด, รองลงมา คือ สารสกัดด้วยน้ำของผักเชียงดาอ่อนและ สารสกัดด้วยน้ำของผักเชียงดาแก่ที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงกันมาก, ส่วนสารสกัดผักหวานด้วยน้ำและ ด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ต่ำที่สุด. อย่างไรก็ตาม สารสกัดของทั้งผักเชียงดาและผักหวานบ้านทั้ง 5 ตัวอย่างนี้ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่ำกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบคือ วิตามินซี, trolox (วิตามินอี) และ rutin ที่มีค่า IC_{50} = 1.374 , 1.904 และ 1.607 ppm, ตามลำดับ. สารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้น, มีความบริสุทธิ์ และสามารถออกฤทธิ์ได้แม่นยำ ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติในสารสกัดผักเชียงดาและผักหวานบ้าน อยู่ในรูปสารผสมของสารหลายตัว ซึ่งแต่ละตัวอาจมีปริมาณน้อยมากและอาจเสริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหรือยับยั้งก็ได้ จึงอาจเป็นสาเหตุที่สารสกัดมีฤทธิ์น้อยกว่าสารเคมีสังเคราะห์.

3. ผักเชียงดาและผักหวานบ้านมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระออกซิเจนชนิดซูเปอร์ออกไซด์ ($O^{\bullet}_2$ scavenging activity)

ซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet}$) เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเกิดได้ตลอดเวลาในเซลล์ร่างกาย, โดยเฉพาะจากการที่เซลล์ร่างกาย คือ เม็ดเลือดขาวทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อโรค. ในการวิจัยโครงการนี้ ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล $O_2^{\bullet}$ ของสารสกัดผักเชียงดาและผักหวานบ้าน โดยใช้เทคนิค Photochemiluminescence (PCL) ซึ่งสามารถวัดปฏิกิริยาจากการเรืองแสง (chemiluminescence) ของสารตัวอย่างที่ใช้ในระบบด้วยเครื่อง Photochem®. การทำงานของระบบจะใช้สารเคมีคือ luminol ซึ่งมีคุณสมบัติเรืองแสงได้เมื่อผ่านการกระตุ้น (photosensitizer compound) เป็นตัวสร้างอนุมูลอิสระ $O_2^{\bullet}$ ขึ้นโดยผ่านการกระตุ้นจากแสงอัลตราไวโอเลตที่มีแหล่งกำเนิดอยู่แล้วภายในเครื่อง Photochem® ซึ่งจะมีอัตราการเกิดมากกว่าสถานะปกติถึง 100 เท่า. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ detector substance และในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาจะมีการปล่อยโฟตอน (photon) และเกิดการเรืองแสงขึ้น ซึ่งจะถูกตรวจจับสัญญาณและวัดได้โดยเครื่อง Photochem®. หากตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้เกิดการยับยั้งจำนวนอนุมูลอิสระ ($O_2^{\bullet}$) ที่เกิดขึ้น. ทั้งนี้ในการประเมินผลระบบจะทำการตรวจวัดจากปริมาณอนุมูลอิสระที่หลงเหลืออยู่ และแปรค่าเป็นประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant activity, AA) โดยแสดงค่าเป็นประสิทธิภาพเทียบเท่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เช่น วิตามินซี (ascorbic acid) และวิตามินอี (หรือ trolox) ในหน่วยระดับนาโนโมล (nanomole ; nmole).

ผลการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ พบว่า สารสกัดของผักเชียงดาและผักหวานบ้านทุกตัวอย่าง มีคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $O_2^{\bullet}$ ได้และเป็นไปในลักษณะที่เพิ่มขึ้นตามขนาดหรือ dose-dependent response โดยพบว่า ตัวอย่างที่มีฤทธิ์สูงที่สุด คือ ผักหวานบ้านที่สกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และตัวอย่างที่มีฤทธิ์รองลงมา คือ สารสกัดของผักหวานบ้านด้วยน้ำ. ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของผักเชียงดาส่วนอ่อนและสารสกัดน้ำผักเชียงดาส่วนแก่ มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน และอยู่ในระดับเดียวกันกับสารสกัดของผักหวานบ้านด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์.

4. ผักเชียงดาและผักหวานบ้านมีฤทธิ์ต้านต้านอนุมูลอิสระที่สามารถป้องกันการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงมนุษย์ (anti-hemolytic activity)

ความสามารถในการป้องกันการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ต่อผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นคุณสมบัติประการหนึ่งของสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทำการตรวจสอบกับสารสกัดผักเชียงดาและผักหวานบ้าน โดยใช้สารเคมีมาตรฐาน คือ 2,2-Azo-bis-2-methylpropio namidine (AAPH) เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยา และทำการวัดความเสียหายของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง จากปริมาณความเข้มข้นของฮีโมโกลบินที่หลั่งออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดแดงเนื่องจากผนังเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยทำการศึกษาในสารสกัดจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน. ผลการทดสอบ พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำผักเชียงดาส่วนอ่อน และสารสกัดน้ำผักหวานบ้าน มีค่าใกล้เคียงกันคือ 44.50 ± 1.34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 47.17 ± 0.86 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ, ส่วนสารสกัด 50%เอทานอลผักหวานบ้าน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 101.33 ± 0.95 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร. สารมาตรฐานทั้ง 2 ตัวที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบบวกให้ผลในการยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงใกล้เคียงกัน คือ วิตามินอี ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.17 ± 0.54 และวิตามินซีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.09 ± 1.36 ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่าของสารสกัดของผักเชียงดาและผักหวานบ้าน ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบที่มีสารหลายตัวรวมกันอยู่และยากต่อการแยกเป็นสารบริสุทธิ์เดี่ยวๆ (pure compound). ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์กับสารมาตรฐานได้. เมื่อเทียบเฉพาะสารสกัดผักพื้นบ้าน พบว่าผักเชียงดาและผักหวานบ้านที่สกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์ยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่าผักที่สกัดด้วยเอทานอล.

5. ผักหวานบ้านมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากคุณสมบัติต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (anti-platelet aggregation activity)

จากผลการตรวจสอบคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่างๆ ข้างต้น ได้ข้อมูลที่ยืนยันฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักเชียงดา ซึ่งใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในกระบวนการสกัด. สำหรับผักหวานบ้านได้นำมาศึกษาต่อ โดยตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากคุณสมบัติต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ซึ่งพบปัญหาในการละลายของตัวอย่างสารสกัดของผักหวานบ้านด้วยน้ำและเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์. ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบฤทธิ์เฉพาะผักหวานบ้านที่สกัดด้วย 50% เอทานอล โดยใช้เลือดจากอาสาสมัคร ประเมินผลโดยใช้เครื่อง Aggro-Meter 430 และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (% inhibition of platelet aggregation). ผลการทดสอบสรุปได้ว่าสารสกัดผักหวานบ้านด้วยเอทานอล 50

เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ดี โดยผลเป็นแบบ dose-dependent คือที่ความเข้มข้น 0.003, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition). การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเพิ่มขึ้นตามขนาดเป็น 14.6, 28.45, 43.85, 60.05 และ 70.65, ตามลำดับ.

6. ผักเชียงดาและผักหวานบ้านมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด (hypoglycemic activity)

จากคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยปกป้องไม่ให้เซลล์เสียหายด้วยการป้องกันการเกิดภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งทำให้โรคหลายอย่างลุกลามเร็วขึ้นรวมทั้งเบาหวานหรือภาวะที่มีน้ำตาลในกระแสเลือดสูงด้วย, โดยภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระและไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้ร่างกายใช้ฮอร์โมนอินซูลินได้น้อยลง จึงไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลได้. ดังนั้นนอกจากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว การศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการทดสอบฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลของสารสกัดน้ำของผักเชียงดาส่วนอ่อน (GYJ) และสารสกัดผักหวานบ้านด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ (SAE-50) และผสมทั้งสองชนิดด้วยกัน (GYJ-SAE), โดยใช้หนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar เป็นตัวทดลองในการทดลองครั้งนี้ต้องการที่จะติดตามระดับน้ำตาลในเลือดนาน 14 วัน จึงใช้การเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง โดยการฉีด alloxan โดยหนูที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่า 120 มิลลิกรัม จะถือว่าเป็นหนูเบาหวาน เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบ.

ผลการทดสอบชี้ ให้เห็นว่า สารสกัดผักเชียงดาส่วนอ่อน (GYJ) และสารสกัดผักหวานบ้านด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ (SAE-50) มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยออกฤทธิ์ได้เร็วคล้ายกับกลไกของยา Gibenclamide ที่ใช้รักษาผู้ป่วยเบาหวาน, โดยเห็นผลชัดเจนที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง. สารสกัดผักเชียงดา (GYJ) ขนาด 50 มก./กก. และสารสกัดผักหวานบ้าน (SAE-50) ขนาด 100 มก./กก. มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดได้ร้อยละ 27.08 $\pm$ 6.87 และ 27.59 $\pm$ 12.06, ตามลำดับ, ซึ่งมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับยา Gibenclamide (30.11 $\pm$ 5.18%) และแสดงฤทธิ์ลดน้ำตาลได้มากขึ้นเมื่อตรวจผลที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง. ผลของกลุ่มที่ได้รับสารผสมของผักเชียงดาและผักเชียงดา (GYJ-SAE) พบว่า ไม่มีฤทธิ์เสริมกันและออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลได้ต่ำกว่าที่เป็นผักเดี่ยว.

7. การพัฒนาสูตรและเตรียมตัวอย่างต้นแบบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารต้านอนุมูลอิสระของผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

ข้อมูลจากผลการทดสอบต่างๆ สนับสนุนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักเชียงดา และผักหวานบ้าน. ดังนั้น จึงมีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารในรูปของเครื่องดื่มสุขภาพจากสารต้านอนุมูลอิสระในผักพื้นบ้าน ชนิดบรรจุขวด ได้ 5 ผลิตภัณฑ์, คือ :

(1) เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพผักเชียงดา - สูตรธรรมดา (GY-F1),

(2) เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพผักเชียงดา - สูตรผสมน้ำผึ้ง-มะนาว (GY-F2),

(3) เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพผักหวานบ้าน - สูตรธรรมดา (SAE-F1),

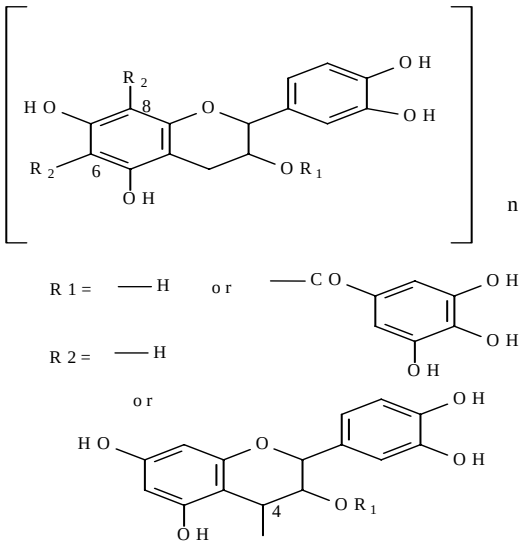
(4) เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพผักหวานบ้าน - สูตรผสมน้ำผึ้ง-มะนาว (SAE-F2),

(5) เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพผักหวานบ้าน - สูตรสารสกัดเข้มข้น (SAE-E50).

ผลิตภัณฑ์ทั้ง 5 ผลิตภัณฑ์ ได้ผ่านการดำเนินการต่อๆ ดังนี้ :

- การศึกษาความคงตัว โดยทดลองเก็บที่อุณหภูมิต่างกัน คือที่ 5, 25 และ 34 องศาเซลเซียส,
- การ ควบคุมคุณภาพทางกายภาพ (สี, กลิ่น, การตกตะกอน) ; ทางชีวภาพ (ตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Chemiluminescence) และตรวจการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค คือ Aerobic bacteria, *Enterobacter*, Yeast/mold, *E. coli, Samonella* spp., *Clostridium* spp.,
- การประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ (ความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการกินในสัตว์ทดลอง),
- การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ทางเดินอาหาร (เซลล์ตับ ด้วยวิธี MMT assay),
- การประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภค.

นอกจากวัตถุดิบที่เป็นผักพื้นบ้าน คือ ผักเชียงดาและผักหวานบ้านแล้ว โครงการนี้ยังได้ทำการศึกษาลู่ทางการใช้ประโยชน์จากส่วนที่เหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้ โดยเฉพาะผลไม้ตามฤดูกาลที่ต้องการเพิ่มมูลค่าและแก้ปัญหาผลผลิตล้นตลาด โดยทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งวัตถุดิบอื่น คือ ผลขององุ่นไทย (*Vitis vinifera cv.* Riber) ที่เป็นซากวัตถุดิบที่เหลือตกค้างจากการคั้นน้ำองุ่นเพื่อทำไวน์, โดยนำมาแยกส่วนของเมล็ดและทำการสกัดสารสำคัญ คือ oligomeric proanthocyanidins หรือ OPCs ซึ่งตรวจยืนยันสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR (nuclear magnetic resonance) ดังแสดงข้างล่าง.



สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Polymeric Proanthocyanidins (OPCs)
ในสารสกัดเมล็ดองุ่นแดงพันธุ์ *Vitis vinifera cv.* Riber (Pok Dum) ของไทย

อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet}$) เป็นอนุภาคที่มีขั้วเป็นลบ สามารถเกิดขึ้นได้เองในกระบวนการเมแทบอลิซึมของทุกเซลล์ภายในร่างกาย หรือในปฏิกิริยาที่มีการใช้ออกซิเจน เช่น ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (respiratory chain) ในกระบวนการหายใจ, และการกำจัดเชื้อโรคของเซลล์เม็ดเลือดขาว (phagocytes). เมื่อซูเปอร์ออกไซด์รวมตัวกับน้ำที่มีอยู่ในเซลล์ร่างกายจะก่อให้เกิดเป็นโมเลกุลของ อนุมูลอิสระของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2^{\bullet}$), ดังปฏิกิริยานี้ :

$$\mathbf{2\ O_2^{\bullet} + 2\ H_2O \longrightarrow O_2 + H_2O_2^{\bullet} + 2\ OH^{\bullet}}$$

เมื่อร่างกายมีปริมาณของอนุมูลอิสระ $H_2O_2^{\bullet}$ ที่มากเกินกว่าร่างกายจะกำจัดออกได้เอง จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อชีวโมเลกุลต่างๆ, โดยเฉพาะต่อสารพันธุกรรม (DNA) ที่ก่อให้เกิดผลร้ายต่อสุขภาพที่ตามมาคือ ความแก่ชรา (aging), โรคมะเร็ง, โรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ และโรคเรื้อรังต่างๆ.

ดังนั้น การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ OPCs จึงเน้นในการตรวจพิสูจน์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และซูเปอร์ออกไซด์, โดยใช้เทคนิค Comet assay เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านการทำลายต่อ DNA (anti-oxidative DNA damage activity) ของสาร OPCs

ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ (TK6, human lymphoblastoid cells) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการทำลาย DNA ด้วยอนุมูลอิสระไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์. หากสาร OPCs สามารถยับยั้งหรือลดการทำลาย DNA จากไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์อนุมูลอิสระได้, แสดงว่า OPCs มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ. ผลของ Comet assay พบว่า สาร OPCs มีฤทธิ์ยับยั้งการทำลาย DNA จาก $H_2O_2^{\bullet}$ ใน TK6 cells ได้, โดยสามารถคำนวณค่าดัชนีการยับยั้งการทำลาย DNA เป็น % DNA damage inhibition ซึ่งสารสกัด OPCs จากเมล็ดองุ่นไทยที่ความเข้มข้น 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการทำลาย DNA จากอนุมูลอิสระ $H_2O_2^{\bullet}$ ได้ ร้อยละ 18.67, 36.37, 30.59 และ 60.08, ตามลำดับ.

ในขณะที่ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\bullet}$ ของ OPCs โดยวิธี Photochemiluminescence ด้วยเครื่อง Photochem® ซึ่งการทำงานของระบบจะใช้สาร luminol เป็นตัวสร้างอนุมูลอิสระ $O_2^{\bullet}$ ซึ่งได้มากกว่าภาวะปกติถึง 100 เท่า. เมื่อตรวจวัดด้วยระบบ ACL (Anti-oxidative Capacity of Lipid Soluble Compound) และเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานในกลุ่ม phenolic compound 2 ตัว คือ gallic และ ellagic พบว่าสารสกัด OPCs มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในลักษณะ dose-response คือ เมื่อวัดที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.03 มก./มล. มีค่า antioxidant capacity (AC) เป็น 20.72745, 41.13445 และ 61.54145 นาโนโมล (trolox equivalent). ผลการทดสอบจาก Comet assay และ Photochem® ชี้ให้เห็นว่า สาร OPCs จากเมล็ดองุ่นไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระซูปเปอร์ออกไซด์.

อย่างไรก็ดี เนื่องจากความจำกัดของงบประมาณที่ได้รับในแต่ละปี และระยะเวลาวิจัยของโครงการที่สิ้นสุดภายใน 3 ปี. ดังนั้นสำหรับสาร OPCs จึงยังไม่มีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ แต่องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยเกี่ยวกับสาร OPCs ครั้งนี้ สามารถนำไปวิจัยต่อยอดในชุดโครงการวิจัยอื่นๆ ของ วว. เช่น ชุดโครงการเภสัชโภชนาภัณฑ์ (nutraceuticals) หรือ ชุดโครงการวิจัยและพัฒนาเวชสำอาง (cosmeceuticals) ได้. อนึ่งผลการวิจัยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ OPCs ในการวิจัยนี้ ได้รับการนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการในระดับชาติ 2 เรื่อง และระดับนานาชาติในต่างประเทศ 5 เรื่อง ดังรายละเอียดผลงานแสดงในภาคผนวก.

6. เอกสารอ้างอิง

ชุณหสวัสดิกุล, บรรจบ. 2542. ผักพื้นบ้านรักษาโรคไขมันในเลือดสูง ความดันเลือดสูง โรคหัวใจ และโรคเบาหวาน ในรวมบทความการสัมมนาวิชาการเรื่องผักพื้นบ้านและอาหารพื้นบ้าน สถาบันการแพทย์แผนไทย, กรุงเทพมหานคร, โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึก.

ตระกูลทิวากร, เกศินี. 2547. "ผักพื้นบ้านไทย ผลกำไรจากท้องถิ่น" [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://www.ku.ac.th/e-magazine/october47/agri/plant.html. [เข้าถึงเมื่อ 9 พ.ย. 2548].

วามานนท์, มาโนช และเพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. 2538. ผักพื้นบ้าน : ความหมายและภูมิปัญญาของสามัญชนไทย กรุงเทพมหานคร, องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก

เมืองมั่น, วีระสิงห์. 2542. การดูแลสุขภาพด้วยการบริโภคอาหาร เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องผักพื้นบ้านและอาหารพื้นเมือง สถาบันการแพทย์แผนไทย กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี.

ล้วนรัตน์, อ้อมบุญ. 2541. Antioxidant จากสมุนไพร. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่อง Free radicals in health and diseases วันที่ 16-20 พฤศจิกายน 2541. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

อิฐรัตน์, อรุณพร. 2544. อาหารเป็นยา. ภาควิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abou Zid, S. F and Elsherbeiny. G. M. 2008. Increase in Flavonoids content in red onion peel by mechanical shredding, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(9), 258-260.

Ainsworth A.E and Gillespie, M. K. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 875 – 877.

Better Health Channel. 2008. Fact Sheet. Antioxidants. [online]. Available at : http:// www.betterhealth.vic.gov.au. [accessed 12 May 2009].

Devasgayam, TPA., Tilak, JC., Boloor, KK., Sane, S.K., Ghaskadbi, S.S., and Lele, R.D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. Review Article. *JAPI* (52), October, pp794-804.

Guillamet E, Creus A, Farina M, Sabbioni E, Fortaner S, and Marcos R. 2008. DNA-damage induction by eight metal compounds in TK6 human lymphoblastoid cells: results obtained with the alkaline Comet assay. *Mut Res*, 65 (1), 22-28.

International Food information. Functional Food Fact Sheets: Antioxidants. (June 2002). Council.Connecticut Avenue, N.W., Suite 430. Washington DC.

Parekh J., Karathia N and Chanda S. 2006. Evaluation of antibacterial axtivity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegate* L. bark., *African Journal of Biomedicinal Research*, 9, 53-56.

Peng, Z. Hayasaka, Y. Iland, P. G. Sefton, M. Høj, P. and Waters, E. J. 2001. Quantitative analysis of polymeric procyanidins 5 (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, *49*, 26-31.

Tice R.R. *et al*. 2000. Single Cell GELL/Comet Assay: Guideline for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. Environmental and Molecular Mutagenesis. 35, 206-221.

Wagner H. and Bladt S. 1996. Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas, second edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 384 p.

Weber, H. A. Hodges, A.E.; Guthrie, J. R. O'Brien, B. M. Robaugh, D. Clark, A. P.; Harris, R. K. Algaier, J. W. and Smith, C. S. 2007. Comparison of proanthocyanidines in commercial antioxidants: grape seed and pine bark extracts. *J. Agric. Food Chem*., *55*, 148 - 156.

Zhang W.M., Lin Han B.L. and Zhang H.D. 2009. Antioxidant activities of extracts from Areca (*Areca catectu* L.) flower, husk and seed. EJEAFChe, 8(9), 740-748.

ภาคผนวก

ลำดับที่ | | |

ภาคผนวก ก
แบบสำรวจความพึงพอใจเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) จัดทำแบบสำรวจชุดนี้ขึ้นเพื่อศึกษาความพึงพอใจเกี่ยวกับเครื่องดื่มจากผักเชียงดา เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบในการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากผักเชียงดาที่ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค จึงใคร่ขอความร่วมมือจากท่านในการตอบแบบสอบถาม ซึ่งข้อมูลที่ได้รับจะไม่มีการนำไปเปิดเผยเป็นรายองค์กรแต่จะนำไปวิเคราะห์ในภาพรวม ในการนี้ทางสถาบันฯ ขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ โอกาสนี้

<u>ส่วนที่1</u> รายละเอียดของผู้ตอบแบบสอบถาม

1. เพศ

(1) ชาย (2) หญิง

2. อายุ (1) 15-25 ปี (2) 26-35 ปี
(3) 36-45 ปี (4) 45 ปีขึ้นไป

3. อาชีพ (1) นักเรียน/นักศึกษา (2) พนักงานเอกชน
(3) รับราชการ/รัฐวิสาหกิจ (4) ธุรกิจส่วนตัว
(5) แม่บ้าน (6) อื่น ๆ (โปรดระบุ).....

4 การศึกษา (1) ต่ำกว่ามัธยมศึกษา (2) มัธยมศึกษา (3) ปวช./ปวส
(4) ปริญญาตรี (5) ปริญญาโท (6) ปริญญาเอก

5. รายได้ (1) ต่ำกว่า 10,000 บาท (2) 10,000 - 15,000 บาท
(3) 15,000 - 20,000 บาท (4) 20,000 - 25,000 บาท
(5) มากกว่า 25,000 บาท

<u>ส่วนที่ 2</u> การทดสอบความพึงพอใจต่อเครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดาและผักหวานบ้าน

กรุณากาเครื่องหมาย ✓ ลงบนช่องที่ท่านมีความคิดเห็นต่อข้อนั้นๆก่อนและหลังทดลองเครื่องดื่ม

(ระดับคะแนน 5= ชอบมากที่สุด,4=ชอบมาก,3=ชอบปานกลาง,2=ชอบน้อย,1=ชอบน้อยที่สุด)

2.1 <u>เครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดารสธรรมชาติ</u>

2.1.1 ความคิดเห็น<u>ก่อนรับประทาน</u>

ความชอบต่อผลิตภัณฑ์	ชอบมากที่สุด	ชอบมาก	ชอบปานกลาง	ชอบน้อย	ชอบน้อยที่สุด
สี	5	4	3	2	1
กลิ่น	5	4	3	2	1
การยอมรับโดยรวม	5	4	3	2	1

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม(ก่อนรับประทาน)

.....

.....

2.1.2 ความคิดเห็น<u>หลังรับประทาน</u>

ความชอบต่อผลิตภัณฑ์	ชอบมากที่สุด	ชอบมาก	ชอบปานกลาง	ชอบน้อย	ชอบน้อยที่สุด
กลิ่น	5	4	3	2	1
รสชาติ	5	4	3	2	1
การยอมรับในความขม	5	4	3	2	1
ความยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวม	5	4	3	2	1

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม(หลังรับประทาน)

.....

.....

2.1.3 หากมีเครื่องดื่มจากผักเชียงดาชนิดนี้วางจำหน่ายท่านจะเลือกซื้อ หรือไม่

1. ซื้อ เพราะ (.....) รสชาติถูกใจ
   (.....) ราคาเหมาะสม
   (.....) สรรพคุณต่อสุขภาพที่ได้รับรองจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ
2. ไม่ซื้อ เพราะ (.....) ไม่ถูกใจรสชาติ
   (.....) ราคาแพงเกินไป

(.....) ไม่สนใจในสรรพคุณต่อร่างกาย

3. ไม่แน่ใจ เพราะ.....

2.1.4 หากเครื่องดื่มจากผักเชียงดาชนิดนี้จำหน่ายในราคา 20 บาทในปริมาณ 200-250 กรัม ท่านคิดว่าเหมาะสมหรือไม่

☐ เหมาะสม

☐ ไม่เหมาะสม ❍ แพงเกินไป ราคาที่เหมาะสมควรจะเป็น ..... บาท/ขวด

❍ ถูกเกินไป ราคาที่เหมาะสมควรจะเป็น ..... บาท/ขวด

2.2 เครื่องดื่มสารสกัดจากผักเชียงดารสน้ำผึ้งมะนาว

2.2.1 ความคิดเห็นก่อนรับประทาน

ความชอบต่อผลิตภัณฑ์	ชอบมากที่สุด	ชอบมาก	ชอบปานกลาง	ชอบน้อย	ชอบน้อยที่สุด
สี	5	4	3	2	1
กลิ่น	5	4	3	2	1
การยอมรับโดยรวม	5	4	3	2	1

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม(ก่อนรับประทาน)

.....

.....

2.2.2 ความคิดเห็นหลังรับประทาน

ความชอบต่อผลิตภัณฑ์	ชอบมากที่สุด	ชอบมาก	ชอบปานกลาง	ชอบน้อย	ชอบน้อยที่สุด
กลิ่น	5	4	3	2	1
รสชาติ	5	4	3	2	1
การยอมรับในความขม	5	4	3	2	1
ความยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวม	5	4	3	2	1

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม(หลังรับประทาน)

.....

.....

2.2.3 หากมีเครื่องดื่มจากผักเชียงดาชนิดนี้วางจำหน่ายท่านจะเลือกซื้อ หรือไม่

1. ซื้อ เพราะ (.....) รสชาติถูกใจ
(.....) ราคาเหมาะสม
(.....) สรรพคุณต่อสุขภาพที่ได้รับรองจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ
2. ไม่ซื้อ เพราะ (.....) ไม่ถูกใจรสชาติ
(.....) ราคาแพงเกินไป
(.....) ไม่สนใจในสรรพคุณต่อร่างกาย
3. ไม่แน่ใจ เพราะ.....

2.2.4 หากเครื่องดื่มจากผักเชียงดาชนิดนี้จำหน่ายในราคา 20 บาทในปริมาณ 200-250 กรัม ท่านคิดว่าเหมาะสมหรือไม่

☐ เหมาะสม
☐ ไม่เหมาะสม ❍ แพงเกินไป ราคาที่เหมาะสมควรจะเป็น ..... บาท/ขวด
❍ ถูกเกินไป ราคาที่เหมาะสมควรจะเป็น ..... บาท/ขวด

2.3 <u>เครื่องดื่มสารสกัดจากผักหวานบ้าน</u>

2.3.1 ความคิดเห็นก่อนรับประทาน

ความชอบต่อผลิตภัณฑ์	ชอบมากที่สุด	ชอบมาก	ชอบปานกลาง	ชอบน้อย	ชอบน้อยที่สุด
สี	5	4	3	2	1
กลิ่น	5	4	3	2	1
การยอมรับโดยรวม	5	4	3	2	1

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม(ก่อนรับประทาน)

.....
.....

2.3.2 ความคิดเห็น<u>หลังรับประทาน</u>

ความชอบต่อผลิตภัณฑ์	ชอบมากที่สุด	ชอบมาก	ชอบปานกลาง	ชอบน้อย	ชอบน้อยที่สุด
กลิ่น	5	4	3	2	1
รสชาติ	5	4	3	2	1
การยอมรับในความขม	5	4	3	2	1
ความยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวม	5	4	3	2	1

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม(หลังรับประทาน)

.....

.....

2.3.3 หากมีเครื่องดื่มจากผักเชียงดาชนิดนี้วางจำหน่ายท่านจะเลือกซื้อ หรือไม่

1. ซื้อ เพราะ (.....) รสชาติถูกใจ

(.....) ราคาเหมาะสม

(.....) สรรพคุณต่อสุขภาพที่ได้รับรองจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ

2. ไม่ซื้อ เพราะ (.....) ไม่ถูกใจรสชาติ

(.....) ราคาแพงเกินไป

(.....) ไม่สนใจในสรรพคุณต่อร่างกาย

3. ไม่แน่ใจ เพราะ.....

2.3.4.หากเครื่องดื่มจากผักเชียงดาชนิดนี้จำหน่ายในราคา 20 บาทในปริมาณ 200-250 กรัม ท่านคิดว่าเหมาะสมหรือไม่

☐ เหมาะสม

☐ ไม่เหมาะสม ❍ แพงเกินไป ราคาที่เหมาะสมควรจะเป็น ..... บาท/ขวด

❍ ถูกเกินไป ราคาที่เหมาะสมควรจะเป็น ..... บาท/ขวด

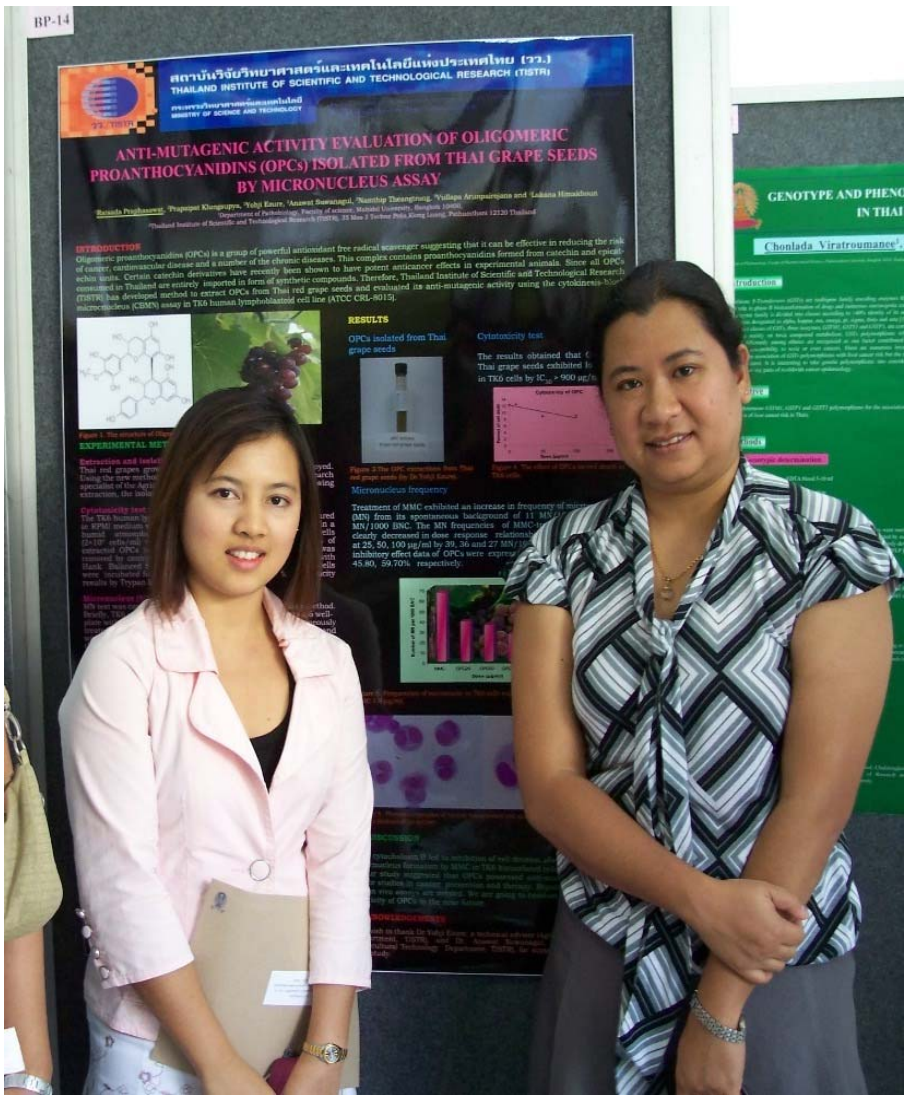
ขอขอบคุณในที่สละเวลาในการตอบแบบสอบถาม

ภาคผนวก ข

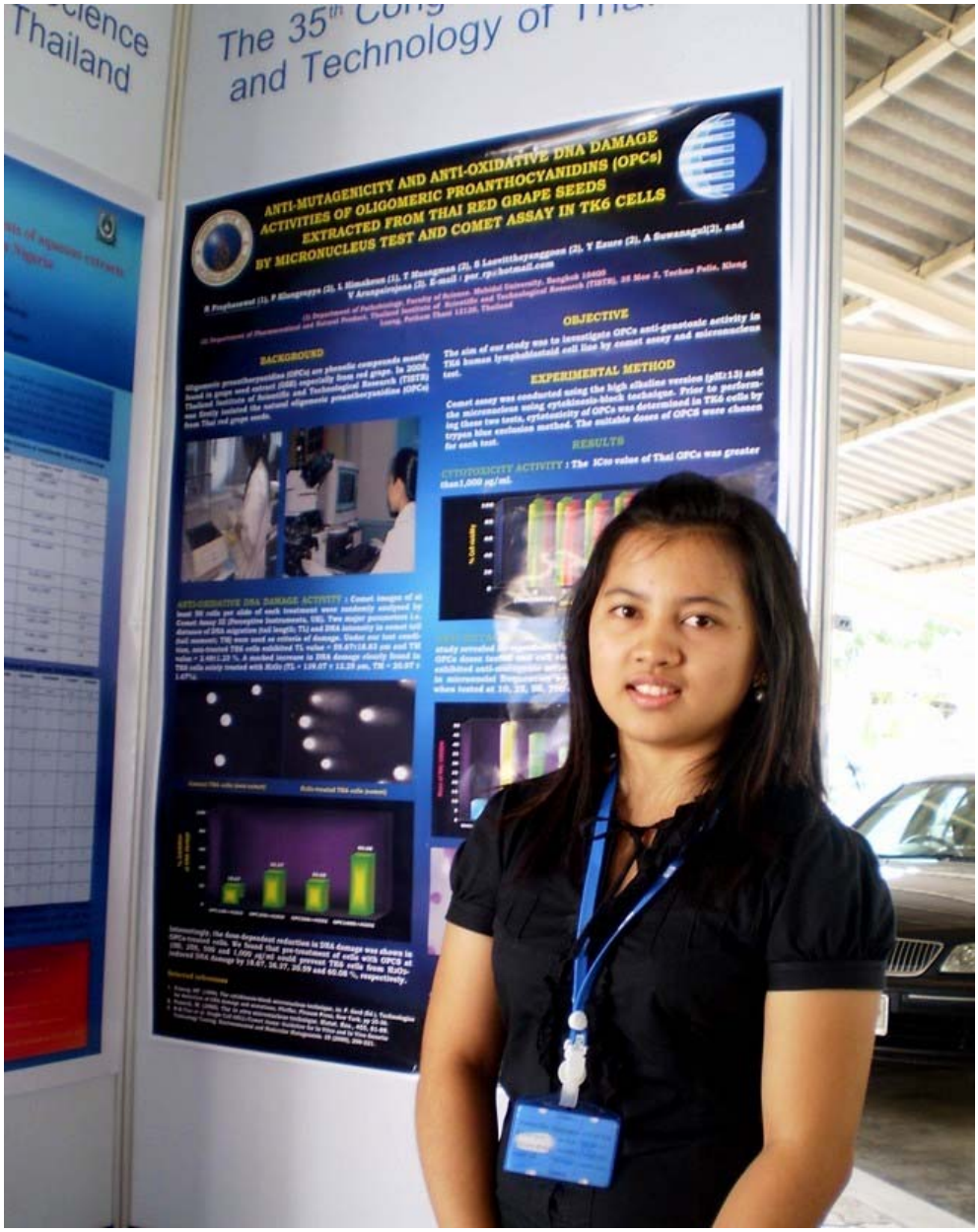
การแสดงผลงานวิจัยโครงการในการประชุมวิชาการ

1. เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ

1.1 Ratsada Prapasawat, Prapaipat Klungsupya, Yohji Ezure, Anawat Suwanagul, Namthip Theangtrong, Lakana Himakhoun and Vullapa Arunpairojana. **ANTI-MUTAGENIC ACTIVITY OF OLIGOMERIC PROANTHOCYANIDINES (OPCS) ISOLATED FROM THAI RED GRAPE SEEDS BY MICRONUCLEUS ASSAY**. Thai J.Phar.Sci 32 (Suppl.) 2008 (p.81)

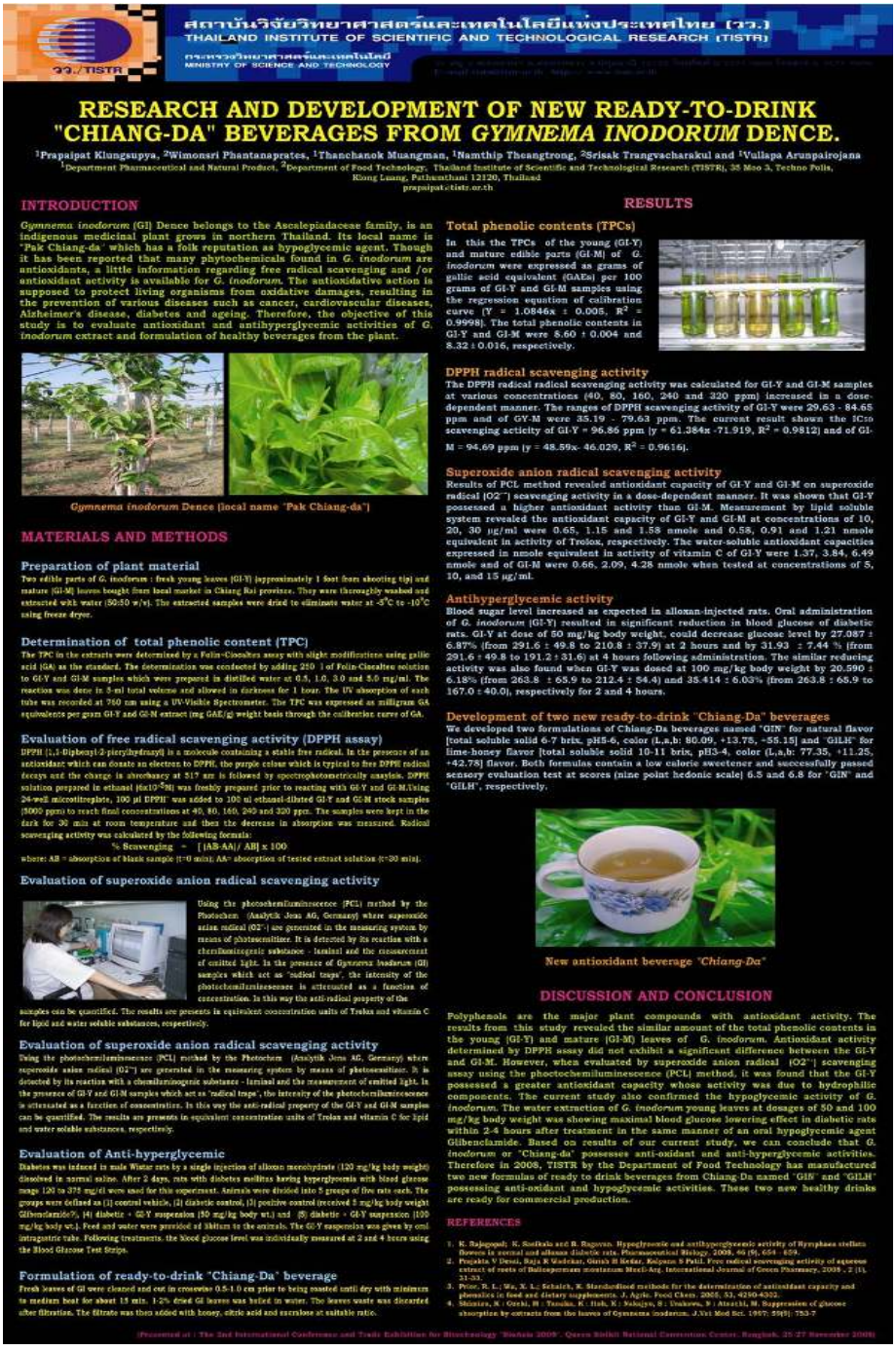


1.2 R. Praphasawat, P. Klungsupya, Sarunya Laovitthayanggoon, Yohji Ezure, Anawat Suwanagul, Lakana himakhoun and Vullapa Arunpairojana. **ANTI-MUTAGENICITY ACTIVITY OF NATURAL OPCs EXTRACTED FROM THAI RED GRAPES IN MMC-TREATED TK6 CELLS BY MICRONUCLEUS ASSAY**. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วทท 35) ครั้งที่ 35 จัดขึ้นโดย กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ณ โรงแรมเดอะบีชรีสอร์ท ที่จังหวัดชลบุรี ระหว่างวันที่ 15-17 ตุลาคม 2552



2. การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (จัดในประเทศ)

2.1 Klungsupya, P, Phantanaprates, W., Muangman, T, Theangtrong, N, Trangvacharakul, S. and Arunpairojana, V. (2008). **RESEARCH AND DEVELOPMENT OF NEW READY-TO-DRINK "CHIANG-DA" BEVERAGE FROM *GYMNEMA INODORUM* DENCE.** The 2nd International Trade Exhibition and Conference for Biotechnology : International of Life Sciences 2008, Bangkok, Thailand ; November 25-27, 2008. (Poster presentation)



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
THAILAND INSTITUTE OF SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH (TISTR)
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
MINISTRY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF NEW READY-TO-DRINK "CHIANG-DA" BEVERAGES FROM *GYMNEMA INODORUM* DENCE.

[1]Prapaipat Klungsupya, [2]Wimonsri Phantanaprates, [1]Thanchanok Muangman, [1]Namthip Theangtrong, [2]Srisak Trangvacharakul and [1]Vullapa Arunpairojana
[1]Department Pharmaceutical and Natural Product, [2]Department of Food Technology, Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), 35 Moo 3, Techno Polis, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand
prapaipat@tistr.or.th

INTRODUCTION

Gymnema inodorum (GI) Dence belongs to the Ascalepiadaceae family, is an indigenous medicinal plant grows in northern Thailand. Its local name is "Pak Chiang-da" which has a folk reputation as hypoglycemic agent. Though it has been reported that many phytochemicals found in *G. inodorum* are antioxidants, a little information regarding free radical scavenging and /or antioxidant activity is available for *G. inodorum*. The antioxidative action is supposed to protect living organisms from oxidative damages, resulting in the prevention of various diseases such as cancer, cardiovascular diseases, Alzheimer's disease, diabetes and ageing. Therefore, the objective of this study is to evaluate antioxidant and antihyperglycemic activities of *G. inodorum* extract and formulation of healthy beverages from the plant.

Gymnema inodorum Dence (local name "Pak Chiang-da")

MATERIALS AND METHODS

Preparation of plant material

Two edible parts of *G. inodorum* : fresh young leaves (GI-Y) (approximately 1 foot from shooting tip) and mature (GI-M) leaves bought from local market in Chiang Rai province. They were thoroughly washed and extracted with water (50:50 w/v). The extracted samples were dried to eliminate water at -5°C to -10°C using freeze dryer.

Determination of total phenolic content (TPC)

The TPC in the extracts were determined by a Folin-Ciocalteu assay with slight modifications using gallic acid (GA) as the standard. The determination was conducted by adding 250 µl of Folin-Ciocalteu solution to GI-Y and GI-M samples which were prepared in distilled water at 0.5, 1.0, 3.0 and 5.0 mg/ml. The reaction was done in 5-ml total volume and allowed in darkness for 1 hour. The UV absorption of each tube was recorded at 760 nm using a UV-Visible Spectrometer. The TPC was expressed as milligram GA equivalents per gram GI-Y and GI-M extract (mg GAE/g) weight basis through the calibration curve of GA.

Evaluation of free radical scavenging activity (DPPH assay)

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) is a molecule containing a stable free radical. In the presence of an antioxidant which can donate an electron to DPPH, the purple colour which is typical to free DPPH radical decays and the change is stoichiometry at 517 nm is followed by spectrophotometrically analysis. DPPH solution prepared in ethanol ($6x10^{-5}$M) was freshly prepared prior to reacting with GI-Y and GI-M.Using 24-well microtitreplate, 100 µl DPPH˙ was added to 100 ul ethanol-diluted GI-Y and GI-M stock samples (5000 ppm) to reach final concentrations at 40, 80, 160, 240 and 320 ppm. The samples were kept in the dark for 30 min at room temperature and then the decrease in absorption was measured. Radical scavenging activity was calculated by the following formula:

% Scavenging = [(AB-AA)/ AB] x 100

where: AB = absorption of blank sample (t=0 min); AA= absorption of tested extract solution (t=30 min).

Evaluation of superoxide anion radical scavenging activity

Using the photochemiluminescence (PCL) method by the Photochem (Analytik Jena AG, Germany) where superoxide anion radical ($O2^{\cdot-}$) are generated in the measuring system by means of photosensitizer. It is detected by its reaction with a chemiluminogenic substance - luminol and the measurement of emitted light. In the presence of GI-Y and GI-M samples which act as 'radical traps', the intensity of the photochemiluminescence is attenuated as a function of concentration. In this way the anti-radical property of the samples can be quantified. The results are presents in equivalent concentration units of Trolox and vitamin C for lipid and water soluble substances, respectively.

Evaluation of superoxide anion radical scavenging activity

Using the photochemiluminescence (PCL) method by the Photochem (Analytik Jena AG, Germany) where superoxide anion radical ($O2^{\cdot-}$) are generated in the measuring system by means of photosensitizer. It is detected by its reaction with a chemiluminogenic substance - luminol and the measurement of emitted light. In the presence of GI-Y and GI-M samples which act as 'radical traps', the intensity of the photochemiluminescence is attenuated as a function of concentration. In this way the anti-radical property of the GI-Y and GI-M samples can be quantified. The results are presents in equivalent concentration units of Trolox and vitamin C for lipid and water soluble substances, respectively.

Evaluation of Anti-hyperglycemic

Diabetes was induced in male Wistar rats by a single injection of alloxan monohydrate (120 mg/kg body weight) dissolved in normal saline. After 2 days, rats with diabetes mellitus having hyperglycemia with blood glucose range 120 to 375 mg/dl were used for this experiment. Animals were divided into 5 groups of five rats each. The groups were defined as [1] control vehicle, [2] diabetic control, [3] positive control received 5 mg/kg body weight Glibenclamide?, [4] diabetic + GI-Y suspension [50 mg/kg body wt.) and [5] diabetic + GI-Y suspension [100 mg/kg body wt.]. Food and water were provided ad libitum to the animals. The GI-Y suspension was given by oral intragastric tube. Following treatments, the blood glucose level was individually measured at 2 and 4 hours using the Blood Glucose Test Strips.

Formulation of ready-to-drink "Chiang-Da" beverage

Fresh leaves of GI were cleaned and cut in crosswise 0.5-1.0 cm prior to being roasted until dry with minimum to medium heat for about 15 min. 1-2% dried GI leaves was boiled in water. The leaves waste was discarded after filtration. The filtrate was then added with honey, citric acid and sucralose at suitable ratio.

RESULTS

Total phenolic contents (TPCs)

In this the TPCs of the young (GI-Y) and mature edible parts (GI-M) of *G. inodorum* were expressed as grams of gallic acid equivalent (GAEs) per 100 grams of GI-Y and GI-M samples using the regression equation of calibration curve (Y = 1.0846x ± 0.005, R^2 = 0.9998). The total phenolic contents in GI-Y and GI-M were 8.60 ± 0.004 and 8.32 ± 0.016, respectively.

DPPH radical scavenging activity

The DPPH radical radical scavenging activity was calculated for GI-Y and GI-M samples at various concentrations (40, 80, 160, 240 and 320 ppm) increased in a dose-dependent manner. The ranges of DPPH scavenging activity of GI-Y were 29.63 - 84.65 ppm and of GY-M were 35.19 - 79.63 ppm. The current result shown the IC_{50} scavenging acticity of GI-Y = 96.86 ppm (y = 61.384x -71.919, R^2 = 0.9812) and of GI-M = 94.69 ppm (y = 48.59x- 46.029, R^2 = 0.9616).

Superoxide anion radical scavenging activity

Results of PCL method revealed antioxidant capacity of GI-Y and GI-M on superoxide radical ($O2^{\cdot-}$) scavenging activity in a dose-dependent manner. It was shown that GI-Y possessed a higher antioxidant activity than GI-M. Measurement by lipid soluble system revealed the antioxidant capacity of GI-Y and GI-M at concentrations of 10, 20, 30 µg/ml were 0.65, 1.15 and 1.58 nmole and 0.58, 0.91 and 1.21 nmole equivalent in activity of Trolox, respectively. The water-soluble antioxidant capacities expressed in nmole equivalent in activity of vitamin C of GI-Y were 1.37, 3.84, 6.49 nmole and of GI-M were 0.66, 2.09, 4.28 nmole when tested at concentrations of 5, 10, and 15 µg/ml.

Antihyperglycemic activity

Blood sugar level increased as expected in alloxan-injected rats. Oral administration of *G. inodorum* (GI-Y) resulted in significant reduction in blood glucose of diabetic rats. GI-Y at dose of 50 mg/kg body weight, could decrease glucose level by 27.087 ± 6.87% (from 291.6 ± 49.8 to 210.8 ± 37.9) at 2 hours and by 31.93 ± 7.44 % (from 291.6 ± 49.8 to 191.2 ± 31.6) at 4 hours following administration. The similar reducing activity was also found when GI-Y was dosed at 100 mg/kg body weight by 20.590 ± 6.18% (from 263.8 ± 65.9 to 212.4 ± 84.4) and 35.414 ± 6.03% (from 263.8 ± 65.9 to 167.0 ± 40.0), respectively for 2 and 4 hours.

Development of two new ready-to-drink "Chiang-Da" beverages

We developed two formulations of Chiang-Da beverages named "GIN" for natural flavor [total soluble solid 6-7 brix, pH5-6, color (L,a,b: 80.09, +13.75, -55.15] and "GILH" for lime-honey flavor [total soluble solid 10-11 brix, pH3-4, color (L,a,b: 77.35, +11.25, +42.78] flavor. Both formulas contain a low calorie sweetener and successfully passed sensory evaluation test at scores (nine point hedonic scale) 6.5 and 6.8 for "GIN" and "GILH", respectively.

New antioxidant beverage "*Chiang-Da*"

DISCUSSION AND CONCLUSION

Polyphenols are the major plant compounds with antioxidant activity. The results from this study revealed the similar amount of the total phenolic contents in the young (GI-Y) and mature (GI-M) leaves of *G. inodorum*. Antioxidant activity determined by DPPH assay did not exhibit a significant difference between the GI-Y and GI-M. However, when evaluated by superoxide anion radical ($O2^{\cdot-}$) scavenging assay using the photochemiluminescence (PCL) method, it was found that the GI-Y possessed a greater antioxidant capacity whose activity was due to hydrophilic components. The current study also confirmed the hypoglycemic activity of *G. inodorum*. The water extraction of *G. inodorum* young leaves at dosages of 50 and 100 mg/kg body weight was showing maximal blood glucose lowering effect in diabetic rats within 2-4 hours after treatment in the same manner of an oral hypoglycemic agent Glibenclamide. Based on results of our current study, we can conclude that *G. inodorum* or "Chiang-da" possesses anti-oxidant and anti-hyperglycemic activities. Therefore in 2008, TISTR by the Department of Food Technology has manufactured two new formulas of ready to drink beverages from Chiang-Da named "GIN" and "GILH" possessing anti-oxidant and hypoglycemic activities. These two new healthy drinks are ready for commercial production.

REFERENCES

1. K. Rajagopal; K. Sankala and B. Rageeni. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of Nyctanthes stellata flowers in normal and alloxan diabetic rats. Pharmaceutical Biology. 2008, 46 (9), 654 - 659.
2. Prajakta V Dessi, Raja R Wadekar, Girish H Kelkar, Kalpana S Patil. Free radical scavenging activity of aqueous extract of roots of Baliospermum montanum Muell-Arg. International Journal of Green Pharmacy. 2008 , 2 (1), 31-33.
3. Price, K. L.; Wu, X. L.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 4290-4302.
4. Shimizu, K ; Ozeki, M ; Tanaka, K ; Hsh, K ; Nakajyo, S ; Ueakawa, N ; Atsuchi, M. Suppression of glucose absorption by extracts from the leaves of Gymnema inodorum. J.Vet Med Sci. 1997; 59(9): 753-7

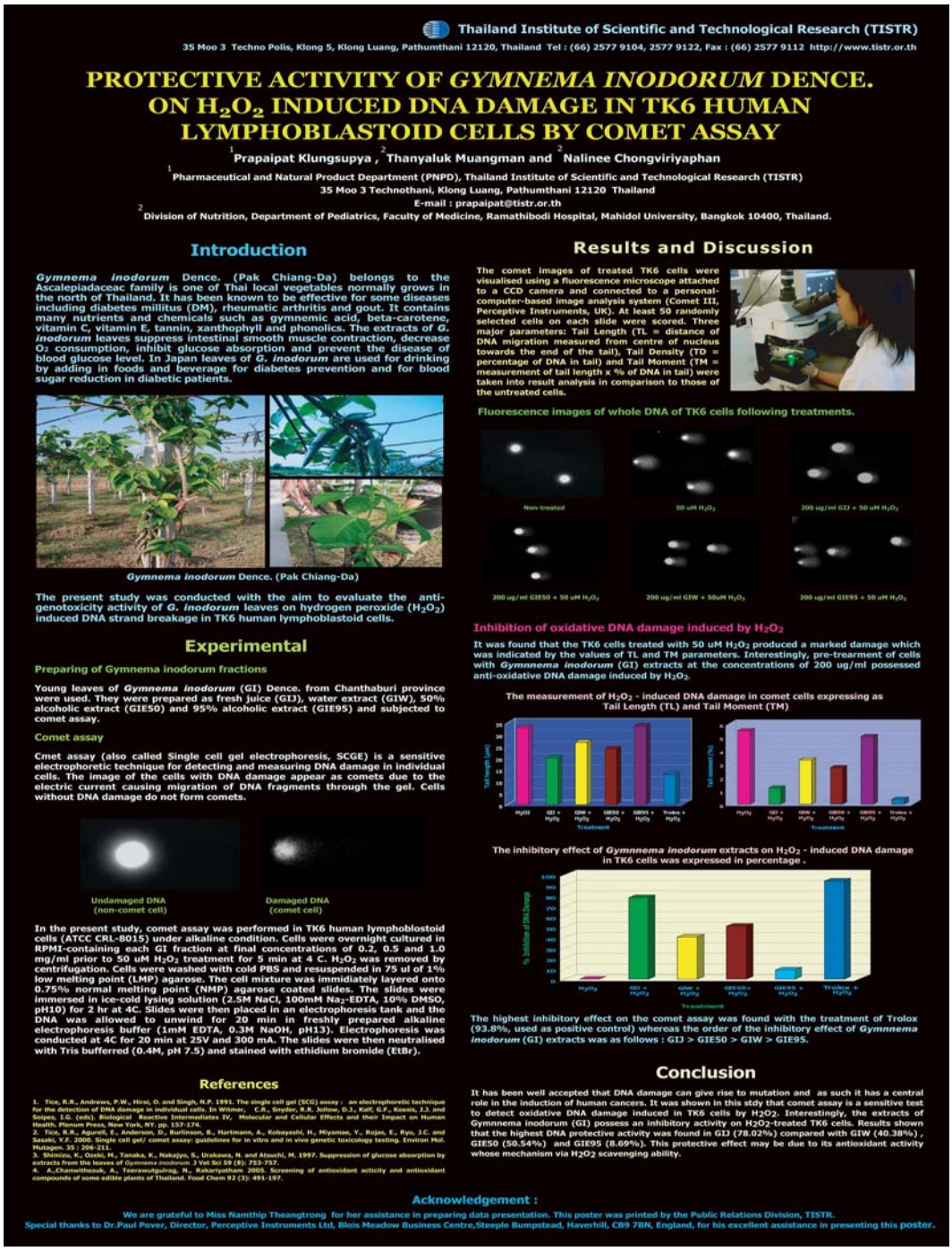
(Presented at : The 2nd International Conference and Trade Exhibition for Biotechnology "Biotech 2008". Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, 25-27 November 2008)

2.2 Klungsupya, P, Muangman, T, Theangtrong, N, Phatvej, W, Khayungarnnawee, A, Thisayakorn, K, Rerk-Am, U, Sematong, T, Trangvacharakul, S and Arunpairojana, V. (2009). **ANTIOXIDANT AND ANTIHYPERGLYCEMIC ACTIVITIES OF *GYMNEMA INODORUM* DENCE.** The 8th Joint Seminar "Innovative Research in Natural Products for Sustainable Development"; NRCT-JSPS Core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Sciences. January 3 – 4, 2009 Bangkok, Thailand. (Poster presentation)

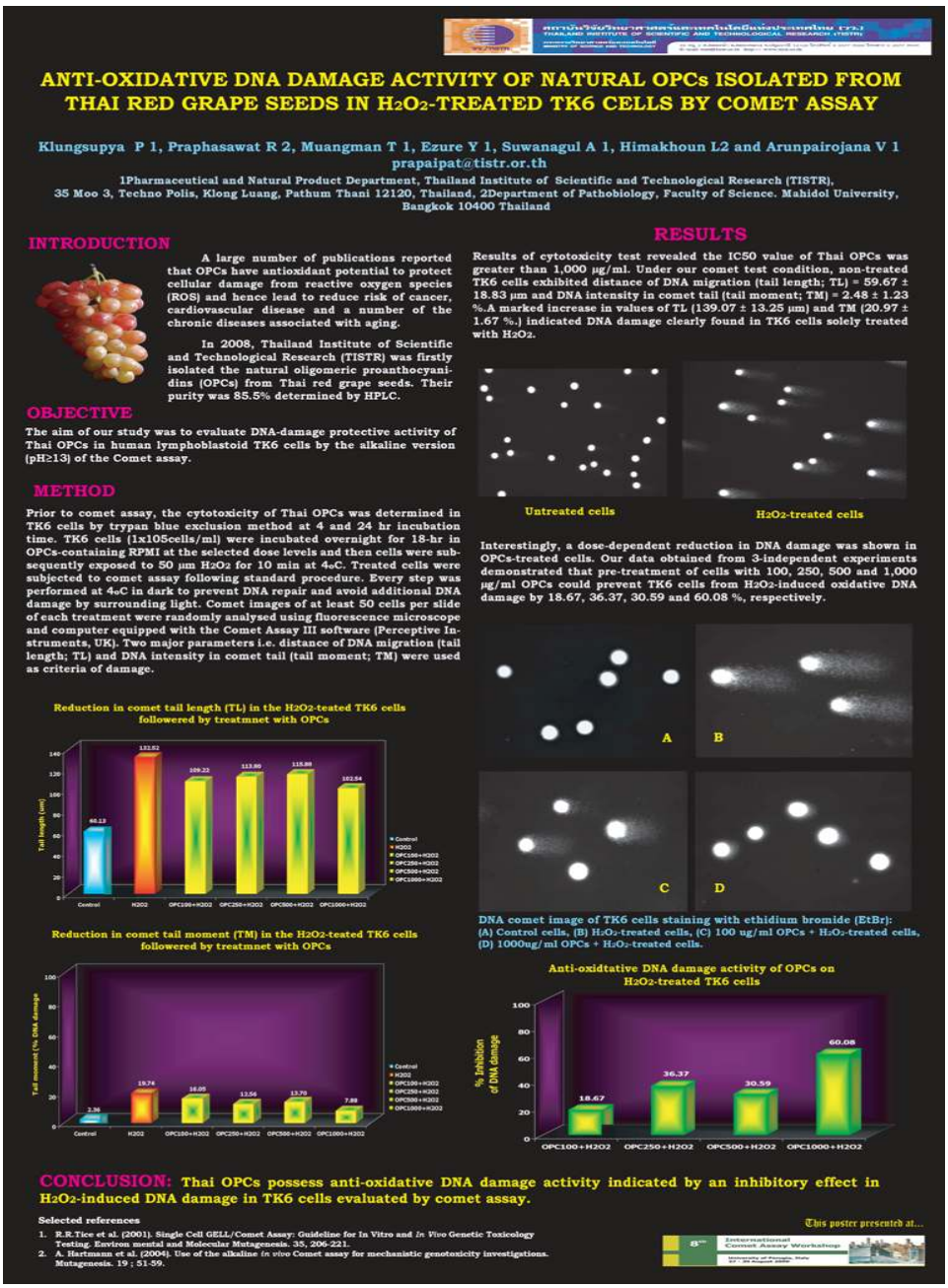
2.3 Muangman, T, Theangtrong, N, Klungsupya, P, Phatvej, W, Khayungarnnawee, A, Thisayakorn, K, Sematong, T, Trangvacharakul S, and Arunpairojana, V. (2009). **ANTI-HYPERGLYCEMIC ACTIVITY OF *SAUPORUS ANDROGYNUS* LEAVES EXTRACT ON ALLOXAN-INDUCED DIABETIC RATS.** The 8th Joint Seminar "Innovative Research in Natural Products for Sustainable Development"; NRCT-JSPS Core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Sciences. January 3 – 4, 2009 Bangkok, Thailand. (Poster presentation)

3. การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (จัดในต่างประเทศ)

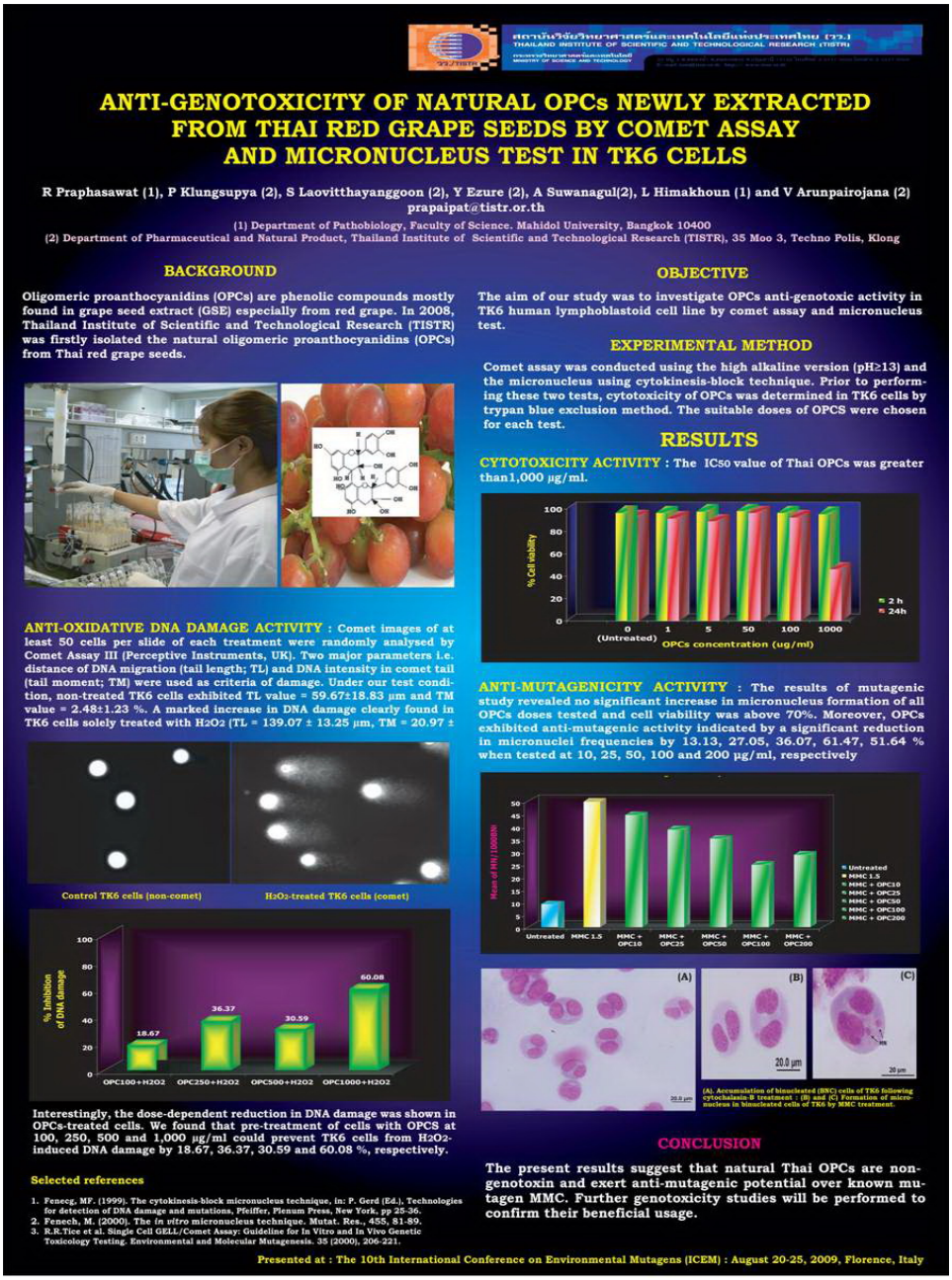
3.1 Klungsupya, P, Muangman, T., and Chongviriyaphan, N. (2007). **PROTECTIVE ACTIVITY OF *GYMNEMA INODORUM* DENCE ON H_2O_2-INDUCED DNA DAMAGE IN TK6 HUMAN LYMPHOBLASTOID CELLS BY COMET ASSAY.** VII International Comet Assay Workshop. June 24-27, 2007. University of Ulster, Coleraine, Northern Ireland. (Poster presentation)



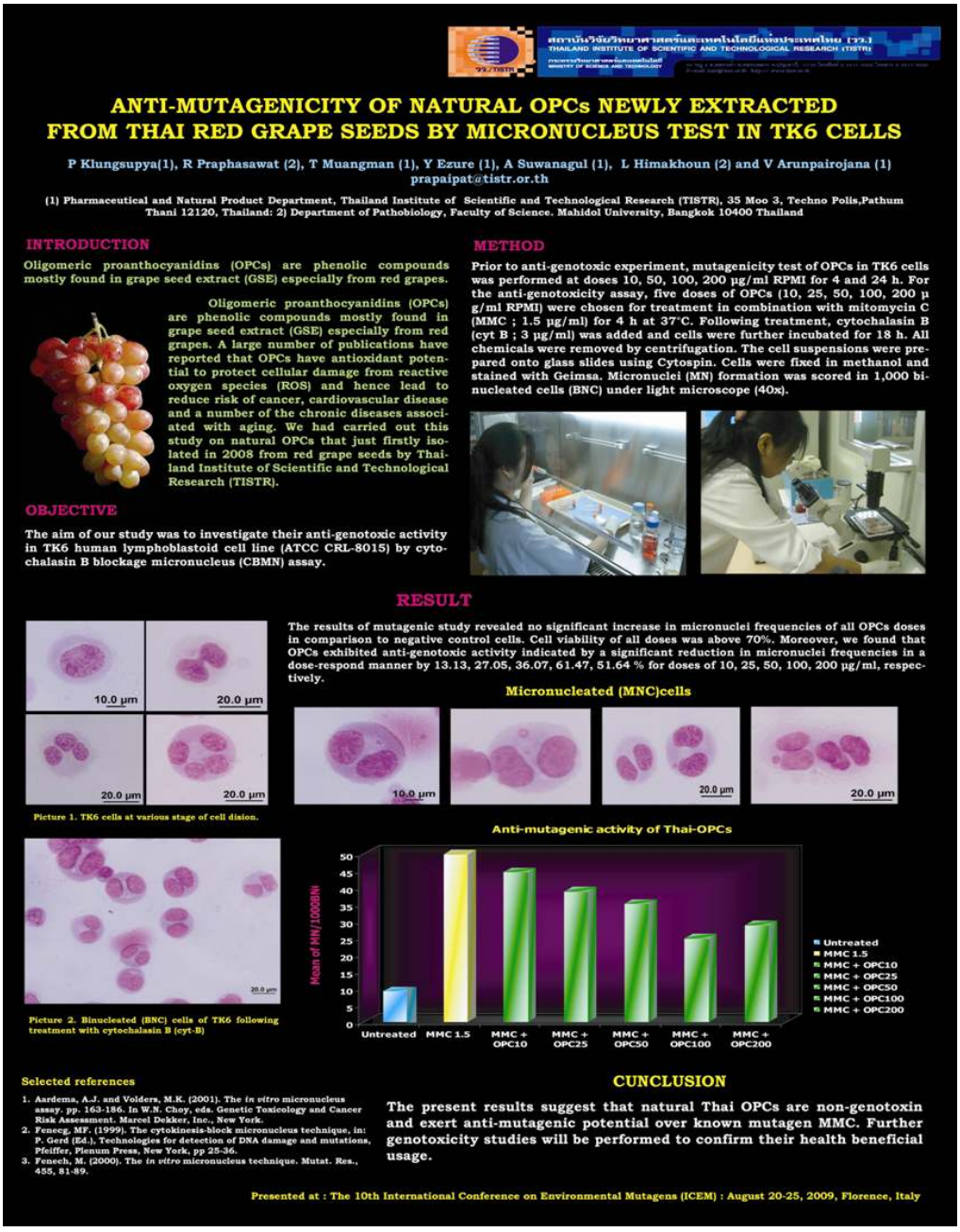
3.2 Klungsupya P, Praphasawat R, Muangman T, Ezure Y, Suwanagul A, Himakhoun L and Arunpairojana V. **ANTI-OXIDATIVE DNA DAMAGE ACTIVITY OF NATURAL OPCs ISOLATED FROM THAI RED GRAPE SEEDS IN H_2O_2-TREATED TK6 CELLS BY COMET ASSAY.** 8th International Comet Assay Workshop (ICAW). 27-30 August 2009, Perugia, Italy. (Poster presentation)



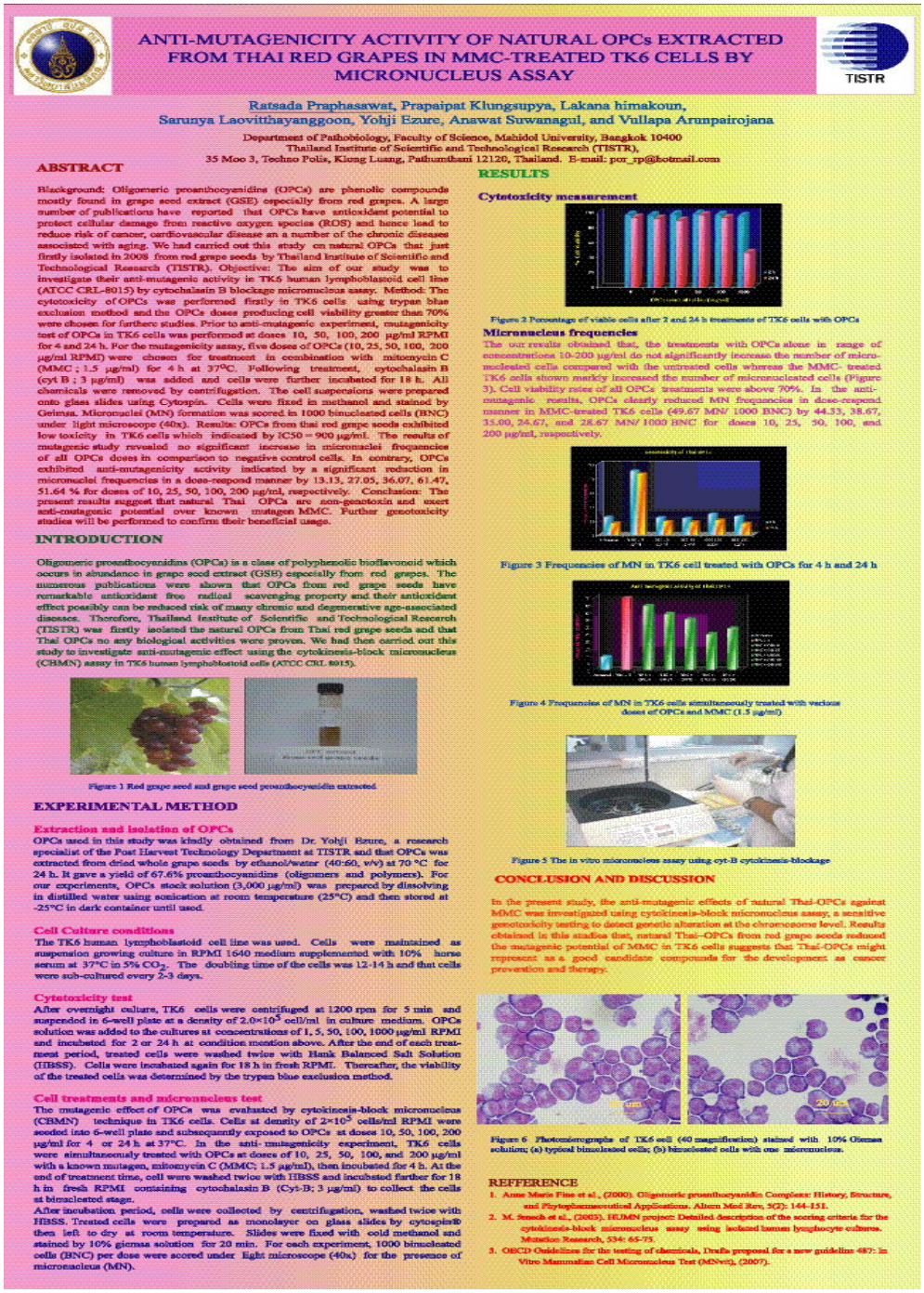
3.3 R Praphasawat, P Klungsupya, T Muangman, Y Ezure, A Suwanagul, L Himakhoun and V Arunpairojana. **ANTI-GENOTOXICITY OF NATURAL OPCs NEWLY EXTRACTED FROM THAI RED GRAPE SEEDS BY COMET ASSAY AND MICRONUCLEUS TEST IN TK6 CELLS.** 10th INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL MUTAGEN (ICEM). 20-25 August 2009, Florence, Italy. (Poster presentation)



3.4 P Klungsupya, R Praphasawat, S Laovitthayangoon, Y Ezure, A Suwanagul, L Himakhoun and V Arunpairojana. **ANTI-MUTAGENICITY OF NATURAL OPCs NEWLY EXTRACTED FROM THAI RED GRAPE SEEDS BY COMET ASSAY AND MICRONUCLEUS TEST IN TK6 CELLS**. 10th INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL MUTAGEN (ICEM). 20-25 August 2009, Florence, Italy (Poster presentation)



3.5 R Praphasawat, P Klungsupya, S Laovitthayanggoon, Y Ezure,A Suwanagul, L Himakhoun And V Arunpairojana. **ANTI-MUTAGENICITY ACTIVITY OF NATURAL OPCs EXTRACTED FROM THAI RED GRAPES IN MMC-TREATED TK6 CELLS BY MICRONUCLEUS ASSAY. The 5th International Congress of Asian Society of Toxicology. Taipei, Taiwan. Sep. 10-13, 2009.** (Poster presentation)



ANTI-MUTAGENICITY ACTIVITY OF NATURAL OPCs EXTRACTED FROM THAI RED GRAPES IN MMC-TREATED TK6 CELLS BY MICRONUCLEUS ASSAY

TISTR

Ratsada Praphasawat, Prapaipat Klungsupya, Lakana himakoun, Sarunya Laovitthayanggoon, Yohji Ezure, Anawat Suwanagul, and Vullapa Arunpairojana

Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400
Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR),
35 Moo 3, Techno Polis, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand. E-mail: por_rp@hotmail.com

ABSTRACT

Background: Oligomeric proanthocyanidins (OPCs) are phenolic compounds mostly found in grape seed extract (GSE) especially from red grapes. A large number of publications have reported that OPCs have antioxidant potential to protect cellular damage from reactive oxygen species (ROS) and hence lead to reduce risk of cancer, cardiovascular disease an a number of the chronic diseases associated with aging. We had carried out this study on natural OPCs that just firstly isolated in 2008 from red grape seeds by Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). Objective: The aim of our study was to investigate their anti-mutagenic activity in TK6 human lymphoblastoid cell line (ATCC CRL-8015) by cytochalasin B blockage micronucleus assay. Method: The cytotoxicity of OPCs was performed firstly in TK6 cells using trypan blue exclusion method and the OPCs doses producing cell viability greater than 70% were chosen for furthere studies. Prior to anti-mutagenic experiment, mutagenicity test of OPCs in TK6 cells was performed at doses 10, 50, 100, 200 µg/ml RPMI for 4 and 24 h. For the mutagenicity assay, five doses of OPCs (10, 25, 50, 100, 200 µg/ml RPMI) were chosen for treatment in combination with mitomycin C (MMC ; 1.5 µg/ml) for 4 h at 37°C. Following treatment, cytochalasin B (cyt B ; 3 µg/ml) was added and cells were further incubated for 18 h. All chemicals were removed by centrifugation. The cell suspensions were prepared onto glass slides using Cytospin. Cells were fixed in methanol and stained by Geimsa. Micronuclei (MN) formation was scored in 1000 binucleated cells (BNC) under light microscope (40x). Results: OPCs from thai red grape seeds exhibited low toxicity in TK6 cells which indicated by IC50 = 900 µg/ml. The results of mutagenic study revealed no significant increase in micronuclei frequencies of all OPCs doses in comparison to negative control cells. In contrary, OPCs exhibited anti-mutagenicity activity indicated by a significant reduction in micronuclei frequencies in a dose-respond manner by 13.13, 27.05, 36.07, 61.47, 51.64 % for doses of 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml, respectively. Conclusion: The present results suggest that natural Thai OPCs are non-genotoxin and exert anti-mutagenic potential over known mutagen MMC. Further genotoxicity studies will be performed to confirm their beneficial usage.

INTRODUCTION

Oligomeric proanthocyanidins (OPCs) is a class of polyphenolic bioflavonoid which occurs in abundance in grape seed extract (GSE) especially from red grapes. The numerous publications were shown that OPCs from red grape seeds have remarkable antioxidant free radical scavenging property and their antioxidant effect possibly can be reduced risk of many chronic and degenerative age-associated diseases. Therefore, Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) was firstly isolated the natural OPCs from Thai red grape seeds and that Thai OPCs no any biological activities were proven. We had then carried out this study to investigate anti-mutagenic effect using the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in TK6 human lymphoblastoid cells (ATCC CRL-8015).

Figure 1 Red grape seed and grape seed proanthocyanidin extracted

EXPERIMENTAL METHOD

Extraction and isolation of OPCs

OPCs used in this study was kindly obtained from Dr. Yohji Ezure, a research specialist of the Post Harvest Technology Department at TISTR and that OPCs was extracted from dried whole grape seeds by ethanol/water (40:60, v/v) at 70 °C for 24 h. It gave a yield of 67.6% proanthocyanidins (oligomers and polymers). For our experiments, OPCs stock solution (3,000 µg/ml) was prepared by dissolving in distilled water using sonication at room temperature (25°C) and then stored at -25°C in dark container until used.

Cell Culture conditions

The TK6 human lymphoblastoid cell line was used. Cells were maintained as suspension growing culture in RPMI 1640 medium supplemented with 10% horse serum at 37°C in 5% CO_2. The doubling time of the cells was 12-14 h and that cells were sub-cultured every 2-3 days.

Cytotoxicity test

After overnight culture, TK6 cells were centrifuged at 1200 rpm for 5 min and suspended in 6-well plate at a density of 2.0×10^5 cell/ml in culture medium. OPCs solution was added to the cultures at concentrations of 1, 5, 50, 100, 1000 µg/ml RPMI and incubated for 2 or 24 h at condition mention above. After the end of each treatment period, treated cells were washed twice with Hank Balanced Salt Solution (HBSS). Cells were incubated again for 18 h in fresh RPMI. Thereafter, the viability of the treated cells was determined by the trypan blue exclusion method.

Cell treatments and micronucleus test

The mutagenic effect of OPCs was evaluated by cytokinesis-block micronucleus (CBMN) technique in TK6 cells. Cells at density of 2×10^5 cells/ml RPMI were seeded into 6-well plate and subsequently exposed to OPCs at doses 10, 50, 100, 200 µg/ml for 4 or 24 h at 37°C. In the anti- mutagenicity experiment, TK6 cells were simultaneously treated with OPCs at doses of 10, 25, 50, 100, and 200 µg/ml with a known mutagen, mitomycin C (MMC; 1.5 µg/ml), then incubated for 4 h. At the end of treatment time, cell were washed twice with HBSS and incubated further for 18 h in fresh RPMI containing cytochalasin B (Cyt-B: 3 µg/ml) to collect the cells at binucleated stage.
After incubation period, cells were collected by centrifugation, washed twice with HBSS. Treated cells were prepared as monolayer on glass slides by cytospin® then left to dry at room temperature. Slides were fixed with cold methanol and stained by 10% giemsa solution for 20 min. For each experiment, 1000 binucleated cells (BNC) per dose were scored under light microscope (40x) for the presence of micronucleus (MN).

RESULTS

Cytotoxicity measurement

Figure 2 Percentage of viable cells after 2 and 24 h treatments of TK6 cells with OPCs

Micronucleus frequencies

The our results obtained that, the treatments with OPCs alone in range of concentrations 10-200 µg/ml do not significantly increase the number of micronucleated cells compared with the untreated cells whereas the MMC- treated TK6 cells shown markly increased the number of micronucleated cells (Figure 3). Cell viability rates of all OPCs treatments were above 70%. In the anti-mutagenic results, OPCs clearly reduced MN frequencies in dose-respond manner in MMC-treated TK6 cells (49.67 MN/ 1000 BNC) by 44.33, 38.67, 35.00, 24.67, and 28.67 MN/ 1000 BNC for doses 10, 25, 50, 100, and 200 µg/ml, respectively.

Figure 3 Frequencies of MN in TK6 cell treated with OPCs for 4 h and 24 h

Figure 4 Frequencies of MN in TK6 cells simultaneously treated with various doses of OPCs and MMC (1.5 µg/ml)

Figure 5 The in vitro micronucleus assay using cyt-B cytokinesis-blockage

CONCLUSION AND DISCUSSION

In the present study, the anti-mutagenic effects of natural Thai-OPCs against MMC was investigated using cytokinesis-block micronucleus assay, a sensitive genotoxicity testing to detect genetic alteration at the chromosome level. Results obtained in this studies that, natural Thai-OPCs from red grape seeds reduced the mutagenic potential of MMC in TK6 cells suggests that Thai-OPCs might represent as a good candidate compounds for the development as cancer prevention and therapy.

Figure 6 Photomicrographs of TK6 cell (40 magnification) stained with 10% Giemsa solution; (a) typical binucleated cells; (b) binucleated cells with one micronucleus.

REFFERENCE

1. Anne Marie Fine et al., (2000). Oligomeric proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications. Altern Med Rev, 5(2): 144-151.
2. M. Fenech et al., (2003). HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutation Research, 534: 65-75.
3. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Drafts proposal for a new guideline 487: in Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit), (2007).