ผลของสารฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ และการสะสมพิวรีนในเนื้อไก่

นางสาวอาภรณ์ คิมเข้ม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2561

EFFECT OF FLAVONOID AND HYPOXANTHINE PHOSPHO-RIBOSYL TRANSFERASE ENZYME ON GROWTH PERFORMANCE, MEAT QUALITY AND PURINE ACCUMULATION IN CHICKEN MEAT

Arporn Khimkem

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2018

ผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ และการสะสมพิวรีนในเนื้อไก่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผศ. นสพ. ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์)
ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.สุทิศา เข็มผะกา)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร.วิทธวัช โมฬี)
กรรมการ

(รศ. ดร.อมรรัตน์ โมฬี)
กรรมการ

(ศ. ดร.สันติ แม้นศิริ)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและพัฒนาความเป็นสากล

(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อาภรณ์ คิมเข้ม : ผลของสารฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ และการสะสมพิวรีนในเนื้อไก่ (EFFECT OF FLAVONOID AND HYPOXANTHINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE ENZYME ON GROWTH PERFORMANCE, MEAT QUALITY AND PURINE ACCUMULATION IN CHICKEN MEAT) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิศา เข็มผะกา, 93 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ของหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวัน รวมถึงศึกษาผลของสารออกฤทธิ์ฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส (HPRT) ในอาหารไก่โคราช ต่อการย่อยได้และการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การต้านอนุมูลอิสระ สมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพซาก คุณภาพเนื้อ การสะสมพิวรีนและอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อไก่

การทดลองที่ 1 ศึกษาสารออกฤทธิ์ในหญ้าขัดมอญและแก่นตะวัน โดยพบว่าหญ้าขัดมอญใบยาวมีสารฟลาโวนอยด์แบบหยาบทั้งหมด 8,930 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เคมเฟอรอล 311 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสและอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% เท่ากับ 464.29 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 13.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนแก่นตะวันมีปริมาณเอนไซม์ HPRT 13.05 mU/กรัม และมีค่าอัตกิริยาการเปลี่ยนสารไฮโพแซนทีนเป็นสารอิโนซินมอนอฟอสเฟสเท่ากับ 17.21 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ชั่วโมง

การทดลองที่ 2 ใช้ไก่โคราชคละเพศ จำนวน 64 ตัว อายุ 21 วัน สุ่มไก่เข้างานทดลอง 8 กลุ่มๆ ละ 8 ซ้ำ เลี้ยงบนกรงขังเดี่ยวเป็นระยะเวลา 10 วัน โดยมีอาหารทดลอง 8 กลุ่ม คือ ทรีทเมนต์ 1: กลุ่มควบคุม ทรีทเมนต์ 2: กลุ่มการเสริมอัลโลพูรินอล 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทรีทเมนต์ 3-5: กลุ่มการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาว 0.28 0.56 และ 1.12% (มีฟลาโวนอยด์ 25 50 และ100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ) ทรีทเมนต์ 6-8: กลุ่มการเสริมแก่นตะวัน 1.5 3.0 และ4.5% (มี HPRT 205 410 และ 615 mU/กิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ) ผลการทดลองพบว่าการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันไม่ส่งผลกระทบต่อการย่อยได้และการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ ($p>0.05$) โดยการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.28% สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และลดความเข้มข้นกรดยูริกและไฮโพแซนทีนในพลาสมา รวมถึงลดการขับออกกรดยูริก และเพิ่มการขับออกแซนทีนและพิวรีนทั้งหมดในมูล นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมแก่นตะวันทุกระดับ (1.5-4.5%) สามารถลดความความเข้มข้นไฮโพแซนทีนในพลาสมาได้

การทดลองที่ 3 ใช้ไก่โคราชคละเพศ จำนวน 400 ตัว ทำการสุ่มไก่ที่อายุ 1 วันเข้างานทดลองโดยแบ่งไก่ออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว โดยพบว่าการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาว

และแก่นตะวันไม่ส่งผลกระทบต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพซาก คุณภาพเนื้อ ค่าสีในเนื้อส่วนนอก หนังส่วนนอก และค่า pH หลังฆ่า นอกจากนี้ยังพบว่าหญ้าขัดมอญใบยาวสามารถเพิ่มฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเนื้อส่วนนอก สามารถลดเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำที่ 24 ชั่วโมงและการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุก ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าสารฟลาโวนอยด์จากหญ้าขัดมอญใบยาวและเอนไซม์ HPRT จากแก่นตะวัน สามารถลดการสะสมไฮโพแซนทีนและพิวรีนทั้งหมดในเนื้อไก่โคราชโดยไม่ส่งผลกระทบต่อสารอิโนซีนโมโนฟอสเฟต โดยการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาว 0.56% และแก่นตะวัน 3.0% เป็นระดับที่เหมาะสมที่สุด ตามลำดับ

โดยสรุป สารฟลาโวนอยด์จากหญ้าขัดมอญใบยาว และเอนไซม์ HPRT จากแก่นตะวันเป็นสารธรรมชาติอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้ผลิตเนื้อไก่ที่มีไฮโพแซนทีนและพิวรีนทั้งหมดต่ำรวมทั้งมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา____________

ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา____________

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม____________

ARPORN KHIMKEM : EFFECT OF FLAVONOID AND HYPOXANTHINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE ENZYME ON GROWTH PERFORMANCE MEAT QUALITY AND PURINE ACCUMULATION IN CHICKEN MEAT. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUTISA KHIMPAKA, Ph.D., 93 PP.

PURINE/HYPOXANTHINE/HYPOXANTHINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE/ XANTHINE OXIDASE/ URIC ACID

This study aimed to investigate the phytochemical properties of *Sida acuta* Burm.f. (SA) and *Jerusalem artichoke* (JA) as well as its dietary supplement effects of flavonoid and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) on nutrient digestibility and retention, antioxidant activity, growth performance, carcass trait, meat quality, purine and purine derivative accumulation in chicken meat.

Experiment 1 was conducted to investigate the phytochemical properties of SA and JA. The result showed that SA contained 8,930 mg/kg of crude flavonoids, 311 mg/kg of keamferol, and half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value for xanthine oxidase and antioxidant activity (DPPH assay) were 464.29 µg/ml and 13.05 µg/ml, respectively. The JA contained 13.05 mU/g of HPRT and the activity of enzyme involved in hypoxanthine conversion into inosine monophosphate (IMP) was 17.21 µM/ml/hour.

Experiment 2, a total of 64 mixed sex 21-day-old Korat chickens were randomly allotted to 8 groups (8 birds each) and placed in individual cages for 10 days. The 8 experimental diets were as follows, T1: control, T2: 25 mg allopurinol/kg diet, T3-T5:

supplemented SA at 0.28, 0.56 and 1.12% (contained flavonoids 25, 50 and 100 mg/kg diet, respectively), T6-T8: supplemented JA at 1.5, 3.0 and 4.5% (205, 410 and 615 mU HPRT/kg diet, respectively). The results revealed that SA and JA did not show negative effects on nutrient digestibility and retention ($p>0.05$). The supplementation of SA at 0.28% can enhance antioxidant and decrease uric acid and hypoxanthine in plasma, as well as, decrease uric acid excretion and increase xanthine and total purine excretion in excreta. In addition, all supplementation levels of JA (1.5-4.5%) can decrease plasma hypoxanthine concentration.

Experiment 3, a total of 400 mixed sex one-day-old Korat chickens were allotted to 5 treatments (composed of different levels of SA and JA) with 4 replicates of 20 chicks each. The results showed that the supplementation of SA with JA had no negative effect on growth performance, carcass trait, meat quality, breast and breast skin color, and pH. In addition, the SA can enhance antioxidant in breast, and decrease percentages of drip loss and cooking loss. It, is interesting to note that the flavonoid from SA and HPRT enzyme from JA can decrease hypoxanthine and total purine accumulation in chicken meat, without showing negative effect on IMP. The optimum supplementation level of SA and JA were 0.56% and 3.0%, respectively.

In conclusion, it is indicated that dietary flavonoid from SA and HPRT enzyme from JA can be used as alternative natural products for producing chicken meat with low hypoxanthine and purine accumulations and enriched with antioxidants.

School of Animal Technology and Innovation	Student's Signature Arporn Khimkem
Academic Year 2018	Advisor's Signature Sutisa Khempaka
	Co-advisor's Signature W. Molee

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิศา เข็มผะกา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ. ดร.วิทธวัช โมพี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และช่วยสนับสนุนงานด้านการทดลองตลอดระยะเวลาการศึกษา รวมทั้งกรุณาให้แนะนำแก้ไข ข้อบกพร่องต่างๆ และช่วยทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบรูณ์ นอกจากนี้ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ ตลอดจนอาจารย์ผู้สอนทุกท่านที่อบรมสั่งสอนและให้ความรู้ทางด้านวิชาที่เป็นประโยชน์จนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนทุนการศึกษาและค่าครองชีพภายใต้โครงการทุนกิตติบัญฑิตตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตเป็นเวลา 2 ปีการศึกษา (พ.ศ. 2559-2560)

ขอขอบคุณทุนโครงการวิจัยพัฒนาด้านผลิตภัณฑ์สมุนไพรภายใต้โครงการการจัดตั้ง Northeastern Agri-Food Technopolis ที่สนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัยด้านการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาวัตถุดิบผลิตภัณฑ์ และกระบวนการผลิตสมุนไพร

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่งานสัตว์ปีก และเจ้าหน้าที่งานฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการเลี้ยงไก่โคราช ขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ และสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ สำหรับการดำเนินงานวิจัย

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ ที่ให้ความช่วยเหลือระหว่างการดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่านที่คอยให้กำลังใจ ให้การสนันสนุน และช่วยเหลือจนประสบความสำเร็จในการศึกษา

อาภรณ์ คิมเข้ม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) .... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) .... ค
กิตติกรรมประกาศ .... จ
สารบัญ .... ฉ
สารบัญตาราง .... ฎ
สารบัญภาพ .... ฐ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย 3
1.3 สมมุติฐานงานวิจัย 3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย 4

2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสัมพันธ์ของการบริโภคอาหารและการเกิดโรคเกาต์ 5
2.2 ที่มาและกลไกการสังเคราะห์กรดยูริก 8
2.3 โอกาสความเป็นไปได้ในการลดอนุพันธ์พิวรีนและกรดยูริก 10
2.3.1 อัลโลพูรินอล (allopurinol) 10
2.3.1.1 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) และแซนทีนดีไฮโดรจีเนส (xanthine dehydrogenase) โดยยาอัลโลพูรินอล (allopurinol) ในตับและไตของไก่เนื้อ 11
2.3.1.2 ผลการใช้ยาอัลโลพูรินอลต่อปริมาณกรดยูริกในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อ 12
2.3.2 สารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) 12

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.2.1 การศึกษาสารฟลาโวนอยด์ในพืชเขตร้อนชนิดต่างๆ.......................12
2.3.2.2 การศึกษาสารฟลาโวนอยด์เชิงปริมาณในหญ้าขัดมอญใบยาว (*Sida acuta* Burm. f)..16
2.3.2.3 ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยกลุ่มสารฟลาโวนอยด์..17
2.3.2.4 ผลของสารฟลาโวนอยด์ต่อการต้านอนุมูลอิสระ 17
2.3.3 เอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส (Hypoxanthinephosphoribosyl transferase; HPRT)...19
2.3.3.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีกู้คืนพิวรีนที่สามารถพบได้ในพืช..........19
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย
3.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส (HPRT) ในแก่นตะวัน และสารออกฤทธิ์ในหญ้าขัดมอญใบยาว ฤทธิ์ต้านการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 22
3.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ...22
3.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสในแก่นตะวัน...22
3.1.2.1 การสกัดเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส 23
3.1.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส...23
3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของหญ้าขัดมอญใบยาวในหลอดทดลอง 24
3.1.3.1 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์.......................................24
3.1.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) ในหลอด 24

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง....................25
3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันที่ระดับต่างๆ ต่อการย่อยได้ของโภชนะ การทำงานเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริก ในพลาสมาและมูล
และความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริก ในพลาสมาและมูล..................25
3.2.1 สัตว์และการจัดกลุ่มทดลอง....................25
3.2.2 อาหารทดลอง....................26
3.2.3 การเก็บข้อมูล....................26
3.2.3.1 การเก็บมูลเพื่อวัดการย่อยได้ของโภชนะและสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริก....................26
3.2.3.2 การเก็บพลาสมาเพื่อวิเคราะห์สารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริก....................27
3.2.3.3 การเก็บซีรัมเพื่อวิเคราะห์การทำงานเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ......27
3.2.4 การบันทึกข้อมูล....................27
3.2.5 การวิเคราะห์ทางเคมี....................27
3.2.5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในวัตถุดิบและสูตรอาหาร........27
3.2.5.2 การวิเคราะห์การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ....................27
3.2.5.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกในพลาสมา....................28
3.2.5.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริก........28
3.2.5.5 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในซีรัม 29
3.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ....................29
3.2.7 สถานที่ทำการทดลอง....................29
3.2.8 ระยะเวลาในการทดลอง....................30
3.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลการเสริมหญ้าขัดมอญร่วมกับแก่นตะวันต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ การต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ และการสะสมพิวรีนอนุพันธ์พิวรีนกรดยูริกในเนื้อไก่โคราช....................30

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.1 สัตว์และการจัดกลุ่มทดลอง 30
3.3.2 อาหารทดลอง 30
3.3.3 การบันทึกข้อมูล และลักษณะต่างๆ ที่ต้องการศึกษา 30
3.3.4 การวิเคราะห์ทางเคมี 31
3.3.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอยทางเคมี 31
3.3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิวรีน อนุพันธุ์พิวรีน และกรดยูริก ในเนื้อ 31
3.3.4.3 การวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างในเนื้อ 32
3.3.4.4 การวัดค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บ (drip loss) 32
3.3.4.5 การวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear forces) 32
3.3.4.6 การวัดค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังปรุงสุก (cooking loss) 32
3.3.4.7 การวิเคราะห์ค่าการทำงานเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ 32
3.3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ 32
3.3.6 สถานที่ทำการทดลอง 33
3.3.7 ระยะเวลาในการทดลอง 33
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง
4.1 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส (HPRT) ในแก่นตะวัน และสารออกฤทธิ์ในหญ้าขัดมอญใบยาว ฤทธิ์ต้านการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศัตรูธรรมชาติ 34
4.2 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันที่ระดับต่างๆ ต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ และการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในซีรัม ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริก ในพลาสมาและมูล 38
4.3 ผลศึกษาการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันที่ระดับต่างๆ ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตคุณภาพเนื้อ การต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ และการสะสมพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริกในเนื้อไก่โคราช 44

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ....56
5.1 บทสรุป 56
5.2 ข้อเสนอแนะ 57
รายการอ้างอิง....58
ภาคผนวก 67
ประวัติผู้เขียน 93

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ปริมาณพิวรีนในส่วนต่างๆของเนื้อสัตว์แต่ละชนิดและการจัดกลุ่มพิวรีน ...6
2.2 การทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) และแซนทีนดีไฮดรอจีเนส (xanthine dehydrogenase) ในตับและไตของไก่เนื้อ ...11
2.3 ผลการใช้อัลโลพูรินอลต่อปริมาณกรดยูริกในส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อ ...13
2.4 สารฟลาโวนอยด์ในพืชเขตร้อนชนิดต่างๆ ...15
2.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบฟลาโวนอยด์เชิงปริมาณในหญ้าขัดมอญใบยาว (*Sida acuta* Burm. f) ...16
2.6 ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยกลุ่มของสารฟลาโวนอยด์ ...18
2.7 ผลของสารฟลาโวนอยด์ต่อการต้านอนุมูลอิสระ ...19
2.8 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีกู้คืนพิวรีนที่สามารถพบได้ในพืช ...21
3.1 สูตรอาหารทดลองที่มีการเสริมหญ้าขัดมอญและแก่นตะวันที่ระดับแตกต่างกัน ...26
3.2 สูตรอาหารทดลองที่มีการเสริมหญ้าขัดมอญร่วมกับแก่นตะวันที่ระดับแตกต่างกัน ...31
4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสและคุณค่าทางโภชนะเบื้องต้นในแก่นตะวัน ...35
4.2 ผลการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์และคุณค่าทางโภชนะเบื้องต้นในหญ้าขัดมอญใบยาว ...35
4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของยาอัลโลพูรินอลและหญ้าขัดมอญใบยาว ...37
4.4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากหญ้าขัดมอญใบยาวเทียบกับกรดวิตามินซีสังเคราะห์ ...37
4.5 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันในอาหารไก่โคราชที่ระดับต่างๆต่อการย่อยได้ของโภชนะ ...39
4.6 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันในอาหารไก่โคราชที่ระดับต่างๆ ต่อความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนในพลาสมาเปรียบเทียบกับสูตรอาหารควบคุม ...42

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.7 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันในอาหารไก่โคราชที่ระดับต่างๆ ต่อความเข้มข้นสารพิวีริน อนุพันธ์พิวีรินในมูลเปรียบเทียบกับสูตรอาหารควบคุม.................43
4.8 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่โคราชที่ช่วงอายุ 0-3 และ 3-6 สัปดาห์ 48
4.9 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่โคราชที่ช่วงอายุ 6-9 และ 9-12 สัปดาห์...49
4.10 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อคุณภาพเนื้อของไก่โคราชที่อายุ 9 และ 12 สัปดาห์ 50
4.11 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อค่าสีในหนังอกและเนื้ออกของไก่โคราชที่อายุ 9 และ12 สัปดาห์ 51
4.12 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อคุณภาพซากของไก่โคราชที่อายุ 9 สัปดาห์...52
4.13 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อคุณภาพซากของไก่โคราชที่อายุ 12 สัปดาห์ 53
4.14 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อการสะสมพิวีริน อนุพันธ์พิวีรินและกรดยูริกในเนื้ออกของไก่โคราชที่อายุ 9 และ12 สัปดาห์.....................................54
4.15 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อการสะสมพิวีริน อนุพันธ์พิวีรินและกรดยูริกในเนื้อสะโพกของไก่โคราชที่อายุ 9 และ12 สัปดาห์.....................................55
ข.1 การเตรียมสารมาตราฐานพิวีริน อนุพันธ์พิวีริน และกรดยูริกที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล 82
ข.2 การเตรียมสารมาตราฐานพิวีริน อนุพันธ์พิวีรินกรดยูริก และอัลโลพูรินอลที่ความเข้มข้น stock solution เท่ากับ 2 ไมโครโมล 83
ข.3 การเตรียมสารมาตราฐานพิวีริน อนุพันธ์พิวีริน และกรดยูริกที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมล 86

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างการรับประมานอาหารพิวรีนและการเกิดโรคเกาต์ 5

2.2 การเปรียบเทียบปริมาณสารพิวรีนในเนื้อไก่โคราชและเนื้อไก่ทางการค้า.............................7

2.3 โครงสร้างไนโตรจีนัสเบสของพิวรีน และอนุพันธุ์พิวรีนที่สำคัญ 8

2.4 กระบวนการสังเคราะห์กรดยูริก...9

2.5 กลไกการยับยั้งการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยยาอัลลูโพลินิล 10

2.6 กลไกกการยับยั้งการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซินเดสโดยฟลาโวนอยด์ 14

2.7 กลไกการกู้คืนพิวรีนนิวคลีโอไทด์โดยเอนไซม์ HPRT 20

4.1 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวในอาหาร ไก่โคราชที่ระดับต่างๆ ต่อการทำงาน
เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในซีรัม 40

4.2 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวในอาหาร ไก่โคราชที่ระดับต่างๆ ต่อความเข้มข้น
กรดยูริกในพลาสมาและความเข้มข้นกรดยูริกในมูล 44

4.3 กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาลูก โซ่จากกระบวนลิปิดเปอร์ออกซิชัน โดยฟลาโวนอยด์...............46

ก.1 โครโมโตกราฟสารมาตรฐานเควอซิตินและเคมเฟอรอล 72

ก.2 การยับยั้งการสร้างสีฟอร์แซนโดยเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส..............................77

ก.3 กราฟมาตรฐาน SOD...79

ก.4 กราฟมาตฐานกัวนีน+แซนทีน ไฮโพแซนทีน และอะดีนีน ตามลำดับ.................................84

ก.5 กราฟมาตฐาน IMP...87

ก.6 โครโมโตกราฟและลำดับ retention time ของสารมาตรฐานพิวรีน และอนุพันธ์
พิวรีน (a) โครโมโตกราฟสารพิวรีนและอนุพันธ์พิวรีนในพลาสมา 88

ก.7 โครโมโตกราฟและลำดับ retention time ของสารมาตรฐานพิวรีน และอนุพันธ์
พิวรีน โครโมโตกราฟสารพิวรีนและอนุพันธ์พิวรีนในมูล 89

ก.8 โครโมโตกราฟและลำดับ retention time ของสารมาตรฐานพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน
และ Internal standard โครโมโตกราฟสารพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนในเนื้ออก
เนื้อสะโพก 90

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

ก.9 ลักษณะการเข้าทำลายของเพลี้ยอ่อน 91

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำงานวิจัย

ในปัจจุบันความต้องการบริโภคเนื้อไก่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายเนื่องจากเนื้อไก่เป็นแหล่งโปรตีนจากเนื้อสัตว์ที่มีราคาถูกและคุณภาพดีที่ผู้บริโภคทุกระดับสามารถเข้าถึงได้ แต่เนื้อไก่จัดเป็นอาหารในกลุ่มที่มีพิวรีนและกรดยูริกปานกลางถึงสูง (Kaneko et al., 2014) ทำให้เป็นข้อจำกัดสำหรับผู้บริโภคบางกลุ่ม เช่น ผู้ป่วยโรคเกาต์ (gout) และผู้ที่มีแนวโน้มเสี่ยงต่อการเป็นโรคเกาต์ โดยพิวรีนส่วนเกินที่ได้รับมาจากอาหารจะถูกย่อย สุดท้ายจะอยู่ในรูปของกรดยูริก (Ellington, 2005) โดยเกาะอยู่ตามกระดูกอ่อนของข้อต่าง ๆ ดังนั้นการรับประทานเนื้อไก่จึงเป็นสาเหตุหนึ่งของการเพิ่มปริมาณกรดยูริกในกระแสเลือดให้สูงขึ้น (Kaneko et al., 2014) และอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ที่บริโภคเนื้อไก่เป็นประจำและเป็นระยะเวลานานได้ โดยอาจมีกรดยูริกในกระแสเลือดที่สูงจนถึงจุดที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเกาต์ (Bardin, 2004; Choi and Curhan, 2005)

เนื้อไก่พื้นเมืองหรือเนื้อไก่พื้นเมืองลูกผสม จัดเป็นกลุ่มเนื้อไก่ที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเฉพาะกลุ่มสูง เนื่องจากมีโปรตีนสูงและไขมันต่ำ ไก่โคราชจัดเป็นกลุ่มไก่ลูกผสมพื้นเมือง 50% เป็นไก่สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็ว มีเนื้อสัมผัสที่เหนียวนุ่มและรสชาติอร่อย ถึงแม้ว่าปริมาณพิวรีนรวมทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วย กัวนีน (guanine) อะดีนีน (adenine) ไฮโพแซนทีน (hypoxanthine) และแซนทีน (xanthine) ในเนื้อไก่โคราชและเนื้อไก่ทางการค้าไม่มีความแตกต่างกัน (Kiratikrankul and Yongsawatdigul, 2016; Sirinya et al., 2014) อย่างไรก็ตามไฮโพแซนทีนในเนื้อไก่โคราชตามขนาดน้ำหนักส่งตลาด (1.2 กิโลกรัม) ก็มีแนวโน้มที่สูงกว่าเนื้อไก่ทางการค้า (3.0 กิโลกรัม) (Sirinya et al., 2014) โดยพบว่าไฮโพแซนทีนมีอิทธิพลต่อการเกิดโรคเกาต์มากกว่าสารพิวรีนตัวอื่นๆ (Brule et al., 1992) ดังนั้นการใช้สารฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ในวิถีกู้คืนพิวรีน เพื่อผลิตเนื้อไก่สุขภาพ (healthy meat) มีปริมาณพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีน ต่ำลง อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะลดข้อจำกัดในการบริโภคเนื้อไก่ อีกทั้งสารฟลาโวนอยด์ยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระช่วยชะลอการเสื่อมสภาพในเนื้อ (Reddy and Lokesh, 1994) รวมถึงมีรายงานว่าฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ยังช่วยปกป้องกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) จากการถูกออกซิไดซ์ (Havsteen, 2002) ซึ่งน่าจะเป็นผลดีต่อสุขภาพผู้บริโภค

พิวรีนประกอบด้วยกัวนีน อะดีนีน และอนุพันธ์พิวรีนประกอบด้วย ไฮโพแซนทีน และแซนทีน ซึ่งพิวรีนและอนุพันธ์ดังกล่าวมีผลต่อการเพิ่มความเข้มข้นของกรดยูริกในกระแสเลือดของคนปกติ ผู้ป่วยไฮเปอร์ยูริซิมิก (hyperuricemic) และผู้ป่วยโรคเกาต์ (Clifford et al., 1976) โดยอนุพันธ์ไฮโพแซนทีนเป็นปัจจัยเสี่ยงสูงสุดกว่าพิวรีนและอนุพันธ์ตัวอื่น (Brule et al., 1992) เนื่องจากจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดยูริกในสองขั้นตอนสุดท้ายของวิถีเมแทบอลิซึมพิวรีน โดยไฮโพแซนทีนจะถูกเปลี่ยนเป็นแซนทีนและสุดท้ายเปลี่ยนเป็นกรดยูริก ด้วยการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) (James and Russ, 2008) ดังนั้นการรักษาโรคเกาต์ในคน จึงมีการใช้ยาอัลลูพูรินอล (allopurinol) โพรเบเนซิด (probenecid) และซัลฟินไพราโซน (sulfinpyrazone) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งกลไกการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Mandell, 2002; Aggarwal et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากยาที่กล่าวมาข้างต้น ยังพบว่าสารฟลาโวนอยด์จากพืช ก็มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเช่นกัน (James and Russ, 2008; Nagao et al., 1999) รวมถึงเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส (hypoxanthine phosphoribosly transferase; HPRT) ก็มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนสารไฮโพแซนทีน ซึ่งเป็นอนุพันธ์พิวรีนที่ก่อให้เกิดโรคเกาต์มากที่สุดไปอยู่ในรูปของอิโนซินมอนอฟอสเฟต (insine monophosphate; IMP) (Saugstad, 1998) จากกระบวนการดังกล่าวนอกจากจะลดไฮโพแซนทีนลงได้ ยังอาจทำให้ให้เนื้อมีความอร่อยเพิ่มมากขึ้น เพราะอิโนซินมอนอฟอสเฟตเป็นสารที่บ่งชี้ถึงความอร่อยของเนื้อ

สารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid compounds) เป็นสารที่พบได้ในพืชหลากหลายชนิด แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวน (flavones) ฟลาโวนอล (flavonol) ไอโซฟลาโวน (isoflavone) ฟลาโวโนน (flavonone) ฟลาโวโนนอล (flavononol) และฟลاวานอล (flavanol) แต่กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ดี คือกลุ่มของฟลาโวนและฟลาโวนอล ซึ่งได้แก่ ลูทิโอลิน (luteolin) เคมเฟอรอล (kaempferol) เควอซิติน (querectin) และ ไมริซิติน (myricetin) (Nagao et al., 1999) และสารฟลาโวนอยด์สามารถพบได้ในหญ้าขัดมอญใบยาว (*Sida acuta* Burm. f.) ซึ่งพบหลักๆ ในกลุ่มของ C.O-glycosylated flavonol และ kaempferol-diglycoside (Prakash et al., 1981) และสารฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส เหมือนกับยาอัลโลพูรินอล (Nagao et al., 1999) นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Singh et al., 2005) ส่วนเอนไซม์ HPRT คือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีกู้คืนพิวรีนนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความจำเพาะต่อการเปลี่ยนไฮโพแซนทีนเป็นอิโนซินมอนอฟอสเฟต จากการศึกษาเอกสารครั้งนี้พบว่าวัตถุดิบที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ HPRT ที่ดี คือ แก่นตะวัน (*Jerusalem artichoke*) เนื่องจากเป็นพืชที่ประกอบด้วยเอนไซม์ HPRT และยังเป็นพืชที่ไม่มีพิษ หาซื้อง่าย อีกทั้งถูกจัดให้เป็นพืชสมุนไพรจึงถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เช่น ช่วยลดความอ้วนและ

ป้องกันโรคเบาหวาน เป็นต้น (นิมิต และสนั่น, 2549) ดังนั้นการใช้หญ้าขัดมอญใบยาว ซึ่งมีสารประกอบฟลาโวนอยด์ร่วมกับแก่นตะวันที่มีเอนไซม์ HPRT ในอาหารน่าจะช่วยลดการสะสมพิวรีนและอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อไก่โคราชได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาหาปริมาณเอนไซม์ HPRT ในแก่นตะวัน สารออกฤทธิ์ในหญ้าขัดมอญใบยาวที่เกี่ยวข้องกับการต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และการต้านอนุมูลอิสระ

1.2.2 เพื่อหาระดับการเสริมสารฟลาโวนอยด์จากหญ้าขัดมอญใบยาวและเอนไซม์เอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันที่เหมาะสมในการลดพิวรีนและอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อไก่ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการย่อยได้และใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ สมรรถนะการเจริญเติบโต และคุณภาพเนื้อไก่โคราช

1.3 สมมุติฐานงานวิจัย

การเสริมสารฟลาโวนอยด์จากหญ้าขัดมอญใบยาวและเอนไซม์ HPRT จากแก่นตะวันสามารถลดการสะสมพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อไก่โคราช โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการย่อยได้และใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ สมรรถนะการเจริญเติบโต และคุณภาพเนื้อ

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

การวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาผลของการเสริมสารฟลาโวนอยด์จากหญ้าขัดมอญใบยาว และเอนไซม์ HPRT จากแก่นตะวันที่ระดับต่างๆ ในอาหาร ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ การต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ และการสะสมพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนในเนื้อไก่ ในไก่โคราชซึ่งศึกษาในช่วงอายุ 0-12 สัปดาห์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้เนื้อไก่ที่มีปริมาณพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนลดลง

1.5.2 ได้อาหารโปรตีนคุณภาพดี ที่ช่วยลดข้อจำกัดการบริโภคเนื้อไก่ของผู้ที่เป็นโรคเกาต์หรือผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเกาต์

1.5.3 เป็นเนื้อไก่ทางเลือก ที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (functional meat) สำหรับผู้บริโภคที่รักสุภาพหรือบุคลทั่วไปที่ต้องการบริโภคอาหารโปรตีนคุณภาพสูง ไขมันต่ำ มีสารต้านอนุมูลอิสระสูงและไม่เสี่ยงต่อการเป็นโรคเกาต์ในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

ภาษาไทย : พิวรีน, ไฮโพแซนทีน, ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทราสเฟอเรส, แซนทีนออกซิเดส กรดยูริก

ภาษาอังกฤษ : purine, hypoxanthine, hypoxanthine phosphoribosyl transferase, xanthine oxidase, uric acid

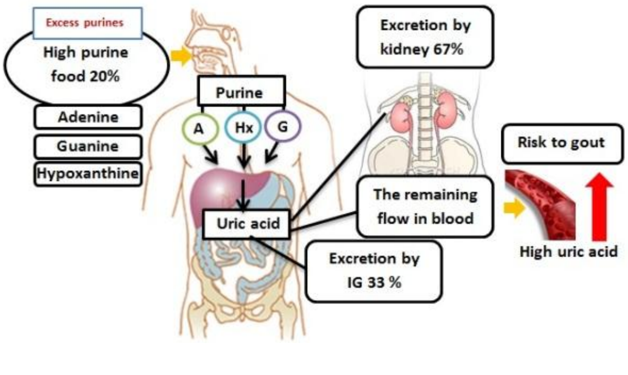
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสัมพันธ์ของการบริโภคอาหารและการเกิดโรคเกาต์

การรับประทานอาหารที่มีพิวรีนสูงเป็นประจำและเป็นเวลานาน อาจเป็นสาเหตุหนึ่งในการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคเกาต์ในคนปกติ และอาจไปกระตุ้นให้โรคข้ออักเสบกำเริบขึ้นได้ในคนที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคเกาต์อยู่แล้ว โรคเกาต์เป็นโรคที่พบเป็นอันดับหนึ่งของโรคข้ออักเสบ (inflammatory arthritis diseases) โดยพบว่ามีประมาณ 5 ใน 1000 ของประชากรที่มีอายุมากกว่า 15 ปี นับเป็นโรคข้ออักเสบเพียงชนิดเดียวที่มียารักษาจำเพาะ รักษาง่ายและได้ผลดี แต่เป็นที่น่าเสียดายว่าผู้ป่วยโรคเกาต์ในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังไม่ได้รับการดูแลรักษาที่ถูกต้องกลายเป็นโรคข้ออักเสบเรื้อรังที่มีภาวะทุพลภาพและมีไตพิการแทรกซ้อนมากกว่าร้อยละ 50 โดยปัจจัยที่กระตุ้นโรคข้ออักเสบ เช่น 1) เครียดจากการเจ็บป่วยหรือผ่าตัด 2) กินอาหารที่มีพิวรีนสูง เช่น สัตว์ปีกหรือยอดผัก 3) การดื่มสุรา และ 4) การได้รับยาบางชนิด เช่น แอสไพริน (aspirin) (ศิรภพและรัตนวดี, 2541)

กรดยูริก คือ ผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการแมแทบอลิซึมของสารพิวรีนที่ได้รับมาจากอาหารและการสังเคราะห์ขึ้นเองภายในร่างกาย ดังภาพที่ 2.1 กรดยูริกนี้จะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ ประมาณร้อยละ 67 และทางอุจจาระประมาณร้อยละ 33 การที่มีกรดยูริกในเลือดสูง เกิดจากร่างกายมีการสร้างกรดยูริกมากกว่าปกติ หรือรับประทานอาหารที่มีสาร**พิวรีน** อนุพันธ์พิวรีนสูง ซึ่งสารเหล่านี้จะเปลี่ยนเป็นกรดยูริกทำให้มีระดับกรดยูริกในเลือดสูงผิดปกติ และในสภาวะที่กรดยูริกในเลือดสูงจะเป็นปัจจัยเสี่ยงทำให้เกิดโรคเกาต์ (ปารยะ, 2553)



ภาพที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างการรับประมานอาหารพิวรีนและการเกิดโรคเกาต์

ที่มา: ปารยะ (2553)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณพิวรีนในส่วนต่างๆ ของเนื้อสัตว์แต่ละชนิดและการจัดกลุ่มพีวรีน (mg/100g)

Meat	Part	Adenine	Guanine	[1]Hx	Xanthine	Total purine	[2]Calculated as uric acid
Chicken	Breast	20.5	21.4	98.4	1.0	141.2	171.8
	Gizzard	45.9	51.4	29.5	6.1	142.9	169.8
	Heart	31.3	36.1	52.6	5.4	125.4	150.0
	Leg	27.0	19.6	76.2	0.0	122.5	149.6
	Liver	121.6	151.1	ND	39.5	312.2	363.1
	Skin	48.6	43.8	27.2	ND	119.7	142.9
	White meat	27.0	16.6	110.2	0.0	153.9	188.3
Beef	Riblion	13.5	7.5	39.5	13.7	74.2	89.1
	Shoulder ribs	14.9	9.1	36.7	16.7	77.4	92.5
	Shoulder sirloin	16.2	9.1	55.8	9.1	90.2	109.3
	Tenderloin	16.2	9.1	64.0	9.1	98.4	119.4
Pork	Shoulder ribs	16.2	10.6	64.0	0	90.8	110.9
	Shoulder sirloin	18.9	13.6	62.6	0	95.1	116.0
	Shoulder knee	21.6	16.6	69.4	0	107.6	131.1
	Shoulder	16.2	12.1	53.1	0	81.4	99.2

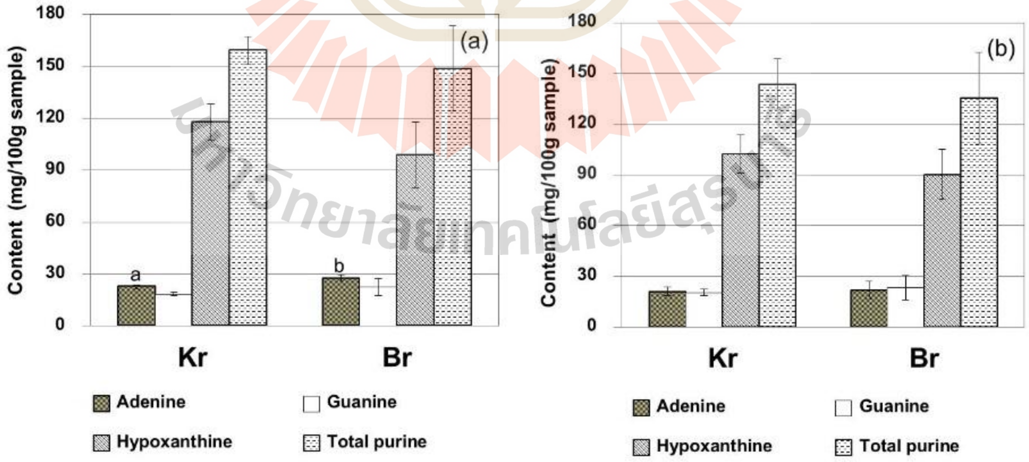
หมายเหตุ: [1]Hx =hypoxanthine; [2]Calculated as uric acid = (total purine(umol)x168.1(g/mol)/1000) การจัดกลุ่มพิวรีนประกอบด้วย 1: กลุ่มพิวรีนต่ำมาก: พิวรีนต่ำกว่า 50 mg/100g (น้อยกว่า 350 µmol/100 g), 2: กลุ่มพิวรีนต่ำ: พิวรีน 50-100 mg/100 g (350-700 µmol/100 g), 3: กลุ่มพิวรีนปานกลาง: 100-200 mg/100 g (มากกว่า 700-1400 µmol/100 g), 4: พิวรีนสูง: 200-300 mg/100 g (1400-2050 µmol/100 g), 5; พิวรีนสูงมาก: มากกว่า 300 mg/100 g (มากกว่า 2050 µmol/100 g), ND: ไม่สามารถตรวจได้

ที่มา: Kaneko et al. (2014)

การรับประทานเนื้อไก่กับการเกิดโรคเกาต์ เมื่อกล่าวถึงเนื้อสัตว์ที่ได้รับความนิยมในการบริโภคนอกจากเนื้อไก่แล้วยังมีเนื้อสัตว์ชนิดอื่นที่ได้รับความนิยมในการบริโภคเช่นกัน อาทิ เนื้อหมู เนื้อวัว แต่หากพิจารณาถึงองค์ประกอบพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 พบว่าเนื้อไก่มีปริมาณไฮโพแซนทีนและพิวรีนทั้งหมดสูงกว่าเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ เมื่อคำนวนปริมาณพิวรีนที่คาดว่าจะก่อให้เกิดกรดยูริกในร่างกาย พบว่าเนื้อไก่ก่อให้เกิดการ

พัฒนาเป็นกรดยูริกสูงเช่นกัน โดยคำนวนได้จากสมการดังนี้ กรดยูริก (มิลลิกรัม/100 กรัม) เท่ากับพิวรีนทั้งหมดที่คาดว่าจะได้รับจากอาหาร (ไมโครโมล) คูณด้วยมวลโมเลกุลของกรดยูริก (168.1 กรัม/โมล) จากนั้นหารด้วย 1000 ซึ่งในการพิจารณาปริมาณพิวรีนในอาหารไม่ควรคำนึงถึงเฉพาะพิวรีนทั้งหมดแต่ควรให้ความสำคัญต่อสัดส่วนของไฮโพแซนทีน ด้วยเพราะไฮโพแซนทีนเป็นสารตัวสำคัญที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการพัฒนาให้เกิดโรคเกาต์มากที่สุด (Kaneko et al., 2014; Brule et al., 1992)

การเปรียบเทียบปริมาณสารพิวรีนในเนื้อไก่โคราชและเนื้อไก่ทางการค้า ดังแสดงในภาพที่ 2.2 พบว่า สารไฮโพแซนทีน เป็นสารอนุพันธ์พิวรีนหลักที่ตรวจพบ ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่าทั้งไก่เนื้อโคราชและไก่เนื้อทางการค้ามีสารไฮโพแซนทีนที่สูง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอะดีนีนในเนื้ออกของไก่โคราชต่ำกว่าไก่ทางการค้า ซึ่งอาจเกี่ยวเนื่องจากพฤติกรรมของไก่โคราชที่มักมีการบิน หรือกระพือปีก รวมทั้งการต่อสู้กันภายในฝูงทำให้กล้ามเนื้อส่วนอกที่เชื่อมต่อกับปีกมีการเคลื่อนไหวมากกว่าไก่ทางการค้า จากการศึกษาเอกสารพบว่ามัดกล้ามเนื้อ (muscle fiber) ที่ใช้ในการเคลื่อนไหวมักจะพบเอนไซม์ชนิด อะดีโนซีนมอนอฟอสเฟตดีอะมิเนส (adenosine monophosphate deamenase; AMP deaminase) สูงกว่าเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ (Moriwaki et al. 1999) เพราะเอนไซม์ AMP deaminase มีความสำคัญในการช่วยปรับสมดุลแหล่งพลังงานในกล้ามเนื้อ โดยการเปลี่ยนอะดีนีนในกล้ามเนื้อเป็นอิโนซีน และอิโนซีนเปลี่ยนต่อเป็น IMP จากนั้น IMP จะถูกเปลี่ยนให้เป็นอะดีนิวโลซัคซิเนต (adenylosuccinate) (Coffee and Solano, 1977)

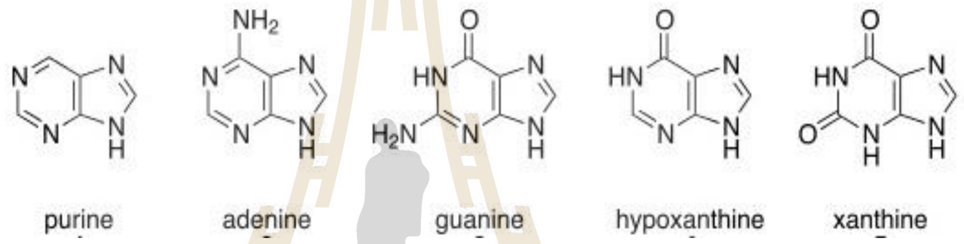


ภาพที่ 2.2 การเปรียบเทียบปริมาณสารพิวรีนในเนื้อไก่โคราชและเนื้อไก่ทางการค้า (A) Breast, (B) Thigh

ที่มา: Sirinya et al. (2014)

2.2 ที่มาและกลไกการสังเคราะห์กรดยูริก

พิวรีน คือ เบสไนโตรเจนที่พบในโครงสร้างของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ซึ่งได้จากการสลายกรดนิวคลีอิกหรือพิวรีนนิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยอะดีนีน และกัวนีน นอกจากนี้ยังพบอนุพันธ์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของพิวรีนได้แก่ อะดิโนซินมอนอฟอสเฟต (adenosine monophosphate; AMP) กัวโนซินมอนอฟอสเฟต (guanosine monophosphate: GMP) อิโนซินมอนอฟอสเฟต (inosine monophosphate; IMP) แซนโทซินมอนอฟอสเฟต (xanthosine mono-phosphate; XMP) แซนทีน (xanthine) และไฮโพแซนทีน (hypoxanthine) ดังภาพที่ 2.3 ซึ่งอนุพันธ์ที่ได้กล่าวมาในข้างต้นพบว่ามีผลต่อการเพิ่มระดับความเข้มข้นของกรดยูริกในกระแสเลือด (Clifford et al., 1976)

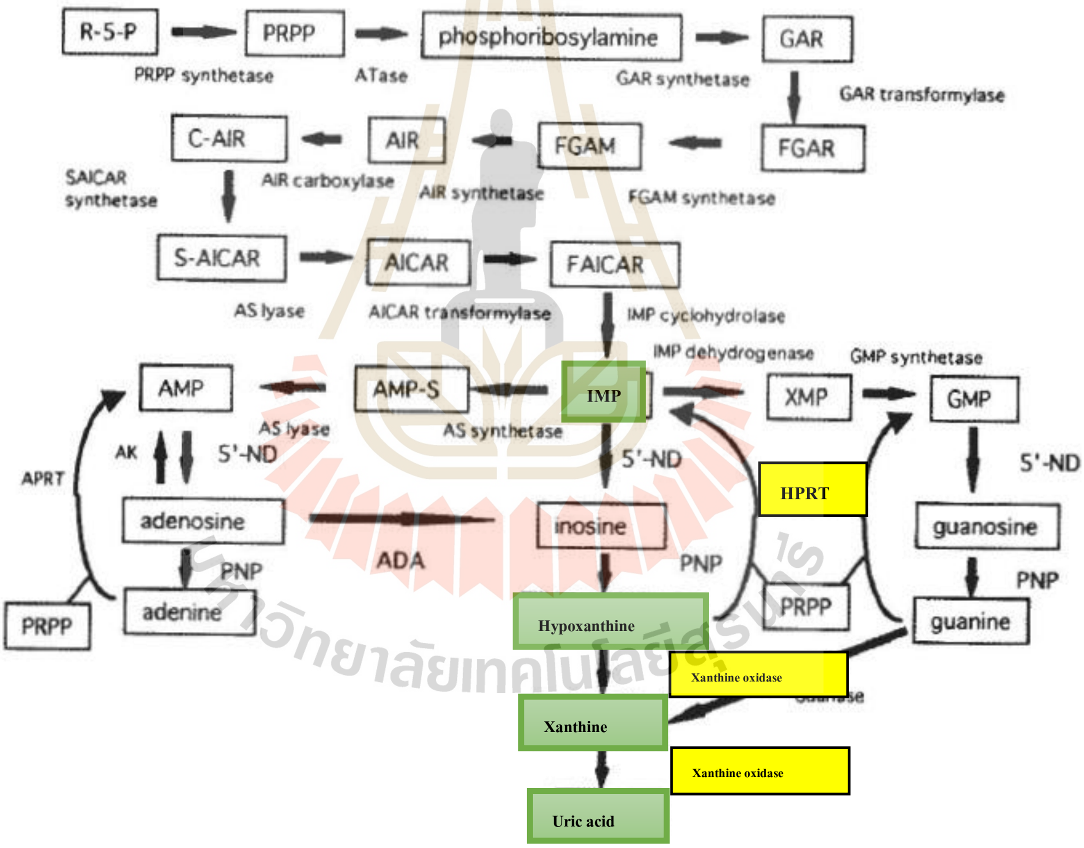


ภาพที่ 2.3 โครงสร้างไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) ของพิวรีน และอนุพันธุ์พิวรีนที่สำคัญ
ที่มา: Moriwaki et al. (1999)

เบสพิวรีนอิสระส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกจนได้ผลผลิตสุดท้ายซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของสัตว์ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมการสลายเบสอะดีนีนจะเริ่มต้นในระดับของนิวคลีโอไทด์ คือ อะดีโนซีน กล่าวคืออะดีโนซีนจะถูกกำจัดหมู่อะมิโนออกไปได้โดยเอนไซม์อะดิโนซินดีอะมิเนส (adenosine deaminase) ได้เป็นอิโรซีน ซึ่งจะสลายต่อไปเป็นไฮโพแซนทีนโดยเอนไซม์นิวคลีโอไซด์ฟอสโฟไรเรส (nucleoside phosphorrylase) หรือ nucleosidase สำหรับเบสกัวนีนจะถูกดึงเอาหมู่อะมิโนออกไปเช่นเดียวกันโดยเอนไซม์กัวเนส (guanase) ได้เป็นแซนทีน สำหรับเอนไซม์กัวเนสมีอยู่ในอวัยวะต่างๆ เช่น ลำไส้ ตับ ไต ม้าม ดังนั้นการสลายเบสกัวนีนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจึงเริ่มจากเบสอิสระได้

ไฮโพแซนทีนที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดส์ได้เป็นแซนทีน และแซนทีนจะถูกออกซิไดส์ต่อได้เป็นกรดยูริก โดยเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มี FAD, Fe^{+}และ Mo^{6+} เป็นโคแฟกเตอร์ ส่วนแซนทีนดีไฮโดรจีเนส (xanthine dehydrogenase) มี NAD^{+} และ H_2O เป็นโคแฟคเตอร์ ถ้าไม่มีเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้กรดยูริกก็จะไม่ถูกผลิตขึ้น โดยกรดยูริกเป็นผลผลิตสุดท้ายของการสลายพิวรีนในคน พวกสัตว์ไพรเมตและนก

สารตั้งต้นตัวแรกคือ ฟอสโฟไรโบซิล ไพโรฟอสเฟต (phosphoribosyl pyrophosphate; PRPP) ซึ่งจะถูกใช้ในการสังเคราะห์พิวรีนนิวคลีโอไทด์ ใน de novo pathway สารอนุพันธ์ตัวแรกที่สังเคราะห์ได้ คือ อิโนซีนมอนอฟอสเฟต (inosine monophosphate) หรือที่เรียกว่า IMP ซึ่งจะมีเบส คือ ไฮโพแซนทีนเป็นส่วนประกอบหลังจากนั้น IMP จึงจะถูกเปลี่ยนเป็น AMP และ GMP และเปลี่ยนต่อไปจนได้ผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้ายคือ กรดยูริก แสดงในภาพที่ 2.4 เอนไซม์ตัวสำคัญที่ทำให้เกิดกรดยูริกคือ แซนทีนออกซิเดสและแซนทีนดีไฮโดรจีเนส โดยเปลี่ยนไฮโพแซนทีนให้เป็นแซนทีน และสุดท้ายได้เป็นกรดยูริกตามลำดับและเอนไซม์ตัวสำคัญในวิถีกู้คืนไฮโพแซนทีน คือ ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส หรือ HPRT โดยเปลี่ยนไฮโพแซนทีนเป็น IMP ซึ่ง IMP คือสารดัชนีบ่งชี้ความอร่อยในเนื้อไก่



ภาพที่ 2.4 กระบวนการสังเคราะห์กรดยูริก

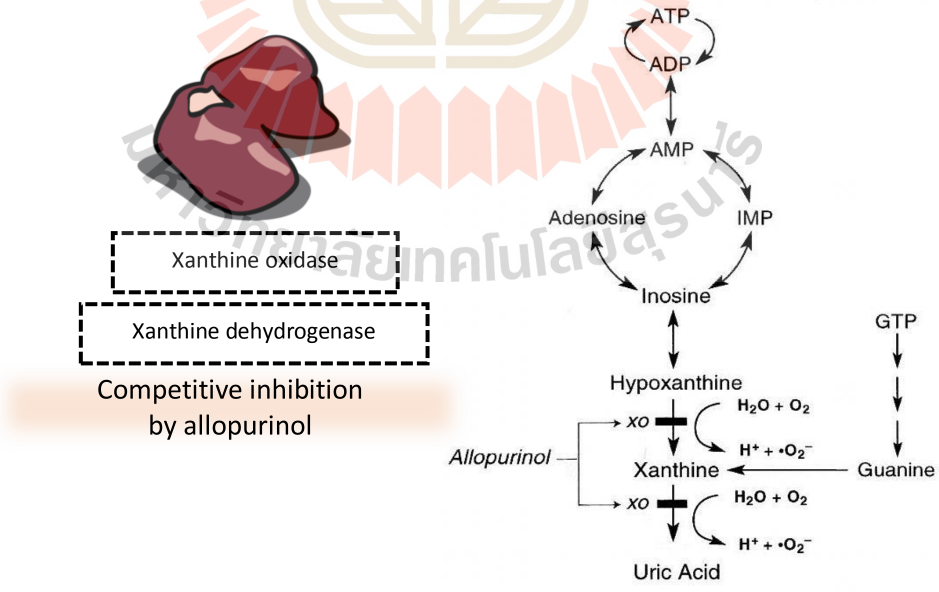
ที่มา: Moriwaki et al. (1999)

2.3 โอกาสความเป็นไปได้ในการลดอนุพันธ์พิวรีนและกรดยูริก

เอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของพิวรีน (purine metabolism) ผลจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ทำให้ลดการผลิตกรดยูริกลง และสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม พิวรีนอะนาล๊อก (purine analogues) ประกอบด้วย อัลโลพูรินอล (allopurinol) ออกซิพูรินอล (oxypurinol) ไตโซพิวรีน (tisopurine) และกลุ่มอื่นๆ ประกอบด้วย ไฟติกแอซิด (phytic acid) และไมโออินนอสซิทอล (myoinositol)

2.3.1 อัลโลพูรินิล (allopurinol)

เป็นยากลุ่มแรกๆ ที่วงการแพทย์นำมาใช้รักษาโรคเกาต์ ในอดีตยังมีการนำยานี้มาใช้รักษาโรคไต โรคหัวใจล้มเหลว โรคเลือดไปเลี้ยงหัวใจไม่เพียงพอ โรคลมชัก โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น กลไกการทำงานยาอัลโลพูรินอลจะเปลี่ยนเป็นออกซีพูรินอล (oxypurinol) ซึ่งโครงสร้างคล้ายกับไฮโพแซนทีน สารนี้จึงเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสแบบแข่งขัน (competitive) ดังภาพที่ 2.5 ด้วยกลไกนี้ส่งผลให้สารเคมี 3 ตัวในร่างกายที่เกี่ยวข้อง คือ ออกซีพูรินอล (oxypurinol) ไฮโพแซนทีน และแซนทีนไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดยูริก ดังนั้นจึงทำให้การสังเคราะห์กรดยูริกลดลงหลังจากให้ยาอัลโลพูรินอล แก่คนไข้ที่เป็นโรคเกาต์ ซึ่งพบว่าสามารถทำให้ระดับของกรดยูริกในกระแสเลือดลดลง



ภาพที่ 2.5 กลไกการยับยั้งการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยยาอัลลูโพลินอล

ที่มา: http://flipper.diff.org/apptagsaccount/items/432

2.3.1.1 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) และแซนทีนดีไฮโดรจีเนส (xanthine dehydrogenase) โดยยาอัลโลพูรินอล (allopurinol) ในตับและไตของไก่เนื้อ

การใช้ยาอัลโลพูรินอลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และแซนทีนดีไฮโดรจีเนส ดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยภาพรวมพบว่ายาอัลโลพูรินอลมีแนวโน้มในการลดการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และแซนทีนดีไฮโดรจีเนสได้ทั้งในตับและไตเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Settle et al. (2012) รายงานว่ายาอัลโลพูรินอล สามารถลดความเข้มข้นของกรดยูริกและยับยั้งการทำงานของแซนทีนดีไฮโดรจีเนสในไต ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายาอัลโลพูรินอลมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์แซนทีนดีไฮโดรจีเนส ส่วนปริมาณความเข้มข้นของกรดยูริกในไตก็สะท้อนให้เห็นว่า ความเข้มข้นของกรดยูริกที่ถูกหลั่งเข้าสู่ท่อหลอดไตต่ำลง ซึ่งส่งผลให้ความเข้มข้นของกรดยูริกในไตต่ำลง การลดการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวจึงมีผลต่อการสร้างกรดยูริกทำให้มีการขับทิ้งกรดยูริกต่ำลง

ตารางที่ 2.2 การทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) และแซนทีนดีไฮโดรจีเนส (xanthine dehydrogenase) ในตับและไตของไก่เนื้อ

References	Treatments	Activity (units/mg protein)					
		Liver			Kidney		
		XO	XD	XO+XD	XO	XD	XO+XD
Settle et al. (2012)	Control	8.05	40.0	48.1	5.55	34.5	40.0
	AR	6.73	25.8	32.5	5.82	31.6	36.4
	25 mg AL	8.69	39.3	48.0	4.88	24.6	29.5
	UAF	7.99	35.2	43.2	4.58	24.9	29.5
	UAI	7.45	38.2	45.7	5.85	29.4	35.3
Horn and	Control		14.54[a]				
Featherstone (1971)	150 mg AL		0.51[b]				
Carro et al. (2010)	Control	8.95	49.9[a]	58.9[a]	6.41	46.7	53.1
	25 mg AL	10.1	58.8[ab]	68.9[ab]	5.29	42.8	48.1
	50 mg AL	11.0	69.2[b]	80.2[b]	5.69	45.3	51.0

หมายเหตุ: XO; xanthine oxidase XD; xanthine dehydrogenase XO+XD; xanthine oxidase + xanthine dehydrogenase AR; ให้ allopurinol ติดต่อกัน 2 สัปดาห์และถอนยา 3 สัปดาห์สุดท้าย AL; เสริม allopurinol 25 mg UAF; เสริม allopurinol 25 mg + uric acid 6.24 mg ในอาหาร UAI; เสริม allopurinol 25 mg + uric acid 120 mg ฉีดให้ทุกวัน

2.3.1.2 ผลการใช้ยาอัลโลพูรินอลต่อปริมาณกรดยูริกในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อ

ผลของการใช้อัลลูพูรินอลต่อความเข้มข้นกรดยูริกในเนื้อเยื่อตับและไตแสดงในตารางที่ 2.3 โดยภาพรวมพบว่ากลุ่มที่ได้รับยาอัลโลพูรินอลทำให้ความเข้มข้นของกรดยูริกในเนื้อเยื่อตับ ไต และเลือดมีแนวโน้มลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากยาอัลโลพูรินอลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และแซนทีนดีไฮโดรจีเนส ทำให้การสังเคราะห์กรดยูริกลดลง (Horn and Featherstone, 1971; Settle et al., 2012) และส่งผลให้ความเข้มข้นกรดยูริกในกระแสเลือดลดลง การลดลงของกรดยูริกในกระแสเลือดมีผลต่อความเข้มข้นของกรดยูริกในเนื้อเยื่อตับและไตลดลงเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Carro et al. (2010) ที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดยูริกในกระแสเลือดกับความเข้มข้นของกรดยูริกในเนื้อเยื่อตับที่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($r = 0.828$; $P<0.001$; ข้อมูลวิเคราะห์จากไก่ 15 ตัว หลังจากได้รับอัลลูพูรินอลเป็นเวลา 5 สัปดาห์) และในทำนองเดียวกันงานทดลองของ Horn and Featherstone (1971) พบว่าปริมาณกรดยูริกในมูลของกลุ่มที่ได้รับยาอัลโลพูรินอลมีปริมาณการขับทิ้งกรดยูริกที่ลดลง และมีการขับทิ้งสารไฮโพแซนทีน และแซนทีนมากขึ้น อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนไฮโพแซนทีน และแซนทีนให้เป็นกรดยูริกถูกยับยั้งโดยอัลลูพูรินอล ทำให้มีปริมาณสารไฮโพแซนทีน และแซนทีนตกค้างเป็นจำนวนมาก จึงถูกขับทิ้งทางมูลในปริมาณที่มากขึ้น

2.3.2 สารฟลาโวนอยด์

สารฟลาโวนอยด์สามารถพบได้ในพืช โดยมีสารออกฤทธิ์ 4 ชนิดหลักๆ คือ ลูทิโอลิน (luteolin) เคมเฟอรอล (kaemferol) ไมริซิติน (myricetin) และเควอซิติน (quercetin) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเหมือนกับการใช้ยาอัลลูพูรินอลในการรักษาโรคเกาต์ (Bardin et al., 2004; Nagao et al., 1999) โดยมีกลไกดังนี้ โครงสร้างสารฟลาโวนอยด์ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 5-OH หรือ 7-OH ซึ่งสามารถเติมลงบนตำแหน่งคาร์บอนที่ 2-O^{-} หรือ 6-O^{-} ของแซนทีนในบริเวณเร่งต่อเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส จากกลไกนี้จึงส่งผลให้เอนไซม์แซนทีนออกซิเดสไม่สามารถเปลี่ยนแซนทีนที่ถูกเติมด้วยหมู่ไฮดรอกซิลในคาร์บอนที่ 2-OH หรือ 6-OH ให้อยู่ในโครงสร้างกรดยูริกได้ (Cotelle et al., 1996) กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยฟลาโวนอยด์ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2.6

2.3.2.1 การศึกษาสารฟลาโวนอยด์ในพืชเขตร้อนชนิดต่างๆ

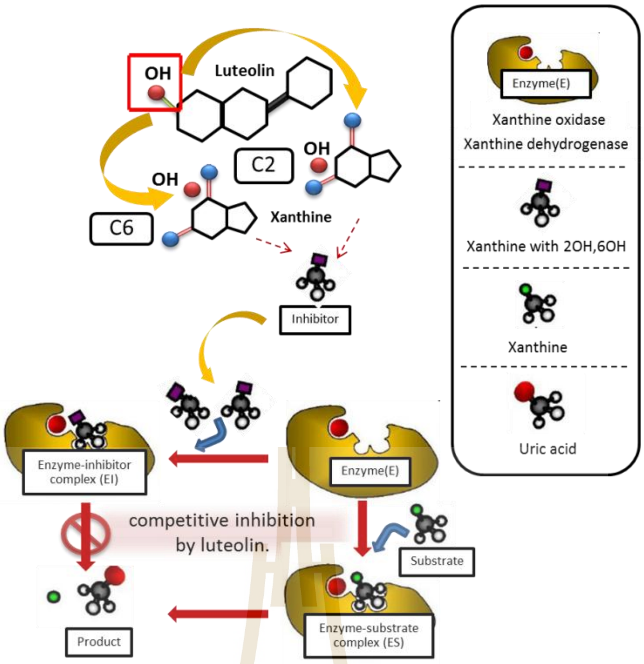
การศึกษาสารฟลาโวนอยด์จากพืชที่สามารถรับประทานได้ในเขตร้อนแสดงในตารางที่ 2.4 พบว่า หญ้าขัดมอญใบยาว (*Sida acuta* Brum.f.) เป็นพืชที่ประกอบด้วยสารฟลาโวนอยด์สูง จากการศึกษาของ Jindal et al. (2012) รายงานว่าหญ้าขัดมอญใบยาวมีสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 8,500 mg/kg DM ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Edeoga et al. (2005) ที่รายงานว่าหญ้าขัดมอญใบยาวมีสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 9,800 mg/kg DM ซึ่งความแตกต่าง

ของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสองงานทดลองในข้างต้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากวิธีการสกัดสารฟลาโวนอดย์ที่แตกต่างกันโดย Edeoga et al. (2005) ทำการสกัดโดยใช้เมทานอล 80% ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (whaman No.42) ส่วนการสกัดของ Jindal et al. (2012) ทำการสกัดโดยใช้เมทานอลที่ร้อน 80% จากนั้นนำไปสกัดต่อด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) (fraction I) เพื่อแยกไขมันออกและสกัดต่อด้วยเอทิล อีเทอร์ (ethyl ether) (fraction II) เพื่อแยกน้ำตาลที่จับกับฟลาโวนอยด์ออก สุดท้ายสกัดด้วยเอทิล อะซีเตท (ethyl acetate) (fraction III) ซึ่งในส่วนนี้จะประกอบด้วยฟลาโวนอยด์อิสระ จากนั้นใช้ฟลาโวนอยด์ใน fraction II และ fraction III คำนวนสารสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า หญ้าขัดมอญใบยาวมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสที่ดีซึ่งจากคุณสมบัติการยับยั้งดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Asha et al. (2018) ที่รายงานว่าในหญ้าขัดมอญใบยาวมี

ตารางที่ 2.3 ผลการใช้อัลโลพูรินอลต่อปริมาณกรดยูริกในส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อ

Reference	**Treatments**	**Uric acid in tissues**		**Plasma uric acid (mg/100 ml)**			
		Liver (mg/liver)	**Kidney (mg/g)**	**1wk**	**2wk**	**3wk**	**4wk**
A	Control	4.75^{b}					
	AL 35 mg	1.39^{a}					
	Control	8.31	0.414	8.46	6.01	5.45	4.05
	AR	4.12	0.495	8.58	3.27	2.31	4.79
B	AL 25mg	1.29	0.082	8.36	2.57	2.07	2.26
	UAF	1.30	0.148	8.55	4.30	2.91	3.01
	UAI	1.56	0.119	8.50	5.59	2.21	2.93
C	Control	0.839^{a}	0.964^{b}		390^{a}	412^{a}	469^{a}
	AL 25 mg	0.280^{b}	0.256^{a}		173^{b}	189^{b}	195^{b}
	AL 50 mg	0.256^{b}	0.107^{a}		167^{b}	163^{b}	181^{b}
				Plasma	Excreta (%)		
					HX	X	U
D	Control			6.46	3.00^{a}	3.91^{a}	93.09^{a}
	AL150 mg			8.40	26.6^{b}	35.70	37.66^{b}

หมายเหตุ: A; Settle et al., 2015 B; Settle et al., 2012 C; Carro et al., 2010 D; Horn and Featherstone, 1971; HX; hypoxanthine X; xanthine UA; uric acid AL; allopurinol AR; ให้ allopurinol ติดต่อกัน 2 สัปดาห์และถอนยา 3 สัปดาห์สุดท้าย UFA; เสริม allopurinol 25 mg + uric acid 6.24 mg ในอาหาร UAI; เสริม allopurinol 25 mg + uric acid 120 mg ฉีดให้ทุกวัน



ภาพที่ 2.6 กลไกการยับยั้งการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซินเดสโดยฟลาโวนอยด์ (ลูทิโอลิน)
ที่มา: Cotelle et al. (1996)

สารกลุ่มเคมเฟอรอล (keampferol) เป็นองค์ประกอบอยู่ ซึ่งจัดเป็นสารฟลาโวนอยด์ตัวหนึ่งที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเป็นอย่างมาก (Nagao et al., 1990) นอกจากนี้ยังพบว่าใบฝรั่งและใบสะเดาก็มีความน่าสนใจเช่นกัน จากตารางพบว่าใบฝรั่งมีสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 1,128 mg/kg DM มีสารออกฤทธิ์คือไมริซินติน (myricetin) และสะเดามีฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 2,041 mg/kg DM มีสารออกฤทธิ์คือเควอซิตินและไมริซิติน แต่อย่างไรก็ตามการนำพืชเหล่านี้มาใช้ควรพิจารณาถึงข้อจำกัดของพืชแต่ละชนิดด้วย เช่น สะเดาและใบฝรั่งเป็นพืชที่ประกอบด้วยแทนนิน ซึ่งในสัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ และแทนนินยังเป็นสารต้านการใช้ประโยชน์จากโภชนะในสัตว์กระเพาะเดี่ยวโดยการไปจับตัวกับโภชนะต่างๆ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปย่อยสารอาหารได้

ตารางที่ 2.4 สารฟลาโวนอยด์ในพืชเขตร้อนชนิดต่างๆ

Sample	ชื่อภาษาไทย	Content (mg/kg DM)					Reference
		TF	M	Q	L	K	
Sida acuta Burm.f.	หญ้าขัดมอญ	8,500	NA	NA	NA	NA	1
Sida acuta Burm.f.	หญ้าขัดมอญ	9,800	NA	NA	NA	NA	2
Mulberry	ใบหม่อน	-	2,500	-	-	-	3
Green tea	ชาเขียว	-	1,560	830	-	1,790	4
Back tea	ชาดำ	-	240	400	-	1,720	
Red chili	พริกแดง	890	29.5	799.5	-	-	
Bird chili	พริกขี้นก	1,663	236	392	1,035	-	
Onion leaves	ใบหอม	2,720	-	1,497.5	391	832	
Garlic	กระเทียม	957	693	47	-	-	
Papaya shoots	ยอดมะละกอ	1,264	-	811	-	453	
Guava leaves	ใบฝรั่ง	1,128	549.5	-	-	-	
Turmeric	ขมิ้น	92	92.5	-	-	-	
Belimbi leaves	ใบตะลิงปลิง	532	27	40.5	465	-	5
Fern shoots	ยอดผักกูด	213	-	213	-	-	
Lady's fingers	กระเจี๊ยบเขียว	260	54.5	205.5	-	-	
Angular loofha	บวบ	675.5	433.5	242	-	-	
Local celery	ขึ้นฉ่าย	419	-	-	80.5	-	
Daun turi	ใบแคร์	306	27	18.5	-	21	
Semambu leaves	ใบสะเดา	2,041	853	1,188	-	-	
Kesom	ผักแพรว	308.5	126.5	182	-	-	
Pegaga	ใบบัวบก	444	-	423.5	-	20.5	

หมายเหตุ: 1= Jindal et al. (2012); 2 = Edeoga et al. (2005); 3 = Lin and Tang (2007); 4 = Wang and Helliwell (1998); 5 = Mieam and Mohamed (2001); TF; total flavonoids, M; myricetin, Q; quercetin, L; luteolin, K; keamferrol

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.3.2.2 การศึกษาสารฟลาโวนอยด์เชิงปริมาณในหญ้าขัดมอญใบยาว (*Sida acuta* Burm.f.)

ปริมาณฟลาโวนอยด์ในส่วนต่างๆ ของหญ้าขัดมอญใบยาว (*Sida acuta* Burm.f.) แสดงในตารางที่ 2.5 ทั้งนี้หญ้าขัดมอญเป็นพืชในวงศ์ *Malvaceae* พบได้ในเขตร้อนถึงอบอุ่น มี 4 สายพันธุหลักๆ ที่นิยมนำมาศึกษาและใช้เป็นสมุนไพรประกอบด้วย หญ้าขัดมอญใบป้อม (*Sida cordifolia* L.) หญ้าขัดมอญหลวง (*S. corylifolia* Wall.) หญ้าขัดมอญใบมน (*S. rhombifolia* L.) และหญ้าขัดมอญใบยาว (*S. acuta* Burm. f.) (Halde, 2011) แต่พบว่าหญ้าขัดมอญใบยาวเป็นสายพันธุ์ที่ตรวจพบสารพฤกษเคมี (phytochemicals) หลากหลายชนิดมากกว่าสายพันธุ์อื่น (Asha et al., 2018) อาทิ ซาโปนิน (saponin) สเตียรอยด์ (steroid) แทนนิน (tannin) ฟีโนลิก (phenolic) คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiacglycoside) แอลคาลอยด์ (alkaloid) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) (Nacoulma, 1996; Konate et al., 2010; Ramai et al., 2014; Asha et al., 2018) โดยสารพฤกษเคมีหลัก ๆ อยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์ ทั้งนี้สารออกฤทธิ์สามารถพบได้ทั้งในรากและใบ แต่ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่พบมากสุดในใบ (Prakash et al., 1981; Konate et al., 2010; Ramai et al., 2014) นอกจากคุณสมบัติต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสแล้วฟลาโวนอยด์ยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Yao et al., 2004; Van and Montoro, 2009) ต้านแบคทีเรีย (antibacterial) ต้านการอักเสบ (anti-inflamatory) (Iniaghe et al., 2009)

ตารางที่ 2.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบฟลาโวนอยด์เชิงปริมาณในหญ้าขัดมอญใบยาว (*Sida acuta* Burm.f.)

Part	Flavonoids(mg/g DM)		
	Free	Bound with sugar	Total
Root	4.25	0.5	4.75
Stem	5.0	0.45	5.45
Leaf	8.15	0.35	8.5
Bud	4.10	1.75	5.85

ที่มา: Jindal et al. (2010)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.3.2.3 ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยกลุ่มสารฟลาโวนอยด์

สารฟลาโวนอยด์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเป็นสารในกลุ่มลูทิโอลิน เคมเฟอรอล เควอซิติน และไมริซิติน ดังแสดงในตารางที่ 2.6 โดยเควอซิติน เคมเฟอรอล และลูทิโอลิน มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสสูง เนื่องจากเป็นกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ที่ประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และตำแหน่งที่ 7 ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Nagao et al., 1990) รวมถึง Cotelle et al. (1996) รายงานว่าลูทิโอลิน มีคุณสมบัติการยับยั้งการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสแบบแข่งขัน (competitive) โดยอธิบายว่า 7-OH ของลูทิโอลินถูกเติมลงตำแหน่งของคาร์บอนที่ 2 หรือ 6 ของแซนทีน ได้เป็น 2-OH หรือ 6-OH ซึ่งเป็นบริเวณเร่งต่อเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเช่นเดียวกันกับ เควอซิติน เคมเฟอรอล ที่มีคุณสมบัติการยับยั้งแบบแข่งขัน (Chang et al., 1993) ฉะนั้นจะเห็นได้ว่า ลูทิโอลิน เคมเฟอรอล และเควอซิติน เป็นโครงสร้างที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสสูง เนื่องจากประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และตำแหน่งที่ 7 แต่อย่างไรก็ตาม Nagao et al. (1990) รายงานว่าในโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 เพียงอย่างเดียวไม่ได้บ่งชี้ถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส นอกจากนี้ยังพบว่า (+)-แคทเทชิน (catechin) และ (-)-อิพิแคทเทชิน (epicatechin) เป็นโครงที่ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส จากการศึกษาของ Nagao et al. (1990) รายงานว่าสารฟลาโวนอยด์ที่มีโครงสร้างแบบ planar เป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสมากกว่ากลุ่มที่มีโครงสร้างแบบ non-planar ดังนั้นจากผลที่ได้แสดงในตารางที่ 2.6 พบว่าโครงสร้างของสารกลุ่ม ฟลาโวโนน เช่น (+)-แคทเทชิน และ (-)-อิพิแคทเทชินจึงเป็นโครงสร้างที่ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

2.3.2.4 ผลของสารฟลาโวนอยด์ต่อการต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาผลของฟลาโวนอยด์ต่อการต้านอนุมูลอิสระดังแสดงในตารางที่ 2.7 พบว่าสารฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยสารฟลาโวนอยด์ที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์จะป้องกันกรดไขมันไม่อิ่มไม่ให้ถูกออกซิไดซ์ ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับกรดวิตามินซี (Havsteen, 2002) สอดคล้องกับการรายงานของ Singh et al. (2005); Podsedek et al. (2007) นอกจากนี้ Van and Montoro (2009) รายงานว่าฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 2.6 ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยกลุ่มของสารฟลาโวนอยด์

Class	**Compound**	**Substituent**	**IC_{50} value (μm)**	**Ki value (μm)**
Flavone	Chrysin	5,7-OH	5.02	
	Luteolin	5,7,3',4'-OH	0.96	0.31
	Flavones	-	no inhibition	
Flavonol	Kaempferol	3,5,7,4'-OH	0.67	0.23
	Quercetin	3,5,7,3',4'-OH	0.44	0.28
	Myricitin	3,5,7,3',4',5'-OH	1.27	0.75
	Rhamnetin	3,5,3',4'-OH;7-OMe	>50	
	Isorhamnetin	3,5,7,3'-OH;4-OH	0.40	0.17
	Tangertin	3,5-OH;6,7,8-OMe	>100	
	Rutin	5,7,3',4'-OH;3-*o*-rutin	46.8	
Isoflavone	Genistein	5,7,4'-OH	83.0	
	Daidzein	7,4'-OH	>100	
Flavonone	Hesperetin	5,7,3'-OH;4'-OMe	27.4	
Flavononol	Taxifolin	3,5,7,3',4'-OH	>100	
Flavanol	(+)-Catechin	3,5,7,3',4'-OH	no inhibition	
	(-)-Epicatechin	3,5,7,3',4'-OH	no inhibition	
	(-)-Epigallocatechin	3,5,7,3',4'.5'-OH	>100	

ที่มา: Nagao et al. (1990)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.7 ผลของสารฟลาโวนอยด์ต่อการต้านอนุมูลอิสระ

Reference	Key finding
Havsteen (2002)	The flavonoids in the cell membrane can protect the unsaturated fatty acids (UFA) against oxidants as ascorbic acid
Singh et al. (2005)	The flavonoids compounds can acting as primary antioxidant free-radical and works as a part of cellular antioxidant systems
Podsedek et al. (2007)	The predominant compounds in flavonoids such as quercetin and kaempferol which display free radical scavenging activity and induce protective enzymes
Van and Montoro. (2009)	The flavonoids and other compositions with a variety of biological functions, such as improving growth performance, nutrient digestibility, and antioxidant activities of animals

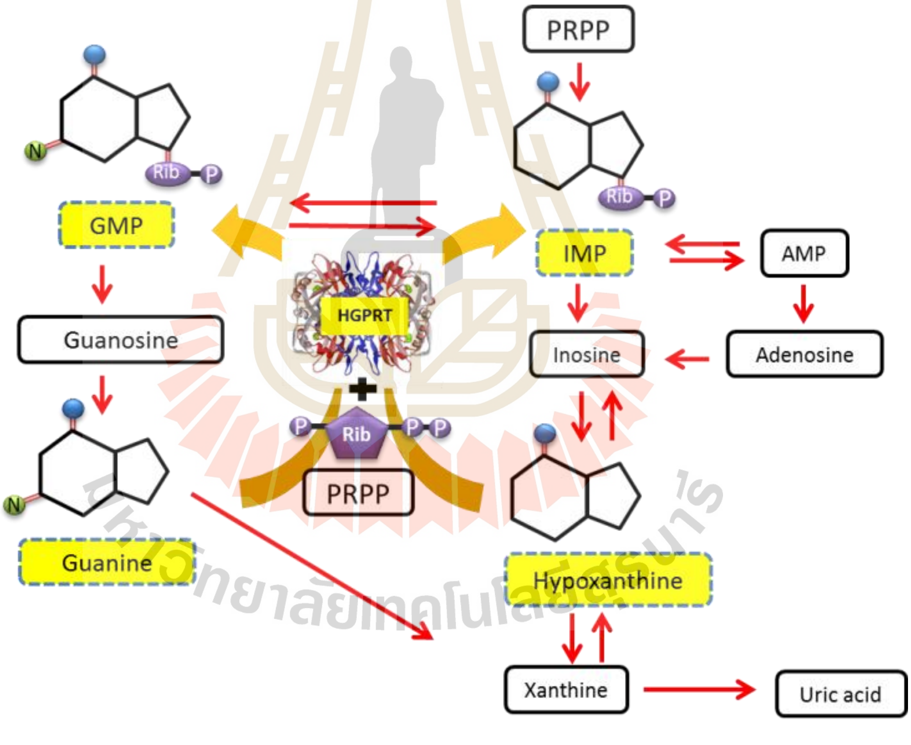
2.3.3 เอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส (Hypoxanthine phosphoribosyl transferase; HPRT)

เอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนสารไฮโพแซนทีนเป็น IMP ในกระบวนการสังเคราะห์พิวรีนนิวคลีโอไทด์โดยวิถีกู้คืน (salvage pathway) โดยปกติประมาณ 90% ของสารไฮโพแซนทีน จะถูกกู้กลับนำมาใช้ใหม่โดยวิถีกู้คืนโดยให้อยู่ในรูป IMP ดังภาพที่ 2.7 โดยการสังเคราะห์ IMP ในวิถีกู้คืนต้องการ Phosphoribosyl-pyrophosphate (PRPP) กับ ATP และต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮ HPRT เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Saugstad, 1998) จากกลไกดังกล่าวจึงทำให้สามารถเปลี่ยนสารไฮโพแซนทีนซึ่งเป็นอนุพันธ์พิวรีนตัวสำคัญที่มีบทบาทต่อการเกิดโรคเกาต์ในอนาคตโดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูป IMP ซึ่ง IMP คือสารให้รสชาติอร่อยในเนื้อสัตว์ (Vani et al., 2006)

2.3.3.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีกู้คืนพิวรีนที่สามารถพบได้ในพืช

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการกู้คืนพิวรีนนิวคลีโอไทด์ที่สามารถพบในพืชแสดงในตารางที่ 2.8 โดยพบว่าแก่นตะวัน (*Jerusalem artichoke*) เป็นพืชที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีเอนไซม์ HPRT ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการกู้คืนสารไฮโพแซนทีนเป็น IMP (Koyama et al., 2003) อีกทั้งแก่นตะวันยังสามารถเพาะปลูกได้ในประเทศไทยและถูกจัดให้เป็นพืชสมุนไพร ดังนั้นจึงถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เช่น ช่วยลดความอ้วนและป้องกันโรคเบาหวาน (นิมิต และสนั่น, 2549) ส่วนพืชชนิดอื่นๆ ที่พบเอนไซม์อะดิโนซินมอนอฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส หรือ APRT โดย APRT กู้คืน อะดิโนซิน (adenosine) เป็นอะดิโนซินมอนอ

ฟอสเฟส (AMP) และเปลี่ยนต่อเป็นอิ IMP (Koyama et al., 2003) เช่น แพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) มะเขือเทศพวง (*Lycopersicon esculentum*) ผักกาดเขียว (*Brassica juncea*) และน้ำยางพารา (*Hevea brasiliensis*) พืชเหล่านี้ถือว่าเป็นพืชที่มีความน่าสนใจเนื่องจากสามารถเพาะปลูกได้ในประเทศได้เช่นกัน แต่ทั้งนี้ในการเลือกวัตถุดิบเพื่อใช้เป็นสารเสริมในอาหารไก่ควรพิจารณาถึงราคา ฤดูกาลเพาะปลูก สารพิษที่อาจก่อให้เกิดโทษในวัตถุดิบ เช่น น้ำยางพารา จะมีโปรตีนลาเท็กซ์ซึ่งเป็นสารก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ (กนกวรรณ และคณะ, 2557) น้ำยางจากรากแพงพวยฝรั่ง จะมีสารพิษเช่นวินซีน (vinceine) ยูโซริก แอซิด (ursolic acid) เรสเซอปีน (reserpine) เรสซินนามีน (rescinnamine) เป็นต้น ทำให้เกิดอาการประสาทหลอน (Homeonlines, 2558) ดังนั้นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ในวิถีกู้คืนพิวรีนนิวคลีโอไทด์ที่ดี คือ แก่นตะวัน (*Jerusalem artichoke*)



ภาพที่ 2.7 กลไกการกู้คืนพิวรีนนิวคลีโอไทด์โดยเอนไซม์ HPRT

ที่มา: Meek et al. (2016)

ตารางที่ 2.8 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีกู้คืนพิวรีนที่สามารถพบได้ในพืช

Plant source	Activity enzyme	Part	References
Catharanthus roseus	APRT	Cell	Hirose and Ashihara. (1983a)
Lycopersicon esculentum	APRT	Roots, Leaves	Burch and Stuchbury. (1986)
Brassica juncea	APRT	Leaves	Moffatt and Somerville (1990)
Arabidopsis thaliana	APRT	Leaves	Lee and Moffatt. (1993)
Hevea brasiliensis	APRT	Latex	Gallois et al. (1996)
white spruce	APRT	Leaves	Ashihara et al. (1997;2000)
Jerusalem artichoke	HPRT	Shoots	Le Floc'h and Lafleuriel (1981)

หมายเหตุ: APRT; adenine phosphoribosyl-transferase, HPRT; hypoxanthine phosphoribosyl-transferase

ที่มา: ปรับจาก Ashihara et al. (2018)

ดังนั้นจากการวิเคราะห์และรวบรวมเอกสารในครั้งนี้จึงอาจมีความเป็นไปได้ในการใช้สารฟลาโวนอยด์ในหญ้าขัดมอญใบยาวและเอนไซม์ HPRT ในแก่นตะวันลดพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อไก่ เพื่อท้ายที่สุดจะสามารถลดข้อจำกัดในการบริโภคเนื้อไก่ สำหรับคนเป็นโรคเกาต์หรือคนที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเกาต์ลงได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดลองที่ 1 : การศึกษาปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส (HPRT) ในแก่นตะวัน และสารออกฤทธิ์ในหญ้าขัดมอญใบยาว ฤทธิ์ต้านการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาปริมาณเอนไซม์ HPRT ในแก่นตะวัน และสารออกฤทธิ์ในหญ้าขัดมอญใบยาวซึ่งประกอบด้วยสารออกฤทธิ์หลักๆ คือ เคมเฟอรอล (kaempferol) ต่อการต้านการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการทดลองที่ 2 และ 3 ต่อไป

3.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ HPRT คือแก่นตะวันโดยใช้ส่วนของหัวใต้ดิน นำมาทำความสะอาดจากนั้นนำมาสับเป็นชิ้นขนาดเล็กและอบที่อุณภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-5 วัน ซึ่งจะรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 37°C ตลอดระยะเวลาในการอบเพื่อลดการสูญเสียสภาพของเอนไซม์จากการถูกทำลายโดยความร้อน จากนั้นนำวัตถุดิบมาบดละเอียดผ่านตะแกรง ขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อเตรียมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ ความชื้น เถ้า โปรตีน เยื่อใย ไขมัน และปริมาณเอนไซม์ HPRT

ทำการเก็บรวบรวมหญ้าขัดมอญใบยาวระหว่างเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม (ระยะก่อนออกดอก) นำเฉพาะส่วนใบมาทำความสะอาด และอบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำมาบดละเอียดผ่านตะแกรง 1 มิลลิเมตร เพื่อเตรียมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ ความชื้น เถ้า โปรตีน เยื่อใย ไขมัน สกัดสารออกฤทธิ์ และเก็บสารสกัดไว้เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส (HPRT) ในแก่นตะวัน

3.1.2.1 การสกัดเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส

การสกัดเอนไซม์ประยุกต์ตามวิธีการของ Davies (1970) ชั่งผงแก่นตะวัน 1 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารผสมอะซิโตนเย็น (สารอะซิโตนที่ประกอบด้วยกลีเซอรอล 1% v/v และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.05% v/v; เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C) 8 มิลลิลิตร และกวนสารบนเครื่องกวนสารละลายด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ด้วยความเร็วรอบ 300 rpm

เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง และผสมด้วยสารผสมอะซิโตนเย็นอีก ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนำสารละลายและตะกอนไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งและนำตะกอนตัวอย่างที่ได้เติมด้วยสารละลายฟอสเฟตบับเฟอร์ (KH_2PO_4) pH 7.5 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใช้แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) คนด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่ $4^{0}C$ เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสโดยทันที

3.1.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส

การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสในหลอดทดลองครั้งนี้ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (PRECICE® HPRT Assay kit, NOVOCIB) โดยวัดการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารไฮโพแซนทีนเป็น IMP และเปลี่ยน IMP เป็นแซนโทซีนมอนอฟอสเฟส ซึ่งในขั้นตอนนี้ได้ผลิตภัณฑ์ร่วม คือ $NADH_2$ ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่จำเพาะ ดังนั้นในการวัดการเกิดปฏิกิริยาจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $NADH_2$ ที่ 340 นาโนเมตร และใช้สารละลายเร่งปฏิกิริยา (reaction buffer) เป็นตัวควบคุม (blank) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวนค่าการทำงานและปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสดังสมการ

$$\text{HPRT activity (nmol/ml/hour)} = [(AR_{sample} - AR_{blank}) / ({}^{1}6220 \times {}^{2}0.789)]$$

หมายเหตุ:
- AR_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่าง
- AR_{blank} คือค่าการดูดกลืนแสงตัวควบคุม
- ${}^{1}6220$ คือค่าสัมประสิทธิ์ของ NADH ที่ 340 นาโนเมตร
- ${}^{2}0.789$ คือค่าสัมประสิทธิ์ระยะทางที่แสงเคลื่อนที่ (path length) ของ 96 well microplate ด้วยปริมาตร 200 ไมโครลิตร

$$N_{sample} = [(HA_{sample} \times N_{std}\,(mU)) / HA_{std}]$$

หมายเหตุ:
- N_{sample} คือปริมาณเอนไซม์ของตัวอย่าง (mU)
- HA_{sample} คือค่าการทำงานเอนไซม์ HPRT ของตัวอย่าง
- N_{std} คือปริมาณเอนไซม์ HPRT ของ purified HPRT (75 mU)
- HA_{std} คือค่าการทำงานเอนไซม์ HPRT ของ purified HPRT

3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของหญ้าขัดมอญใบยาวในหลอดทดลอง

3.1.3.1 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์

การสกัดฟลาโวนอยด์วิเคราะห์ตามวิธี Jindal et al. (2012) ชั่งตัวอย่างบดละเอียด 1 กรัม เติมเอทานอล 80% จำนวน 80 มิลลิลิตร นำไปสกัดที่อุณหภูมิ 90^{o}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) และเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ชนิดละ 80 มิลลิลิตร ทิ้งให้แยกชั้นในกรวยแยกชั้น เก็บเฉพาะสารสกัดส่วนบนและเติมด้วยซัลฟิวริกเข้มข้น 7% จำนวน 80 มิลลิลิตร สกัดต่ออีก 2 ชั่วโมง นำไปประเหยสารละลายออก ชั่งน้ำหนักเพื่อนำไปคำนวนสาร ฟลาโวนอยด์ (crude flavonoids) และนำสารสกัดที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20^{o}C เพื่อรอวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Ghasemzadeh et al., 2010) ทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.1.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) ในหลอดทดลอง

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสจากสารสกัดที่ได้ในข้อ 3.1.3.1 ด้วยการวัดการสร้างกรดยูริกโดยประยุกต์วิธีของ Sarawek (2007) ดังนี้ เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (KH_2PO_4) (pH 7.8) ความเข้มข้น 0.1 โมล สารแซนทีนบัฟเฟอร์ ($C_5H_4N_4O_2$) ความเข้มข้น 400 ไมโครโมล และเอนไซม์แซนทีน 0.4 ยูนิต/มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นเอนไซม์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 มิลลิโมล (pH 7.8) ในการทดลองครั้งนี้ใช้ยาอัลโลพูรินอลเป็นสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 100 และ 400 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และเตรียมสารสกัดจากหญ้าขัดมอญในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิโมล ที่ระดับความเข้ม 100 300 500 และ 1000 ไมโครกรัมสารสกัด/มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายแซนทีนบัฟเฟอร์ และเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (0.4 ยูนิต/มิลลิลิตร) ลงในหลอดสารละลายมาตรฐานและหลอดตัวอย่าง นำไปบ่มที่อุณภูมิ 37^{o}C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (0.4 ยูนิต/มิลลิลิตร) เป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวน % xanthine oxidase inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Xanthine oxidase inhibition} = (1-B/A) \times 100$$

หมายเหตุ: A คือค่าการเปลี่ยนการดูดกลืนแสงตัวควบคุม Δ abs (with enzyme - without enzyme)

B คือค่าการเปลี่ยนการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง Δ abs (with enzyme -without enzyme)

3.1.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการวัดปฏิกิริยาออกซิเดชันประยุกต์วิธีการจาก Lin et al. (2016) โดยการเตรียมสาร DPPH ในสารละลายเอทานอล (0.1 ไมโครโมล) และเติมสารสกัดหญ้าขัดมอญใบยาวที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ (0-1 มิลลิกรัมสารสกัด/มิลลิลิตร) นำไปผสมเข้าด้วยกัน ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้กรดวิตมินซีเป็นตัวเปรียบเทียบ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวนเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังสมการ

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = 100 - [(A0-A1)/A0] \times 100$$

หมายเหตุ: A0 คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

A1 คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันที่ระดับต่างๆ ต่อการย่อยได้ของโภชนะ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริก ในพลาสมาและมูลของไก่โคราช

เพื่อศึกษาหาระดับการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันเบื้องต้นในอาหารไก่โคราชต่อการย่อยได้และการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริกในพลาสมาและมูล โดยเปรียบเทียบกับยาอัลโลพูรินอล ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคเกาต์ ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้จะใช้สำหรับการทดลองที่ 3 ต่อไป โดยจะพิจารณาและคัดเลือกระดับการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันที่มีผลต่อการลดความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริกในพลาสมาและมูล รวมทั้งการส่งเสริมการทำงานเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเลือดที่ดีที่สุด โดยไม่ส่งผลกระทบด้านลบต่อการย่อยได้ของโภชนะ

3.2.1 สัตว์และการจัดกลุ่มทดลอง

ใช้ไก่เนื้อโคราช จำนวน 64 ตัว ด้วยการเลี้ยงแบบคละเพศ โดยลูกไก่ที่อายุ 1 วันเลี้ยงภายใต้โรงเรือนและการให้อาหารตามคำแนะนำและการควบคุมของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และไก่ทุกตัวจะได้รับวัคซีนป้องกันโรคมาเร็ก มาจากโรงฟักของฟาร์มมหาวิทยาลัย ได้รับวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล และหลอดลมอักเสบ ที่อายุ 7 และ 21 วัน และได้รับวัคซีนป้องกัน

โรคกัมโบโร ที่อายุ 14 วัน เมื่อครบอายุ 3 สัปดาห์ สุ่มไก่เข้างานทดลองที่จัดแบ่งตามน้ำหนักตัว แบ่งไก่ออกเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 8 ซ้ำๆ ละ 1 ตัว เลี้ยงบนกรงขังเดี่ยว (metabolic cage) เพื่อเก็บตัวอย่างเลือดและมูลวิเคราะห์การย่อยได้และใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์ พิวรีน กรดยูริกในพลาสมาและมูล รวมทั้งการทำงานเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเลือด มีระยะเวลาในการทดลอง 10 วันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ไก่ทุกตัวจะได้รับปริมาณอาหารเท่ากันและให้น้ำแบบเต็มที่ตลอดการทดลอง

3.2.2 อาหารทดลอง

เป็นการทดสอบหาระดับที่เหมาะสมเบื้องต้นในการเสริมวัตถุดิบแหล่งฟลาโวนอยด์และแหล่งเอนไซม์ HPRT ในอาหารไก่โคราช แสดงในตารางที่ 3.1 สูตรอาหารทดลองทั้งหมดคำนวณให้มีระดับของโปรตีนและพลังงานเท่ากันตามคำแนะนำของ Maliwan (2016)

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารทดลองที่มีการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันที่ระดับแตกต่างกัน

Control (Negative control)			**(T1)**
	Percent in diet (%)	Active ingredients in diet	
Allopurinol (Positive control)	0.0025	25 mg/kg diet	(T2)
	0.28	25 mg/kg diet	(T3)
Sida acuta Burm.f.	0.56	50 mg/kg diet	(T4)
	1.12	100 mg/kg diet	(T5)
	1.50	205 mU/kg diet	(T6)
Jurusalem artichoke	3.00	410 mU/kg diet	(T7)
	4.50	615 mU/kg diet	(T8)

หมายเหตุ: mg = milligram; kg = kilogram; mU = milli-unit

3.2.3 การเก็บข้อมูล

3.2.3.1 การเก็บมูลเพื่อวัดการย่อยได้ของโภชนะและพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริก

ทำการเก็บมูลที่ไก่ขับถ่ายออกมาวันละ 1 ครั้ง ในช่วง 4 วัน สุดท้ายของการทดลองสเปรย์มูลที่เก็บได้ในแต่ละวันด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5% เพื่อป้องกันการสูญเสียไนโตรเจน และนำมูลของไก่แต่ละกลุ่มการทดลองที่ได้รับในแต่ละวันไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55°C นำมาบดละเอียดใส่ถุงพลาสติกและเก็บไว้เพื่อรอการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

3.2.3.2 การเก็บพลาสมาเพื่อวิเคราะห์สารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริก

การเก็บพลาสมาเพื่อวิเคราะห์สารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกตามวิธีของ Carro et al. (2010) เมื่อสิ้นสุดงานทดลอง ทำการสุ่มไก่กลุ่มการทดลองละ 8 ตัว หลังการอดอาหาร 2 ชั่วโมง ทำการเก็บเลือดจากเส้นเลือดบริเวณปีก (wing vein) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างเลือดในหลอดเฮพารีน (heparinized) ทันที หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดมาปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที สามารถเก็บส่วนพลาสมาไว้ที่ -80^{0}C เพื่อรอวิเคราะห์สารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริก

3.2.3.3 การเก็บพลาสมาเพื่อวิเคราะห์สารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริก

การเก็บซีรัมเพื่อวิเคราะห์การทำงานเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีของ Lin et al. (2016) เมื่อสิ้นสุดงานทดลอง ทำการสุ่มไก่กลุ่มการทดลองละ 8 ตัว เก็บเลือดจากเส้นเลือดบริเวณปีก (wing vein) จำนวน 3 มิลลิลิตร หลังการอดอาหาร 2 ชั่วโมง และทิ้งให้เกิดการแยกชั้นจนได้ซีรัม นำซีรัมมาปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 x g อุณหภูมิ 4^{0}C เป็นเวลา 30 นาที เก็บซีรัมส่วนบนไว้ที่ -4^{0}C เพื่อรอการวิเคราะห์การทำงานเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

3.2.4 การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกน้ำหนักตัว ปริมาณการกินได้ในแต่ละวัน และบันทึกทุกครั้งที่มีไก่ตาย

3.2.5 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.2.5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในวัตถุดิบและสูตรอาหาร

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหญ้าขัดมอญ แก่นตะวัน และสูตรอาหารในการทดลอง คือ ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และการวิเคราะห์พลังงานรวม (AOAC, 1980)

3.2.5.2 การวิเคราะห์ย่อยได้ของโภชนะ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารและมูล คือ ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน และสารอินทรีย์ (AOAC, 1980) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวนการย่อยได้ และการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะดังสมการ

$$\text{\% การย่อยได้ของสิ่งแห้ง (Dry matter digestibility)} = \frac{\text{(น้ำหนักอาหารที่กิน – น้ำหนักมูล) *100}}{\text{น้ำหนักอาหารที่กิน}}$$

% การย่อยได้ของโภชนะ (Nutrient digestibility)

$$= \frac{\text{[(น.น.อาหารที่กิน \%โภชนะอาหาร) - (น.น.มูล \%โภชนะมูล)] *100}}{\text{(น้ำหนักอาหารที่กิน \%โภชนะในอาหาร)}}$$

3.2.5.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกในพลาสมา

การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริกในพลาสมา ตามวิธีการของ Bierau (2011) โดยดูดพลาสมาจำนวน 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2 โมล เขย่าให้เข้ากันและวางทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 10 นาที ขั้นตอนนี้เป็นการกำจัดโปรตีนออกจากตัวอย่าง (deproteinize) เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 20,000 rpm ที่ 4^{0}C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใส 300 ไมโครลิตร และเติมด้วยสารละลายฟีนอลเรด 5% (w/v) 10 ไมโครลิตร สารละลาย KOH (4 โมล)+KH2PO4 (1 โมล) ผสมกัน 1:1 แล้วดูดมา 100 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันและวางทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 20,000 rpm ที่ 4^{0}C เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสด้วยตัวกรองไนลอน 0.2 ไมโครเมตร (0.2 µm nylon membrance; SiliCycle Syringe) ลงในขวดแก้วบรรจุสารฉีด และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) กำหนดปริมาตรฉีดสารเข้าคอลัมน์ที่ 20 ไมโครลิตร ใช้ reversed phase column (SD, C18, 250 cm) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ใช้ KH_2PO_4 0.02M เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ปรับค่า pH ให้ได้ 3.4 ด้วยกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) การระบุพีคสารพิวรีนแต่ละชนิดในตัวอย่างจะใช้ค่าเวลาการออกของสาร (retention time) แต่ละชนิดในตัวอย่างเทียบกับค่าเวลาการออกของสารพิวรีนมาตรฐานแต่ละชนิด การคำนวนความเข้มข้นสารพิวรีนแต่ละตัวจะใช้วิธี external standard ดังสมการ

$$Rf = As/ns$$

$$Ci = f*Ai/Rf$$

หมายเหตุ: Rf คือ response factor ($nmol^{-1}$)
As คือพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานพิวรีนแต่ละตัว
ns คือปริมาณสารมาตรฐานพิวรีนแต่ละตัวที่ฉีดเข้าคอลัมน์ (nmol)
Ci คือความเข้มข้นสารพิวรีนแต่ละตัวในตัวอย่าง
Ai คือพื้นที่ใต้กราฟสารพิวรีนแต่ละตัวในตัวอย่าง
f คือปริมาณการเจือจางตัวอย่าง (dilution factor)

3.2.5.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกในมูล

การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกในมูลประยุกต์ตามวิธีการของ Lou et al. (2005) ชั่งมูลไก่บดละเอียด 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง

เติมสารผสม (trifloroacetic acid : formic acid : DI water; 5:5:1; v/v/v) จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปย่อยด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิหลุมความร้อนแบบดิจิตอล (heating box) ที่อุณหภูมิ 100^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ตั้งสารสกัดทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเทสารสกัดใส่ขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร นำไปปกลั่นเพื่อระเหยกรดออกจากตัวอย่าง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นเติม KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.02 โมล 10 มิลลิลิตร ลงในตะกอนตัวอย่าง และแช่ใน ultrasonic water bath เป็นเวลา 5 นาที เพื่อละลายตะกอนตัวอย่าง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายตัวอย่างใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 20,000 rpm ที่ 4^{0}C เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสด้วยตัวกรองไนลอน 0.2 ไมโครเมตรลงในขวดแก้วบรรจุสารฉีด และนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกตามข้อ 3.2.4.3

3.2.5.5 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในซีรัม

วิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) ตามวิธีการของ Lin et al. (2016) โดยนำตัวอย่างซีรัมมาทดสอบการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป (SOD determination kit,Sigma Aldrich) และคำนวนการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสดังสมการ

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{[(\text{Ablank 1} - \text{Ablank 3}) - (\text{Asample} - \text{Ablank 2})] \times 100}{(\text{Ablank 1} - \text{Ablank 3})}$$

3.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variances, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Tukey HSD โดยใช้ SPSS 16.0 software และใช้ Orthogonal contrasts เพื่อเปรียบเทียบ 1) ความแตกต่างค่าเฉลี่ยในกลุ่มอาหารควบคุม vs. กลุ่มการเสริมอัลโลพูรินอล 2) ความแตกต่างค่าเฉลี่ยในกลุ่มอาหารควบคุม vs. กลุ่มการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาว 3) ความแตกต่างค่าเฉลี่ยในกลุ่มการเสริมอัลโลพูรินอล vs. กลุ่มการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาว 4) ความแตกต่างค่าเฉลี่ยในกลุ่มอาหารควบคุม vs. กลุ่มการเสริมแก่นตะวัน 5) ความแตกต่างค่าเฉลี่ยในกลุ่มการเสริมอัลโลพูรินอล vs. กลุ่มการเสริมแก่นตะวัน และ6) กลุ่มการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาว vs. กลุ่มการเสริมแก่นตะวัน

3.2.7 สถานที่ทำการทดลอง

3.2.7.1 ห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือกลาง อาคารเครื่องมือ 10

3.2.7.2 ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์กระเพาะเดี่ยว อาคารเครื่องมือ 14

3.2.7.3 งานสัตว์ปีก ฟาร์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2.8 ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลองระหว่างวันที่ 18 พฤษภาคม ถึง 23 มิถุนายน 2561

3.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวัน ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ การต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ การสะสมพิวรีนและอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อไก่โคราช

เพื่อศึกษาหาผลของการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันในอาหารไก่โคราช ในช่วงอายุ 1 วัน-12 สัปดาห์ โดยศึกษาผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ และปริมาณการสะสมสารพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อไก่ โดยคัดเลือกระดับการเสริมหญ้าขัดมอญและแก่นตะวันจากการทดลองที่ 2 ที่ส่งผลดีที่สุด โดยไม่มีผลกระทบต่อการย่อยได้และใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ

3.3.1 สัตว์และการจัดกลุ่มทดลอง

ใช้ไก่โคราชคละเพศ จำนวน 400 ตัว เลี้ยงภายใต้โรงเรือนตามคำแนะนำและการควบคุมของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ไก่ทุกตัวได้รับวัคซีนป้องกันโรคมาเร็กจากโรงฟักของฟาร์มมหาวิทยาลัย ได้รับวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล และหลอดลมอักเสบที่อายุ 7 และ 21 วัน และวัคซีนป้องกันโรคกัมโบโรที่อายุ 14 วัน โดยทำการสุ่มที่อายุ 1 วันเข้าสู่งานทดลองที่จัดแบ่งตามน้ำหนักตัว (body weight) ทำการแบ่งไก่ออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว ระยะเวลาในการทดลองทั้งหมด 12 สัปดาห์ ใช้แผนการทดลองแบบ Augmented Factorial in CRD (2x2+1) โดยให้ไก่ทุกตัวได้รับอาหารและน้ำแบบเต็มที่ตลอดการทดลอง (ad libitum)

3.3.2 อาหารทดลอง

เลือกระดับการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันที่ให้ผลดีที่สุด โดยไม่มีผลกระทบต่อการย่อยได้ของโภชนะจากการทดลองที่ 2 อาหารทดลองทั้งหมดคำนวณให้มีระดับของโปรตีนและพลังงานเท่ากันตามคำแนะนำของ Maliwan (2016) และแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 3.2

3.3.3 การบันทึกข้อมูล และลักษณะต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษา

3.3.3.1 บันทึกน้ำหนักตัว ปริมาณอาหารที่กิน โดยบันทึกปริมาณอาหารที่ให้และอาหารที่เหลือในแต่ละคอก และบันทึกอัตราการตายทุกครั้งที่มีไก่ตายตลอดการทดลอง เมื่อสิ้นสุดในแต่ระยะการเจริญเติบโต (ที่อายุ 3 6 9 และ12 สัปดาห์) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวนหาน้ำหนักตัว น้ำหนักตัวไก่ที่ขึ้นเพิ่ม อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการตาย

ตารางที่ 3.2 สูตรอาหารทดลองที่มีการเสริมหญ้าขัดมอญร่วมกับแก่นตะวันที่ระดับแตกต่างกัน

Treatment	*Sida acuta* Burm.f. Percentage in diet (active ingredient)	*Jerusalem artichoke* Percentage in diet (active ingredient)
Control (1)	-	-
(T2)	0.28% (flavonoid 25 mg/kg diet)	1.50% (HPRT 205 mU/kg diet)
(T3)	0.28% (flavonoid 25 mg/kg diet)	3.00% (HPRT 410 mU/kg diet)
(T4)	0.56% (flavonoid 50 mg/kg diet)	1.50% (HPRT 205 mU/kg diet)
(T5)	0.56% (flavonoid 50 mg/kg diet)	3.00% (HPRT 410 mU/kg diet)

3.3.3.2 เมื่อไก่ได้น้ำหนักที่ประมาณ 1.2 และ 1.8 kg (อายุ 9 และ12 สัปดาห์) ทำการสุ่มไก่แต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว และทำให้ตายตามหลักสวัสดิภาพสัตว์สากล เพื่อวัดคุณภาพซากคุณภาพเนื้อ และวิเคราะห์การสะสมสารพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อ ในส่วนของการเก็บตัวอย่างเนื้ออกเพื่อวัดเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเนื้อจะใช้สารคลอโรฟอร์มทำให้สัตว์สลบก่อนเชือด จากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้ออกและแช่ลงในโตรเจนเหลวทันที และเก็บไว้ที่ -40^{o}C จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์

3.3.4 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.3.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหารสัตว์และสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองคือ ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และการวิเคราะห์พลังงานรวม (AOAC, 1980)

3.3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิวรีน และอนุพันธุ์พิวรีน ในเนื้อ

การสกัดสารพิวรีนประยุกต์ตามวิธีของ ตามวิธี Lou et al. (2005) การเตรียมตัวอย่างเนื้ออกและเนื้อสะโพก นำตัวอย่างเนื้อมาปั่นให้เป็นชิ้นเล็ก คลุกเคล้าตัวอย่างให้เข้ากัน จากนั้นแยกส่วนที่เป็นเส้นและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่างๆ ออกจากตัวอย่างเนื้อ และนำตัวอย่างที่ได้ไป freeze-drying และสกัดด้วยไดเอทิลเอเทอร์เพื่อทำให้ตัวอย่างปราศจากไขมัน ปล่อยตัวอย่างให้แห้ง และนำมาบดด้วยเครื่องบดละเอียด (Wiley mill) ร่อนตัวอย่างบดละเอียดผ่านตะแกรง 0.5 มิลลิเมตร ชั่งตัวอย่างเนื้อออก หรือสะโพกที่บดละเอียด 100 มิลลิกรัมมาย่อยด้วยสารผสม (trifloroacetic acid : formic acid : DI water; 5:5:1; v/v/v) จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปย่อยด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิหลุมความร้อนแบบดิจิตอล (heating box) ที่อุณหภูมิ 100^{o}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทิ้งสารสกัดให้เย็น จากนั้นเทสารสกัดใส่ขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร นำไปปกลั่นเพื่อระเหยกรดออกจากตัวอย่าง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นเติม KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.02 โมล 10 มิลลิลิตร ลงในตะกอนตัวอย่างและแช่ใน ultrasonic water bath เป็นเวลา 5

นาที เพื่อละลายตะกอนตัวอย่าง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายตัวอย่างใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 20,000 rpm ที่ 4^{0}C เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสด้วยตัวกรองไนลอน 0.2 ไมโครเมตรลงในขวดแก้วบรรจุสารฉีด และนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นสารพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีน ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง

3.3.4.3 การวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างในเนื้อ

การวัดค่า pH โดยทำการวัดหลังเชือด 45 นาที หลังจากนั้นเก็บเนื้อไว้ในถุงพลาสติก และนำไปแช่เย็น (chilling) ที่อุณหภูมิ 4^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัด pH ซ้ำอีกครั้ง โดยใช้เครื่องมือวัด pH meters ซึ่งต้องวัดตัวอย่างที่จุดเดียวกัน โดยวัดบริเวณเนื้ออก ทำการวัดทั้งหมด 3 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.3.4.4 การวัดค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บ (drip loss)

นำตัวอย่างเนื้อมาตัดให้มีขนาด กว้างxยาวxหนา เท่ากับ 1 x 2.5 x 0.5 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักตัวอย่างเนื้อให้สม่ำเสมอกันและห่อด้วยผ้าก๊อซ 2 ชั้น พันอีกครั้งด้วยถุงพลาสติก นำไปแขวนในห้องเย็นอุณหภูมิ 4^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาชั่งน้ำหนัก และนำค่าที่ได้มาคำนวนตามสูตร

$$\%\ \text{การสูญเสียน้ำในระหว่างการเก็บ} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนแช่เย็น} - \text{น้ำหนักหลังแช่เย็น} \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนแช่เย็น}}$$

3.3.4.5 การวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear forces)

นำตัวอย่างเนื้อมาตัดให้มีขนาดกว้าง x ยาว x หนา เท่ากับ 1.5 x 3 x 0.5 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนัก บรรจุลงในถุงพลาสติกปิดสนิททนความร้อน นำไปต้มในอ่างน้ำร้อน 80^{0}C เป็นเวลา 10 นาที ทำให้อุณหภูมิลดลงให้เท่ากับอุณหภูมิห้อง โดยการนำไปแช่น้ำเย็น นำเนื้อมาตัดแต่งให้มีขนาด 1.0x2.0x0.5 เซนติเมตร นำไปวัดค่าแรงตัดผ่านด้วยเครื่อง Texture analyer รุ่น TA-XT2i โดยกำหนดอัตราการเคลื่อนที่ของใบมีด 2 มม./วินาที (Dawson et al., 1991)

3.3.4.6 การวัดค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังปรุงสุก (cooking loss)

ตัดตัวอย่างเนื้อหลังการเชือดที่ 24 ชั่วโมง ให้มีขนาด 3.0 x 4.0 x 0.5 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักและใส่ในถุงสูญญากาศ นำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอุณหภูมิภายในตัวอย่างถึง 77 องศาเซลเซียส โดยการวัดอุณหภูมิจุดกึ่งกลางภายในชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยเทอร์โมมิเตอร์ หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (Schilling et al., 2008)

$$\%\ \text{cooking loss} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างดิบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างสุก} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างดิบ}}$$

3.3.4.7 การวิเคราะห์ค่าการทำงานเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ

การสกัดเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเนื้อตามวิธีการของ Niu et al. (2016) เริ่มจากการทำให้สัตว์สลบ ด้วยวิธีการรมคลอโรฟอร์ม ก่อนการเชือด จากนั้นนำตัวอย่างชิ้นเนื้อออกแช่ลงในไนโตรเจนเหลว เมื่อถึงห้องแลปนำตัวอย่างดังกล่าวโฮโมจิไนส์ (homogenization) กับน้ำเกลือเข้มข้น 0.86% ในอัตราส่วน 1:9 (w/v) จนละเอียด และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารสะลายส่วนใสมาวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase หรือ SOD) โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป SOD determination kit (Sigma Aldrich, #19160) และคำนวนค่าการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในเนื้อตามวิธีในข้อ 3.2.4.5

3.3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ค่าความแปรปวน Analysis of Variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Augmented factorial in CRD (2x2) + 1 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยวิธี Orthogonal contrast และ Tukey HSD

3.3.6 สถานที่ทำการทดลอง

3.2.6.1 ห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือกลาง อาคารเครื่องมือ 10

3.2.6.2 ห้องปฏิบัติการโภชนะศาสตร์สัตว์กระเพาะเดี่ยว อาคารเครื่องมือ 14

3.2.6.3 งานสัตว์ปีก ฟาร์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3.7 ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลองระหว่างวันที่ 19 ตุลาคม 2561 ถึง 10 มกราคม 2562

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส (HPRT) ในแก่นตะวัน และสารออกฤทธิ์ในหญ้าขัดมอญใบยาว ฤทธิ์ต้านการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ HPRT และคุณค่าทางโภชนะเบื้องต้นในแก่นตะวันแสดงในตารางที่ 4.1 โดยพบว่าแก่นตะวันมีองค์ประกอบของสิ่งแห้ง 94.42% โปรตีน 5.87% เยื่อใย 3.53% เถ้า 7.14% และไขมัน 0.38% ซึ่งใกล้เคียงกับงานทดลองที่ได้มีการรายงานไว้ว่าแก่นตะวันมีค่าสิ่งแห้ง โปรตีน เยื่อใย เถ้า และไขมัน เป็น 93.30 7.02 5.64 9.05 และ 0.36% (Yildiz et al., 2006) และ 92.80 5.80 4.50 4.60 และ 0.70% (Kaewwongsa et al., 2013) ตามลำดับ ปริมาณเอนไซม์ HPRT เท่ากับ 13.65 มิลลิยูนิต/กรัม มีค่า K_m หรือค่าที่บอกถึงอัตกิริยาการเปลี่ยนสารไฮโพแซนทีนเป็นสารอิโนซินมอนอฟอสเฟสเท่ากับ 17.21 ไมโครโนโมล/มิลลิลิตร/ชั่วโมง ซึ่งมีค่าสูงกว่า Le Floc'h and Lafleuriel (1981) ที่ได้รายงานค่า K_m ของเอนไซม์เอนไซม์ HPRT ในแก่นตะวันเท่ากับ 6.1 ไมโครโมล ซึ่งค่อนข้างต่ำกว่าการทดลองในครั้งนี้ ความแตกต่างดังกล่าวอาจเป็นผลจากความบริสุทธิ์ของสารสกัดและความไม่เสถียรของเอนไซม์ ซึ่งควรเพิ่มกระบวนการสกัดและการทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ก่อนการทดสอบ (Le Folch’h and Lafleuriel, 1981)

คุณค่าทางโภชนะและสารออกฤทธิ์ในหญ้าขัดมอญใบยาวแสดงไว้ในตารางที่ 4.2 โดยพบว่าหญ้าขัดมอญใบยาวมีองค์ประกอบของสิ่งแห้ง 89.57%โปรตีน 20.91% เยื่อใย 14.38% เถ้า 10.85% และไขมัน 1.45% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่ได้มีการรายงานโดย Ramai et al. (2014) คือมี สิ่งแห้ง โปรตีน เยื่อใย เถ้า และไขมัน เท่ากับ 90.97 19.13 9.50 6.33 และ 0.87% ตามลำดับ หญ้าขัดมอญใบยาวมีสารฟลาโวนอยด์ (crude flavonoids) ทั้งหมด 8,930±0.76 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เคมเฟอรอล 311 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แต่ตรวจไม่พบเควอซิติน ซึ่งสารฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับ Jindal et al. (2012); Raimi et al. (2014) ที่รายงานการตรวจพบสารฟลาโวนอยด์ในหญ้าขัดมอญใบยาวมีค่าเท่ากับ 8,500 และ12,550 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ รวมถึงสารออกฤทธิ์ที่ตรวจพบสอดคล้องกับ Prakash et al. (1981) ที่รายงานว่าสารฟลาโวนอยด์ที่พบในหญ้าขัดมอญใบยาวมีสารออกฤทธิ์หลักๆ อยู่ในกลุ่มของ C.O-glycosylated flavonol และ kaempferol-diglycoside ทั้งนี้สารออกฤทธิ์สามารถพบได้ทั้งในรากและใบ แต่ปริมาณสารออกฤทธิ์ขึ้นอยู่กับลักษณะทาง

กายภาพ อาทิ ความอุดมสมบรูณ์ของลำต้น ขนาดใบ และช่วงอายุในการเก็บเกี่ยว โดยพบว่าที่อายุ 6 เดือน มีสารออกฤทธิ์มากที่สุด (Prakash et al., 1981) แต่อย่างไรก็ตามการใช้หญ้าขัดมอญใบยาวในอาหารไก่ ควรคำนึงถึงปริมาณเยื่อใยในอาหารโดยเฉพาะการเสริมในอาหารไก่เล็ก (0-3 สัปดาห์)

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส และคุณค่าทางโภชนะในแก่นตะวัน

Items	Amounts	
Dry matter (%)	94.42	
Crude protein (%)	5.87	
Crude fiber (%)	3.53	
Ash (%)	7.14	
Ether extract (%)	0.38	
Goss energy (kcal/kg)	3,772.48	
Enzyme source	**[1]HPRT activity (nmol/ml/hour)**	**Amount in material (mU)**
[2]purifeid HPRT	94.59	75.00
Jerusalem artichoke	17.21	13.65

หมายเหตุ: [1]HPRT activity (nmol/ml/hour) = calculated by equation according to assay kits, [2]purified HPRT = HPRT purified from human blood 1 ml; kg = kilogram; kcal = kilocalories; ml = milliliter; g = gram; mU = milli-unit

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์และคุณค่าทางโภชนะเบื้องต้นในหญ้าขัดมอญใบยาว

Items	Amounts
Dry matter (%)	89.57
Crude protein (%)	20.91
Crude fiber (%)	14.38
Ash (%)	10.85
Ether extract (%)	1.45
Goss energy (kcal/kg)	3,963.97
Crude flavonoid (mg/kg)	8,930±0.76
Keamferol (mg/kg)	311
Quercetin (mg/kg)	Not detected

หมายเหตุ: mg = milligram; kg = kilogram; kcal = kilocalories

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเทียบกับยาอัลโลพูรินอลแสดงในตารางที่ 4.3 โดยพบว่าความสามารถในการต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้น ตามระดับความเข้มข้นทั้งจากสารสกัดหญ้าขัดมอญใบยาวและยาอัลโลพูรินอลที่เพิ่มขึ้น โดยสารสกัดจากหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสมากกว่า 80% เนื่องจากโครงสร้างสารฟลาโวนอยด์ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) ที่คาร์บอนตำแหน่ง 5 และ 7 ซึ่งมีความสามารถในการยั้บยังการทำงานแซนทีนออกซิเดสสูง โดยหมู่ไฮดรอกซิลเหล่านี้จะถูกเติมลงในคาร์บอนของแซนทีนตำแหน่งที่ 2 และ 6 ซึ่งเป็นบริเวณเร่ง (active site) ต่อเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส จึงทำให้เอนไซม์แซนทีนออกซิเดสไม่สามารถเปลี่ยนแซนทีนไปเป็นผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้ายในรูปกรดยูริก ดังนั้นจึงเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสแบบแข่งขัน (Cotelle et al.,1996; Chang et al., 1993) ทั้งนี้ เคมเฟอรอลเป็นสารออกฤทธิ์หลักในหญ้าขัดมอญใบยาวโดยภายในโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 3, 5, 7, 4’-OH (Havsteen, 2002) และค่าความเข้มข้นสารออกฤทธิ์ยับยั้งได้ 50% หรือ IC_{50} ของสารสกัดจากหญ้าขัดมอญใบยาวและยาอัลโลพูรินอลในครั้งนี้เท่ากับ 464.29 ไมโครกรัมสารสกัด/มิลลิลิตร และ 70.27 ไมโครโมล หรือ 9.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าการยับยั้งในข้างต้นพบว่าสารสกัดจากหญ้าขัดมอญใบยาวมีฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสต่ำกว่ายาอัลโลพูรินอล 48.5 เท่า แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดจากหญ้าขัดมอญใบยาวถือเป็นสมุนไพรอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ต้านการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากหญ้าขัดมอญใบยาวเทียบกับวิตามินซีสังเคราะห์ (ascorbic acid) ด้วยการวัดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ตารางที่ 4.4) พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากหญ้าขัดมอญใบยาวและวิตามินซีสังเคราะห์เพิ่มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยค่าความเข้มข้นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ 50% หรือ IC_{50} ของสารสกัดจากหญ้าขัดมอญใบยาวและกรดวิตามินซีสังเคราะห์เท่ากับ 13.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 9.79 ไมโครโมล หรือ 1.72 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองสอดคล้องกับการายงานของ Barros et al. (2011) ที่รายงานว่าฟลาโวนอยด์มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ (ROS) ด้วยการจับแบบคีเลต (chelate) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ของฟลาโวนอยด์กับโลหะไอออน (metal ions) หรือออกซิเจนเรดิคอล (oxygen radicals; O_2^-) อาทิ การจับของเคมเฟอรอล (keampferol) กับเฟอรัสไอออน (ferrous ion; Fe^{2+}, Fe^{3+}) (Maria et al., 2015) ซึ่งคุณสมบัตินี้คล้ายกับการต้านอนุมูลอิสระของกรดวิตามินซี (Rice-Evans et al, 1996) ถึงแม้ว่ากรดวิตามินซีสังเคราะห์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า 7.5 เท่า แต่อย่างไรก็ตาม ผลจากการทดลองครั้งนี้ก็ชี้ให้เห็นว่าทั้งสารสกัดจากหญ้าขัดมอญใบยาว และกรดวิตามินซีสังเคราะห์มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี

ตารางที่ 4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของยาอัลโลพูรินอลและหญ้าขัดมอญใบยาว

Allopurinol			*Sida acuta* Burm f.		
Concentration (uM)	**XO inhibition (%)**	**IC_{50} (uM)**	**Concentration (uM)**	**XO inhibition (%)**	**IC_{50} (uM)**
10	37.38		100	22.68	
25	43.92		200	34.94	
50	46.70	70.27	400	46.10	464.29
100	54.24		500	53.53	
200	75.03		1000	84.76	
400	83.06				

หมายเหตุ: [1]IC_{50}= half maximal inhibitory concentration; ml = milliliter; ug = microgram; uM = micromole

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากหญ้าขัดมอญใบยาวเทียบกับกรดวิตามินซีสังเคราะห์

Tested materials	**Concentration**	**Inhibition (%)**	**[1]IC_{50}**
Ascorbic acid (µM)	1	13.43	9.79
	2.5	15.30	
	5	30.22	
	10	50.75	
	25	65.30	
Sida acuta Brum f. (µg/ml)	2.5	26.75	13.05
	5	39.92	
	10	48.15	
	25	68.72	
	40	70.37	
	100	85.60	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันที่ระดับต่างๆ ต่อการย่อยได้และใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในซีรัม ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริก ในพลาสมาและมูลไก่โคราช

ผลการศึกษาการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันที่ระดับต่างๆ ต่อการย่อยได้และใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะโดยประมาณ (apparent digestibility) อาทิ สิ่งแห้ง ไขมัน โปรตีน เถ้า และสารอินทรีย์ แสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันทุกระดับมีการใช้ย่อยได้และใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะโดยประมาณไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยการย่อยได้ของสิ่งแห้ง 73.39%ไขมัน 78.51% และการใช้ประโยชน์ได้ของโปรตีน 56.72% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองอื่นๆ ที่เคยมีการรายงานไว้โดยมีการย่อยได้ของสิ่งแห้งเท่ากับ 69.90-70.32% (Maliwan, 2016; Mountzouris et al., 2010; Pekel et al., 2015) การใช้ประโยชน์ได้ของโปรตีนเท่ากับ 57.00-57.16% (Maliwan, 2016; Lopez and Lesson, 2005) และการย่อยได้ของไขมันเท่ากับ 79.40% (Martin and Ferrell, 1998) ดังนั้นจากการทดลองในครั้งนี้พบว่าสามารถเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันได้ถึงระดับ 1.12% และ 4.5% ตามลำดับ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการย่อยได้และการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะในไก่โคราช

ผลการศึกษาการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวต่อการต้านอนุมูลอิสระจากการวัดการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในซีรัม พบว่ากลุ่มการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($p<0.05$) โดยการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.26-1.12% ซึ่งประกอบด้วยสารฟลาโวนอยด์ 25-100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร มีการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 4.1) ผลดังกล่าวเนื่องจากฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและกำจัดอนุมูลอิสระ (Singh et al., 2005; Hempel et al., 1999; Montanari et al., 1998; Tsuda et al., 1996; Ursini et al., 1994) จากการรายงานของ Castenmiller et al. (1999) และ Kim et al. (2003) รายงานว่าสารฟลาโวนอยด์เป็นสารในกลุ่มของโพลีฟีนอล (polyphenol) มีคุณสมบัติช่วยจำกัดสารออกซิเจนเรดิคอล (oxygen radicals) โดยการจับแบบคีเลต หรือเรียกการจำกัดอนุมูลอิสระแบบ primary antioxidant ทำให้ลดการเสื่อมสลายของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ในอีกแง่หนึ่งสารฟลาโวนอยด์ยังมีบทบาทต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการกระตุ้น Nrf2-promotor ให้เคลื่อนไปเกาะบนตำแหน่ง AREs core sequence (antioxidant responsive elements) ของยีนเป้าหมาย (*GSTYa* gene) ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น อาทิ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase; GSH) ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และคะตะเลส (Moosavi et al., 2015; Chen et al., 2000) ด้วยเหตุนี้จึงพบว่ากลุ่มการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

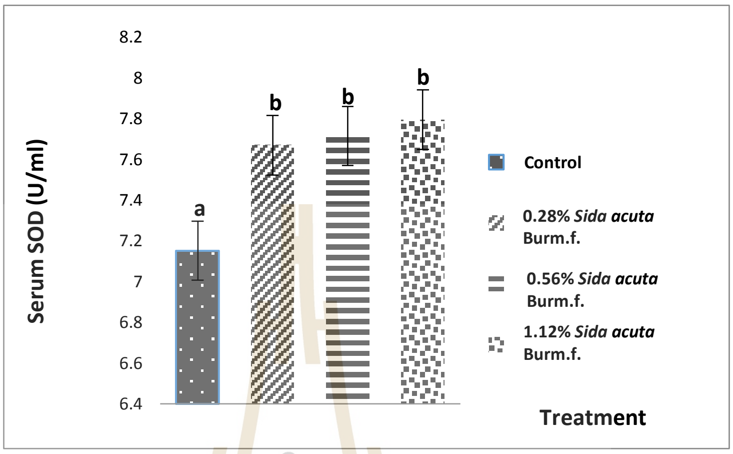
ตารางที่ 4.5 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันในอาหารไก่โคราชที่ระดับต่างๆ ต่อการย่อยได้และการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ

Treatment	Apparent nutrient digestibility (%)				
	Dry matter	Fat	[1]CP	Ash	[2]OM
Control	73.06	78.87	57.39	28.63	75.34
Allopurinol 25 mg/kg feed	73.80	77.82	57.30	28.55	75.88
0.28% *Sida acuta* Burm f.	73.12	78.60	57.02	29.40	75.16
0.56% *Sida acuta* Burm f.	73.07	77.13	56.32	29.71	75.25
1.12% of *Sida acuta* Burm f.	72.62	77.99	56.60	29.32	74.96
1.5% *Jerusalem artichoke*	74.58	78.49	56.70	29.39	76.98
3.0% *Jerusalem artichoke*	72.93	78.55	56.24	29.14	75.19
4.5% *Jerusalem artichoke*	74.00	80.66	56.19	29.02	76.31
Pooled [3]SEM	0.494	0.477	0.818	0.914	0.495
	P-value of contrast				
Control vs. Others	NS	NS	NS	NS	NS
Control vs. Allopurinol	NS	NS	NS	NS	NS
Control vs. SA	NS	NS	NS	NS	NS
Control vs. JA	NS	NS	NS	NS	NS
[4]SA vs. [5]JA	NS	NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : [a b c] Means with different superscripts in column are significantly different ($p<0.05$); [1]CP = crude protein; [2]OM = organic matter; ME = metabolizable energy [3]SEM = standard error of mean; [4]SA = *Sida acuta* Burm f.; [5]JA = *Jerusalem artichoke*;

เสริมสารฟลาโวนอยด์มีระดับการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม ผลจากการทดลองสอดคล้องกับงานทดลองก่อนหน้านี้ที่รายงานการเสริมสารฟลาโวนอยด์สกัดจากอัลฟัลฟา (alfalfa flavonoids) ที่ระดับ 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (Ouyang et al., 2016) สารฟลาโวนอยด์สกัดระดับ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (Iskender et al., 2016) และสาร ฟลาโวนอยด์จากใบหม่อนระดับ 0.50-2.00% (Lin et al., 2016) สามารถเพิ่มการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในซีรัมของไก่ได้สูงขึ้น จากการรายของ Ting et al. (2011) รายงานว่าการเสริมสารนารินจีนิน (naringenin) และฟลาโวนอยด์ จากพืชตระกูลส้มสามารถเพิ่มการทำงานเอนไซม์คะตะเลส

(catalase; CAT) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในซีรัมไก่ไข่ได้เช่นกัน นอกจากนี้ Jiang et al. (2007) รายงายการเสริมสารฟลาโวนอยด์ที่ระดับ10-80 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหารในไก่เนื้อ สามารถเพิ่มการทำงานเอนไซม์แอนตี้ออกซิแดนซ์ทั้งหมด (total antoxidative activity) ในซีรัมได้



ภาพที่ 4.1 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวในอาหารไก่โคราชที่ระดับต่าง ๆ ต่อการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในซีรัม

หมายเหตุ : [a b c] Means with different superscripts are significantly different ($p<0.05$)

ผลของการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันในอาหารที่ระดับต่างๆ ต่อความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกในพลาสมาของไก่โคราช แสดงในตารางที่ 4.6 และภาพ 4.2(a) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ Othogonal contrasts พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมยาอัลโลพูรินอล 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร มีความเข้มข้นไฮโพแซนทีน และแซนทีนในพลาสมาสูงกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาว และกลุ่มการเสริมแก่นตะวัน ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าในไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมแก่นตะวัน มีความเข้มข้นไฮโพแซนทีนในพลาสมาต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($p<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างดังกล่าวในกลุ่มการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาว ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่าการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.28% (ฟลาโวนอยด์ 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) สามารถลดความเข้มข้นสารไฮโพแซนทีนในพลาสมา ในส่วนของผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันในอาหารที่ระดับต่างๆ ต่อความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกในมูลของไก่โคราชแสดงไว้ในตารางที่ 4.7 และภาพ 4.2(b) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ Orthogonal contrasts พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมยาอัลโลพูรินอล 25 มิลิลกรัม/กิโลกรัมอาหาร ส่งผลให้มูลมีความเข้มข้นไฮโพแซนทีน แซนทีน และพิวรีนรวมทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มการเสริมหญ้าขัดมอญ

ใบยาว และกลุ่มการเสริมแก่นตะวัน (p<0.05) อีกทั้งยังพบว่ามูลของไก่ที่ได้รับอาหารเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวมีความเข้มข้นแซนทีน และพิวรีนรวมทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบผลดังกล่าวในกลุ่มการเสริมแก่นตะวัน นอกจากนี้ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.28% พบว่ามีความเข้มข้นกรดยูริกในพลาสมาต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (p<0.05) รวมทั้งมี

ความเข้มข้นกรดยูริกในมูลต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (p<0.05) ซึ่งได้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่พบว่าการเสริมยาอัลโลพูรินอล 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (Settle et al., 2012) และ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (Horn and Featherston, 1971) สามารถลดความเข้มข้นกรดยูริกในพลาสมาได้ สอดคล้องกับ Horn and Featherston (1971) ที่รายงานว่าการเสริมยาอัลโลพูรินอล 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร สามารถลดความเข้มข้นกรดยูริก และเพิ่มความเข้มข้นของสารไฮโพแซนทีนและแซนทีนในมูล เนื่องจากการเปลี่ยนไฮโพแซนทีน และแซนทีนให้เป็นกรดยูริกถูกยับยั้งโดยยาอัลลูพูรินอล เช่นเดียวกับคุณสมบัติการยับยั้งการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของหญ้าขัดมอญใบยาวแบบแข่งขันโดยมีเคมเฟอรอลเป็นสารออกฤทธิ์หลัก จึงทำให้เกิดการยับยั้งการเปลี่ยนสารไฮโพแซนทีน เป็นแซนทีน และเปลี่ยนแซนทีนเป็นผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้ายในรูปของกรดยูริก (Chang et al., 1993; Cotelle et al., 1996) ทั้งนี้เอนไซม์แซนทีนออกซิเดสในไก่ถูกผลิตขึ้นที่ตับอ่อน ลำไส้ ตับ และไต (Moriwaki et al., 1999) ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของหญ้าขัดมอญใบยาวอาจเกิดฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งในตับอ่อนและลำไส้ ทำให้มีปริมาณสารไฮโพแซนทีนและแซนทีนที่ไม่ถูกดูดซึมเข้าผนังลำไส้ตกค้างเป็นจำนวนมากจึงถูกขับทิ้งทางมูลในปริมาณที่มากขึ้น ในส่วนของการเสริมแก่นตะวันที่ระดับ 1.5% (205 mU of HPRT/ kg diet) 3% (410 mU of HPRT/ kg diet) และ 4.5% (615 mU of HPRT/ kg diet) สามารถลดความเข้มข้นสารไฮโพแซนทีนในพลาสมาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลดังกล่าวเกี่ยวเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ HPRT ในแก่นตะวัน โดยเอนไซม์ HPRT ถูกดูดซึมเข้าสู่ผนังลำไส้ และเกิดการทำงานที่ตับ จากนั้นจึงเปลี่ยนไฮโพแซนทีนอิสระเป็นอิโนซินมอนอฟอสเฟส หรือ IMP

อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่าการเสริมอัลโลพูรินอล 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร มีผลทำให้ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกทั้งในพลาสมาและมูลเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Lumeij et al. (1998) ที่รายงานว่าการใช้ยาอัลโลพูรินอลในเหยี่ยวส่งผลให้ความเข้มข้นกรดยูริกในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้น และในทำนองเดียวกัน Poffers et al. (2002) รายงานว่าการใช้ยาอัลโลพูรินอลในเหยี่ยวส่งผลให้ความเข้มข้นสารไฮโพแซนทีนและ แซนทีนในพลาสมาสูงขึ้นเช่นกัน ซึ่งเป็นผลมาจากผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้ายของสารอัลโลพูรินอลหรือที่เรียกว่าออกซิพูรินอล (oxypurinol) มีความเป็นพิษและตกค้างในไตทำให้ไตถูกทำลาย ส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดของเสียต่างๆ ลดลง (Lumeij et al., 1998) จากงานทดลองพบว่าความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกที่ตรวจพบในพลาสมาและมูลของกลุ่มการเสริมอัลโลพูรินอล

ตารางที่ 4.6 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันในอาหารที่ระดับต่างๆ ต่อความเข้มข้นสารพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนในพลาสมาของไก่โคราช

Treatment	**Purines (uM)**				
	Guanine	Adenine	Hypoxanthine	Xanthine	Total purines
Control	41.74^{ab}	6.04	3.70^{ab}	3.72^{b}	53.97^{ab}
25 mg/kg feed AL[1]	48.43^{a}	5.68	4.01^{a}	5.76^{a}	62.18^{a}
0.28% *Sida acuta* Burm f.	32.99^{b}	5.08	2.69^{c}	2.49^{b}	40.63^{b}
0.56% *Sida acuta* Burm f.	37.25^{ab}	5.80	2.97^{abc}	2.83^{b}	45.50^{ab}
1.12% *Sida acuta* Burm f.	42.04^{ab}	5.85	2.92^{bc}	2.92^{b}	52.58^{ab}
1.5% *Jerusalem artichoke*	30.08^{ab}	5.02	2.57^{c}	2.55^{b}	40.21^{b}
3.0% *Jerusalem artichoke*	34.93^{ab}	5.70	2.60^{c}	2.58^{b}	41.89^{b}
4.5% *Jerusalem artichoke*	33.86^{ab}	5.26	2.61^{c}	3.03^{b}	44.10^{b}
Pooled SEM[2]	*1.355*	*0.107*	*0.179*	*0.203*	*1.627*
		P-value of contrast			
Control vs. Others	NS	NS	<0.05	<0.05	NS
Control vs. Allopurinol	NS	NS	NS	0.02	NS
Control vs. SA	NS	NS	NS	NS	NS
Control vs. JA	NS	NS	<0.05	NS	NS
Allopurinol vs. SA	0.03	NS	<0.05	<0.05	NS
Allopurinol vs. JA	0.02	NS	<0.05	<0.05	<0.05
SA[3] vs. JA[4]	NS	NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : $^{a\,b\,c}$ Means with different superscripts in column are significantly different ($p<0.05$), [1]AL = allopurinol; [2]SEM = standard error of mean, [3]SA = *Sida acuta* Burm f., [4]JA = *Jerusalem artichoke*

25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อาหารมีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นไปในทิศทางเดียวกัน ผลดังกล่าวจึงอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการกำจัดของเสียต่างๆ ของไตลดลง โดยบ่งชี้ได้จากความเข้มข้นสารไฮโพแซนทีน แซนทีน และกรดยูริกที่ตรวจพบในมูล ในอีกแง่หนึ่งอาจเกี่ยวเนื่องกับการกดการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสที่มากเกินไป ดังนั้นเพื่อชดเชยระดับกรดยูริกให้สมดุลจึงมีการเพิ่มการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสให้มากขึ้น และในทางตรงกันข้ามยาอัลโลพูรินอลที่เกินพอยังสามารถเป็นสารตั้งต้นกระตุ้นการผลิตเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสอีกด้วย (Carro et al., 2009) เช่นเดียวกันสารไฮโพแซนทีนและแซนทีนที่ตกค้างปริมาณมาก ยังสามารถใช้เป็นสารตั้งต้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

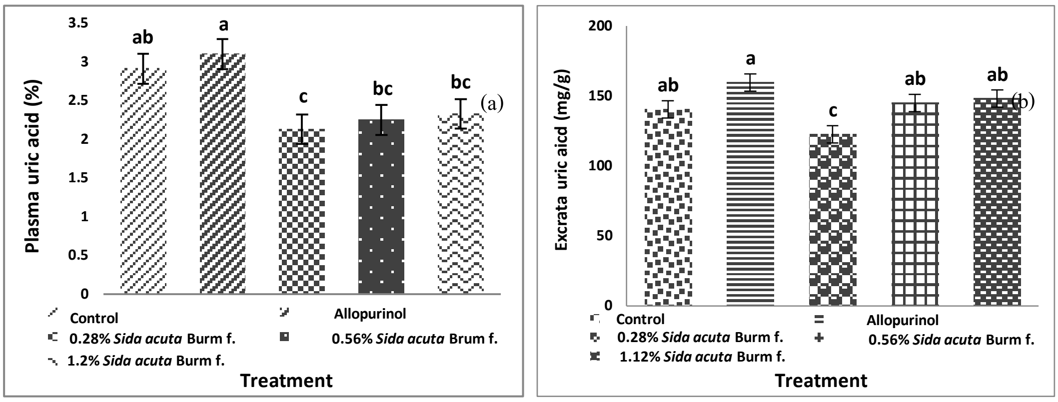
ย้อนกลับไปกระตุ้นการผลิตเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Stirpe and Della Corte, 1965) อย่างไรก็ตามการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.28% และแก่นตะวันทุกระดับในอาหารไก่โคราช สามารถลดความเข้มข้นสารไฮโพแซนทีนในพลาสมาลง และการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.28% ยังสามารถลดความเข้มข้นกรดยูริกในพลาสมาและมูล เพิ่มการขับทิ้งแซนทีน พิวรีนทั้งหมดในมูล

ตารางที่ 4.7 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันในอาหารไก่โคราชที่ระดับต่างๆ ต่อความเข้มข้นสารพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนในมูล

Treatment	**Purines (mg/g excreta)**				
	Guanine	**Adenine**	**Hypoxanthine**	**Xanthine**	**Total purines**
Control	10.74	0.37	5.27^{c}	3.78^{c}	20.13^{c}
25 mg/kg feed AL[1]	11.41	0.29	44.99^{a}	25.57^{a}	82.20^{a}
0.28% Sida acuta Burm f.	11.22	0.30	8.78^{b}	8.67^{b}	28.98^{b}
0.56% *Sida acuta* Burm f.	10.39	0.31	5.84^{c}	3.82^{c}	20.33^{c}
1.12% Sida acuta Burm f.	10.45	0.29	5.91^{c}	3.99^{c}	20.61^{c}
1.5% *Jerusalem artichoke*	10.25	0.31	4.88^{c}	3.69^{c}	20.04^{c}
3.0% *Jerusalem artichoke*	10.35	0.30	4.78^{c}	3.01^{c}	19.72^{c}
4.5% *Jerusalem artichoke*	10.57	0.31	4.42^{c}	2.78^{c}	18.06^{c}
Pooled SEM[2]	*0.214*	*0.009*	*1.687*	*0.972*	*2.728*
			P-value of contrast		
Control vs. Others	NS	NS	<0.05	<0.05	<0.05
Control vs. Allopurinol	NS	NS	<0.05	<0.05	<0.05
Control vs. SA	NS	NS	NS	0.046	0.047
Control vs. JA	NS	NS	NS	NS	NS
Allopurinol vs. SA	NS	NS	<0.05	<0.05	<0.05
Allopurinol vs. JA	NS	NS	<0.05	<0.05	<0.05
SA[3] vs. JA[4]	NS	NS	<0.05	<0.05	<0.05

หมายเหตุ : [a b c] Means with different superscripts in column are significantly different ($p<0.05$), [1]AL = allopurinol; [2]SEM = standard error of mean, [2]SA = *Sida acuta* Burm f., [3]JA = *Jerusalem artichoke*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.2 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวในอาหารไก่โคราชที่ระดับต่างๆ ต่อความเข้มข้นกรดยูริกในพลาสมา (a) และความเข้มข้นกรดยูริกในมูล (b)

หมายเหตุ : [a b c] Means with different superscripts are significantly different ($p<0.05$)

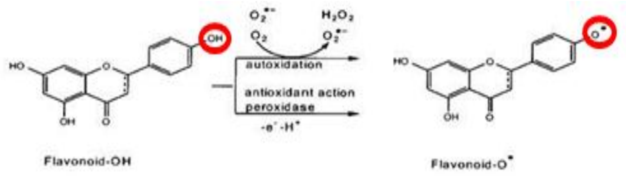
4.3 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันที่ระดับต่างๆ ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ การต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ การสะสมพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อไก่โคราช

ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันที่ระดับต่างๆ ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตที่ช่วงอายุ 0-3 และ 3-6 แสดงในตารางที่ 4.8 และช่วงอายุ 6-9 และ 9-12 สัปดาห์แสดงในตารางที่ 4.9 การทดลองครั้งนี้อาหารทดลองทุกช่วงอายุมีการคำนวนระดับโปรตีนและพลังงานที่เหมาะสมตาม Maliwan (2016) ผลการศึกษาการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต โดยภาพรวมพบว่าการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันทุกระดับไม่ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน การกินได้ และอัตราการแลกเนื้อทุกช่วงอายุตลอดงานทดลอง ($p>0.05$) นอกจากนี้สมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่โคราชในงานทดลองครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงที่รายงานโดย Maliwan (2016); Hang (2016) จากการศึกษาผลงานวิจัยที่คล้ายกันก่อนหน้านี้ พบว่าการเสริมสารฟลาโวนอยด์จากใบกิงโกะหมัก (fermented *Ginkgo bilola* leaves) ไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในไก่เนื้อ และสามารถเสริมได้ถึงระดับ 5.5% ในสูตรอาหาร (Niu et al., 2016; Cao et al., 2012) เช่นเดียวกับการเสริมแก่นตะวันในงานทดลองของ Katiyanon et al. (2006) ที่ระดับ 1-4% ในสูตรอาหารไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในไก่เช่นเดียวกัน

ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันที่ระดับต่างๆ ต่อคุณภาพเนื้อและการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อที่อายุ 9 และ 12 สัปดาห์แสดงในตารางที่ 4.10 พบว่ากลุ่มการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวัน สามารถลดเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำที่ 24 ชั่วโมง (%drip loos) และ

การสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุก (%cooking loss) รวมถึงสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) ได้ทั้ง 2 ช่วงอายุ (9 และ 12 สัปดาห์) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) โดยการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.56% สามารถลดค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำที่ 24 ชั่วโมงและค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุก และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสได้สูงกว่าการเสริมหญ้าขัดมอญที่ระดับ 0.28% ($p<0.05$) ทั้งสองช่วงอายุ แต่ไม่พบผลดังกล่าวจากการเสริมแก่นตะวัน ทั้งนี้เนื่องจากหญ้าขัดมอญมีสารออกฤทธิ์หลัก คือ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและกำจัดอนุมูลอิสระ (Sing et al., 2005; Hempel et al., 1999; Montanari et al., 1998; Ursini et al., 1994; Tsuda et al., 1996) โดยมีบทบาทการต้านอนุมูลอิสระและกำจัดอนุมูลอิสระในเนื้อ ในสภาวะปกติเนื้อไก่เป็นเนื้อที่ถูกออกซิไดซ์ด้วยสารอนุมูลอิสระได้ง่ายเนื่องจากประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวสูง (Arshad et al., 2011) และการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวทำให้มีการกระจายตัวและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนปฐมภูมิและทุติยภูมิ ซึ่งในการเกิดออกซิเดชันจะมีการเหนี่ยวนำทำให้เกิดพันธะระหว่างโมเลกุลที่สามารถนำไปสู่การรวมตัวของโปรตีน และการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของโปรตีน อาทิ ความสามารถในการอุ้มน้ำ ความนุ่ม หรือแม้กระทั่งคุณค่าทางโภชนาการของเนื้อ (Wangang et al., 2011) จากการศึกษางานของ Havsteen (2002) รายงานว่าสารฟลาโวนอยด์สามารถลดการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ในเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีผลทำให้ลดการสร้างอนุมูลลิปิด โดยอนุมูลลิปิด คือ สารอนุมูลอิสระที่เกิดจากการออกซิเดชันกรดไขมันไม่อิ่มตัว ด้วยเหตุนี้สารฟลาโวนอยด์จึงสามารถลดความเสียหายของเซลล์ที่ถูกทำลายโดยอนุมูลลิปิดได้ ซึ่งเรียกการต้านอนุมูลอิสระแบบปฐมภูมิ หรือ chain-breaking antioxidants แสดงกลไกดังภาพที่ 4.3 โดยฟลาโวนอยด์ทำหน้าที่เป็นผู้ให้ไฮโดรเจน (H-donator) โดยให้หมู่ไฮโดรเจน (H^+) แก่อนุมูลลิปิด (LOO^-) ทำให้อนุมูลลิปิดเกิดความสเถียร (LOOH) ดังนั้นจึงเกิดการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของการสร้างสารอนุมูลลิปิด จากกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) (Young and Woodside, 2001) ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่าการป้องกันการเกิดออกซิเดชันกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวเนื้อไก่ของฟลาโวนอยด์จึงมีผลต่อค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำที่ 24 ชั่วโมงและค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุกที่ลดลง

นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์ยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระแบบทุติยภูมิหรือ protective antioxidants โดยการจับแบบคีเลตกับอนุมูลไฮดรอกซิลจากซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) (Halliwell, 1999) และด้วยการจับแบบคีเลสของฟลาโวนอยด์กับอนุมูลอิสระนี้จึงทำให้สามารถลดการเสื่อมสลายของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระมีการทำงานเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ผลจากงานทดลองนี้สอดคล้องกับ Ouyang et al. (2016)



Flavonoids-OH + LOO-　　　　　Flavonoids-O- + LOOH

ภาพที่ 4.3 กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่จากกระบวนลิปิดเปอร์ออกซิชันโดยฟลาโวนอยด์
ที่มา: Young and Woodside (2001)

ที่รายงานว่า การเสริมสารฟลาโวนอยด์สกัดจากอัลฟัลฟา (alfalfa flavonoids) ในอาหารไก่เนื้อที่ระดับ 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร สามารถลดเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำที่ 24 ชั่วโมง Niu et al. (2016) พบว่าการเสริมใบกิงโกะหมัก (fermented *Ginkgo bilola* leaves) ซึ่งมีฟลาโวนอยด์เป็นสารออกฤทธิ์หลักที่ระดับ 3.5% ในอาหาร ทำให้เนื้อไก่มีค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำที่ 24 และ 48 ชั่วโมง และค่าการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุกลดลง และมีปริมาณเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสเพิ่มสูงขึ้น ในทำนองเดียวกัน Cao et al. (2012) รายงานว่าการเสริมใบกิงโกะหมักด้วย *Aspergillus niger* ในอาหารที่ระดับ 0.35- 0.50% เนื้อไก่มีค่าการสูญเสียน้ำที่ 24 ชั่วโมง และค่าการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุกลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมใบกิงโกะหมักดังกล่าว ที่ระดับ 0.20-0.50% สามารถเพิ่มปริมาณเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในเนื้อได้เพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม ในการทดลองครั้งนี้พบว่าการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันทุกระดับไม่มีผลต่อค่าสีในเนื้อและหนังส่วนนอก ($p>0.05$) ค่าความเป็นกรดด่างที่ 45 นาที และ 24 ชั่วโมงหลังเชือดทั้ง 2 ช่วงอายุ ($p>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.11 ในส่วนของผลต่อคุณภาพซากโดยรวมพบว่าไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้ง 2 ช่วงอายุ ($p>0.05$) แสดงในตารางที่ 4.12 และ 4.13 ตามลำดับ

ผลของการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันที่ระดับต่างๆ ต่อการสะสมพิวรีนอนุพันธ์ พิวรีน และกรดยูริกในเนื้ออกและสะโพกแสดงไว้ในตารางที่ 4.14 และ 4.15 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ Orthogonal contrasts พบว่าการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันมีอิทธิพลร่วมกัน ต่อการสะสมไฮโพแซนทีน ปริมาณพิวรีนทั้งหมด และกรดยูริกในเนื้ออก โดยการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.56% ร่วมกับแก่นตะวันที่ระดับ 3% สามารถลดการสะสมไฮโพแซนทีน ปริมาณพิวรีนทั้งหมด และกรดยูริกในเนื้ออกที่อายุ 9 และ12 สัปดาห์ลงได้ ($p<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันทุกระดับ ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงสะสมพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อสะโพกที่อายุ 9 และ12 สัปดาห์ ($p>0.05$) นอกจากนี้ก็ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณ IMP ทั้งในเนื้ออกและสะโพกทั้ง 2 ช่วงอายุ (9 และ12 สัปดาห์) ($p>0.05$) เช่นดียวกัน

จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันมีอิทธิพลร่วมกันในการลดการสะสมไฮโพแซนทีน และปริมาณพิวรีนทั้งหมดในเนื้ออก แต่ไม่มีผลกระทบต่อความอร่อยของเนื้อ ทั้งนี้เนื่องจากสารออกฤทธิ์หลักในหญ้าขัดมอญ คือ ฟลาโวนอยด์และเคมเฟอรอล มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการทำงานเอนของไซม์แซนทีนออกซิเดส (Bardin et al., 2004; Nagao et al., 1990) (Havsteen, 2002) ฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสแบบแข่งขันโดยหมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนตำแหน่ง 5 และ 7 มีความสามารถในการยั้บยังการทำงานแซนทีนออกซิเดสสูง ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลเหล่านี้จะถูกเติมลงในคาร์บอนของแซนทีนตำแหน่งที่ 2 และ 6 ซึ่งเป็นบริเวณเร่ง (active site) ทำให้เอนไซม์แซนทีนออกซิเดสไม่สามารถเปลี่ยนไฮโพแซนทีน เป็นแซนทีน และเปลี่ยนแซนทีนไปเป็นผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้ายในรูปกรดยูริก ในขณะเดียวกันเอนไซม์ HPRT ในแก่นตะวันก็มีบทบาทสำคัญในการกู้กลับไฮโพแซนทีนไปเป็น IMP (Saugstad, 1998) ดังนั้นจากการทำงานร่วมกันของทั้งสองกลไกในข้างต้น จึงทำให้มีการผลิตไฮโพแซนทีนลดลง และส่งผลโดยตรงทำให้ปริมาณพิวรีนทั้งหมดและกรดยูริกลดลงด้วย ทั้งนี้จากการวิเคราะห์และรวบรวมเอกสารพบว่าไฮโพแซนทีนเป็นอนุพันธ์พิวรีนที่เป็นปัจจัยเสี่ยงมากที่สุดต่อการเกิดโรคเกาต์ (Brule et al., 1992) ดังนั้นการเลือกรับประทานอาหาร นอกจากจะต้องให้ความสำคัญกับปริมาณพิวรีนทั้งหมดแล้ว ควรพิจารณาถึงสัดส่วนไฮโพแซนทีนต่อปริมาณพิวรีนทั้งหมดด้วย (Kaneko et al., 2014) จากการทดลองนี้ เนื้อไก่ที่ได้จากการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.56% แก่นตะวันระดับ 3% มีปริมาณไฮโพแซนทีน และสัดส่วนไฮโพ แซนทีนต่อพิวรีนทั้งหมดเป็น 86.35 มิลลิกรัม/100 กรัม vs. 56.88% (ที่อายุ 9 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย 1.27 กิโลกรัม) และ 91.13 มิลลิกรัม/100 กรัม vs 56.82% (ที่อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย 1.68 กิโลกรัม) ตามลำดับ หรือมีปริมาณไฮโพแซนทีนและสัดส่วนไฮโพแซนทีนต่อพิวรีนทั้งหมดที่ลดลงเป็น 17.96% และ 20.63% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ Kiratikrankul and Yongsawatdigul (2016) ได้รายงานปริมาณไฮโพแซนทีน และสัดส่วนของไฮโพแซนทีนต่อปริมาณพิวรีนทั้งหมดในเนื้อไก่สายพันธุ์การค้า (น้ำหนักเฉลี่ย 1.55 กิโลกรัม) มีค่าเป็น 124.10 มิลลิกรัม/100 กรัม vs. 73.01% ส่วนไก่พื้นเมืองประดู่หางดำ (น้ำหนักเฉลี่ย 1.51 กิโลกรัม) มีค่าเป็น 89.50 มิลลิกรัม/100 กรัม vs. 62.76% จะเห็นได้ว่าการเสริมหญ้าขัดมอญร่วมกับแก่นตะวัน สามารถลดการสะสมไฮโพแซนทีน และสัดส่วนไฮโพแซนทีนต่อพิวรีนทั้งหมดได้ต่ำลงกว่าทั้งในเนื้อไก่ทางการค้าและเนื้อไก่พื้นเมือง ซึ่งแนวทางการผลิตเนื้อไก่พิวรีนต่ำดังกล่าว เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการผลิตอาหารเชิงหน้าที่ (functional food) สำหรับผู้บริโภคที่รักสุขภาพ และโดยเฉพะผู้ที่มีความเสี่ยงในการเป็นโรคเกาต์ในอนาคต

ตารางที่ 4.8 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่โคราชที่ช่วงอายุ 0-3 และ 3-6 สัปดาห์

Treatment		**Period 0-3 weeks (g/bird)**						**Period 3-6 weeks (g/bird)**				
SA[1] (%)	JA[2] (%)	IBW[3] (g)	FBW[4] (g)	BWG[5] (g)	ADG[6] (g/d)	FI[7] (g)	FCR[8]	FBW (g)	BWG (g)	ADG (g/d)	FI (g)	FCR
Control		43.06	309.89	266.83	12.70	430.47	1.61	748.91	439.02	20.90	870.16	1.98
0.28	1.50	43.03	309.29	266.26	12.68	429.74	1.61	749.22	439.92	20.94	863.44	1.96
	3.00	43.03	294.08	256.38	12.35	426.46	1.68	723.76	429.67	20.46	854.38	1.98
0.56	1.50	43.01	302.39	256.61	12.21	421.91	1.62	729.76	426.68	20.31	837.82	1.96
	3.00	43.01	299.62	251.05	11.95	421.61	1.67	729.88	430.25	20.49	844.03	1.96
Pooled SEM[9]		0.128	2.392	2.357	0.112	2.952	0.089	2.180	0.549	0.212	2.930	0.083
P-value of contrast												
Control vs. Others		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SA*JA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : SA[1] = *Sida acuta* Burm f.; JA[2] = *Jerusalem artichoke*; IBW[3] = initial body weight; FBW[4] = final body weight; BWG[5] = body weight gain; ADG[6] = average daily gain; FI[7] = feed intake; FCR[8] = feed conversion ratio; SEM[9] = standard error of mean

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.9 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่โคราชที่ช่วงอายุ 6-9 และ 9-12 สัปดาห์

Treatment		Period 0-3 weeks (g/bird)						Period 3-6 weeks (g/bird)				
SA[1] (%)	JA[2] (%)	IBW[3] (g)	FBW[4] (g)	BWG[5] (g)	ADG[6] (g/d)	FI[7] (g)	FCR[8]	FBW (g)	BWG (g)	ADG (g/d)	FI (g)	FCR
Control		748.91	1292.82	543.91	25.96	1505.94	2.77	1704.58	413.66	19.69	1430.38	3.42
0.28	1.50	749.22	1338.18	578.18	27.53	1534.93	2.65	1744.85	424.29	20.20	1474.17	3.41
	3.00	723.76	1244.53	520.79	24.80	1464.80	2.80	1637.65	393.12	18.72	1351.36	3.44
0.56	1.50	729.07	1225.29	496.23	23.63	1450.70	2.88	1631.67	406.12	19.35	1399.45	3.45
	3.00	729.88	1262.18	532.31	25.34	1514.40	2.84	1675.83	411.77	19.60	1412.09	3.44
Pooled SEM[9]		2.180	1.333	1.132	0.539	1.498	0.077	2.119	0.397	3.34	3.34	0.025
P-value of contrast												
Control vs. Others		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SA*JA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : SA[1] = *Sida acuta* Burm f.; JA[2] = *Jerusalem artichoke*; IBW[3] = initial body weight; FBW[4] = final body weight; BWG[5] = body weight gain; ADG[6] = average daily gain; FI[7] = feed intake; FCR[8] = feed conversion ratio; SEM[9] = standard error of mean

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.10 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อคุณภาพซากของไก่โคราชที่อายุ 9 สัปดาห์

Item	Treatment						*P*-value of contrast			
	Control	SA_1[1]-JA_1[2]	SA_1-JA_2[3]	SA_2[4]-JA_1	SA_2-JA_2	Pooled SEM[5]	Control vs. Others	SA[6]	JA[7]	SA*JA
Live weight (kg)	1262.5	1243.75	1256.25	1270.0o	1262.50	12.513	0.501	NS	NS	NS
Dressing (%)	65.14	66.46	65.19	65.02	65.22	0.479	0.633	NS	NS	NS
% of hot carcass weight										
Heart	0.52	0.53	0.49	0.53	0.53	0.014	0.831	NS	NS	NS
Spleen	0.30	0.41	0.47	0.41	0.47	0.032	0.115	NS	NS	NS
Liver	1.82	1.93	1.97	1.83	1.87	0.031	0.117	NS	NS	NS
Gizzard	2.44	2.44	2.45	2.42	2.46	0.064	0.152	NS	NS	NS
Abdominal fat	0.56	0.47	0.40	0.45	0.53	0.069	0.107	NS	NS	NS
Organs fat	0.60	0.39	0.46	0.44	0.44	0.037	0.051	NS	NS	NS
% of chilled carcass weight										
Thigh	11.18	11.54	11.45	11.60	11.44	0.139	0.423	NS	NS	NS
Drumstick	9.87	10.46	10.28	10.46	10.05	0.106	0.124	NS	NS	NS
Wings	8.47	8.83	8.53	9.03	8.72	0.074	0.083	NS	NS	NS
Fillet	11.39	11.59	11.06	11.71	11.28	0.143	0.955	NS	NS	NS
Fillet	3.31	3.58	3.66	3.63	3.37	0.078	0.237	NS	NS	NS

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.11 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อคุณภาพซากของไก่โคราชที่อายุ 12 สัปดาห์

Item	**Treatment**						***P*-value of contrast**			
	Control	**SA$_1$[1]-JA$_1$[2]**	**SA$_1$-JA$_2$[3]**	**SA$_2$[4]-JA$_1$**	**SA$_2$-JA$_2$**	**Pooled SEM[5]**	**Control vs. Others**	**SA[6]**	**JA[7]**	**SA*JA**
Live weight (kg)	1693.75	1681.25	1681.50	1731.25	1706.25	12.885	0.857	NS	NS	NS
Dressing (%)	66.66	67.09	66.65	66.64	65.55	0.219	0.733	NS	NS	NS
% of hot carcass weight										
Heart	0.37	0.38	0.40	0.40	0.39	0.008	0.170	NS	NS	NS
Spleen	0.38	0.33	0.32	0.33	0.28	0.020	0.229	NS	NS	NS
Liver	1.65	1.67	1.71	1.59	1.75	0.038	0.806	NS	NS	NS
Gizzard	2.48	2.40	2.45	2.50	2.48	0.072	0.864	NS	NS	NS
Abdominal fat	0.83	0.53	0.43	0.65	0.63	0.103	0.341	NS	NS	NS
Organs fat	0.50	0.47	0.33	0.30	0.31	0.048	0.253	NS	NS	NS
% of chilled carcass weight										
Thigh	11.01	11.48	11.40	11.81	11.52	0.167	0.235	NS	NS	NS
Drumstick	9.88	10.05	10.19	10.60	10.29	0.126	0.220	NS	NS	NS
Wings	8.40	8.51	8.51	8.59	8.51	0.058	0.962	NS	NS	NS
Fillet	10.33	10.82	10.82	11.67	11.53	0.463	0.652	NS	NS	NS
Fillet	3.60	3.67	3.69	3.90	3.76	0.094	0.630	NS	NS	NS

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.12 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อค่าสีในหนังอกและเนื้ออกของไก่โคราชที่อายุ 9 และ12 สัปดาห์

Treatment		**9 week of age**						**12 week of age**					
SA[1] (%)	**JA[2] (%)**	**Breast skin**			**Breast muscle**			**Breast skin**			**Breast muscle**		
		L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Control		5.57	5.54	8.63^{a}	24.46^{a}	2.76	8.22^{a}	5.49	5.53	8.92^{a}	24.55^{a}	2.83	8.29^{a}
	1.50	5.56	5.56	6.88^{b}	22.67^{ab}	2.77	8.69^{b}	5.49	5.57	6.98^{b}	22.14^{ab}	2.84	8.69^{b}
0.28	3.00	5.52	5.52	6.90^{b}	22.43^{ab}	2.72	8.69^{b}	5.51	5.51	7.09^{b}	22.43^{ab}	2.88	8.71^{b}
	1.50	5.58	5.49	6.61^{b}	20.67^{b}	2.75	8.84^{b}	5.52	5.55	6.72^{b}	20.84^{b}	2.82	8.81^{b}
0.56	3.00	5.51	5.45	6.65^{b}	20.61^{b}	2.74	8.87^{b}	5.50	5.55	6.69^{b}	20.81^{b}	2.85	8.85^{b}
Pooled SEM[3]		0.365	0.080	0.054	0.486	0.093	0.063	0.703	0.073	0.053	0.902	0.073	0.064
					P-value of contrast								
Control vs. Others		0.384	0.089	0.338	0.072	0.895	0.061	0.349	0.588	0.144	0.089	0.220	0.146
SA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SA*JA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : SA[1] = *Sida acuta* Burm f.; JA[2] = *Jerusalem artichoke*; SEM[3] = standard error of mean; L* = lightness; a* = redness; b* = yellowness

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.13 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อคุณภาพเนื้อของไก่โคราชที่อายุ 9 และ 12 สัปดาห์

Treatment		9 week of age						12 week of age					
SA[1] (%)	**JA[2] (%)**	pH $_{45\ min}$	pH $_{24\ h}$	DL[3]	CL[4]	SF[5]	SOD[6]	pH $_{45\ min}$	pH $_{24\ h}$	DL	CL	SF	SOD
Control		62.58	1.45	4.62	48.73	1.56	4.71	64.96	1.66	4.68	49.16	1.66	4.75
	1.50	63.41	1.50	4.96	52.06	1.82	5.16	66.89	1.73	4.99	53.92	1.82	5.04
0.28	3.00	64.08	1.181	5.01	51.12	1.86	5.05	67.98	1.92	5.09	53.49	1.81	5.07
	1.50	63.47	1.61	4.91	50.62	1.71	4.95	65.86	1.73	4.95	52.90	1.72	4.97
0.56	3.00	62.87	1.47	4.91	49.97	1.75	4.82	66.33	1.69	4.86	52.94	1.67	4.76
Pooled SEM[3]		0.018	0.017	0.195	0.377	0.072	0.049	0.014	0.011	0.200	0.388	0.064	0.042
						P-value of contrast							
Control vs. Others		0.170	0.489	<0.001	<0.001	0.947	<0.001	0.642	0.704	<0.001	<0.001	0.940	<0.001
SA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.050	0.001	NS	0.036
JA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SA*JA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : SA[1] = *Sida acuta* Burm f.; JA[2] = *Jerusalem artichoke*; SEM[3] = standard error of mean; L* = lightness; a* = redness; b* = yellowness

ตารางที่ 4.14 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อการสะสมพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกในเนื้ออกของไก่โคราชที่อายุ 9 และ 12 สัปดาห์

Treatment		Amount of purines, 9 week of age (mg/100g)						Amount of purines, 12 week of age (mg/100g)					
SA[1] (%)	**JA[2] (%)**	G+X[3]	Hx[4]	A[5]	TP[6]	IMP[7]	Calculated as U[8]	G+X	Hx	A	TP	IMP	Calculated as U
Control		43.04	105.26[a]	33.57	183.04[a]	364.81	228.15[a]	48.32	114.83[a]	36.12	200.12[a]	367.15	249.18[a]
	1.50	42.05	104.70[a]	33.26	183.95[a]	368.96	219.35[a]	45.49	107.36[ab]	34.33	190.46[ab]	372.18	229.87[a]
0.28	3.00	39.61	101.07[a]	34.09	177.31[a]	371.49	212.19[a]	44.19	105.40[ab]	34.25	185.43[ab]	374.49	223.90[ab]
	1.50	37.34	99.93[a]	32.43	173.08[a]	374.36	208.92[ab]	44.18	102.65[ab]	32.85	182.09[ab]	375.25	219.64[ab]
0.56	3.00	37.11	86.35[b]	33.14	151.81[b]	374.40	189.87[b]	42.77	91.13[b]	32.39	160.36[b]	375.18	193.61[b]
Pooled SEM[3]		0.663	1.879	0.477	3.845	0.036	4.640	1.021	1.658	0.316	3.756	0.037	4.471
						P-value of contrast							
Control vs. Others		NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05
SA		NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05
JA		NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05	NS	<0.05
SA*JA		NS	0.050	NS	0.043	NS	0.046	NS	0.044	NS	0.025	NS	0.046

หมายเหตุ : SA[1] = *Sida acuta* Burm f.; JA[2] = *Jerusalem artichoke*; G+X[3] = guanine+xanthine; Hx[4] = hypoxanthine; A[5] = adenine; TP[6] = total purines; IMP[7] = inosine-monophosphate; U[8] = calculated total purines according to uric acid digestion by human; followed U = (total purines (umol)x m.w. uric acid (168.1 g/mol))/1000; SEM[9] = standard error of mean

ตารางที่ 4.15 ผลการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันต่อการสะสมพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกในเนื้อสะโพกของไก่โคราชที่อายุ 9 และ12 สัปดาห์

Treatment		Amount of purines, 9 week of age (mg/100g)						Amount of purines, 12 week of age (mg/100g)					
SA[1] (%)	**JA[2] (%)**	G+X[3]	Hx[4]	A[5]	TP[6]	IMP[7]	Calculated as U[8]	G+X	Hx	A	TP	IMP	Calculated as U
Control		45.77	88.21	32.95	174.79	142.29	210.32	48.97	91.60	32.99	187.38	146.81	225.16
	1.50	44.65	85.04	32.91	167.41	142.12	201.36	47.09	90.17	33.82	177.56	147.36	213.75
0.28	3.00	44.40	84.03	33.51	166.61	147.07	200.43	46.10	87.70	33.91	171.68	151.65	206.67
	1.50	44.20	83.24	33.50	164.33	151.36	197.74	46.78	84.35	33.78	170.20	152.57	204.62
0.56	3.00	43.59	77.69	33.49	149.32	153.66	179.56	45.13	83.63	33.78	161.51	156.36	194.40
Pooled SEM[3]		0.502	0.892	0.412	1.171	0.025	2.065	0.538	0.997	0.418	2.340	0.022	2.812
							P-value of contrast						
Control vs. Others		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SA*JA		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : SA[1] = *Sida acuta* Burm f.; JA[2] = *Jerusalem artichoke*; G+X[3] = guanine+xanthine; Hx[4] = hypoxanthine; A[5] = adenine; TP[6] = total purines; IMP[7] = inosine-monophosphate; U[8] = calculated total purines according to uric acid digestion by human; followed U = (total purines (umol)x m.w. uric acid (168.1 g/mol))/1000; SEM[9] = standard error of mean

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ของหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวัน รวมถึงศึกษาผลของการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวและแก่นตะวันในอาหารไก่โคราช ต่อการย่อยได้และการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การต้านอนุมูลอิสระ สมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพซาก คุณภาพเนื้อ การสะสมพิวรีนและอนุพันธ์พิวรีนในเนื้อ โดยภาพรวมสรุปได้ดังนี้

5.1.1 หญ้าขัดมอญใบยาวมีสารฟลาโวนอยด์แบบหยาบทั้งหมด 8,930 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เคมเฟอรอล 311 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ 50% เท่ากับ 464.29 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ 50% เท่ากับ 13.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนแก่นตะวันมีปริมาณ HPRT เท่ากับ 13.65 มิลลิยูนิต/กรัม มีค่า K_m value หรือค่าที่บอกถึงอัตกิริยาการเปลี่ยนสารไฮโพแซนทีนเป็นสารอิโนซินมอนอฟอสเฟส หรือ IMP เท่ากับ 17.21 ไมโครโนโมล/มิลลิลิตร/ชั่วโมง

5.1.2 การเสริมสารฟลาโวนอยด์จากหญ้าขัดมอญใบยาวและเอนไซม์ HPRT จากแก่นตะวันไม่ส่งผลกระทบต่อการย่อยได้และใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ โดยการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.28% (มีสารฟลาโวนอยด์ 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) สามารถลดความเข้มข้นกรดยูริกและไฮโพแซนทีน ในพลาสมา ลดการขับออกกรดยูริก แต่เพิ่มการขับออกแซนทีน และพิวรีนทั้งหมดทางมูล รวมทั้งการเสริมแก่นตะวันทุกระดับ คือ 1.5-4.5% (มีเอนไซม์ HPRT 205-615 mU/กิโลกรัมอาหาร) สามารถลดความความเข้มข้นไฮโพแซนทีนในพลาสมาได้

5.1.3 การเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันในอาหารไก่โคราชช่วงอายุ 0-12 สัปดาห์ ไม่มีผลกระทบต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพซาก คุณภาพเนื้อ ค่าสีในหนังส่วนนอกเนื้อส่วนนอก และค่า pH ที่ 45 นาทีและ 24 ชั่วโมงหลังการฆ่า โดยสามารถเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวได้ถึงระดับ 0.56% (มีสารฟลาโวนอยด์ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) และเสริมแก่นตะวันได้ถึงระดับ 3% (มีเอนไซม์ HPRT 410 mU/กิโลกรัมอาหาร)

5.1.4 การเสริมสารฟลาโวนอยด์จากหญ้าขัดมอญใบยาวสามารถเพิ่มฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส) ทั้งในพลาสมาและเนื้อส่วนนอก สามารถลดเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำที่ 24 ชั่วโมง และการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุก แต่ไม่พบผลดังกล่าวในแก่นตะวัน

5.1.5 การเสริมหญ้าขัดมอญที่ระดับ 0.56% ร่วมกับแก่นตะวัน 3% สามารถลดการสะสมไฮโพแซนทีนและปริมาณพิวรีนทั้งหมด ในเนื้ออกของไก่โคราชได้ทั้งช่วง 2 อายุ (9 และ 12 สัปดาห์) โดยสามารถลดปริมาณไฮโพแซนทีน และสัดส่วนของไฮโพแซนทีนได้ประมาณ 17.96% และ 20.63% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสาร IMP หรือสารให้รสชาติอร่อยในเนื้อ นอกจากนี้โดยภาพรวมยังสามารถลดการเกิดกรดยูริกในร่างกายของผู้ที่บริโภคเนื้อไก่ ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมเปลี่ยนจากพิวรีนในเนื้อไก่ไปเป็นกรดยูริกได้ลดต่ำลง 16.77% และ 22.30% ที่อายุ 9 และ12 สัปดาห์ ตามลำดับ

จากผลการทดลองในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าระดับการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.56% (ฟลาโวนอยด์ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) ร่วมกับแก่นตะวัน 3% (HPRT 410 mU/กิโลกรัมอาหาร) เป็นระดับที่มีความเหมาะสมที่สุดในลดการสะสมไฮโพแซนทีน และพิวรีนทั้งหมด และยังสามารถเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อไก่ได้สูงสุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวที่ระดับ 0.28-0.56% (มีฟลาโวนอยด์ 25-50 มิลลิกรัม/กิโลโลกรัมอาหาร) สามารถยับยั้งการทำเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ทำให้ลดการผลิตไฮโพแซนทีนและกรดยูริก แต่อย่างไรก็ตามไม่ควรเสริมฟลาโวนอยด์ในสูตรอาหารเกิน 50 มิลลิกรัม/กิโลโลกรัมอาหาร เนื่องจากพบว่ามีแนวโน้มการผลิตไฮโพแซนทีนและกรดยูริกเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเสริมหญ้าขัดมอญใบยาวร่วมกับแก่นตะวันในสูตรอาหารจึงควรทราบปริมาณสารฟลาโวนอยด์และปริมาณเอนไซม์ HPRT ที่เป็นองค์ประกอบที่แน่นอน เนื่องจากเมื่อนำมาเสริมร่วมกันจะสามารถคำนวณระดับที่เหมาะสมของฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ HPRT ในสูตรอาหารได้อย่างแม่นยำเพื่อให้ได้อาหารที่มีประสิทธิภาพในการลดการสะสมพิวรีน อนุพันธ์ พิวรีน กรดยูริก และมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงในเนื้อไก่

5.2.2 การพิจารณานำวัตถุดิบแหล่งฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ HPRT ในพืชชนิดอื่นๆ เสริมในสูตรอาหารไก่ มีข้อควรพิจารณา ดังนี้ ปริมาณสารออกฤทธิ์ ราคาวัตถุดิบ ระยะเวลาในการปลูก ระยะการเก็บเกี่ยว หากเป็นหญ้าขัดมอญใบยาวพบว่าระยะการเก็บเกี่ยวที่มีสารออกฤทธิ์สูงสุดคือ 6 เดือน และต้องเป็นวัตถุดิบที่ไม่มีสารต้านการใช้ประโยชน์ของโภชนะในสัตว์กระเพาะเดี่ยว อาทิ แทนนิน รวมทั้งควรหลีกเลี่ยงวัตถุดิบที่มีเยื่อใยสูงมาใช้ในสูตรอาหารไก่เล็ก (0-3 สัปดาห์) ซึ่งเยื่อใยไม่เกิน 5% เนื่องจากอาจส่งผลกระทบต่อการย่อยได้และการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

กนกวรรณ จารุกาจร, วิลัดดา สินทร และ ชรินญา พิมพ์สอน. 2557. ความสัมพันธ์ของภาวะเครียดออกซิเดชั่นและภาวะไขมันในเลือดสูง. **วารสารพิษวิทยาไทย**. 29(1-2): 57-69. กรุงเทพธุรกิจ. (25 กุมภาพันธุ์ 2558). [ออนไลน์]:*www.bangkokbiz news.com/news/detail/636208*

นิมิต วรสูต และ สนั่น จอกลอย. 2549. อินนูลิน: สาระสำคัญสำหรับสุขภาพในแก่นตะวัน. **วารสารแก่นเกษตร**. 34 (2): 85-91.

ปารยะ อาศนะเสน. 2553. **คำแนะนำสำหรับผู้ที่มีระดับกรดยูริกในเลือดสูง.** (23 พฤษจิกายน 2553) [ออนไลน์]: *http://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor/e-pl/articledetail.asp?id=829*

ศิรภพ สุวรรณโรจน์ และ รัตนวดี ณ นคร. 2541. การรักษาโรคเกาต์ในเวชปฏิบัติ. **ศรีนครินทร์เวชสาร**. 13 (13): 224-228.

โฮมออนไลน์ (Homeonline). **ต้นไม้พิษใกล้ตัวคุณ**. (29 พฤษภาคม 2558). [ออนไลน์]: http://www.home onlines.com/th/knowledge-detail.php?dID =633.

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**. 105: 121-126.

Aggarwal, B. B., S. Prasad, S. Reuter, R. Kannappan, V. R. Yadev, B. Park, and B. Sung. 2011. Identification of novel anti-inflammatory agents from ayurvedic medicinefor prevention of chronic diseases: reverse pharmacology and bedside tobench approach. **Curr. Drug Targets**. (11): 1595-1653.

AOAC. 1980. Official Methods of Analysis. 12th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, DC.

Arshad, M. S., F. M. Anjum, A. Asghar, M. I. Khan, M. Yasin, M. Shahid, and A. H. EI-Ghorab. 2011. Lipid stability and antioxidant profile of microsomal fraction of broiler meat enriched with α-lipoic acid and α-tocopherol acetate. **J. Agric. Food Chem**. 59(13): 7346-7352.

Asha, A., F. Shameema, and E. C. Baiju. 2018. Phytochemical profiling and antibacterial activity of selected *Sida* species against common human pathogenic bacteria an in vitro study. **JPP**. 7(3): 1201-1205

Ashihara, H., C. Atasolla, T. Fujimura and A. Crozier. 2018. Purine salvage in plants. **Phyto. Chem.** 147: 89-124.

Bardin, T. 2004. Current management of gout in patients unresponsive or allergicto allopurinol. **Joint Bone Spine**. 71(6): 481-485.

Barros. A., F M. Nunes., B. Gonçalves., R. N. Bennett andA. P. Silva. 2011. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). **Food Chem**. 128(4): 165-172.

Bierau, J. 2011. Erndim advisory document of the quantitative analysis of purines and pyrimidines. **Ph.D. Thesis.** Maastricht University Medical Centre, Netherlands.

Brule, D., G. Sarwar, and L. Savoie. 1992. Changes in serum and urinary uric acid levels in normal humansubjects fed purine-rich foods containing different amounts of adenine and hypoxanthine. **J. Am.Coll. Nutr.** 3(11): 353-358.

Cao, F. L., X. H. Zhang, W. W. Yu, L. G. Zhao and T. Wang. 2012. Effect of feeding fermented *Ginkgo biloba* leaves on growth performance, meat quality, and lipid metabolism in broilers. **Poult. Sci.** 91(5): 1210-1221.

Carro, M. D., E. Falkenstein, K. P. Blemings, and H. Klandorf. 2009. Determination of xanthine oxidoreductase activity in broilers: effect of pH and temperature of the assay and distribution in tissues. **Poult. Sci.** 88(11): 2406-2414.

Carro, M. D., E. Falkenstein, W. J. Radke, and H. Klandorf. 2010. Effects of allopurinol on uric acid concentrations, xanthine oxidoreductase activity and oxidative stress in broiler chickens. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol Pharmacol.** 151(1): 12-17.

Castenmiller, J. J. M., S. T. Lauridsen, L. O. Dragsted, K. Hof, J. P. H. Linssen, and C. E. West. 1999. Carotene does not change markers of enzymatic and nonenzymatic antioxidant activity in human blood. **J. Nutri**. 129(12): 2162-2169.

Chang, W. S., Y. J. Lee, F. J. Lu, and H. C. Chiang. 1993. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. **Anticancer Res.** 13(6A): 2165-2170.

Chen, C., R. Yu, E. D. Owuor, and A. N. Kong. 2000. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. **Arch. Pharm. Res.** 23(6): 605-612.

Choi, H. K., G. Atkinson, E. Karlson, and G. Curhan. 2005. Obesity, weight change, hypertension, diuretic use, and risk of gout in men. **Arch. Intern. Med.** 165(7): 742-748.

Clifford, A. J., J. A. Riumallo, V. R. Young, and N. S. Scrimshaw. 1976. Effect of oral purines on serum and urinary uric acid of normal, hyperuricemic and gouty humans. **J. Nutr.** 106: 428-434.

Coffee, C. J. and C. Solano. 1977. Rat muscle 5 adenlylic acid aminohydrolase , role of k^+ and adenylate enery charge in expression of kinetic and regulatory properties. **J. Biol. Chem.** 252: 1606-1612.

Cotelle, N., J. L. Bernier, J. P. Catteau, J. Pommery, J. C. Wallet, and E. M. Gaydou. 1996. Antioxidant properties of hydroxyl-flavones. **Free Radic. Biol. Med.** 20(1): 35-43.

Dawson, P., B. Sheldon, and J. Miles. 1991. Effect of aseptic processing on the texture of chicken meat. **Poult. Sci.** 70(11): 2359-2367.

Devies M. E. 1970. Multisample enzyme extraction from cultured plant cell suspensions. **Plant Physiol.** 47(1): 38-42.

Edeoga, H.O., D. E. Okwu, and B.O Mbaebie. 2005. Proximate, phytochemical and micronutrient composition of *Sida acuta.* **J. App. Chem. (IOSR-JAC).** 7(2): 2278-5736.

Ellington, A. 2005. Reduction of purine content in commonly consumed meat products through rinsing and cooking. **Ph.D. Thesis**. University of Georgia, Athens

Ghasemzadeh, A., H. Z. Jaafar, and A. Rahmat. 2010. Identification and concentration of some flavonoid components in malaysian young ginger (*zingiber officinale* roscoe) varieties by a high performance liquid chromatography method. **J. Mole.** 15(2): 6231-6243.

Guoyao, W. 2013. **Amino acids biochemistry and nutrition**. CRC press, NY.

Halliwell, B. 1999. Antioxidant defense mechanism: from the beginning to the end. **Radic. Bio. and Med**. 31(4): 261-272.

Halde, U. K. 2011. Genus Sida the plants with ethno medicinal and therapeutic potential. **ISSN**. 1(5): 1-4.

Hang, T. T. T. 2016. Production of functional chicken meat by dietary supplementation of oil rich in n-3 fatty acids and turmeric oleoresin. **Ph.D. Thesis.** Suranaree University of Technology, Thailand.

Havsteen, B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids**. Pharmacol. Ther.** 96(2-3): 67-202.

Hempel, J., Pforte, H., Raab, B., Engst, W., Bohm, H., & Jacobasch, G. (1999). Flavonols and flavones of parsley cell suspension culture change the antioxidative capacity of plasma in rats. **Nahrung**. 43(3): 201-204.

Horn, G. W, and W.R. Featherstone. 1972. Influence of allopurinol and azaserine on nitrogen metabolism in the chick. **Poult. Sci.** 51(3): 882-890.

Iniaghe, O. M., S. O. Malomo, and J. O. Adebayo. 2009. Proximate composition and phytochemical constituents of leaves of some Acalypha species. **Pak. J. Nutr.** 8(3): 256-258.

Iskender, H., G. Yenice, E. Dokumacioglu, O. Kaynar, and A. K. Hayirli. 2016. The effects of dietary flavonoid supplementation on the antioxidant status of laying hen. **Braz. J. Poul. Sci**. 18(4): 663-668.

James, M. P, and H. Russ. 2008. Inhibition studies of bovine xanthine oxidase by luteolin, silibinin, quercetin, and curcumin**. J. Nat. Prod** .72(4): 725-731.

Jiang, X, and F. Chen. 1992. The effect of lipid peroxides and superoxide dismutase on systemic lupus erythematosus: a preliminary study. **Clin. Immunol. Immunopathol.** 63(1): 39-44.

Jiang, Z.Y., S.Q. Jiang, Y. C. Lin, P. B. Xi, D. Q. Yu, and T. X. Wu. 2007. Effects of soybean isoflavone on growth performance, meat quality, and antioxidation in male broilers. **Poult. Sci.** 86(7): 1356-1362.

Jindal, A., P. Kumar, and G. Singh. 2012. Extraction and pharmacological evaluation of *Sida acuta* Burm f. **Intern. J. Green Pharm**. 6(3): 34-41.

Kaewwongsa, W., M. Puewdum, and V. Pensuk. 2013. Effect of Jerusalem artichoke powder in diets on egg production performance in laying hens. **Agricultural Sci.** J. 44(1): 271-274.

Kaneko, K., A. Yasuo, F. Tomoko, I. Katsunori, and Y. Noriko. 2014. Total purine and purine bas content of common foodstuffs for facilitating nutritional therapy for gout and hyperuricemia. **Biol. Pharm. Bull.** 37(5): 709-721.

Katiyanon, P., J. Khajarean, B. Tengjaroenkul and K. Pimpukdee. 2006. Effects of feeding Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) on performance, carcass quality and health of broilers. **Khon Kaen Agric.** 34 (2): 199-204.

Kim, H.Y., O. H. Kim, and M. K. Sung. 2003. Effects of phenol-depleted and phenol-rich diets on blood markers of oxidative stress, and urinary excretion of quercetin and kaempferol in healthy volunteers. **J. Amer. Nutri**. 22(3): 217-223.

Kiratikrankul, B and J. Yongsawatdigul. 2014. Purines and meat quality of chicken meat from various breeds. 62 **International Congress of Meat Science and Technology**, 14-19 August, Bangkok, Thailand.

Kleijnen, J., and P. Knipschild. 1992. Ginkgo biloba. **Lancet.** 340(8828): 1136-1139.

Konate, K., A. Souza., A. Y. Coulibaly, N. T. R. Meda, M. Kiendrebeogo, A. Lamien-Meda, J. Millogo-Rsolodimby, M. Lamidi, and O. G. Nacoulma. 2010. In vitro antioxidant, lipoxygenase and xanthine oxidase inhibitory activies of fractions *from Cienfuegosia digitata Cav*, *Sida alba L*. and *Sida acuta* Burm f. **Pak. J. Biol. Sci**. 13(2): 1092-1098.

Koyama, Y., Y. Tmada., M. Kato, and H. Ashihara. 2003. Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming *Theobroma cacao* leaves. **P. Physiol. Biochem**. 41(11-12): 977-984.

Le Floc'h, F., Lafleuriel, J., 1981. L'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase des pousses de topinambour Helianthus tuberosus. **Z. P. flanzenphysiol**. 104(4): 331-340.

Nacoulon, O. G. 1996. Medicinal plants and their traditional uses in Burkina Faso. **Ph.D. Thesis.** University of Ouagadougou, Ouagadougou

Lin, J. Y, and C. Y. Tang . 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food. Chem.** 100(1): 140-147.

Lin, W. C., M. T. Lee, S. C. Chang, Y. L. Chang, C. H. Shih, B. Yu, and T. T. Lee. 2016. Effects of mulberry leaves on production performance and the potential modulation of antioxidative status in laying hens. **Poult. Sci.** 96(5): 1191-1203.

Lopez, G., and S. Leeson. 2005.Utilization of metabolizable energy by young boilers and birds of intermediate growth rate. **Poult. Sci.** 84(7): 1069-1076.

Lou, S. N., H. H. Chen, P. Y. Hsu and D. H. Chang. 2005. Changs in purine content of tilapia surimi product during processing. **Fisheries. Sci.** 71: 859-895.

Lumeij, J.T., E.P.M. Sprang and P.T. Redig. 1998. Further studies on allopurinol-induced hyperuricaemia and visceral gout in red-tailed hawks (Buteo jamicensis). **Avian Pathol.** 27(4), 390-393.

Maliwan, P. 2016. Energy and protein requirements of Korat chickens from 0 to 12 weeks of age. **Ph.D Thesis**. Suranaree University of Technology, Thailand

Mandell, B. F. 2002. Hyperuricemia and gout: a reign of complacency. **Cleve. Clin. J. Med.** 69(8): 583-592.

Maria, M. K., A. Erxleben and J. Ochocki. 2015. Properties and applications of flavonoid metal complexes. **Ph.D Thesis** National University of Ireland. Ireland.

Martin, E. A. and d. J. Farrell. 1998. Strategies to improve the nutritive value of rice bran in poultry diets. II. Changes in oil digestibility, metabolisable energy and attempts to increase the digestibility of the oil fraction in the diets of chickens and ducklings. **Brit. Poul. Sci.** 39(4): 555-559.

Meek, S., A. J. Thomson, L. Sutherland, M. G. F. Sharp, J. Thomson, V. Bishop, S. L. Meddle, Y. Gloaguen, S. Weidt, K. Singh-Dolt, M. Buehr, H. K. Brown, A. C. Gill, and T. Burdon. 2016. Reduced levels of dopamine and altered metabolism in brains of HPRT knock-out rats: a new rodent model of Lesch-Nyhan Disease. **Sci. Rep.** 17(6): 255-262.

Mieam, K. H, and S. Mohamed. 2001. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **J. Agric Food Chem.** 49(6): 3106-3112.

Montanari, A., Chen, J., & Widmer, W. (1998). Citrus flavonoids: a review of past biological activity against disease. Discovery of new flavonoids from Dancy tangerine cold pressed peel oil solids and leaves. **Adv Exp Med Biol**. 439: 103-116.

Moosavi, F., R. Hosseini., L. Saso and O. Firuzi. 2015. Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols**. Drug Des. Devel. Ther.** 21(10): 23-42.

Morel, I., G. Lescoat, P. Cogrel, O. Sergent, N. Pasdeloup, P. Bissot, P. Cillard, and J. Cillard. 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Bio. Pharm.** 45(1): 13-19.

Moriwaki, Y., T. Yamamoto and K. Higashino. 1999. Enzymes involved in purine metabolism. A review of histochemical localization and functional implications. **Histol. Histopathol.** 14: 1321-1340.

Mountzouris, K. C., P. Tsitrsikos, I. Palamidi, A. Arvaniti, M. Mohnl, G. Schatzmayr, and K. Fegeros. 2010. Effects ofnprobiotic inclusion levels in boiler nutrition on growth, nutrient digestibility, plasma immunoglobulin and cercal microflora composition. **Poult Sci.** 89(1): 58-67.

Nagao, A., M. Seki, and H. Kobayachi. 1999. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 63(10): 1787-1790.

Niu, Y., X. L. Wan, X. H. Zhang, L. G. Zhao, J. T. He, J. F. Zhang, L. L. Zhang, and T. Wang. 2016. Effect of supplemental fermented *Ginkgo biloba* leaves at different levels on growth performance, meat quality, and antioxidant status of breast and thigh muscles in broiler chickens. **Poult. Sci.** 96(4): 869-877.

Ouyang, K., X. Mingsheng, J. Yan, and W. Wenjun. 2016. Effects of alfalfa flavonoids on broiler performance, meat quality, and gene expression. **Canad. J. Ani. Sci.** 96(3): 332-341.

Pekel, G. M., J. I. Kim, C. Chapple, and O. Adeola. 2015. Nutritional Characteristics of camelina meal for 3 week old broiler chickens**. Poult. Sci.** 94(3): 371-378.

Podsedek, A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of brassica vegetables: review. **Food Sci. Technol.** 40(1): 1-11.

Poffers, J., J.T. Lumeij, E.P.M. Timmermans-Sprang and P.T. Redig. 2002. Further studies on the use of allopurinol to reduce plasma uric acid concentrations in the red-tailed hawk (Buteo jamicensis) hyperuricaemic model. **Avian Pathol.** 31(6): 567-572.

Prakash, A., R. K. Varma, and S. Ghosal. 1981. Alkaloid constituents of *Sida acuta*, *S. humilis*, *S. rhombifolia* and *S. spinosa*. **Plant. Med.** 43(2): 384-388.

Raimi, M. M., M. Oyekanmi, and B. M. Adegoke. 2014. Proximate, phytochecal and micronutrient composition of *Sida acuta*. **IOSR J. App. Chem.** 7(2): 93-98.

Rice-Evans, C. A., N. J. Miller and G. Paganga. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free. Radic. Biol. Med.** 20(2): 933-956.

Reddy, A. C, and B. R. Lokesh. 1994. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. **Food. Chem. Toxicol.** 32(3): 279-283.

Sarawek, S. 2007**.** Xanthine oxidase inhibition and antioxidant activity of an artichoke leaf extract (*cynarascolymus* l.) and its compounds. **Ph.D Thesis**. University of Florida, United States of America.

Saugstad, O. D. 1988. Hypoxanthine as an indicator of hypoxia: its role in health and disease through free radical production. **Pediatr. Res.** 23(2): 143-150.

Schilling, M. W., V. Radhakrishnan, Y. V. Thaxton, K. Christensen, J. P. Thaxton, and V. Jackson. 2008. The effects of broiler catching method on breast meat quality. **Meat Sci.** 79: 163-171.

Settle, T., E. Falkenstein, and H. Klandorf. 2015. The effect of allopurinol administration on mitochondrial respiration and gene expression of xanthine oxidoreductase, inducible

nitric oxide synthase and inflammatory cytokines in selected tissues of broiler chickens. **Poult. Sci.** 94(10): 2555-2565.

Settle, T., M. D. Carro, E. Falkenstein, W. Radke, and H. Klandrof. 2012. The effects of allopurinol, uric acid, and inosine administration on xanthine oxidoreductase activity and uric acid concentrations in broilers. **Poult. Sci.** 91(11): 2895-2903.

Singh, G., P. Marimuthu, C. S. De-Heluani, and C. Catalan. 2005. Antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Myristica fragrans* Houtt. **J. Food. Sci.** 70: 141-148.

Sirinya, P., T. Suttinon, A. Molee and J. yongsawatdigul. 2014. Comparative study on meat quality of korat chicken and commercial broiler. **Proceedings of the 5th Meat Science and Technology** 25-26 July 2014, Bangkok, Thailand.

status, and serum metabolites of broiler chickens. Poult. Sci. 70(2): 2159-2166.

Stirpe, F., and E. Della Corte. 1965. Regulation of xanthine dehydrogenase in chick liver. Effect of starvation and of administration of purines and purine nucleosides. **Biochem J.** 94(1): 309-313.

Ting, S., H. S. Yeh and T. F. Lien. 2011. Effects of supplemental levels of hesperetin and naringenin on egg quality, serum traits and antioxidant activity of laying hens. **Anim. Feed. Sci. Technol.** 163: 59-66.

Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., & Osawa, T. (1996). Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris L*. **Biochem Pharmacol.** 52(7): 1033-1039.

Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P., Roveri, A., & Pifferi, G. (1994). A novel antioxidant flavonoid affecting molecular mechanisms of cellular activation. **Free Radic Biol Med**. 16(5): 547-553.

Van Beek, T. A., and P. Montoro. 2009. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. **J. Chrom. Ani.** 12(16): 2002-2032.

Vani, N. D., V. K. Modi, S. Kavitha, N. M. Sachindra, and N. S. Mahendrakar. 2006. Degradation of inosine-5-monophosphate (IMP) in aqueous and in layering chicken muscle fibre systems: effect of pH and temperature. **Food Sci. and Technolo.** 39(6): 627-632.

Wang, H, and K. Helliwell. 1998. Determination of flavonols in tea leaves by HPLC with isocratic elution system. **Food Research Internation.** 34(2-3): 223-227.

Wangang, Z., S. Xiao., E. J. Lee. and D. U. Ahn. 2011. effects of dietary oxidation on the quality of broiler breast meat. **Animal industry report**. Iowa State University, United States of America.

Yao, L. H., Y. M. Jiang, J. Shi, F. A. Tomas-Barberan, N. Datta, R. Singanusong, and S. S. Chen. 2004. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant. Food. Human. Nutri.** 59(3): 113-122.

Yildiz, G., P. Sacakli, and T. Gungor. 2008. The effect of dietary Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) on performance, egg quality characteristics and egg cholesterol content in laying hens. **Czech J. Anim. Sci.** 51(8): 349-354.

Young, I. S. and J. V. Woodside. 2001. Antioxidants in health and disease. **Clin Pathol** : 154: 176-186.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

วิธีการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ

1. การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสในแก่นตะวัน

การวัดการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารไฮโพแซนทีนเป็นอิโนซีนมอนอฟอสเฟส และเปลี่ยนอิโนซีนมอนอฟอสเฟสเป็นแซนโทซีนมอนอฟอสเฟสซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ร่วม คือ NADH2 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่จำเพาะที่ 340 นาโนเมตร

1.1 การสกัดเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน (Davies, 1970)

ใช้ส่วนของหัวใต้ดิน นำมาทำความสะอาดจากนั้นนำมาสับเป็นชิ้นขนาดเล็กและอบที่อุณภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-5 วัน ซึ่งจะรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 37°C ตลอดระยะเวลาในการอบเพื่อลดการสูญเสียสภาพของเอนไซม์จากการถูกทำลายโดยความร้อน จากนั้นนำวัตถุดิบมาบดละเอียดผ่านตะแกรง 1 มิลลิเมตร เพื่อเตรียมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ HPRT

วัสดุและอุปกรณ์

1. Eppendorf tube
2. Vortex
3. Microplate reader
4. Centrifuge
5. 96 well plate
6. Micropipette
7. Volume matric flask 10 ml
8. Hot plate
9. Magnetic

สารเคมี

1. Acetone
2. Glycerol
3. 2-mercaptoathanol
4. Potassium-phosphate

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. Phosphoric acid (adjusted pH)

6. Deionized water (DI water) type II

วิธีการสกัด

1. ชั่งผงแก่นตะวัน 1 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 10 มิลลิลิตร

2. เติมสารผสมอะซิโตนเย็น (กลีเซอรอล 1% v/v และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.05% v/v; เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20^{0}C) 8 มิลลิลิตร

3. ใช้แมกเนติกคนด้วยความเร็วรอบ 300 rpm เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาเทสารละลายส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

4. เมื่อครบ 3 ครั้ง ให้นำสารละลายและตะกอนไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้งและนำตะกอนตัวอย่างที่ได้เติมด้วยสารละลายฟอสเฟสบับเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้แมกเนติกคนด้วยความเร็วรอบ 150 rpm 60 นาที

5. เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่ 4^{0}C เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสโดยทันที

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส

การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสในหลอดทดลองครั้งนี้ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (PRECICE® HPRT Assay kit, NOVOCIB) โดยการวัดการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารไฮโพแซนทีนเป็นอิโนซีนมอนอฟอสเฟส และเปลี่ยนอิโนซีนมอนอฟอสเฟสเป็นแซนโทซีนมอนอฟอสเฟสซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ร่วม คือ $NADH_2$ ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่จำเพาะ ดังนั้นในการวัดการเกิดปฏิกิริยาจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $NADH_2$ ที่ 340 นาโนเมตรด้วย microplate reader และใช้สารละลายเร่งปฏิกิริยา (reaction buffer) เป็นตัวควบคุม (blank)

วิธีการคำนวน

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวนค่าการทำงานและปริมาณเอนไซม์ไฮโพแซนทีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรสดังสมการ

$$\text{HPRT activity (nmol/ml/hour)} = [(AR_{sample} - AR_{blank}) / (^{1}6220 \times {}^{2}0.789)]$$

หมายเหตุ: AR_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่าง

AR_{blank} คือค่าการดูดกลืนแสงตัวควบคุม

^{1}6220 คือค่าสัมประสิทธิ์ของ NADH ที่ 340 นาโนเมตร

[2]0.789 คือค่าสัมประสิทธิ์ระยะทางที่แสงเคลื่อนที่ (path length) ของ 96well microplate ด้วยปริมาตร 200 ไมโครลิตร

$N_{sample} = [(HA_{sample} \times N_{std} (mU)) / HA_{std}]$

หมายเหตุ: N_{sample} คือปริมาณเอนไซม์ของตัวอย่าง (mU)

HA_{sample} คือค่าการทำงานเอนไซม์ HPRT ของตัวอย่าง

N_{std} คือปริมาณเอนไซม์ HPRT ของ HPRT purified (75 mU)

HA_{std} คือค่าการทำงานเอนไซม์ HPRT ของ HPRT purified

2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของหญ้าขัดมอญใบยาวในหลอดทดลอง

2.1 การสกัดสารออกฤทธิ์ (Jindal et al., 2012)

นำตัวอย่างหญ้าขัดมอญบดละเอียดมาสกัดสารออกฤทธิ์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วัสดุและอุปกรณ์

1. Soxhlet apparatus
2. Thimble
3. Flat bottom flask 250 ml
4. Separating funnel 1000 ml

สารเคมี

1. Ethanol
2. Petroleum ether
3. Diethyl ether
4. Ethyl acetate
5. Sulfuric acid
6. Deionized water (DI water) type I
7. *Sida acuta* Burm f extract

วิธีการสกัด

1. ชั่งตัวอย่างบดละเอียด 1 กรัมลงในขวดก้นแบน เติมเอทานอล 80% จำนวน 80 มิลลิลิตร นำไปสกัดที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมปิโตรเลียมเอทเทอร์ (petroleum ether) ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) และเอทิล อะซิเตท (ethyl acetate) ชนิดละ 80 มิลลิลิตรทิ้งให้แยกชั้นในกรวยแยกชั้น

3. เมื่อแยกชั้นเก็บเฉพาะสารสกัดส่วนบนและเติมด้วยซัลฟิวริกเข้มข้น 7% จำนวน 80 มิลลิลิตร สกัดต่ออีก 2 ชั่วโมง

4. นำไประเหยสารละลายออก ชั่งน้ำหนักเพื่อนำไปคำนวนสารฟลาโวนอยด์ (crude flavonoids)

วิธีการคำนวน

$$\% \text{ Crude flavonoids} = \frac{\text{A-B x 100}}{\text{C}}$$

หมายเหตุ: A คือน้ำหนักขวดก้นแบนก่อนระเหยสารละลาย
B คือน้ำหนักขวดก้นแบนหลังระเหยสารละลาย
C คือน้ำหนักตัวอย่าง

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ (Ghasemzadeh et al., 2010)

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 2.2 มาวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ด้วย DAD detector

วัสดุและอุปกรณ์

1. Micropipette
2. Volume matric flask 10 ml
3. Clean vial 1.5 ml and capped
4. Filtered nylon 0.45 micrometer
5. Clean syrinx 3 ml

สารเคมี

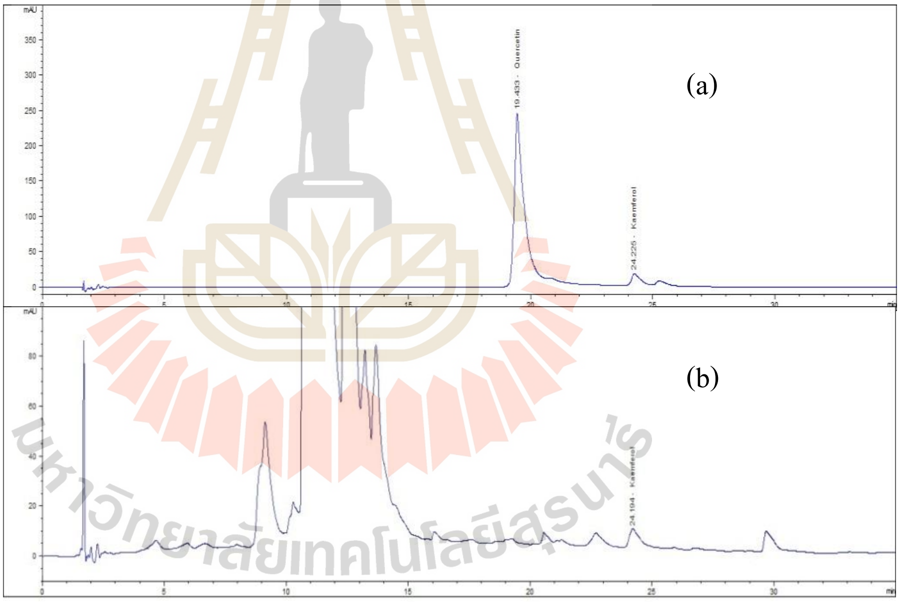
1. Acetic acid
2. Acetonitrile HPLC grade
3. Deionized water (DI water) type II

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. Keammferol HPLC grade
5. Quercitin HPLC grade
6. *Sida acuta* Burm f extract

วิธีการทดสอบ

1. ชั่งสารสกัดจากข้อ 2.2 10 มิลลิกรัมลงในขวดปรับปริมาณ 10 มิลลิลิตร เติมน้ำ DI type IIปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (Stock solution)
2. ดูดสารละลายจาก Stock solution 1 มิลลิลิตรใส่ในกระบอกฉีดยา 3 มิลลิลตร และนำไปกรองผ่าน filtered nylon 0.45 micrometer ลงในขวด vial 1.5 มิลลิลิตร
3. เตรียมสารละลาย mobile phase A ด้วยอะซิติก แอซิด ความเข้มข้น 2% และ mobile phase B ด้วยอะซิโตไนไตร ทำการวัดค่าด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Agilent 1260) ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ด้วย DAD detector



ภาพที่ ก.1 โครโมโตกราฟสารมาตรฐานเควอซิตินและเคมเฟอรอลตามลำดับ (a) โครโมโตกราฟตัวอย่าง (b)

การเตรียมสารละลายมาตราฐาน

เตรียมสารละลายมาตราฐานเคมเฟอรอลและเควอซิติน ด้วยน้ำ DI type II ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบ retention time ระหว่างสารมาตราฐานและตัวอย่าง และใช้พื้นที่ใต้พีคกราฟคำนวนหาปริมาณสารออกฤทธิ์

วิธีการคำนวน

$$Rf = As/Ns$$

$$Ci = f*Ai/Rf$$

หมายเหตุ: Rf คือ response factor ($nmol^{-1}$)

As คือพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตราฐาน

Ns คือปริมาณสารมาตราฐานที่ฉีดเข้าคอลัมน์ (umol)

Ci คือความเข้มข้นสารในตัวอย่าง

Ai คือพื้นที่ใต้กราฟสารในตัวอย่าง

f คือปริมาณการเจือจางตัวอย่าง (dilution factor)

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) ในหลอดทดลอง (Sarawek, 2007)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสด้วยการวัดการสร้างกรดยูริก โดยปฏิกิริยาการยับยั้งการเป็นสารแซนทีนเป็นกรดยูริก ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโมเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

วัสดุและอุปกรณ์

1. Eppendorf tube
2. Vortex
3. Microplate reader
4. 96 well plate
5. Micropipette
6. Volume matric flask 10 ml
7. Glass tube 10 ml

สารเคมี

1. Xanthine oxidase enzyme
2. Xanthine
3. Sodium hydroxide
4. Sodium dihydrogen phosphate
5. Disodium hydrogen phosphate

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. Deionized water (DI water) type II
7. Allopurinol
8. *Sida acuta* Burm f extract

การเตรียมสารละลาย

1. เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล pH 7.8 (สารผสมระหว่าง sodium dihydrogen phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมล ปริมาตร 85 มิลลิลิตร และ disodium hydrogen phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมล ปริมาตร 915 มิลลิลิตรและปรับ pH 7.8)

2. เตรียมสารละลายแซนทีนบัฟเฟอร์ ชั่งสารแซนทีน 12.20 มิลลิกรัมละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล และปรับความเข้มข้นเท่ากับ 400 ไมโครโมล ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมล (pH 7.8)

3. เตรียมสารละลาย xanthine oxidase buffer ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต/มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมล (pH 7.8)

4. เตรียมอัลโลพูรินอล (สารมาตราฐาน) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมล ชั่งอัลโลพูรินอล 1.36 มิลลิกรัมละลายใน DMSO ปริมาตร 2000 ไมโครลิตร จากนั้นปรับระดับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ 5 10 25 50 100 200 และ400 ไมโครโมลด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมล (pH 7.8)

5. เตรียมสารสกัดหญ้าข้อมอญ ความเข้ม 1,000 ไมโครกรัมสารสกัด/มิลลิลิตร ชั่งสารสกัดหญ้าข้อมอญ 10 มิลลิกรัมละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล (pH 7.8) 10 มิลลิลตร จากนั้นปรับระดับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ 100 300 500 และ1000 ไมโครกรัมสารสกัด/มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล (pH 7.8)

วิธีการทดสอบ

1. หลอดควบคุม (control) เติมสารละลาย xanthine oxidase buffer (0.4 ยูนิต/มิลลิลิตร) 7 ไมโครลิตรและเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล (pH 7.8) 127 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 37^{0}C 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลายแซนทีนบัฟเฟอร์ (400 ไมโครโมล) 66 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 37^{0}C 10 นาที เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตรด้วย Spectrophotometer

2. หลอดเปรียบเทียบ (blank) สำหรับใช้เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมเติมสารละลายตามขั้นตอนดังข้อ 1 แต่เปลี่ยนจากสารละลาย xanthine oxidase buffer (0.4 ยูนิต/มิลลิลิตร) 7 ไมโครลิตรเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล (pH 7.8) 7 ไมโครลิตร และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตรด้วย Spectrophotometer

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. หลอดทดสอบ (test sample) เติมสารละลาย xanthine oxidase buffer (0.4 ยูนิต/มิลลิลิตร) 7 ไมโครลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล (pH 7.8) 77 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (อัลโลพูรินอลและสารสกัดหญ้าขัดมอญในแต่ละระดับความเข้มข้น) 50 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 37°C 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลายแซนทีนบัฟเฟอร์ (400 ไมโครโมล) 66 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 37°C 10 นาที เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตรด้วย Spectrophotometer

4. หลอดเปรียบเทียบ (blank) สำหรับใช้เปรียบเทียบกับหลอดทดสอบเติมสารละลายตามขั้นตอนดังข้อ 3 แต่เปลี่ยนจากสารละลาย xanthine oxidase buffer (0.4 ยูนิต/มิลลิลิตร) 7 ไมโครลิตรเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล (pH 7.8) 7 ไมโครลิตร และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตรด้วย Spectrophotometer

วิธีการคำนวน

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวนเปอร์เซนต์การยับยั้งการทำงานเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ดังนี้

$$\% \text{ Xanthine oxidase inhibition} = (1\text{-B/A}) \times 100$$

หมายเหตุ: A คือค่าการเปลี่ยนการดูดกลืนแสงตัวควบคุม (Δ abs (with enzyme-without enzyme)

B คือค่าการเปลี่ยนการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (Δ abs (with enzyme-without enzyme)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของหญ้าขัดมอญใบยาวในหลอดทดลอง (Lin et al., 2016)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการวัดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH; diphynyl-picryhydrazyl radicals) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เมื่อ DDPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมทำให้เกิดสีวงจางๆ จนเป็นสีเหลือง DPPH:H การวัดผลโดยการนำสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย microplate reader

วัสดุและอุปกรณ์

1. Eppendorf tube
2. Vortex
3. Microplate reader

4. 96 well plate

5. Micropipette

สารเคมี

1. DPPH; diphynyl-picryhydrazyl radicals
2. Methanol
3. *Sida acuta* Burm f extract
4. Ascorbic acid

วิธีการทดสอบ

1. เตรียมสาร DPPH ในสารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมล เตรียมสารสกัดหญ้าขัดมอญที่ความเข้มข้นระดับ 2.5 5 10 25 40 และ100 ไมโครกรัมสารสกัด/มิลลิลิตร และเตรียมสารมาตรฐาน (ascorbic acid) ที่ความเข้มข้นระดับ 1 2.5 5 10 และ 20 ไมโครโมล

2. หลอดควบคุม (control) เตรียมโดยใช้เมทานอล 100 ไมโครลิตร และDPPH 400 ไมโครลิตร หลอดตัวอย่างเตรียมโดยใช้สารสกัดหญ้าขัดมอญ 100 ไมโครลิตร และDPPH 400 ไมโครลิตร ในส่วนของหลอดเปรียบเทียบ (blank) เตรียมโดยใช้สารสกัดหญ้าขัดมอญ 100 ไมโครลิตร และเมทานอล 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. นำหลอดตัวอย่าง หลอดควบคุม และหลอดเปรียบเทียบ เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (หรือเก็บไว้จนเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์โดยสังเกตุจากการเปลี่ยนสี จากสีม่วงเป็นสีเหลือง)

4. ปิเปตตัวอย่าง ตัวควบคุม และตัวเปรียบเทียบ 200 ไมโครลิตร ใส่ 96 well plate เพื่อนำไปวัดค่าการดูดที่ความคลื่น 517 นาโนเมตรด้วย microplate reader

วิธีการคำนวน

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยดูจากความสามารถในการเปลี่ยนสาร DPPH ที่มีสีม่วงและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งคำนวนได้จากสมการ

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = 100 - [(A0-A1)/A0] \times 100$$

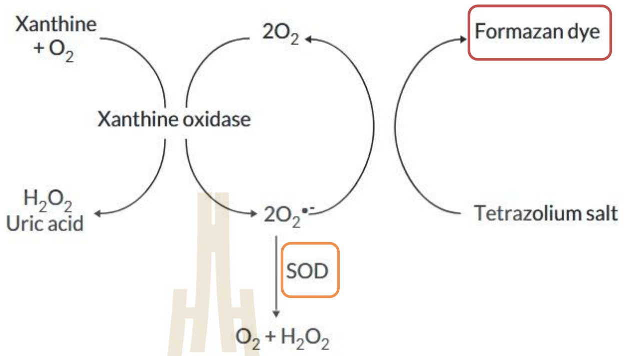
หมายเหตุ: A0 คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

A1 คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3. การวิเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์การทำงานเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในซีรัมครั้งนี้ เป็นการนำตัวอย่างซีรัมและเนื้อไก่มาทดสอบการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป SOD

determination kit (Sigma Aldrich)การวัดการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (unit) โดยวัดปริมาณเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่ใช้ในการยับยั้งอัตราการสร้างสีฟอร์มาแซน (formazan dye)



ภาพที่ ก.2 การยับยั้งการสร้างสีฟอร์แซนโดยเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

3.1 การวิเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในซีรัม (Lin et al., 2016)

วัสดุและอุปกรณ์

1. Micropipette
2. Eppendorf tube
3. Centrifuge
4. Microplate reader

สารเคมี

1. SOD determination kit #19160 (Sigma Aldrich)
2. Deionized water (DI water) type II

วิธีการทดสอบ

1. นำตัวอย่างซีรัมและตัวอย่างสกัดจากเนื้ออกมาปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 x g อุณหภูมิ 4^{0}C เป็นเวลา 30 นาที และดูดสารส่วนใส 1 มิลลิลิตรใส่ใน eppendorf tube และเก็บไว้ที่ -4^{0}C เพื่อวิเคราะห์การทำงานเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระด้วยชุดทดสอบ SOD determination kit

2. ดูดสาระลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate เติม WST working solution 20 ไมโครลิตร และเติม enzyme working solution 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย micropipette (up-down)

3. ตัวเปรียบเทียบ1 (blank1) เติม DI water 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate เติม WST working solution 200 ไมโครลิตร และเติม enzyme working solution 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย micropipette (up-down)

4. ตัวเปรียบเทียบ 2 (blank2) (กรณีตัวอย่างมีสีที่สามารถมองเห็นได้) ดูดสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate เติม WST working solution 200 ไมโครลิตร และเติม DI water 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย micropipette (up-down)

5. ตัวเปรียบเทียบ3 (blank3) เติม DI water 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate เติม WST working solution 200 ไมโครลิตร และ dilution buffer 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย micropipette (up-down)

6. นำ 96 well plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}C 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตรด้วย microplate reader

3.2 การวิเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ Niu et al. (2016)

วัสดุและอุปกรณ์

1. Micropipette
2. Microtube
3. Tube 10 ml
4. Centrifuge
5. Homogenizer
6. Microplate reader

สารเคมี

1. Normal saline
2. SOD determination kit #19160 (Sigma Aldrich)
3. Deionized water (DI water) type II
4. Bovine serum albumin

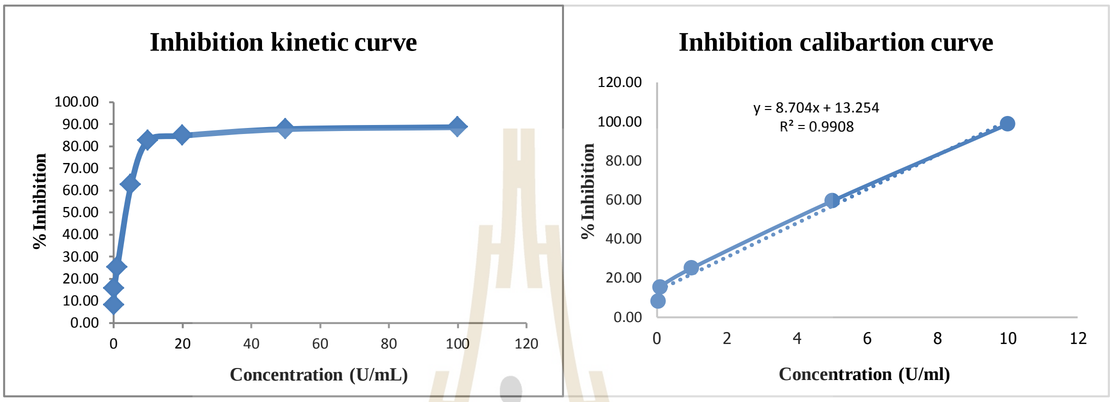
วิธีการทดสอบ

1. นำตัวอย่างชิ้นเนื้อออกแช่ลงในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างที่แช่ไนโตรเจนเหลวมา homogenized ด้วย 0.86% normal saline ที่เย็นในอัตราส่วน 1:9 (w/v) จนละเอียด

2. นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm ที่ 4^{0}C เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสมาทดสอบเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสตามขั้นตอนในข้อ 3.1 และวัดความเข้มข้นโปรตีนโดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานโปรตีน (bovine serum albumin; BSA)

การเตรียมสารละลาย SOD standard

เตรียมสาระลาย SOD standard และปรับระดับความเข้มข้นด้วย dilution buffer ดังนี้ 0.001 0.01 0.05 0.10 1 5 10 20 50 และ100 ยูนิต/มิลลิลิตร เพื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้สร้างสมการ inhibition calibration curve สำหรับคำนวนปริมาณเอนไซม์ SOD



ภาพที่ ก.3 กราฟมาตรฐาน SOD

วิธีการคำนวน

นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและตัวเปรียบเทียบที่ได้มาคำนวนการทำงานเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ดังสมการ

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{[(\text{Ablank 1} - \text{Ablank 3}) - (\text{Asample} - \text{Ablank 2})] \times 100}{(\text{Ablank 1} - \text{Ablank 3})}$$

หมายเหตุ: Asample คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

Ablank1 คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวเปรียบเทียบ1

Ablank2 คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวเปรียบเทียบ2

Ablank3 คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวเปรียบเทียบ3

4. การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีน

การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Agilent 1260) ใช้ reversed phase column วัดความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตรการ

ระบุพีคสารพิวรีนแต่ละตัวในตัวอย่างจะใช้ค่าเวลาการออกของสาร (retention time) แต่ละตัวในตัวอย่างเทียบกับค่าเวลาการออกของสารพิวรีนมาตราฐานแต่ละตัว

4.1 การสกัดสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนในพลาสมา (Bierau, 2011)

วัสดุและอุปกรณ์

1. Micropipette
2. Eppendorf tube
3. Clean vial 1.5 ml and capped
4. Filtered nylon 0.45 micrometer
5. Clean syrinx 3 ml
6. Vortex
7. Centrifuge

สารเคมี

1. Perchloric acid
2. Phenol red
3. Potassium hydroxide (KOH)
4. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
5. Phosphoric acid
6. Purines standard
7. Sida acuta Burm f extract
8. Deionized water (DI water) type II
9. Methanol (HPLC grade)

วิธีการทดสอบ

1. ดูดพลาสมา 200 ไมโครลิตรใส่ eppendorf tube เติมสารละลายเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2 โมล เขย่าให้เข้าและวางทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 10 นาที (ขั้นตอนนี้เป็นการกำจัดโปรตีน (deproteinize) ออกจากตัวอย่าง)

2. เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 20,000 rpm ที่ 4^0C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใส 300 ไมโครลิตร และเติมด้วย 0.5 % ฟีนอลเรดละลายในน้ำ (w/v) 10 ไมโครลิตร เติมสารละลาย KOH ความเข้มข้น 4 โมล + KH_2PO_4 ความเข้มข้น 1 โมล 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและวางทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 15 นาที

3. เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 20,000 rpm ที่ 4^0C เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสด้วยตัวกรองไนลอน 0.2 ไมโครเมตรลงในขวดบรรจุสารฉีด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 การสกัดสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกในมูลและเนื้อ (Lou et al., 2005)

วัสดุและอุปกรณ์

1. Micropipette
2. Glass tube
3. Clean vial 1.5 ml and capped
4. Filtered nylon 0.45 micrometer
5. Clean syrinx 3 ml
6. Vortex
7. Centrifuge
8. Ultrasonic water bath
9. Evaporator
10. Freezer drying
11. Heating box

สารเคมี

1. Trifloroacetic acid
2. Formic acid
3. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
4. Phosphoric acid
5. Deionized water (DI water) type II
6. Methanol (HPLC grade)

วิธีการคำนวน

1. นำตัวอย่างไปประเหยแห้งด้วยความเย็น (freezer drying) ใช้เวลา 3 วัน จากนั้นนำมาบดละเอียด การวิเคราะห์พิวรีนชั่งตัวอย่างเนื้อไก่หรือมูลไก่บดละเอียด 100 มิลลิกรัม ใส่ใน glass tube เติมสารผสม (trifloroacetic acid:formic acid:DI water; 5:5:1; v/v/v) 5 มิลลิลิตร

2. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex และนำไปย่อยด้วยเครื่อง heating box ที่ 100^{0}C เป็นเวลา 40 นาที

3. เมื่อครบเวลาทิ้งสารสกัดให้เย็นและเทสารสกัดใส่ขวดก้นกลม 100 มิลลิลิตรเพื่อกลั่นระเหยกรดออกจากตัวอย่างด้วยเครื่องกลั่นระเหย (evaporator) ภายใต้ความดัน 72 bar อุณหภูมิ 60^{0}C ความเร็วรอบ 150 rpm และทำซ้ำ 2 ครั้งด้วยการเติมน้ำ 5 มิลลิลิตรเพื่อเจือจางกรดในตัวอย่าง

4. หลังจากเจือจางกรดในตัวอย่าง เติม KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.02 โมล ลงในตะกอนตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร และนำไปวางในเครื่อง ultrasonic water bath 5 นาที เพื่อช่วยละลายตะกอนตัวอย่าง

5. เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 20,000 rpm ที่ 4^{0}C เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสด้วยตัวกรองไนลอน 0.2 ไมโครเมตรลงในขวดบรรจุสารฉีด และนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริก

การเตรียมสารมาตราฐานสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน กรดยูริกสำหรับพลาสมาและมูล

เตรียมสารละลายมาตราฐานกัวนีน อะดีนีน ไฮโพแซนทีน แซนทีน และกรดยูริก ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายจาก stock solution ของสารมาตราฐานแต่ละตัว 1 มิลลิลิตร ลงในขวด vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้สำหรับเปรียบเทียบ retention time เพื่อระบุชนิดและคำนวนปริมาณสารกัวนีน อะดีนีน ไฮโพแซนทีน แซนทีน และกรดยูริกในตัวอย่าง

ตารางที่ ข.1 การเตรียมสารมาตราฐานพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล

สารมาตราฐาน	มวลโมเลกุล (กรัม/โมล)	ปริมาณสาร (มิลลิกรัม)	น้ำกลั่น (มิลลิตร)
กัวนีน	151.13	3.02	10
อะดีนีน	135.13	2.70	10
ไฮโพแซนทีน	136.11	2.72	10
แซนทีน	152.11	3.04	10
กรดยูริก	168.11	3.36	10

การวิเคราะห์สารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกในพลาสมาและมูลด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์สารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนสำหรับพลาสมาและมูลประยุกต์ตามวิธิ Lou et al., 2005 จะใช้เครื่อง Agilent HPLC DAD/FID 1260 โดยใช้คอมลัมน์ ZORBAX SB C18 (5 µm, 4.6x250 mm) reversed-phase column ใช้ 0.02M KH_2PO_4 ปรับ pH 3.4 ด้วยกรดฟอสฟอริก เป็นเฟสเคลื่นที่ กำหนดอัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 0.8 มิลลิลิตร/นาที กำหนดปริมาณการฉีดสารเข้าคอมลัมน์ที่ 20 ไมโครลิตร กำหนดอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 35^{0}C และวัดความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร

วิธีการคำนวน

การระบุพีคสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนแต่ละตัวในตัวอย่างจะใช้ค่าเวลาการออกของสารพิวรีนมาตราฐานแต่ละตัว (retention time) เทียบกับค่าเวลาการออกของสารในตัวอย่าง การคำนวนความเข้มข้นสารพิวรีนแต่ละตัวคำนวน ดังสมการ

$$Rf = As/Ns$$

$$Ci = f*Ai/Rf$$

โดย: Rf คือ response factor ($nmol^{-1}$)

As คือพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตราฐานพิวรีนแต่ละตัว

Ns คือปริมาณสารมาตราฐานพิวรีนแต่ละตัวที่ฉีดเข้าคอลัมน์

Ci คือความเข้มข้นสารพิวรีนแต่ละตัวในตัวอย่าง

Ai คือพื้นที่ใต้กราฟสารพิวรีนแต่ละตัวในตัวอย่าง

f คือปริมาณการเจือจางตัวอย่าง (dilution factor)

การเตรียมสารมาตราฐานสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และ Internal standard สำหรับเนื้ออกและสะโพก

เตรียมสารละลายมาตราฐานกัวนีน อะดีนีน ไฮโพแซนทีน และแซนทีน ที่ความเข้มข้น 25 50 100 200 และ300 นาโนโมล/มิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์พิวรีน อนุพันธ์พิวรีนในเนื้ออกและสะโพกจะใช้วิธีการ internal standard curve โดยใช้สารอัลโลพูรินอล ($C_5H_4N_4O$) (Sigma Aldrich; #A0350000) เป็นสารมตราฐานควบคุม ด้วยการ spike internal standard ที่ความเข้มข้น 300 นาโนโมลในปริมาณที่เท่ากันทั้งในขวดสารมาตราฐานสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนและขวดตัวอย่าง

ตารางที่ ข.2 การเตรียมสารมาตราฐานพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนกรดยูริก และอัลโลพูรินอลที่ ความเข้มข้น stock solution เท่ากับ 2 ไมโครโมล

ความเข้มข้น (nM)	กัวนีน+แซนทีน (µL)	ไฮโพแซนทีน (µL)	แซนทีน (µL)	อะดีนีน (µL)	อัลโลพูรินอล (µL)	น้ำกลั่น (µL)
25	12.5	12.5	12.5	12.5	150	800
50	25	25	25	25	150	750
100	50	50	50	50	150	650
200	100	100	100	100	150	450
300	150	150	150	150	150	250

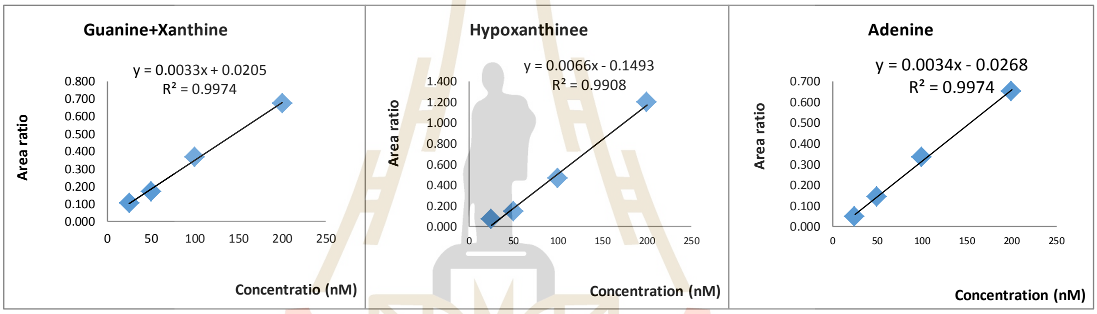
การวิเคราะห์สารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนในเนื้ออกและสะโพกด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์สารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนสำหรับเนื้ออกและสะโพก ประยุกต์ตามวิธี Bierau, 2011 จะใช้เครื่อง Agilent HPLC DAD/RID 1260 โดยใช้คอมลัมน์ Hypersil ODS C18 column (5 µm, 4.0x250 mm) reversed-phase column ใช้ 0.02M KH_2PO_4 ปรับ pH 3.4 ด้วยกรดฟอสฟอริก เป็น

เฟสเคลื่อนที่ A และใช้ 15% Acetone ละลายในเฟสเคลื่อนที่ A เป็นเฟสเคลื่อนที่ B กำหนดอัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 0.5 มิลลิลิตร/นาที กำหนดปริมาณการฉีดสารเข้าคอมลัมน์ที่ 20 ไมโครลิตร กำหนดอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 25^{0}C และวัดความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร

วิธีการคำนวน

การระบุพีคสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนในตัวอย่างจะใช้ค่าเวลาการออกของสารมาตราฐานพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน (retention time) เทียบกับค่าเวลาการออกของพีคสารในตัวอย่าง การสร้างสมการ internal standard curve ของสารมาตรฐานพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน จะกำหนดให้แกน y คือ area ratio ที่ได้จากพื้นที่ใต้พีกของสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนหารด้วยพื้นที่ใต้พีกของสาร internal standard กำหนดให้แกน x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน จากนั้นคำนวนความเข้มข้นสารพิวรีน อนุพันธ์พิวรีนในตัวอย่างจากสมการ internal standard curve



ภาพที่ ก.4 กราฟมาตฐานกัวนีน+แซนทีน ไฮโพแซนทีน และอะดีนีน ตามลำดับ

การคำนวนสารกัวนีนและแซนทีน

$$y = 0.0033x+0.0205$$

โดย: y คือ area ratio ที่ได้จากพื้นที่ใต้พีกของสารกัวนีนและแซนทีนในตัวอย่างหารด้วยพื้นที่ใต้พีกของสาร internal standard

x คือ ความเข้มข้นสารกัวนีนและแซนทีนในตัวอย่าง

การคำนวนสารไฮโพแซนทีน

$$y = 0.0066x-0.1493$$

โดย: y คือ area ratio ที่ได้จากพื้นที่ใต้พีกของสารกัวนีนและแซนทีนในตัวอย่างหารด้วยพื้นที่ใต้พีกของสาร internal standard

x คือ ความเข้มข้นสารกัวนีนและแซนทีนในตัวอย่าง

การคำนวนสารอะดีนีน

$$y = 0.0034x-0.0268$$

โดย: y คือ area ratio ที่ได้จากพื้นที่ใต้พีกของสารกัวนีนและแซนทีนในตัวอย่างหารด้วยพื้นที่ใต้พีกของสาร internal standard

x คือ ความเข้มข้นสารกัวนีนและแซนทีนในตัวอย่าง

5. การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารอิโนซินมอนอฟอตเฟส (IMP) ในเนื้อ

การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารอิโนซิน มอนอฟอตเฟส (IMP) ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Agilent 1260 DAD/RID) ใช้ reversed phase column วัดความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร การระบุพีคสารอิโนซินมอนอฟอตเฟสในตัวอย่างจะใช้ค่าเวลาการออกของสาร (retention time) ในตัวอย่างเทียบกับค่าเวลาการออกของสามาตราฐานอิโนซินมอนอฟอตเฟส

5.1 การสกัดสารอิโนซิน มอนอฟอตเฟส

วัสดุและอุปกรณ์

1. Micropipette
2. Eppendorf tube
3. Clean vial 1.5 ml and capped
4. Filtered nylon 0.45 micrometer
5. Clean syrinx 3 ml
6. Vortex
7. Centrifuge
8. Homogenizer

สารเคมี

1. Perchloric acid
2. Phenol red
3. Potassium hydroxide (KOH)

4. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
5. Phosphoric acid
6. Inosine monophosphate standard
7. Deionized water (DI water) type II
8. Acetone (HPLC grade)
9. Methanol (HPLC grade)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อสด 5 กรัม (ตัวอย่างบดละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน) ใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร

2. เติม 7.5% percholric acid (เย็น) 30 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง นำตัวอย่างไปปั่นละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติม 7.5% percholric acid (เย็น) 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองปิดฝาแล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

3. นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่งเหวี่ยงที่ 2,000 x g อุณหภูมิ 4^0C 5 นาที เมื่อครบเวลาดูดส่วนใสมากรองด้วยกระดาษ Whatman no.1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตรด้วย 7.5% percholric acid (เย็น)

4. ดูดสารละลายตัวอย่าง และ neutralizing buffer pH 7.6 (6.66M KH_2PO_4+6.66M K_2HPO_4) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นทิ้งไว้ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4^0C (จนเกิดตะกอนสีขาว) และดูดสารละลายส่วนใสมากรองด้วย Filtered nylon 0.45 micrometer ใส่ในขวดบรรจุสารฉีด และนำไปวิเคราะห์ทันที

การเตรียมสารมาตราฐานอิโนซินมอนอฟอสเฟส สำหรับวิเคราะห์เนื้ออกและสะโพก

เตรียมสารละลายมาตราฐานอิโนซิน มอนอฟอสเฟส ($C_{10}H_{11}N_4O_8PNa_2$*H_2O) (Sigma Aldrich; #I4625-5G) ที่ความเข้มข้น 30 50 100 200 300 และ400 นาโนโมล

ตารางที่ ข.3 การเตรียมสารมาตราฐานพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และกรดยูริกที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมล

ความเข้มข้น (nM)	ปริมาตร (µL)	น้ำกลั่น (µL)
30	15	985
50	25	975
100	50	950
200	100	900
300	150	850
400	200	800

การวิเคราะห์สารอิโนซินมอนอฟอสเฟส (IMP) ในเนื้ออกและสะโพกด้วยเครื่อง HPLC

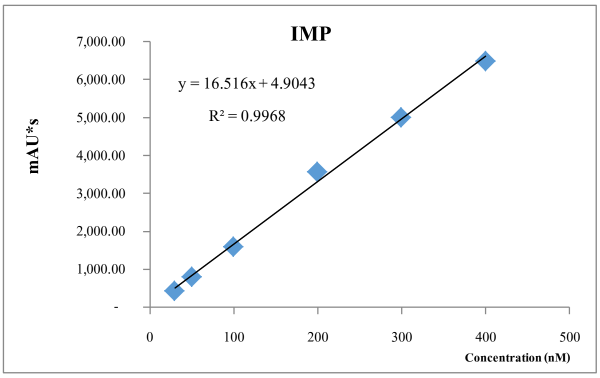
การวิเคราะห์สารอิโนซินมอนอฟอสเฟสในเนื้ออกและสะโพก ประยุกต์ตามวิธี Kaneko et al, (2014) จะใช้เครื่อง Agilent HPLC DAD/RID 1260 โดยใช้คอมลัมน์ Hypersil ODS C18 column (5 µm, 4.0x250 mm) reversed-phase column ใช้ 150 mM KH_2PO_4 + 150 mM KCL ปรับ pH 6.0 ด้วย 50% KOH เป็นเฟสเคลื่อนที่ A และใช้ 20% Acetone ละลายในเฟสเคลื่อนที่ A เป็นเฟสเคลื่อนที่ B กำหนดอัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 0.5 มิลลิลิตร/นาที กำหนดปริมาณการฉีดสารเข้าคอมลัมน์ที่ 10 ไมโครลิตร กำหนดอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 25^{0}C และวัดความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร กำหนดอัตราการไหลเฟสเคลื่อน ดังนี้

เวลาที่ 0-5 นาที	เพิ่มความเขมข้นของสารละลาย B เป็น 3%
เวลาที่ 5-10 นาที	เพิ่มความเขมข้นของสารละลาย B เป็น 9%
เวลาที่ 10-15 นาที	เพิ่มความเขมข้นของสารละลาย B เป็น 20%
เวลาที่ 15-20 นาที	เพิ่มความเขมข้นของสารละลาย B เป็น 100%
เวลาที่ 25-30 นาที	เพิ่มความเขมข้นของสารละลาย B เป็น 100%

วิธีการคำนวน

การระบุพีคสารอิโนซินมอนอฟอสเฟสในตัวอย่างจะใช้ค่าเวลาการออกของสารมาตรฐานสารอิโนซิน มอนอฟอสเฟส (retention time) เทียบกับค่าเวลาการออกของพีคในตัวอย่าง การสร้างสมการ IMP standard curve จะกำหนดให้แกน y คือ พื้นที่ใต้พีกของสารอิโนซิน มอนอฟอสเฟส กำหนดให้แกน x คือ ความเข้มข้นของสารอิโนซิน มอนอฟอสเฟส จากนั้นคำนวนความเข้มข้นสารอิโนซินมอนอฟอสเฟสในตัวอย่างจากสมการ IMP standard curve

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



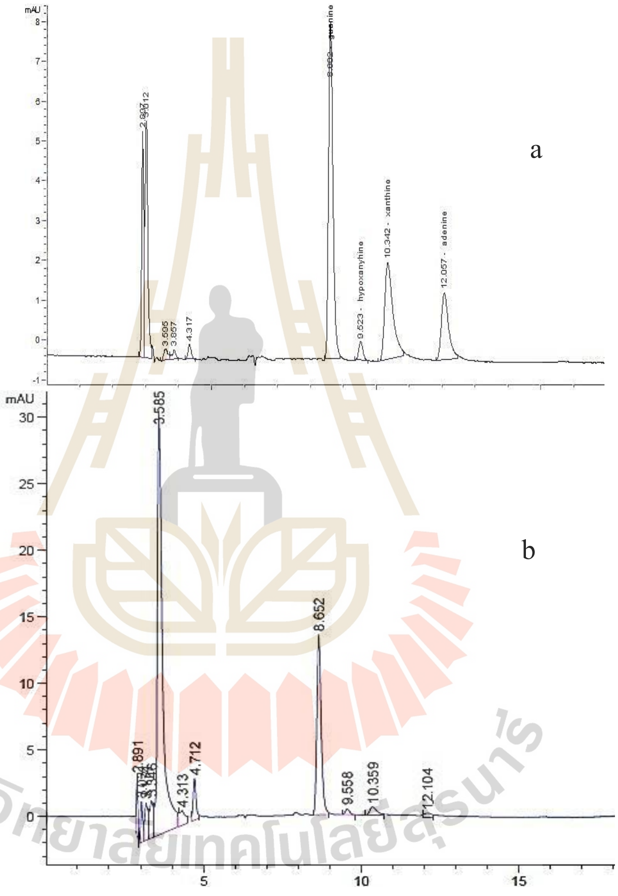
ภาพที่ ก.5 กราฟมาตฐาน IMP

การคำนวนอิโนซินมอนอฟอสเฟส

$$y = 16.516x+4.9043$$

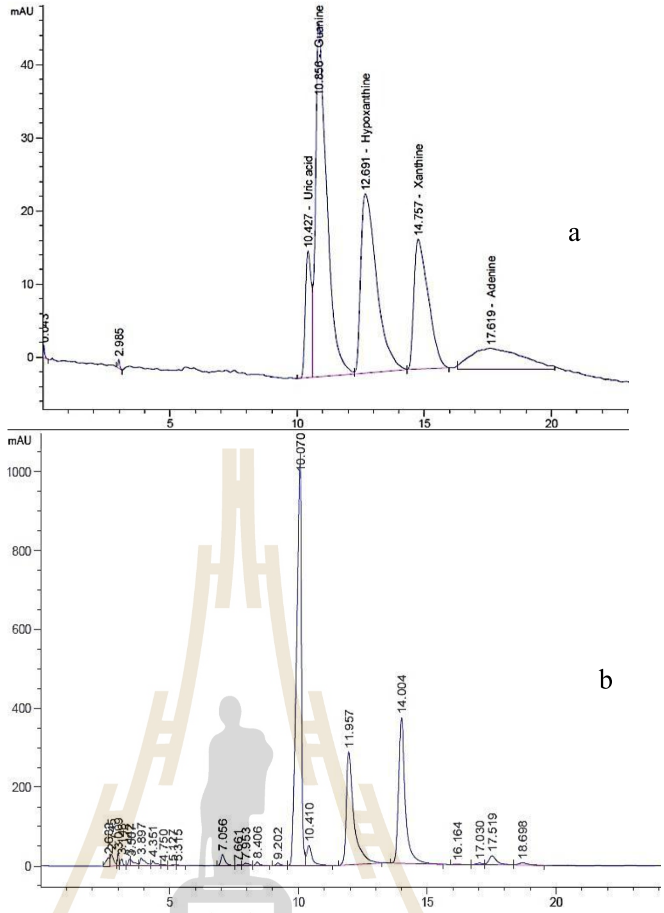
โดย: y คือ พื้นที่ใต้พีกของสารอิโนซินมอนอฟอสเฟสในตัวอย่าง

x คือ ความเข้มข้นของสารอิโนซินมอนอฟอสเฟสในตัวอย่าง



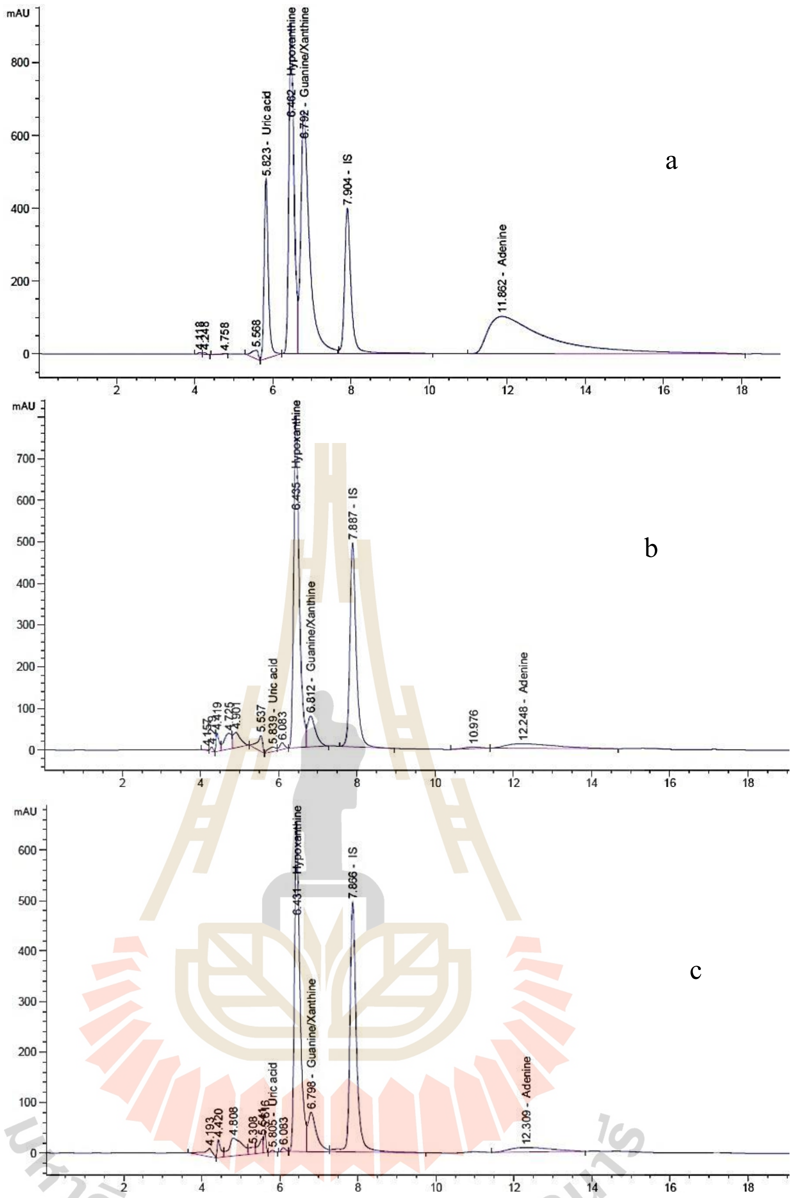
ภาพที่ ก.6 โครโมโตกราฟและลำดับ retention time ของสารมาตรฐานพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีน (a) โครโมโตกราฟสารพิวรีนและอนุพันธ์พิวรีนในพลาสมา

หมายเหตุ: วิเคราะห์ด้วย Agilent HPLC 1260 (DAD/FID); คอลัมน์ ZORBAX SB C18 (5 µm, 4.6x250 mm)



ภาพที่ ก.7 โครโมโตกราฟและลำดับ retention time ของสารมาตรฐานพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีน (a) โครโมโตกราฟสารพิวรีนและอนุพันธ์พิวรีนในมูล (b)

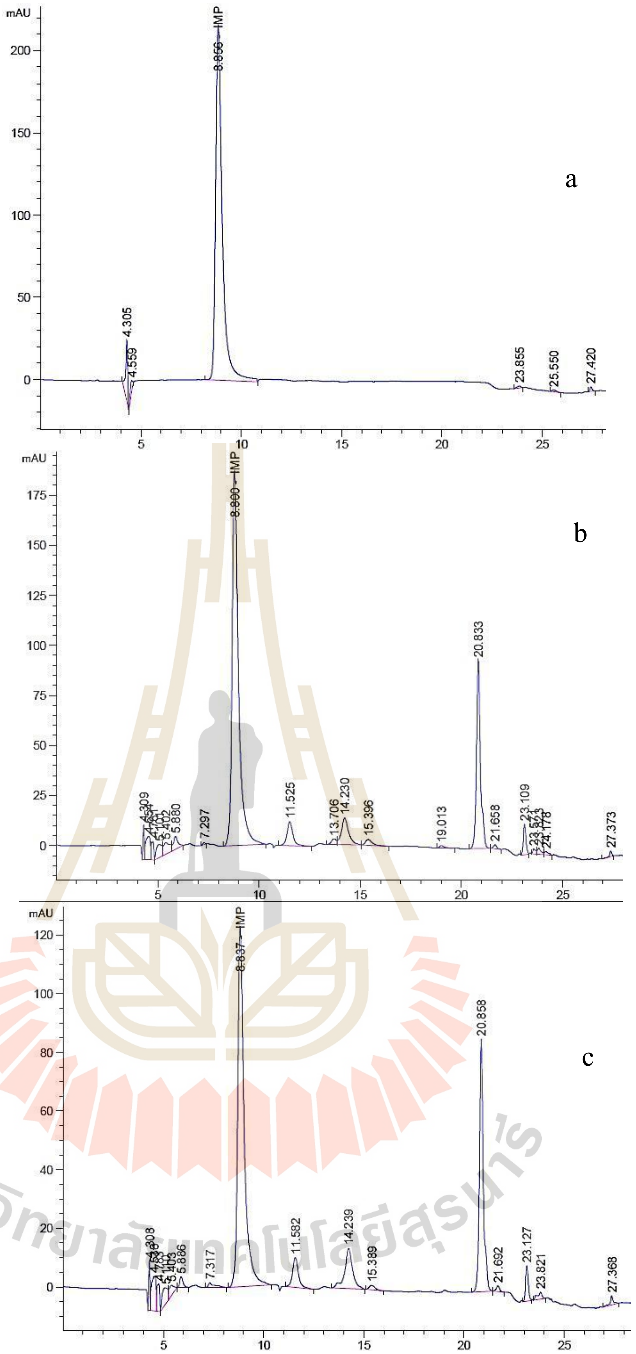
หมายเหตุ: วิเคราะห์ด้วย Agilent HPLC 1260 (DAD/FID); คอลัมน์ ZORBAX SB C18 (5 µm, 4.6x250 mm)



ภาพที่ ก.8 โครโมโตกราฟและลำดับ retention time ของสารมาตรฐานพิวรีน อนุพันธ์พิวรีน และ Internal standard (a) โครโมโตกราฟสารพิวรีน และอนุพันธ์พิวรีนในเนื้ออก (b) เนื้อสะโพก (c)

หมายเหตุ: IS = Internal standard; วิเคราะห์ด้วย Agilent HPLC 1260 (DAD/RID); คอลัมน์ Hypersil ODS C18 column (5 µm, 4.0x250 mm)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพที่ ก.9 โครโมโตกราฟและลำดับ retention time ของสารมาตรฐานอิโนซิน มอนอฟอสเฟส (a) โครโมโตกราฟสาอิโนซิน มอนอฟอสเฟสในเนื้ออก (b) เนื้อสะโพก (c)

หมายเหตุ: IS = Internal standard; วิเคราะห์ด้วย Agilent HPLC 1260 (DAD/RID); คอลัมน์ Hypersil ODS C18 column (5 µm, 4.0x250 mm)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอาภรณ์ คิมเข้ม เกิดวันที่ 5 ตุลาคม พ. ศ. 2536 ที่จังหวัดอุดรธานี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนโชคชัยสามัคคี อำเภอโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา และเข้าศึกษาปริญญาตรีใน สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีเมื่อ พ.ศ. 2558 นั้นเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2559

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี