บทนำ

ในช่วงปี พ.ศ. 2532-2541 ผลผลิตกุ้งของโลกได้เพิ่มขึ้น 696 เปอร์เซ็นต์ และมีราคาที่สูงขึ้นถึง 957 เปอร์เซ็นต์ (New, 2000) ในปี พ.ศ. 2540 ผลผลิตกุ้งก้ามกรามซึ่งเป็นกุ้งน้ำจืดที่สำคัญที่สุดของไทยมีมูลค่าราว 3,000 ล้านบาท (สถิติผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดประจำปี 2540, 2543) ปริมาณกุ้งที่เลี้ยงส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงเพื่อบริโภคภายในประเทศ ส่วนน้อยเป็นการเลี้ยงเพื่อส่งออก ในอนาคตได้มีการคาดการณ์ถึงการเพิ่มของปริมาณการผลิตและการบริโภคกุ้งก้ามกรามทั้งในประเทศและของโลก

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามได้มีการพัฒนาไปในเชิงพาณิชย์ มีการปรับการเลี้ยงไปเป็นแบบพัฒนา โดยเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูง แม้มีการจัดการที่ดีแต่การที่กุ้งอยู่กันอย่างหนาแน่นในพื้นที่จำกัด ทำให้กุ้งมีความเครียดสูง เกษตรมักประสบปัญหาความสูญเสียจากการป่วยตายของกุ้ง และเพื่อลดความเสียหายดังกล่าว ในขณะที่ยังไม่ทราบผลการตรวจวินิจฉัยถึงสาเหตุ เกษตรกรก็มักใช้ยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะในยากลุ่มไนโตรฟูแรน และยาคลอแรมเฟนิคอล แต่เมื่อไม่ได้ผลก็ต้องจับกุ้งขายทำให้เกิดปัญหายาตกค้างในกุ้ง ปัญหาการดื้อยา (Barticados et al., 1990; Nash et al., 1992; Barticados and Padihare, 1992; Abraham et al., 1997; Herwing et al., 1997; Ruangpan et al., 1997; Rahim et al., 1998) รวมถึงปัญหาการส่งออกกุ้งไปยังต่างประเทศ (ชลอ, 2547) และจากปัญหาในข้างต้นที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีความพยายามที่จะนำสารสกัดสมุนไพรซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ตามธรรมชาติ โดยเฉพาะชนิดที่มีฤทธิ์ต่อต้านจุลชีพคล้ายกับยาปฏิชีวนะมาใช้ รวมทั้งฟ้าทะลายโจร (สุภาพร, 2545; Parveen and Kumar, 2000; Okeke et al., 2001; Immanuel et al., 2003; Singha et al., 2003)

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) เป็นพืชล้มลุก ที่มีสารออกฤทธิ์ 2 กลุ่ม คือ สารกลุ่ม lactone เช่น andrographolide, deoxyandrographaolide และ neoandrographolide และสารกลุ่ม flavone (สุภาพร, 2545) ปัจจุบันมีรายงานถึงฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ในฟ้าทะลายโจรในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส รา (จริยา, 2536; Chang et al., 1991; Zhang et al., 1995; Calabrese *et al.*, 2000; Singha et al., 2003; Sivaram, 2004; Reddy et al., 2005) ลดการอักเสบ (Madav et al., 1996; Shen et al., 2002) ป้องกันตับอักเสบ (Roy and Poddar 1984; Kapil et al., 1993) ต้านเชื้อ HIV (Reddy et al., 2005; Calabrese et al., 2000) แก้ไข้ (Saxena et al., 2000) และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Puri et al., 1993; Panossian et al., 2002; See et al., 2002; Ajaya et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีการใช้ฟ้าทะลายโจรอย่างแพร่หลายสำหรับแก้ท้องเสีย (ชัยโย และ ปัญจางค์ 2532; Gupta et al., 1993) แก้ไข้ (Vedavathy and Rao, 1991) ลดการอักเสบ แก้เจ็บคอ (Thamlikitkul et al., 1991) ป้องกันและบรรเทาอาการหวัด (Careres et al., 1997; Careres et al., 1999)

ในประเทศจีนมีการนำสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมาใช้ผสมอาหารปลาเพื่อควบคุมภาวะลำไส้อักเสบ (enteritis) (Direkbusarakom, 2000) ในปี พ.ศ. 2539 สถาพรและคณะ ได้รายงานว่าสมุนไพรหลายชนิด รวมทั้งสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio spp.* ในห้องปฏิบัติการได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแม้มีรายงานถึงสมุนไพรชนิดอื่นๆ เช่น ลูกใต้ใบ (*Phylanthus amarus*) ที่สามารถต่อต้านแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ (ภัสสรและคณะ, 2540) สารสกัดจากสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*) ต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคเรืองแสง (สถาพรและคณะ, 2544) พญายอ (*Clinacanthus nutaus*) เพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว (ลิลาและคณะ, 2543) กระเทียม (*Allium sativum*) สดบดละเอียดช่วยกำจัด gregarine (วรวุฒิและคณะ, 2546) และ สาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*) ช่วยเพิ่มอัตรารอดจากโรคตัวแดงดวง

ขาวในกุ้งกุลาดำได้ (ปิยาลัย และคณะ, 2547) แต่ที่ผ่านมางานวิจัยและและประยุกต์การใช้สมุนไพรส่วนใหญ่เป็นการทดลองถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรที่ยับยั้งเชื้อในห้องปฏิบัติการ ยังขาดข้อมูลการวิจัยในลักษณะที่ใกล้เคียงกับสภาพการเลี้ยงกุ้งจริง ทำให้การนำผลงานวิจัยไปใช้มีขอบเขตจำกัด ด้วยเหตุนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรที่ผสมในอาหารกุ้ง ก่อนกุ้งได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas spp.* ซึ่งเป็นสภาพที่สอดคล้องกับการเลี้ยงจริง หากผลการศึกษาทำให้ทราบปริมาณสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ใช้ได้ผลในกุ้ง รวมถึงวิธีแปรรูปและการควบคุมคุณภาพสารสกัด นอกจากจะช่วยลดปัญหายาปฏิชีวนะตกค้างและการดื้อยาแล้ว เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งสามารถเพิ่มการส่งกุ้งไปต่างประเทศได้มากขึ้น และเกษตรกรที่มีอาชีพเพาะปลูกพืชสมุนไพร ยังมีรายได้จากการปลูกฟ้าทะลายโจรเพื่อจำหน่ายมากขึ้นในอนาคต

วิธีการทดลอง

1. สารเคมีและอุปกรณ์ที่สำคัญ

1. Acetronitrile (HPLC grade; BDH, UK)
2. Methanol (gradient grade; BDH, UK)
3. Methanol (AR grade; BDH, UK)
4. purified water (Mili-Q system; Milipore, Germany)
5. Andrographolide (AR grade; Aldrich)
6. Nova-Pak C_{18} column 3.9x 150 mm 5μm (Waters, USA)
7. Analytical Guard column 4.6x 12.5 mm 5μm (Agilent, USA)
8. Filter ชนิด nylon pore size 0.45 μm
9. Sonicator (Agilent, USA)
10. Sodium sulfate (AR grade; Fluka)
11. Sodium hydroxide (AR grade; Fluka)
12. Hydrochloric acid (AR grade; Flkuka)
13. เครื่อง HPLC-Diode Array Detector และโปรแกรม HP CHEM STATION
14. อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์และแยกเชื้อแบคทีเรีย เช่น ตะเกียง petri dish, loop ฯ
15. Brain Heart Infusion (Broth/ Agar)
16. สารสกัดน้ำสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเข้มข้น (บริษัท ขาวละอออภัสช จำกัด, กรุงเทพฯ)
17. เครื่องบดผสมอาหาร (บ. พงษ์ศธร จำกัด, นครราชสีมา)
18. เครื่องทำอาหารแบบ Mincer (Champion, Bangkok)
19. ตู้กระจกและอุปกรณ์เลี้ยงกุ้ง
20. วัตถุดิบอาหารกุ้ง เช่น ปลาป่น กากถั่ว รำ ปลายข้าว เปลือกกุ้ง เกลือแร่ วิตามิน ฯ

2. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดฟ้าทะลายโจร

2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หา andrographolide (ดัดแปลงจาก อรัญญา ศรีบุษราคัม และคณะ, 2548)

2.1.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำสกัดฟ้าทะลายโจรเข้มข้นและสารสกัดฟ้าทะลายโจรแกรนูล

วิธีการวิจัย

1. ชั่งตัวอย่างฟ้าทะลายโจรในรูปน้ำสกัดเข้มข้น (บริษัท ขาวละอออเภสัช จำกัด, กรุงเทพฯ) และรูปแกรนูล 1 กรัม (น้ำหนักแน่นอน) (วัชรี คุณกิตติ และคณะ, โครงการพัฒนาสารสกัดฟ้าทะลายโจรแกรนูลเป็นสารเสริมอาหารสำหรับสัตว์, สกว. RDG4720021) ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ใส่เมทานอลบริสุทธิ์ (absolute methanol) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปโซนิเคตเป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

2. เจือจางสารละลายตัวอย่าง โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

3. เจือจางสารละลายตัวอย่าง โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วย mobile phase นำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วย HPLC

4. โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ Nova Pak C_{18} (3.5x19mm, 4 μm) สารชะล้าง (mobile phase) ที่ใช้ คือ เมทานอล:น้ำ (45:55) (ข้อมูลเบื้องต้นผู้วิจัย) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 229 นาโนเมตร และ ปริมาณตัวอย่างที่ฉีด 20 ไมโครลิตร

2.1.2 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดฟ้าทะลายโจรแกรนูลผสมในอาหารกุ้ง

วิธีการวิจัย

1. สุ่มชั่งตัวอย่างอาหารกุ้งประมาณ 20 กรัม บดละเอียด

2. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม (น้ำหนักแน่นอน) ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ใส่เมทานอลบริสุทธิ์ (absolute methanol) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

3. กรองสารละลายตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42

4. เจือจางสารละลายตัวอย่างที่กรองได้ โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ

5. กรองสารละลายด้วยตัวกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

6. โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ Nova Pak C_{18} (3.5x19mm, 4 μm) สารชะล้างที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตร์ล:เมทานอล:น้ำ (10:30:60) (รูปที่ 8-9) (ข้อมูลเบื้องต้นผู้วิจัย) มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 229 นาโนเมตร และปริมาณตัวอย่างที่ฉีด 20 ไมโครลิตร ค่าที่วัดได้นำมาคำนวณจากกราฟมาตรฐาน

2.1.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หา total lactone (อรัญญา ศรีบุษราคัม และคณะ, 2548; Thai Pharmacopia, 1995)

วิธีการวิจัย

1. ใส่ sodium sulfate ในขวดรูปชมพู่แล้วนำไป reflux จากนั้น

2. นำมากรองผ่าน celite 1 กรัม หลังกรองล้าง celite ด้วย hot ethanol 2 มิลลิลิตร 3 ครั้ง หลังจากนั้นจึงเติมน้ำ 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น

3. เติม 0.1 M sodium hydroxide จนเป็นกลาง โดยใช้ phenolphthalein เป็น indicator แล้วเติม 0.1 M sodium hydroxide 5 มิลลิลิตร Reflux บน water bath 30 นาที ทิ้งให้เย็น

4. ไตเตรทด้วย 0.05 M hydrochloric acid โดยใช้ phenolphthalein เป็น indicator คำนวณปริมาณ sodium hydroxide ที่เหลือและที่ใช้ไปในการทำปฏิกริยากับ lactone ซึ่ง 0.1 M sodium hydroxide 1 มล. จะทำปฏิกริยากับ andrographolide 35.05 มิลลิกรัม

3. การวิเคราะห์หา andrographolide และ total lactone

3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและกราฟมาตรฐาน

วิธีการวิจัย

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเริ่มต้น (stock standard) เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐาน andrographolide (Alddrich, USA) 25 มิลลิกรัม (น้ำหนักแน่นอน) ละลายในเมทานอล ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล ปิเปตสารละลายที่ได้มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) โดยนำสารละลายมาตรฐานเริ่มต้นเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยสารชะล้างให้มีความเข้มข้น 1, 2, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเริ่มต้น มา 1, 1, 1, 2, และ 4 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50, 25, 10, 10, และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.2 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

วิธีการวิจัย

1. เตรียม Stock standard solution สารมาตรฐานสำหรับกราฟมาตรฐาน (Standard calibration curve) และสารละลายตัวอย่าง ดังข้อ 3.1

2. สุ่มชั่งตัวอย่างอาหารกุ้งประมาณ 20 กรัม บดละเอียด แล้วชั่งตัวอย่าง 1 g (น้ำหนักแน่นอน) ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 ml ใส่เมทานอลปริมาตร 30 ml นำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 ml ด้วยเมทานอล กรองสารละลายตัวอย่าง

ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 เจือจางสารละลายตัวอย่างที่กรองได้ โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 10 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตร

ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรจนครบ 25 ml ด้วย mobile phase กรองสารละลายด้วยตัวกรองขนาดรูพรุน 0.45 μ นำไปวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการแยกสาร

3.2.1 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ HPLC ในการวิเคราะห์ Andrographolide ในอาหาร

วิธีการวิจัย

1. ในเบื้องต้นได้ใช้สภาวะของวิธีการวิเคราะห์ andrographolide ในตัวอย่างน้ำสกัดเข้มข้น คือใช้ mobile phase ของ MeOH:H_2O ในอัตราส่วน(45:55) (อรัญญา ศรีบุศราคัม และ คณะ, 2548) แล้วปรับองค์ประกอบและอัตราส่วนของ mobile phase ให้พีคของ andrographolide ในตัวอย่างอาหารกุ้งแยกออกมาจาก peak ที่รบกวนใน sample blank ได้ชัดเจนมากขึ้น (รูปที่ 4)

3.2.2 การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and range)

วิธีการวิจัย

1. ตรวจวิเคราะห์ spiked sample (blank ตัวอย่าง เติมสารละลายมาตรฐาน) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 2.0, 10.0, 25.0 และ 50.0 μg/ml ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง HPLC

2. นำค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค และความเข้มข้นไปสร้างกราฟ หาค่า Corelation coefficient เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง และช่วงของการตรวจวิเคราะห์

3.2.3 การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

วิธีการวิจัย

1. ตรวจวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นความถูกต้องของวิธีการสกัดของ spiked sample andrographolide ที่ระดับความเข้มข้น 2.00, 10.00, และ 25.00 μg/ml จำนวนความเข้มข้นละ 6 ครั้ง

2. คำนวณความเข้มข้นที่วัดได้เมื่อเทียบกับ standard curve แล้วทำการเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นจริง

3.2.4 การหาเปอร์เซ็นต์การสกัดกลับคืน (Percent recovery)

วิธีการวิจัย

1. ทำการศึกษาเพื่อหาความสามารถของวิธีที่ใช้สกัด spiked sample และความเบี่ยงเบนที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับสารในสารละลายที่ไม่ผ่านการสกัด โดยใช้ 3 ความเข้มข้นในการศึกษา (2.00, 10.00 และ 25.00 μg/ml) ความเข้มข้นละ 6 ตัวอย่าง

2. จากนั้นเปรียบเทียบ %recovery ของ spiked sample ที่ผ่านกับที่ไม่ผ่านการสกัด

3.2.5 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

วิธีการวิจัย

1. การหาเปอร์เซ็นต์ของความแม่นยำของการสกัดของ spiked sample โดยวัดที่ความเข้มข้นของ andrographolide 3 ระดับคือ 2.00, 10.00 และ 25.00 ng/ml โดยในกรณี intra-day

validation ทำการฉีดตัวอย่างให้แล้วเสร็จในวันเดียว จำนวน 6 ครั้ง และในกรณี inter-day validation ทำการฉีดตัวอย่างให้แล้วเสร็จทุกความเข้มข้นในแต่ละวันๆละ 6 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน

2. จากนั้นเปรียบเทียบความเบี่ยงเบนที่เกิดขึ้นในแต่ละวันและ ระหว่างวัน

3.2.6 การทดสอบค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ (Limit of Detection, LOD and limits of quantitative (LOQ) (Mercher and Beecher, 2000)

วิธีการวิจัย

1. ทำโดยการวิเคราะห์ spike sample ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัด peak ของสารได้ โดยการฉีดตัวอย่างจำนวน 8 ตัวอย่างใน condition ของการตรวจวัดปริมาณของ andrographolide ในตัวอย่างอาหารกุ้ง

2. นำพื้นที่ได้พีคไปหาค่า SD โดย LOD คือความเข้มข้นที่ 3SD และ LOQ คือความเข้มข้นที่ 10SD เมื่อคำนวนกลับจากกราฟสมการเส้นตรง

4. การหาความคงตัว andrographolide และ total lactone ในสภาวะเร่ง

4.1 ความคงตัวสารสกัดน้ำฟ้าทะลายโจรเข้มข้น

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างน้ำสารสกัดฟ้าทะลายโจรเข้มข้น 1 กรัม ละลายในเมธานอล 30 มิลลิลิตร

2. ทำการโซนิเคต 15 นาที เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร กรองตัวอย่างผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน

3. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ andrographolide โดยใช้โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ Nova Pak C_{18} (3.5x19mm, 4 μm) สารชะล้างที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตร์ล:เมทานอล:น้ำ (10:30:60) มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 229 นาโนเมตร และปริมาณตัวอย่างที่ฉีด 20 ไมโครลิตร

4. ค่าที่วัดได้นำมาคำนวณจากกราฟมาตราฐาน วัดปริมาณ andrographolides ในสารสกัดน้ำที่เก็บไว้ตู้อบอุณหภูมิ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.2 ความคงตัวสารสำคัญในอาหารกุ้งผสมสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างอาหารกุ้งบดละเอียด 1 กรัม ละลายในเมธานอล 30 มิลลิลิตร

2. ทำการโซนิเคต 15 นาที เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร กรองตัวอย่างผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน

3. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ andrographolide โดยใช้โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูงโดยใช้คอลัมน์ Nova Pak C_{18} (3.5x19mm, 4 μm) สารชะล้างที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตร์ล:เมทานอล:น้ำ (10:30:60) มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 229 นาโนเมตร และ ปริมาณตัวอย่างที่ฉีด 20 ไมโครลิตร

4. ค่าที่วัดได้นำมาคำนวณจากกราฟมาตราฐาน วัดปริมาณ andrographolides ในอาหารที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% ทุกเดือน เป็นเวลา 4 เดือน ตัวอย่างอาหารกุ้งที่วิเคราะห์มี 9 แบบดังนี้

1) อาหารกุ้งที่เตรียมขึ้นเอง ไม่คลุกสารสกัดฟ้าทะลายโจร ไม่เคลือบสาร (I)
2) อาหารกุ้งที่เตรียมขึ้นเอง คลุกสารสกัดฟ้าทะลายโจร ไม่เคลือบสาร (I')
3) อาหารกุ้งที่เตรียมขึ้นเอง คลุกสารสกัดฟ้าทะลายโจร เคลือบแป้งข้าวโพด (II)
4) อาหารกุ้งที่เตรียมขึ้นเอง คลุกสารสกัดฟ้าทะลายโจร เคลือบไคโตซาน (III)
5) อาหารกุ้งที่เตรียมขึ้นเอง คลุกสารสกัดฟ้าทะลายโจร เคลือบน้ำมันปลาหมึก (IV)
6) อาหารกุ้งที่จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ คลุกสารสกัดฟ้าทะลายโจร ไม่เคลือบสาร (I")
7) อาหารกุ้งที่จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ คลุกสารสกัดฟ้าทะลายโจร เคลือบแป้งข้าวโพด (V)
8) อาหารกุ้งที่จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ คลุกสารสกัดฟ้าทะลายโจร เคลือบไคโตซาน (VI)
9) อาหารกุ้งที่จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ คลุกสารสกัดฟ้าทะลายโจร เคลือบน้ำมันปลาหมึก (VII)

วัตถุดิบที่ใช้เตรียมอาหารประกอบด้วยปลาป่น 38% กากถั่วเหลือง 30% ปลายข้าวบด 8% รำ 7% เปลือกกุ้ง 5% น้ำมันปลา 1% สารเหนียว (แป้ง) 1.5% เกลือแร่วิตามิน 1.5%
(ดัดแปลงจาก: บรรจง, 2535; เวียง. 2542; New, 1987) สุ่มตัวอย่างอาหารเพื่อวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อเชื้อแบคทีเรีย

5.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่แยกได้จากปลานิลที่แสดงอาการป่วยในเขตจังหวัดขอนแก่นและมหาสารคาม จำนวน 8 ครั้ง (Isolation) ตามวิธีการของ Carter et al. (1990) จากนั้นนำเชื้อมาเก็บไว้ใน Brain Heart Infusion Broth (BHI) ที่ผสมกลีเซอรีน 15 เปอร์เซ็นต์ เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อ

5.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

วิธีการวิจัย

1. สารสกัดน้ำฟ้าทะลายโจรเข้มข้น (บริษัท ขาวละออเภสัช จำกัด, กรุงเทพฯ) นำมาอบให้แห้งใน petri dish ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง เพื่อระเหยแอลกอฮอล์ในสารสกัดออก

5.3 การหาขนาดสมุนไพรในการยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) (มาลิน, 2532; Baron et al., 1994; Hirsh and Zee, 1999.)

วิธีการวิจัย

1. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller hinton ที่ความเข้มข้นปกติ ปริมาณ 50 ไมโครลิตรใส่ในหลุมที่ 1 ถึง 11 ของไมโครเพลท ส่วนหลุมที่ 12 ใส่ 100 ไมโครลิตร

2. ชั่งสารสกัดฟ้าทะลายโจร 1 กรัม มา ละลายใน ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide)(Fluka, Switzerland) ความเข้มข้น >99.5% ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ดูดสารละลายฟ้าทะลายโจรมา 100 ไมโครลิตรผสมในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 900 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายมา 50 ไมโครลิตรใส่ในหลุมที่ 1 ของไมโครเพลท

3. ทำการเจือจาง 2 เท่าโดยผสมสารละลายฟ้าทะลายโจรกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ดูดสารผสม 50 ไมโครลิตรใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมถัดไปจนถึงหลุมที่ 11 ก่อนดูดทิ้ง 50 ไมโครลิตร

4. ใส่เชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกมาได้ 8 ตัวอย่าง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion (BHI) นำไปบ่มในตู้อบที่ 30 องศาเซลเซียส นำมาเทียบความขุ่นกับ 0.5 McFaland ($1.5x10^8$) แล้วนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:100 จะได้เชื้อความเข้มข้น $1.5x\ 10^6$ โคโลนีต่อหน่วย นำเชื้อมา 50 ไมโครลิตรใส่ในหลุมที่ 1 ถึง 11 ของไมโครเพลท

5. นำไมโครเพลท เข้าอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อ่านผลด้วยสายตาในวันถัดไป ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลุมที่ 11 เป็นกลุ่มควบคุมบวก ซึ่งใส่อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อ แต่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร หลุมที่ 12 เป็นกลุ่มควบคุมลบ ซึ่งใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ

6. การเตรียมอาหารกุ้ง

วิธีการวิจัย

1. เตรียมวัตถุดิบอาหารซึ่งประกอบด้วยปลาป่น 38% กากถั่วเหลือง 32% ปลายข้าวบด 8% รำ 7% เปลือกกุ้ง 5% น้ำมันปลา 1% สารเหนียว (แป้ง) 1.5% แร่ธาตุวิตามิน 1.5% สี (รำสกัด) 6% (ตารางที่ 13) วัตถุดิบมีการบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาดเบอร์ 40 (ดัดแปลงจาก: บรรจง, 2535; เวียง. 2542; New, 1987)

2. ผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรแกรนูลกับรำและสารเหนียว ก่อนไปผสมรวมกับกากถั่วและวัตถุดิบอื่นๆ ต่อไป

3. เติมน้ำในวัตถุดิบในอัตราส่วน 1:5 (v/w) ในเครื่องผสม ก่อนนำเข้าเครื่อง Mincer พร้อมชุดตัดเม็ดอาหาร (Champion, Bangkok, Thailand) ที่ใช้ตัวฉุดขนาด 10 แรงม้า (Kubota, Thailand) อาหารกุ้งที่ได้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 1.2-1.5 เซนติเมตร นำอาหารเม็ดที่เตรียมขึ้นมาตากให้แห้ง เคลือบแป้งข้าวโพด 0.75% โดยน้ำหนัก ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดสมุนไพรในกุ้ง

4. สุ่มตัวอย่างอาหารเพื่อวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะ ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ตารางที่ 14-15)

7. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมอาหารต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย

7.1 การเตรียมลูกกุ้ง

วิธีการวิจัย

1. ลูกกุ้งก้ามกรามน้ำหนักประมาณ 3 กรัม นำมาปรับสภาพการทดลองในตู้กระจกขนาด 200 ลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนการทดลอง

2. กุ้งทดลองแบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2-4 เป็นกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมฟ้าทะลายโจร ทั้ง 4 ระดับคือ 417 834 และ1668 พีพีเอ็ม (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) เลี้ยงกุ้งที่ความหนาแน่น 3 ตัวต่อตู้ (ขนาด 45 ลิตร) ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง นาน 2 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

7.2 การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดฟ้าทะลายโจรในกุ้ง

วิธีการวิจัย

หลังกุ้งกินอาหารผสมสมุนไพรเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ปริมาณ 10^5 โคโลนีต่อ 1 ซีซี (เป็นระดับเชื้อที่ทำให้กุ้งตาย 34 เปอร์เซ็นต์) เข้าที่กล้ามเนื้อลำตัว สังเกตและบันทึกอัตรารอดของกุ้งทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียเพื่อยืนยันสาเหตุการป่วยและตาย และตรวจพยาธิสภาพของกุ้งที่ตายและที่รอดชีวิตในทุกกลุ่ม เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

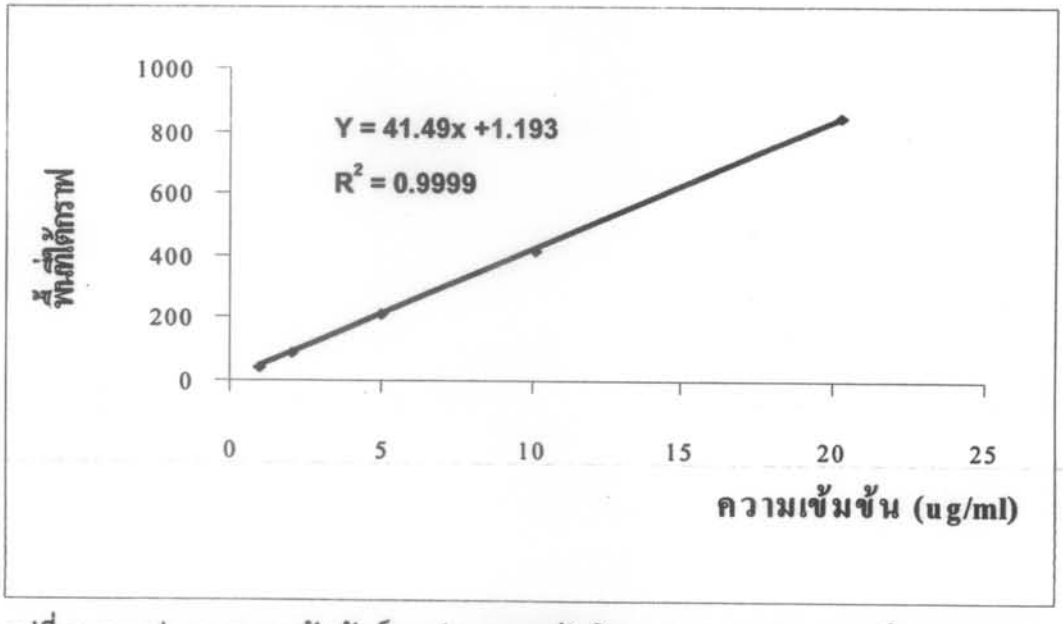
1. การวิเคราะห์หา andrographolide และ total lactone ในตัวอย่าง

1.1 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์กับฟ้าทะลายโจรในอาหาร (Method Validation)

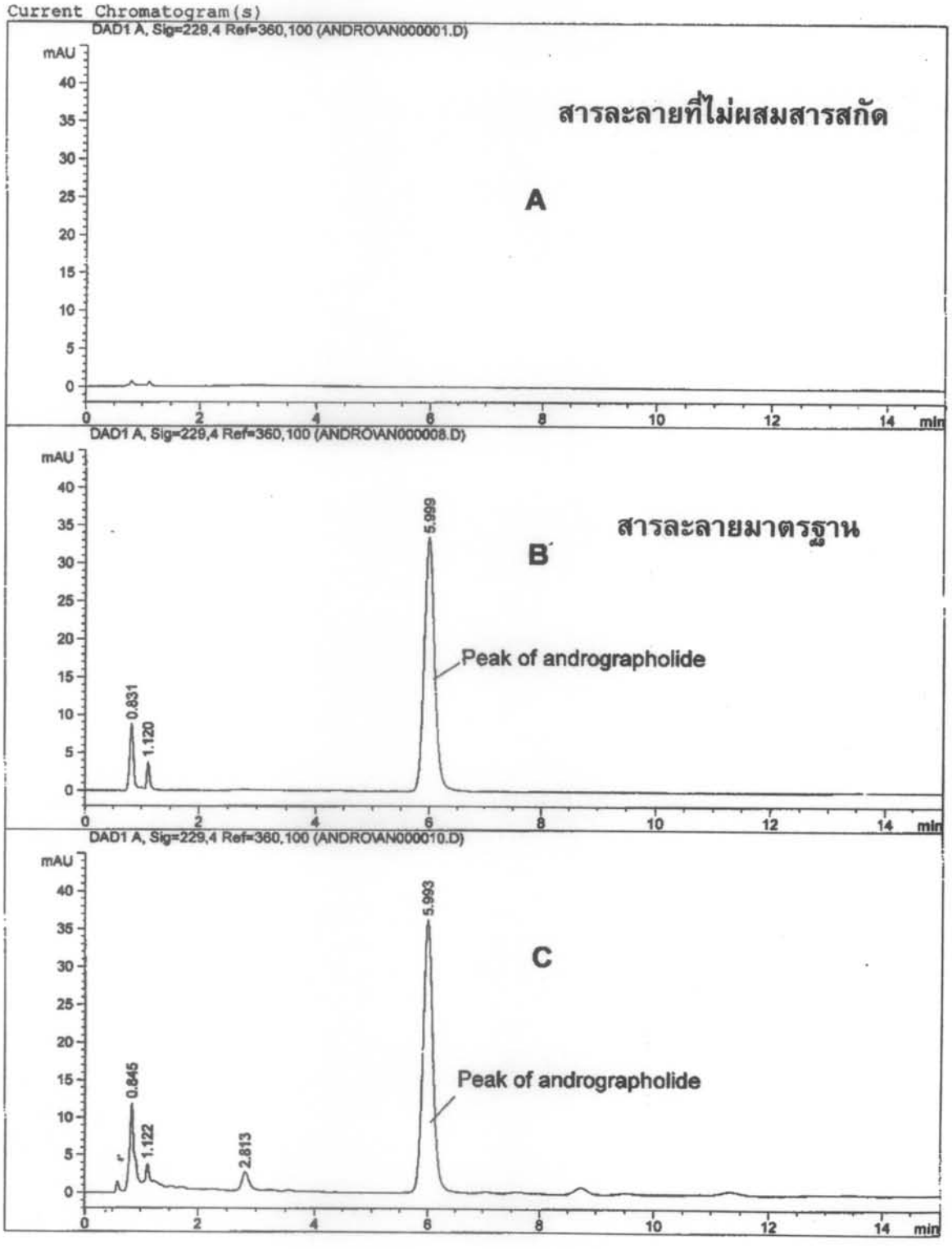
ข้อมูลในการสร้างกราฟมาตรฐานสรุปในตารางที่ 1 กราฟมาตรฐาน (รูปที่ 1) แสดงเป็นเส้นตรงดังสมการ Y = 41.49 + 1.193 ค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ของกราฟ (Relative Coefficient) มีค่า 0.99999โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานแสดงดังรูป 2B และของสารสกัดน้ำเข้มข้นรูป 2C พบ peak ของสารละลาย andrographolide มาตรฐานและของสารสกัดฟ้าทะลายโจรมี retention time ที่ 5.999 และ 5.993 นาที ตามลำดับ peak ที่พบในรูปทั้งสองแยกจาก peak ของสารอื่นอย่างชัดเจน ในการตรวจวัดโดยใช้โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูงในการศึกษานี้ได้ใช้คอลัมน์ C_{18} (3.9x150mm, 4 μm) ซึ่งแตกต่างจากคอลัมน์ที่อรัญญา ศรีบุษราคัม และคณะ (2548) ใช้คือ C_{18} (4.6x250mm, 5 μm) ทำให้ต้องมีการปรับสัดส่วนสารชะล้างที่ใช้คือ เมทานอล:น้ำ จาก 55:60 เป็น 40:60 ปรับอัตราการไหล จาก 0.8 เป็น 1 มิลลิลิตร/นาที และปรับปริมาณตัวอย่างที่ฉีด จาก 10 เป็น 20 ไมโครลิตร (รูปที่ 3) ส่วนค่า total lactone ในสารสกัดน้ำเข้มข้นและในสารสกัดฟ้าทะลายโจรรูปแกรนูลมีค่า 95.53 และ 5.90 mg% (w/w)

ในการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ HPLC ในการวิเคราะห์ Andrographolide ในอาหารกุ้งพบว่าสภาวะของวิธีการวิเคราะห์ andrographolide ในตัวอย่างน้ำสกัดเข้มข้นที่ใช้สารชะล้าง (mobile phase)

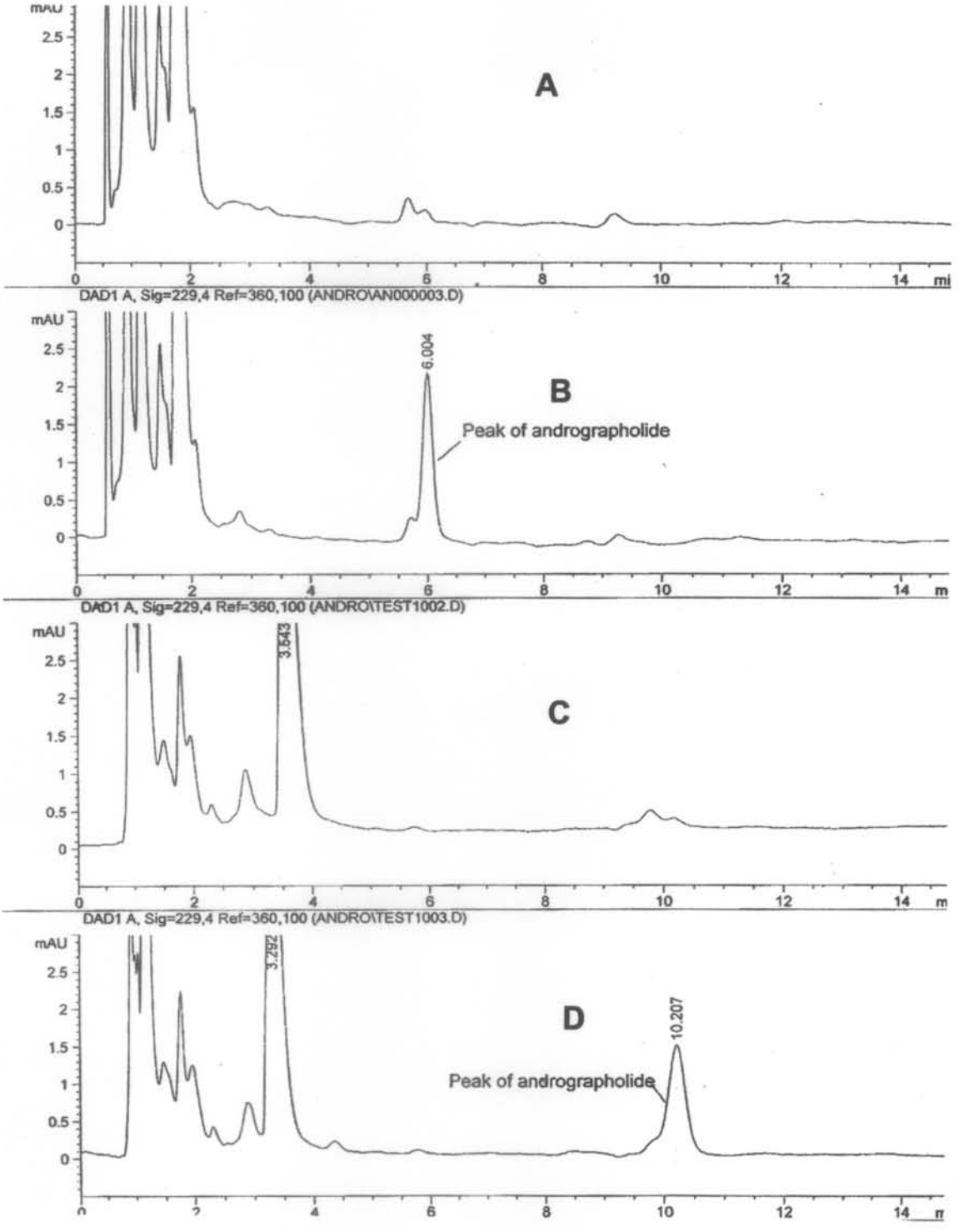
ของเมธานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 45:55 (อรัญญาและคณะ, 2548) ปรากฏว่ามี peak จากตัวอย่างอาหารที่ไม่ผสมสารสกัด (รูป 4A) ที่มี 2 peak ที่ retention time ในช่วง 5.5 ถึง 6 นาที และก็เป็นตำแหน่งเดียวกับ peak ของอาหารที่ผสมสารสกัด (รูป 4B) ที่มี 2 peak เช่นเดียวกันที่มี retention time ในช่วง 5.5 ถึง 6.004 นาที ดังนั้นอัตราส่วนเมธานอลต่อน้ำ (45:55) ไม่เหมาะสม จึงมีการปรับอัตราส่วนของสารชะล้างเป็นเมธานอลต่อน้ำ จาก 45:55 เป็น 40:60 แต่ peak รบกวน (รูป 4C) ยังไม่แยกออกจาก peak ของ andrographolide ในตัวอย่างอาหารที่ผสมสารสกัด (รูป 4D) ดังนั้นผู้วิจัยได้ปรับสภาวะของวิธีการวิเคราะห์ andrographolide ในอาหารกุ้งที่ใช้สารเคลือบต่างกัน 3 ชนิดมีการดัดแปลงจากวิธีการของอรัญญา ศรีบุษราคัม และคณะ (2548) โดยเพิ่มอะซีโตไนไตร์ลและลดปริมาณเมธานอลโดยมีสัดส่วนอะซีโตไนไตร์:เมทานอล:น้ำ 3 อัตราส่วน คือ อัตราส่วนที่ 1 (20:20:60), ที่ 2 (10:30:60) และที่ 3 (5:35:60) เพื่อให้โครมาโตแกรมตัวอย่างสารสกัดฟ้าทะลายโจรแยกจาก peak สารอื่นตามลำดับดังนี้ 1) ปรับอัตราส่วนของสารชะล้างเป็นเมธานอลต่อน้ำ จาก 45:55 เป็น 40:60 แต่พบปัญหา broad peak ของอาหารไม่ผสมสารสกัดที่ retention time 3.417 (รูป 5A) ซึ่งปรากฏเป็น peak ที่ retention time 3.450 ติดกับ peak ของ andrographolide ของอาหารผสมสารสกัด ที่มี retention time 4.224 (รูป 5B) อัตราส่วนที่ 1 จึงยังไม่เหมาะสม 2) ปรับองค์ประกอบและอัตราส่วนสารชะล้างโดยเพิ่มอะซีโตไนไตร์ล แต่ลดปริมาณเมธานอล สัดส่วนของอะซีโตไนไตร์:เมทานอล:น้ำ คือ 10:30:60 และ 5:35:60 (รูป 5C-5F) พบว่า peak ของ andrographolide แยกออกจาก peak ของสารในอาหารอย่างชัดเจน อัตราส่วนนี้จึงเหมาะสมคงเพราะอะซีโตไนไตร์ลช่วยลดความเป็นขั้ว (polarity) ของสารชะล้างลง และทำให้ peak ของ andrographolide ในอาหารแยกจาก peak ของสารอื่น ในทำนองเดียวกันอัตราส่วนที่ 3 ดังรูป 6E-6F ที่มี peak ของ andrographolide แยกออกจาก peak ของสารในอาหารอย่างชัดเจน แต่สัดส่วนสารชะล้างที่ 10:30:60 เหมาะสมมากกว่าเนื่องจาก retention time สั้นกว่าสารชะล้างที่ 5:35:60 การทดลองนี้จึงเลือกใช้สารชะล้างที่มีสัดส่วนของ อะซีโตไนไตร์:เมทานอล:น้ำ 10:30:60 ในการวิเคราะห์หาปริมาณ andrographolide ในอาหารกุ้ง (รูปที่ 6)



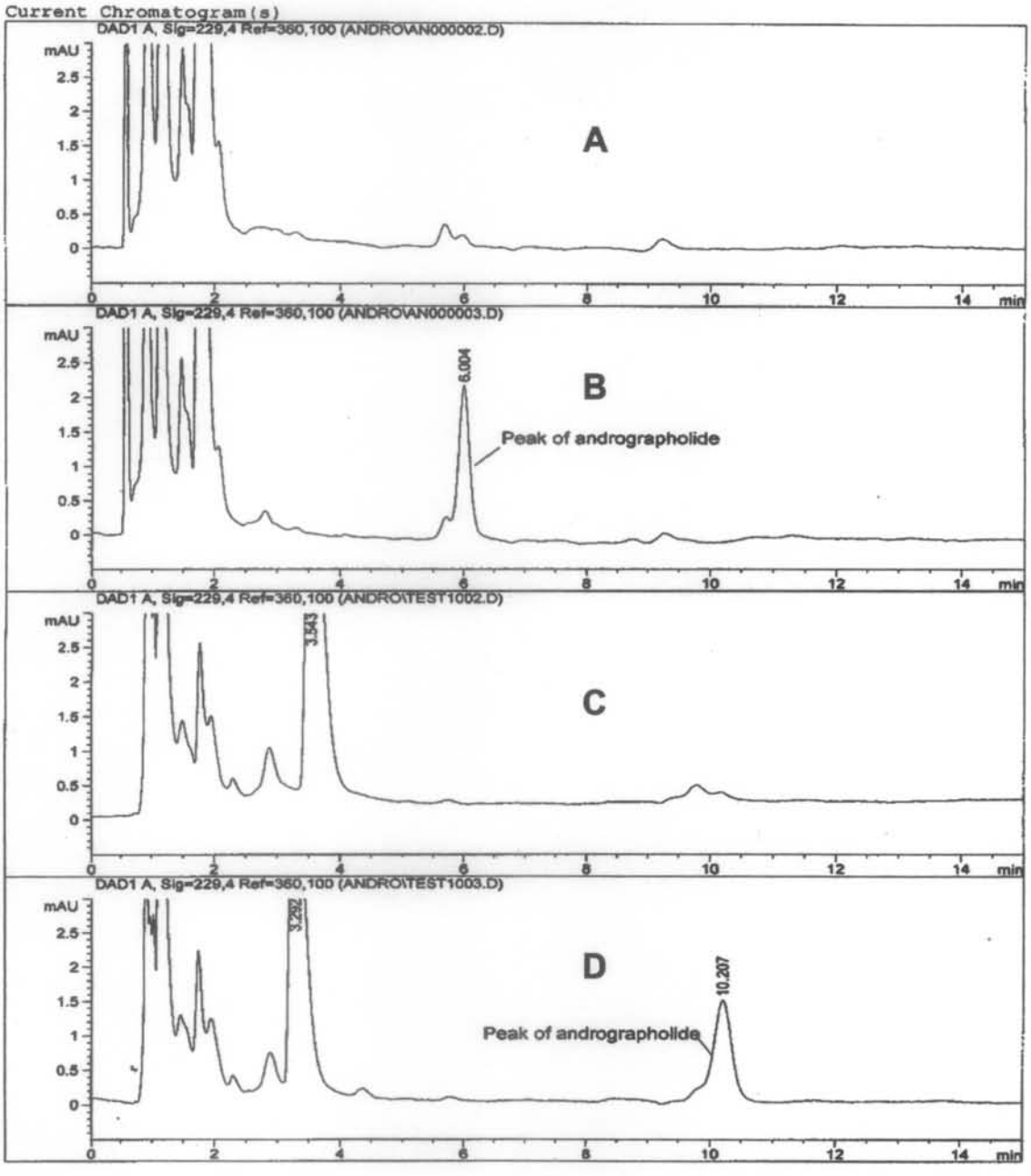
รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ andrographolide ใน spiked samples และพื้นที่ใต้กราฟ



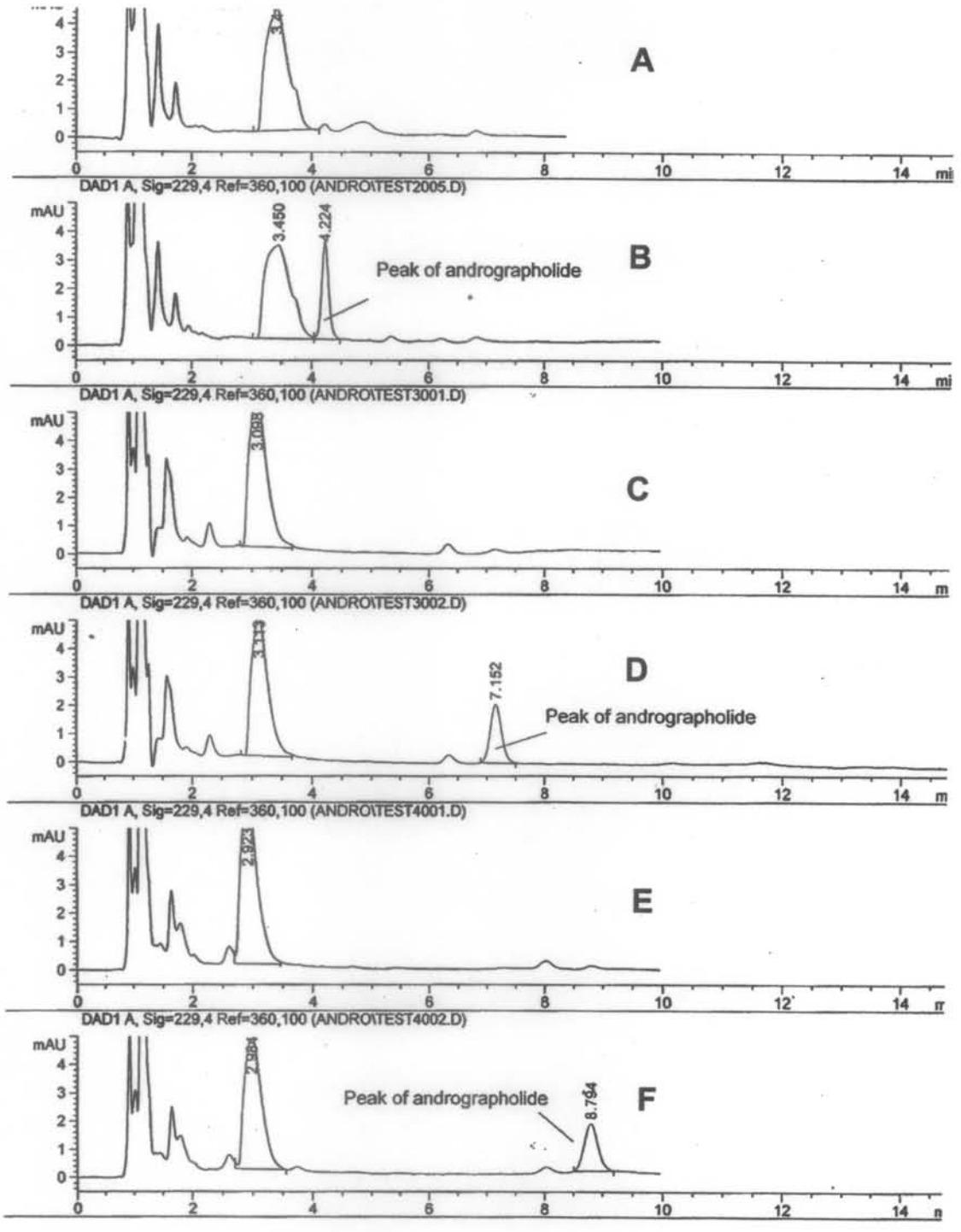
รูปที่ 2 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายที่ไม่มีสารสกัดฟ้าทะลายโจร (A) สารละลายมาตรฐาน เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (B) และ สารละลายตัวอย่างน้ำสกัดฟ้าทะลายโจรเข้มข้น (C)



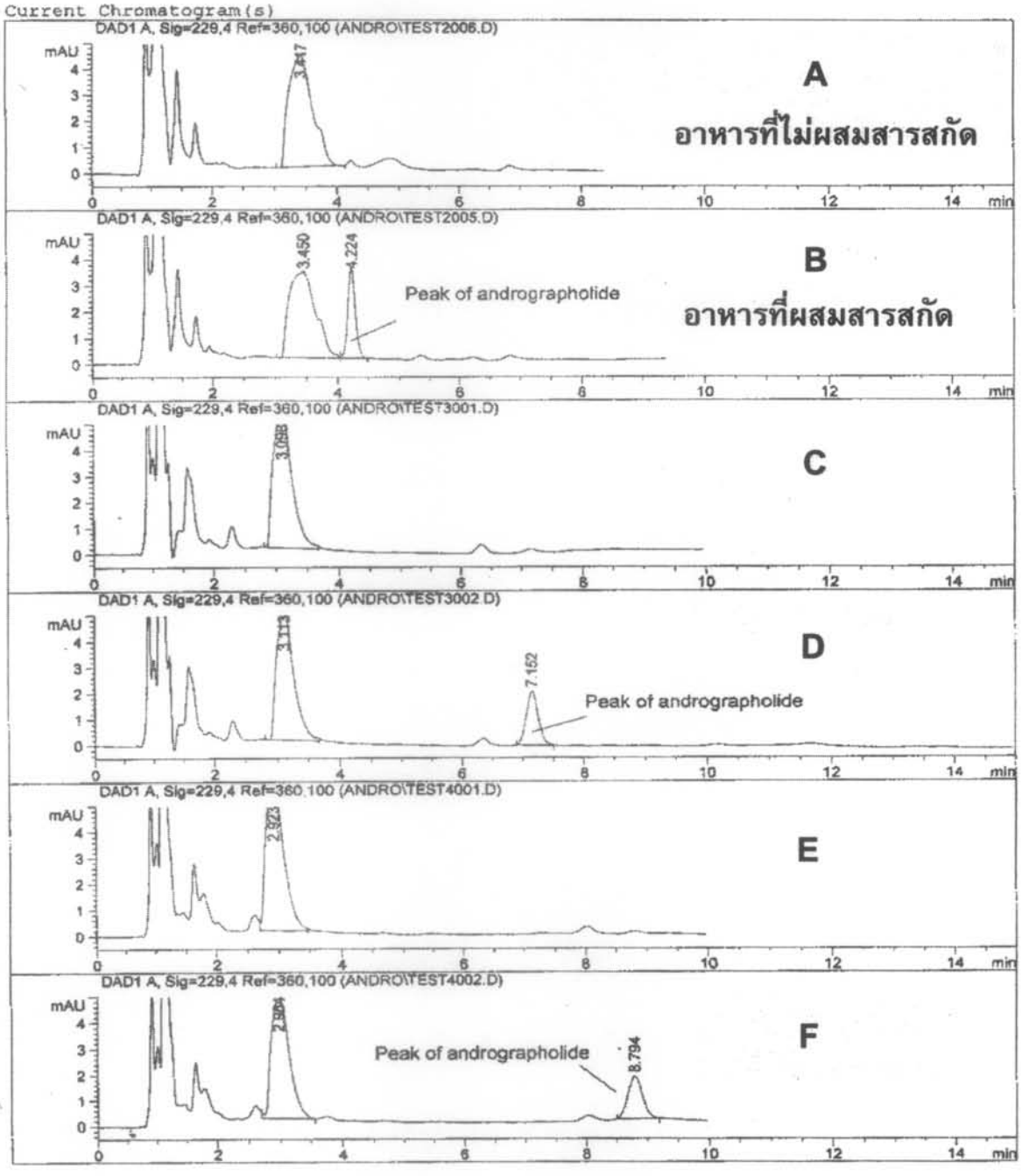
รูปที่ 3 แสดง โคมาโตแกรมที่ได้จากปรับอัตราส่วนของ mobile phase MeOH:H_2O ในอัตราส่วน (45:55) sample blank (A) spiked sample 1 µg/ml (B) และ (40:60) sample blank (C) spiked sample 1 µg/ml (D)



รูปที่ 4 แสดงโครมาโตแกรมที่ได้จากปรับอัตราส่วนของ mobile phase MeOH ต่อ H_2O ในอัตราส่วน 45:55 ตัวอย่างอาหารที่ไม่ผสมสารสกัด (A) ตัวอย่างอาหารที่ผสมสารสกัด (B) และ 40:60 ตัวอย่างอาหารที่ไม่ผสมสารสกัด (C) และตัวอย่างอาหารที่ผสมสารสกัด (D)



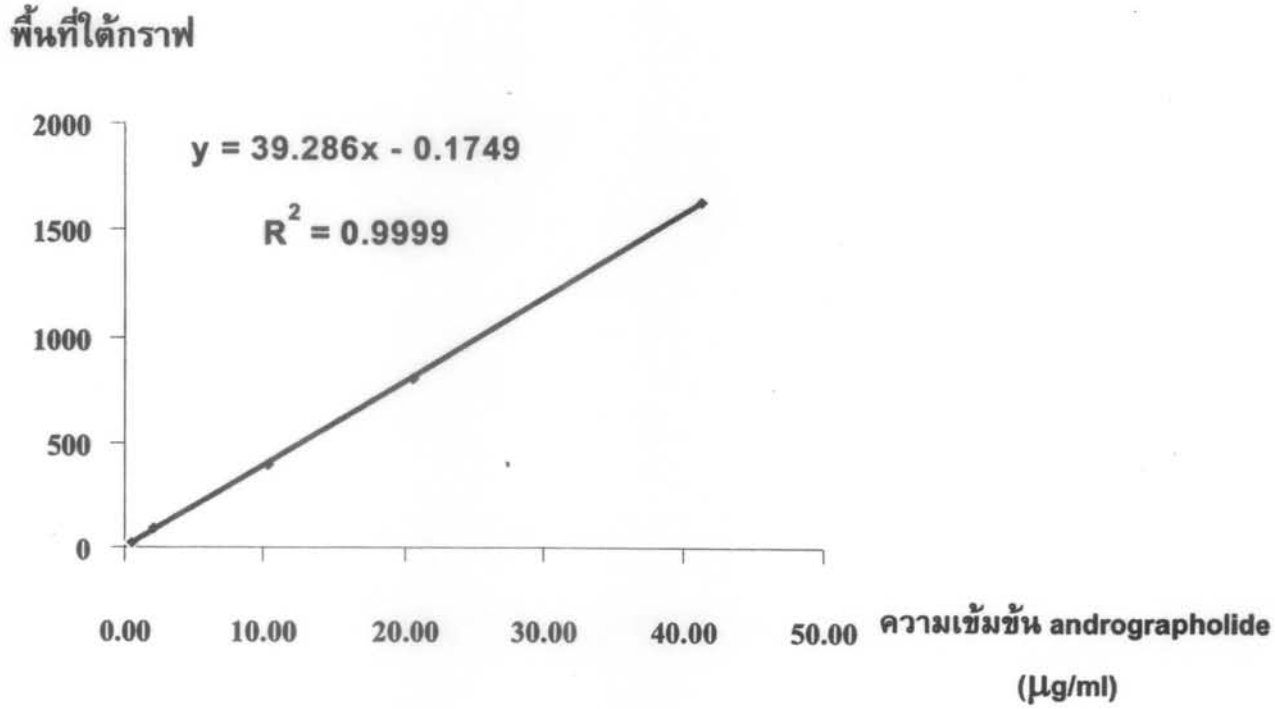
รูปที่ 5 แสดงโคมาโตแกรมที่ได้จากปรับอัตราส่วนของ mobile phase ACN:MeOH:H_2O ใน อัตราส่วน (20:20:60) sample blank (A) spiked sample 1 µg/ml (B) , (10:30:60) sample blank (C) sample (D) และ (5:35:60) sample blank (E) spiked sample 1 µg/ml (F)



รูปที่ 6 แสดงโครมาโตแกรมที่ได้จากปรับอัตราส่วนของ mobile phase ACN:MeOH:H_2O ในอัตราส่วนที่ 1 (20:20:60) รูป A, B ส่วนที่ 2 (10:30:60) รูป C, D และส่วนที่ 3 (5:35:60) รูป E, F

ปัจจุบันการหาปริมาณ andrographolide ในตัวอย่างต่างๆ มีหลายวิธี เช่น HPLC (Xu *et al.*, 2002; สรุพลและคณะ, 2000; Zhao *et al.*, 2002; Patarapanich et al., 2002; Li *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2000; Fu *et al.*, 2001; Saxena et al., 2000; Akowuah *et al.*, 2006) วิธี micellar electrokinetic chromatography (Cheung *et al.*, 2001) และวิธี TLC (Chauhan *et al.*, 2001;Saxena *et al.*, 2000) ซึ่งวิธีมีจุดประสงค์ในการหาปริมาณ andrographolide ในตัวอย่างชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิคการสกัดที่หลากหลายขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานการหาปริมาณของ andrographolide ในอาหารกุ้งซึ่งมีสารรบกวนจากสารอื่น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สาร andrographolide ในอาหารกุ้งและทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Method Validation)

จากการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and range) พบว่า spiked samples ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.5 ถึง 50 µg/ml คือที่ 0.5, 2.0, 10.0, 25.0, และ 50 µg/ml และนำค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค และค่าความเข้มข้นไปสร้างกราฟ พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง มีค่า coefficient (r^2), y-intercept และค่าความชันมีค่าเท่ากับ 0.9998, 4.934 และ 39.925 ตามลำดับ และสมการที่ได้คือ y=39.286x - 0.1749 โดย y เป็นพื้นที่ใต้พีค และ x เป็นความเข้มข้นของ andrographolide (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ andrographolide และพื้นที่ใต้กราฟในการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and range)

จากการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของการวัดความเข้มข้นของ andrographolide ที่ spike ลงใน blank sample 3 ระดับคือ 2 10 และ 25 µg/ml จำนวนความเข้มข้นละ 6 ครั้ง และคำนวณความ

เข้มข้นที่วัดได้เมื่อเทียบกับ standard curves แล้วทำการเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นจริง พบว่าเปอร์เซ็นความถูกต้องอยู่ในช่วง 97.34 ถึง 105.40% แสดงผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง accuracy ของ andrographolide ใน blank sample อาหารกุ้ง

Concentration added(ng/ml)	Concentration found (ng/ml)	% found±sd
2(n=6)	1.94	97.34±6.62
10(n=6)	10.54	105.40±4.23
25(n=6)	24.80	99.23±2.87

จากการหาเปอร์เซนต์การสกัดกลับคืน (Percent recovery) พบว่าค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ %recovery ของ andrographolide หลังการสกัด MeOH อยู่ในเกณฑ์สูงที่ยอมรับได้ทั้ง 3 ความเข้มข้นโดยอยู่ในช่วง 100.00-103.62% และ %CV ของ andrographolide มีค่าไม่เกิน 3.08% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดง % recovery ของ andrpgrapholide ใน spiked sample จากการสกัดด้วย MeOH

Spike value(ng/ml)	% recovery		
	mean	SD.	%CV
2(n=6)	100.00	2.62	2.62
10 (n=6)	103.62	1.77	1.71
25 (n=6)	100.60	1.84	1.83

การทดสอบความเที่ยง (Precision) พบว่า Intra-day และ inter-day validation แสดงผลตามตารางที่ 4 ซึ่งพบว่า ค่าของ %CV ของ intra-day validation ของความเข้มข้น andrographolide ทั้ง 3 ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.84 ถึง 6.93% และค่าของ %CV ของ inter-day validation ของความเข้มข้น andrographolide ทั้ง 3 ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2.02 ถึง 8.24% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงผล precision ของ andrographolide ใน blank sample จากการสกัดด้วย MeOH

Precision	Concentration (ng/ml)	Area of Andrographolide	%CV
Intra-day	2.00	75.46 ±5.23	6.93
(n=6)	10.00	438.39 ±12.43	2.83
	25.00	1000.64 ±18.44	1.84
Inter-day	2.00	75.46 ±6.22	8.24
(n=18)	10.00	438.39 ±15.81	3.61
	25.00	1000.64 ±20.22	2.02

จากการทดสอบค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ (Limit of Detection (LOD) and Limits of Quantitative (LOQ)) พบว่าค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) ของ andrographolide เท่ากับ 0.005 µg/ml และค่าต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) ของ andrographolide เท่ากับ 0.02 µg/ml

จากผลการศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ andrographolide ในตัวอย่างอาหารกุ้ง โดยใช้ HPLC ร่วมกับตัวตรวจวัดชนิด Diode Array Detector พบว่าได้วิธีการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์มีความเหมาะสม มีความไว และมีความแม่นยำเพียงพอที่จะทำการศึกษาในตัวอย่างอาหารกุ้งได้ โดยวิธีวิเคราะห์อยู่ในระดับเกณฑ์ที่ดี

1.2 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์กับฟ้าทะลายโจรในอาหาร (Method Validation)

เมื่อคำนวณเทียบจากพื้นที่ใต้กราฟมาตรฐานพบว่าปริมาณ andrographolide ในสารสกัดน้ำเข้มข้นและในสารสกัดฟ้าทะลายโจรรูปแกรนูลมีค่า 6.27% และ 2.92% โดยน้ำหนัก ส่วนค่า total lactone ในสารสกัดน้ำเข้มข้นและในสารสกัดฟ้าทะลายโจรรูปแกรนูลมีค่า 95.53 และ 5.90 mg% (w/w)

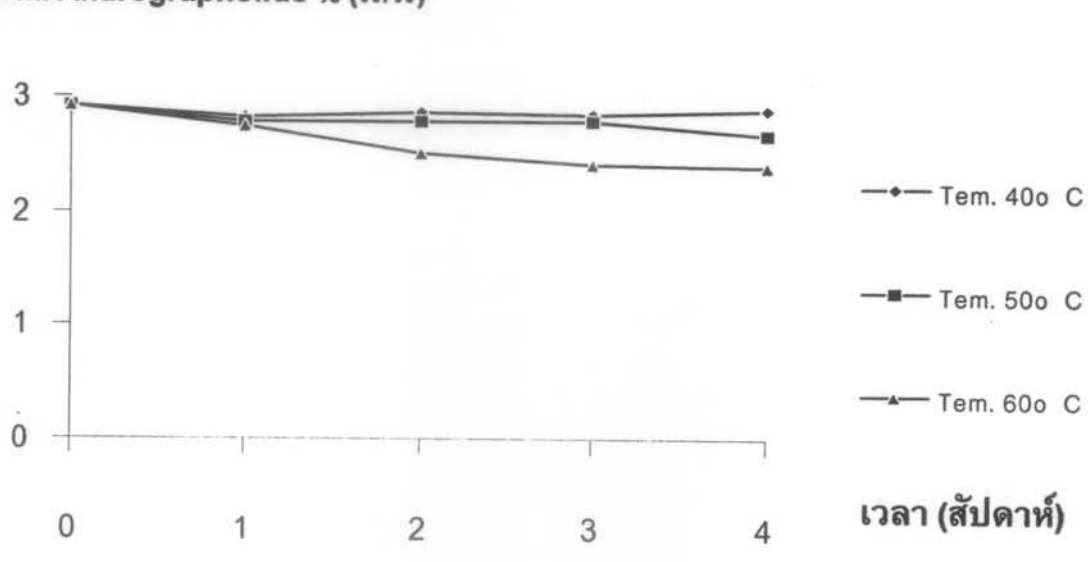
2. การหาความคงตัว andrographolide และ total lactone ในสภาวะเร่ง

2.1 การหาความคงตัว andrographolide ในสภาวะเร่ง

ส่วนการทดสอบความคงตัวของน้ำสกัดฟ้าทะลายโจรเข้มข้น พบว่าปริมาณ andrographolide ที่เก็บไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส ณ เวลาเริ่มต้นการทดสอบความคงตัวพบว่ามีค่า 2.92% โดยน้ำหนัก และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบมีค่า 2.88 2.67 และ 2.39% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (ตารางที่ 4 และรูปที่ 8) และปริมาณ total lactone ที่เก็บไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส ณ เวลาเริ่มต้นการทดสอบความคงตัวพบว่ามีค่า 5.90% โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 5 และรูปที่ 9) และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบมีค่า 5.90 5.78 5.75 และ 5.40% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ andrographolide ในตัวอย่างสารสกัดแกรนูลเมื่อเริ่มต้นการทดสอบปรากฏว่ามี peak ที่ retention time ในช่วง 6.8 ถึง 7.5 นาที และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ andrographolide จากตัวอย่างช่วง 40-60 องศาเซลเซียส มี peak ที่ retention time ในช่วง 6.7 ถึง 7.4 นาที (รูปที่ 10) จากการหาปริมาณ andrographolide และ total lactone ทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิที่เวลา 0 7 14 21 28 วัน เนื่องจากระยะเวลาที่ศึกษาค่อนข้างสั้น ความต่างของการสลายตัวจากวันเริ่มต้นจะน้อยกว่า 15% จึงไม่สามารถบอกได้ว่าการสลายตัวของสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดเป็นแบบ zero order หรือ first order แต่เมื่อประเมินจากค่า r^2 พอจะเห็นแนวโน้มว่าการสลายตัวจะเป็นแบบ first order เมื่อนำอัตราการสลายตัวของแต่ละอุณหภูมิมาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นโดยทำ Arrhenius plot ระหว่าง Log K และ 1/T x 1000 ได้สมการเส้นตรงดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 และนำมาคำนวณหาอายุของสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดที่เหลืออยู่ 90% (t_{90}) (Lieberman et al., 1990) พบว่าถ้าเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศา andrographolide จะคงตัวอยู่นาน 15.5 ปี (รูปที่ 10) และ total lactones จะคงตัวอยู่นาน 4.8 ปี (รูปที่ 11)

ตารางที่ 4 ค่า andrographolide ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรแกรนูล ณ อุณหภูมิ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์

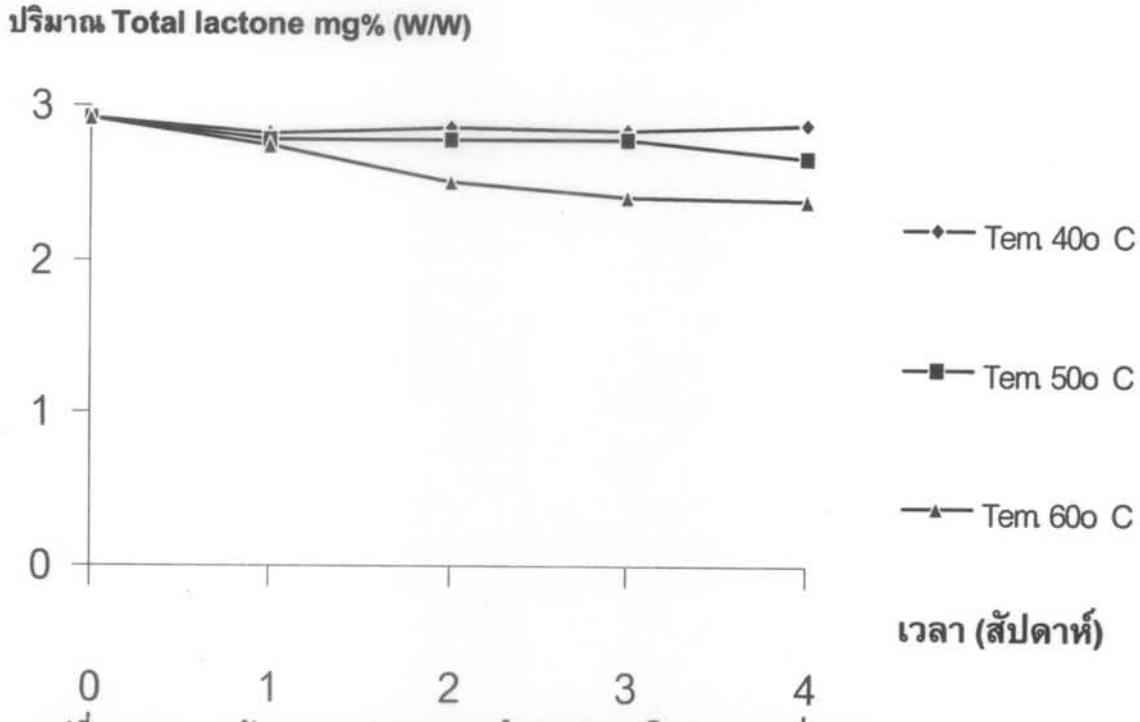
สัปดาห์ที่	ปริมาณ Andrographolide %(W/W)		
	Tem. 40 °C	Tem. 50 °C	Tem. 60 °C
0	2.92	2.92	2.92
1	2.83	2.78	2.75
2	2.86	2.78	2.51
3	2.84	2.79	2.41
4	2.88	2.67	2.39



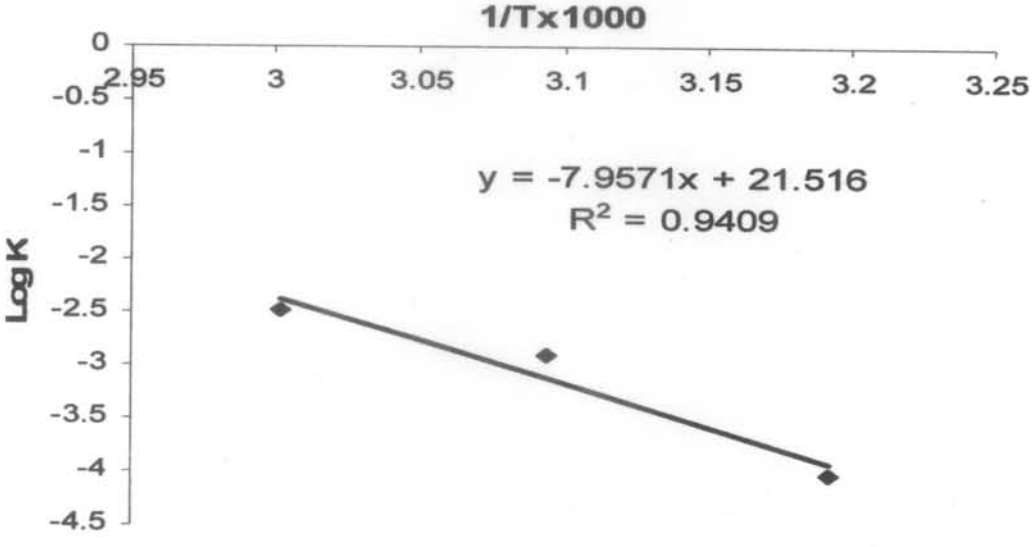
รูปที่ 8 ความคงตัวของ andrographolides ในน้ำสกัดฟ้าทะลายโจรที่อุณหภูมิ 40 50 และ 60 องสาเซลเซียส

ตารางที่ 5 ค่า total lactone ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรแกรนูล ณ อุณหภูมิ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์

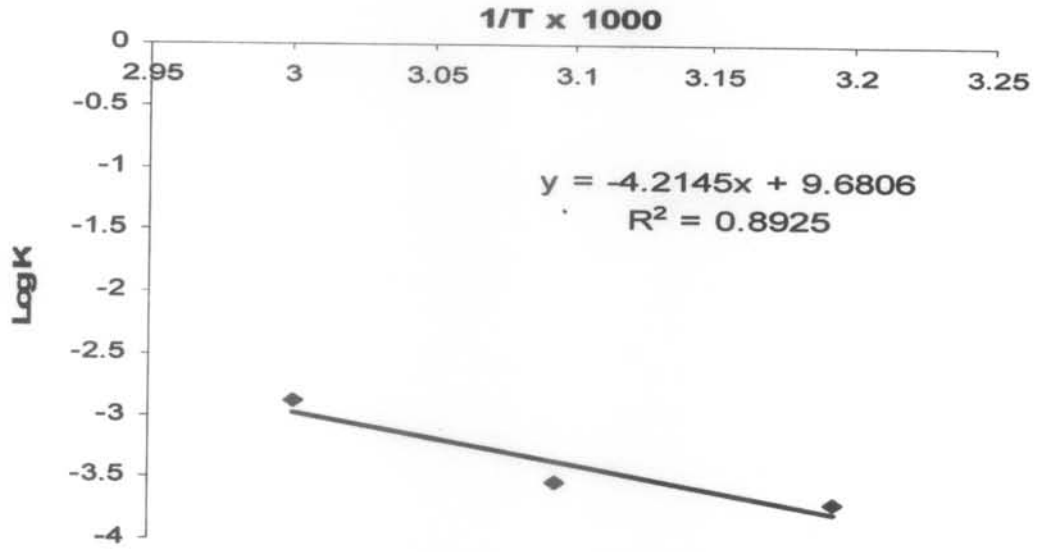
สัปดาห์ที่	ปริมาณ total lactone %(W/W)		
	Tem. 40 °C	Tem. 50 °C	Tem. 60 °C
0	5.90	5.90	5.90
1	5.90	5.85	5.80
2	5.82	5.65	5.65
3	5.80	5.79	5.50
4	5.78	5.75	5.40



รูปที่ 9 ความคงตัวของ total lactone ในฟ้าทะลายโจรแกรนูล ที่อุณหภูมิ 40 50 และ 60 เซลเซียส



รูปที่ 10 Arrhenius plot ระหว่าง Log K ของ andrographolide ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรและส่วนกลับของอุณหภูมิสมบูรณ์



รูปที่ 11 Arrhenius plot ระหว่าง Log Kของ total lactone ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรและส่วนกลับของอุณหภูมิสมบูรณ์

ผลการทดสอบความคงตัวของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ผสมในอาหารในสภาวะเร่ง ณ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% นาน 4 เดือนพบว่า ปริมาณสาร andrographolide ในอาหารกุ้งที่เตรียมขึ้นทั้ง 8 แบบ ณ วันเริ่มต้น (ตารางที่ 6 และรูปที่ 12) มีค่า 29.19, 34.61, 39.71, 42.62, 34.2, 30.4, 28.06 และ 29.23 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าที่ต่างกันอาจเกิดจากการใช้หรือไม่ใช้และชนิดของสารเคลือบและการกระจายตัวของสารสกัดจากการคลุกผสมอาหารอาจทำให้ค่า andrographolide ในอาหารที่เตรียมขึ้นแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามค่าที่วัดได้เป็นเพียงค่า ณ จุดเริ่มต้นการทดสอบความคงตัว การหาค่าความคงตัวจะเป็นการคำนวณโดยเริ่มจากสาร 100% และหาปริมาณ andrographolide ที่เหลือทุกเดือน นาน 4 เดือน เมื่อเก็บอาหารไว้นาน 1 เดือน ปริมาณ andrographolide เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารพบว่า อาหารสูตร 7 ปริมาณ andrographolide เหลืออยู่สูงสุดที่ 43.8 % รองลงมาคืออาหารสูตร 3 เหลือ 42.2% และอาหารกุ้งสูตร 8 เหลือ 38.6% เมื่อเก็บอาหารในสภาวะเร่งนาน 2 เดือน พบว่าอาหารสูตร 7 มีปริมาณ andrographolide เหลือสูงสุดที่ 25.9 % และอาหารสูตรที่เหลือมีปริมาณ andrographolide ต่ำกว่า 23% เมื่อพิจารณาจากแนวโน้มการลดลงตามรูปที่ 14 พบว่าอาหารสูตร 7 คงตัวมากที่สุด รองลงมาคืออาหารสูตร 6 และอาหารสูตร 3 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามหากคำนวณอายุของ andrographolide ที่ลดลงไม่เกิน 90% (t_{90}%) ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่าอาหารทุกสูตรที่ผสมฟ้าทะลายโจรสามารถเก็บได้เกิน 1 เดือน แต่ไม่มีอาหารกุ้งสูตรใดเก็บได้นานถึง 2 เดือน อาหารที่เก็บได้นานมากที่สุดคือ อาหารกุ้งที่จำหน่ายในเชิงพาณิชย์เคลือบไคโตซาน (สูตร 7) สามารถเก็บได้นาน 48.07 วัน รองลงมาคืออาหารกุ้งที่เตรียมขึ้นเองเคลือบไคโตซาน (สูตร 3) เก็บได้นาน 46.68 วัน และอาหารกุ้งที่จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ เคลือบน้ำมันปลาหมึก (สูตร 8) เก็บได้นาน 43.97 วัน จากตารางที่ 10 พบว่าเมื่อละลายอาหารกุ้งในน้ำที่ความเข้มข้นมากขึ้นพบว่า น้ำมีความเป็นกรดสูงขึ้นเล็กน้อยและแต่ละสูตรอาหารมีความเป็นกรดต่างใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ส่วนประกอบของวัตถุดิบในอาหารกุ้งน่าจะส่งผลต่อความคงตัวของ

andrographolides ในฟ้าทะลายโจรแกรนูลที่นำมาผสมในอาหารกุ้ง การที่ปริมาณ andrographolide ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บในสภาวะเร่งอาจเกิดจากส่วนประกอบในอาหาร การเกิดปฏิกริยาออกซิเดชั่นและความเป็นกรดด่างของอาหาร (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ค่า andrographolide ในอาหารที่เก็บ ณ อุณหภูมิ 45 ความชื้นสัมพัทธ์ 75% นาน 4 เดือน

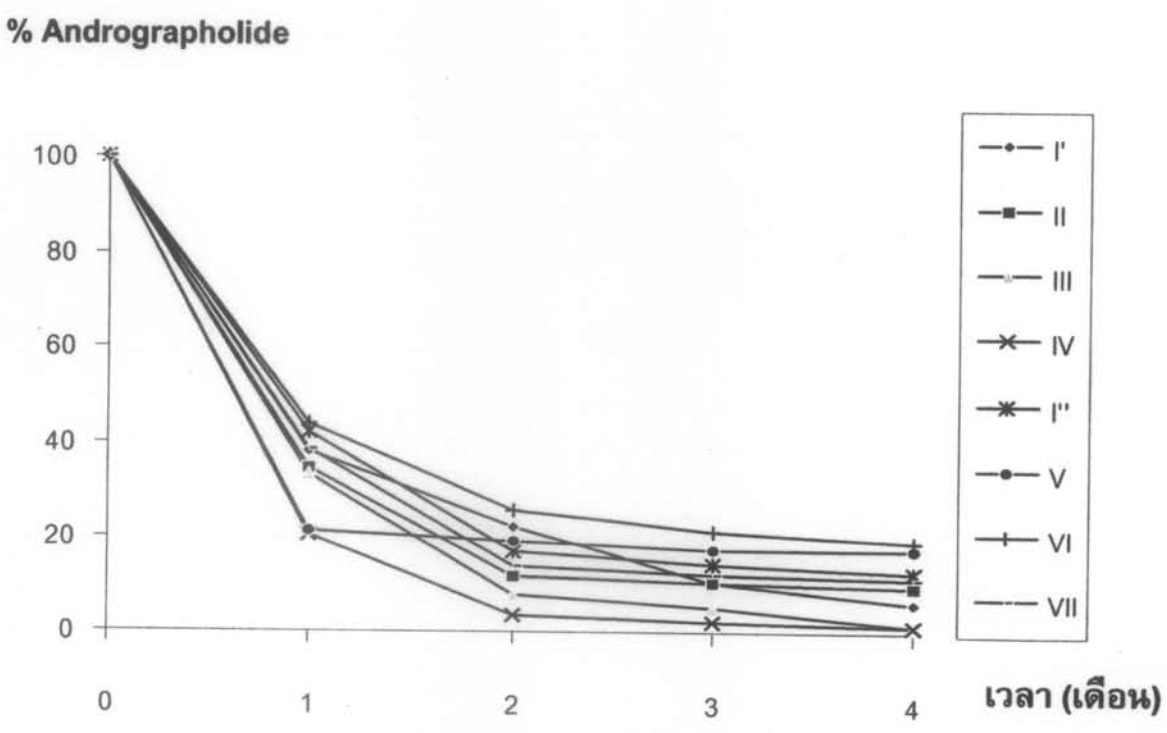
สูตรอาหาร	ค่า andrographolide (mg%) (w/w)				
	วันเริ่มต้น	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4
1 (I')	29.19	11.17	6.59	3.13	1.84
	(100)	(38.27)	(22.58)	(10.72)	(6.30)
2 (II)	34.61	12.02	4.16	3.60	3.41
	(100)	(34.73)	(12.02)	(10.4)	(9.85)
3 (III)	39.71	13.15	3.22	2.05	0.46
	(100)	(33.12)	(8.11)	(5.16)	(1.16)
4 (IV)	42.62	8.78	1.45	1.02	0.53
	(100)	(20.6)	(3.40)	(2.39)	(1.24)
5 (I")	34.20	14.42	5.80	4.89	4.28
	(100)	(42.16)	(16.96)	(14.30)	(12.51)
6 (V)	30.40	6.53	5.92	5.29	5.28
	(100)	(21.48)	(19.47)	(17.40)	(17.37)
7 (VI)	28.06	12.30	7.27	5.99	5.46
	(100)	(43.83)	(25.91)	(21.35)	(19.46)
8 (VII)	29.23	11.28	4.15	3.57	3.28
	(100)	(38.59)	(14.20)	(12.21)	(11.22)

หมายเหตุ: ตัวเลขในวงเล็บแสดงค่า andrographolide เป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับวันเริ่มต้นการทดลอง

ตารางที่ 7 อายุของ andrographolide ในฟ้าทะลายโจรแกรนูลหลังผสมในอาหารกุ้ง

สูตรอาหาร	อาหาร	ความเป็นกรดด่าง		$t_{90\%}$ (วัน)
		5% w/v	10% w/v	
1 (I')	อาหารที่ไม่เคลือบ	6.06	5.99	43.74
2 (II)	อาการเคลือบแป้งข้าวเหนียว	6.07	6.00	41.37
3 (III)	อาหารเคลือบไคโตซาน	6.07	5.95	46.68
4 (IV)	อาหารเคลือบน้ำมันปลาหมึก	6.07	5.96	40.37
5 (I")	อาหารบริษัทไม่เคลือบ	6.07	5.96	34.00
6 (V)	อาหารบริษัทเคลือบไคโตซาน	6.07	5.96	34.39
7 (VI)	อาการบริษัทเคลือบแป้งข้าวเหนียว	6.05	5.93	48.07
8 (VII)	อาหาบริษัทรเคลือบน้ำมันปลาหมึก	6.06	5.95	43.97

$t_{90\%}$: อายุของ andrographolides ในอาหารที่ลดลงไม่เกิน 90%



รูปที่ 12 ความคงตัวของ andrographolide ในฟ้าทะลายโจรแกรนูลผสมในอาหารกุ้ง 8 ชนิด เมื่อเก็บไว้ในสภาวะเร่ง นาน 4 เดือน (อุณหภูมิ 45 ความชื้นสัมพัทธ์ 75%)

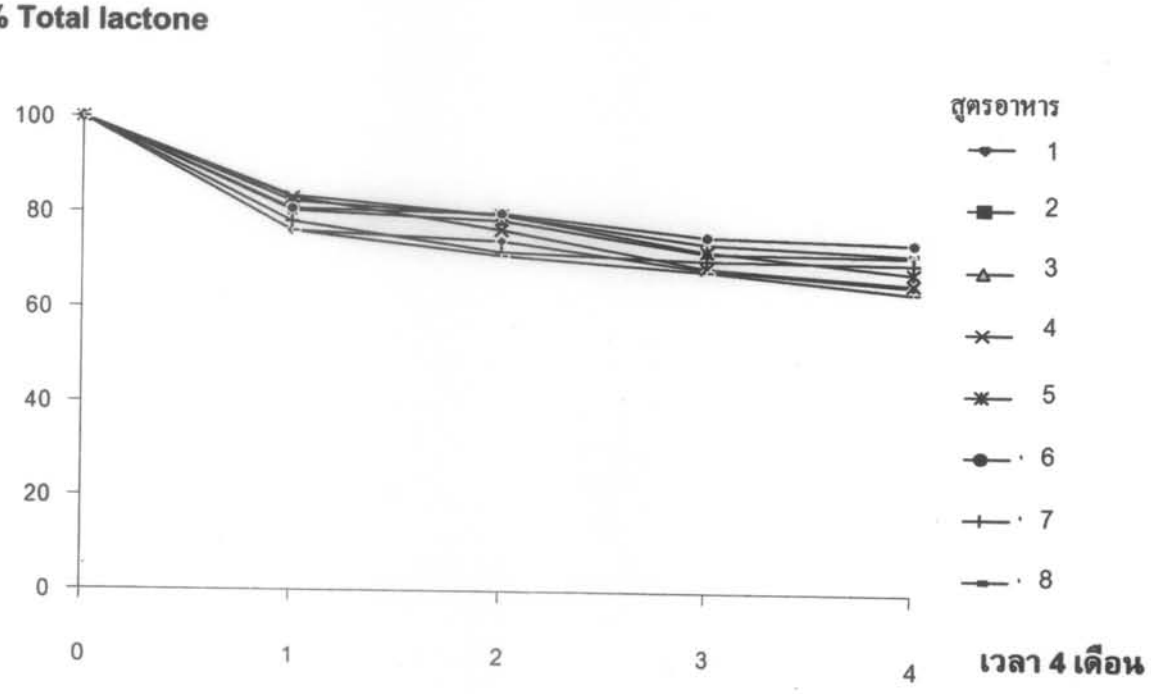
2.2 การหาความคงตัว total lactone ในสภาวะเร่ง

ในการวิเคราะห์หา Total lactone ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรแกรนูลและในอาหาร พบว่าปริมาณ total lactone ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรแกรนูลมีค่า 95.30 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก หลังการคลุกผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรในตัวอย่างอาหารกุ้งทั้ง 8 สูตรพบว่า ปริมาณ total lactone (ตารางที่ 8 และรูปที่ 13) ที่วัดในวันเริ่มต้นการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% อยู่ระหว่าง 41-65 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และหลังการเก็บไว้เป็นเวลา 4 เดือน มีค่าระหว่าง 27-43 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์จากปริมาณ total lactone ในวันเริ่มต้นของแต่ละสูตรพบว่าอยู่ระหว่าง 64-75 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 8 มีการลดลงสูงสุด และสูตรที่ 5 มีการลดลงต่ำที่สุด

ตารางที่ 8 ค่า total lactone ในอาหารที่เก็บ ณ อุณหภูมิ 45 ความชื้นสัมพัทธ์ 75% นาน 4 เดือน

สูตรอาหาร	ค่า total lactone (mg%) (w/w)				
	วันเริ่มต้น	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4
1 (I')	40.88	31.16	30.27	28.05	26.71
	(100)	(76.21)	(74.05)	(68.62)	(65.34)
2 (II)	50.72	40.68	39.75	36.44	36.31
	(100)	(80.21)	(78.37)	(71.85)	(71.6)
3 (III)	59.91	50.09	47.76	44.17	43.14
	(100)	(83.62)	(79.73)	(73.73)	(72.01)
4 (IV)	49.33	40.59	39.22	35.71	33.63
	(100)	(82.28)	(79.5)	(72.4)	(68.17)
5 (I")	65.05	53.99	49.81	44.69	42.71
	(100)	(83)	(76.56)	(68.7)	(65.65)
6 (V)	45.33	36.63	36.35	34.18	33.74
	(100)	(80.81)	(80.19)	(75.39)	(74.42)
7 (VI)	40.61	31.78	29.2	28.51	28.38
	(100)	(78.25)	(71.91)	(70.21)	(69.89)
8 (VII)	42.98	32.72	30.53	29.24	27.49
	(100)	(76.13)	(71.03)	(68.04)	(63.96)

หมายเหตุ: ตัวเลขในวงเล็บแสดงค่า total lactone เป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับวันเริ่มต้นการทดลอง



รูปที่ 13 แสดงระดับ total lactone (%) ในอาหาร 8 สูตรที่เก็บในสภาวะเร่งนาน 4 เดือน

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila*

หลังการผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร กับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ทั้ง 8 ตัวอย่างใน micro-plate และอบที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่าตัวอย่างเชื้อที่แยก 1, 2, 3, 4 และ 7 ทำให้สารผสมหลุมที่ 3 ใส หลุมที่ 4 ขุ่นแต่ตัวอย่างเชื้อที่ 5, 6 และ 8 ทำให้สารผสมหลุมที่ 4 ใส และหลุมที่ 5 ขุ่น และเมื่อเพาะเชื้อจากหลุมที่ใสบน Mueller hinton agar หลุมที่ 2 ของตัวอย่างเชื้อที่ 1, 2, 3, 4 และ 7 และหลุมที่ 3 ของตัวอย่างเชื้อที่ 5, 6 และ 8 ไม่พบการเจริญของเชื้อ หลังจากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรกับเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธี Micro-plate dilution หลุมที่ใสแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของสารสกัดแสดงถึงค่า Minimal inhibitory concentration (MIC)) และเมื่อนำเชื้อจากหลุมที่ใสมาเพาะบน Mueller hinton agar ไม่พบการเจริญของเชื้อแสดงถึงขนาดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อโรคได้ (Minimal bactericidal concentration (MBC)) จากการทดลองเมื่อคำนวณปริมาณ MIC และ MBC พบว่ามีค่า 417 และ 834 พีพีเอ็ม ตามลำดับ (ตารางที่ 12) ค่า MIC ต่อเชื้อ *A. hydrophila* นี้มีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Vibrio* spp. ที่จัดอยู่ในเชื้อกลุ่ม (Genera) เดียวกัน ซึ่งสถาพรและคณะ (2539) รายงานว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Wan และ Coventry (1998) รายงานว่า MIC ของน้ำมันกระเพรา (Basil oils) ต่อเชื้อ *A. hydrophila* มีค่า 0.125% v/v

การที่เชื้อตอบสนองต่อสารสกัดฟ้าทะลายโจรแตกต่างกัน แสดงว่าเชื้อมีความสามารถต่อต้านสารสกัดแตกต่างกัน ตัวอย่างเชื้อที่ 1, 2, 3, 4 และ 7 ต่อต้านสารสกัดได้ดีกว่า 5, 6 และ 8 และตัวอย่างเชื้อที่ 4 ได้ถูกสุ่มเลือกไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดในการต้านเชื้อแบคทีเรียในกุ้งต่อไป (In vivo) อย่างไรก็ตามการศึกษาโดยวิธี microplate agglutination ดังข้างต้น มีขั้นตอนการศึกษาที่ควรระวังโดยเฉพาะการหาปริมาณเชื้อจากการเทียบจากความขุ่นที่ 0.5 McFaland ซึ่งมีปริมาณเชื้อ $1.5x10^8$ ที่อาจเกิดความคลาดเคลื่อนจากผู้วิจัย และการอ่านผลจาก micro-plate ด้วยสายตาอาจไม่ชัดเจน เนื่องจากสารผสมในการศึกษามีสีออกเขียวจากตัวสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

ตารางที่ 12 แสดงขนาดสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อ *A. hydrophila*

ครั้งที่แยกเชื้อ (Isolation)	MIC (ppm หรือ µg/ml)	MBC (ppm หรือ µg/ml)
1	417	834
2	417	834
3	417	834
4	417	834
5	208.5	417
6	208.5	417
7	417	834
8	208.5	417

4. อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้ง

องค์ประกอบและสัดส่วนของวัตถุดิบ คุณค่าทางโภชนะของวัตถุดิบและปริมาณสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เสริมแทนสื่อ (รำสกัด) ในน้ำหนักที่เท่ากัน ในสูตรอาหารอาหารกุ้ง แสดงดังตารางที่ 13-16 และรูปที่ 14

ตารางที่ 13 แสดงสัดส่วนวัตถุดิบของอาหารกุ้งสูตรควบคุม

วัตถุดิบ	สัดส่วนในสูตรอาหาร (%)
ปลาป่น	38
กากถั่วเหลือง	32
รำ	8
ปลายข้าวบด	7
เปลือกกุ้ง	5
น้ำมันปลา	1
สารเหนียว	1.5
วิตามินเกลือแร่	1.5
สื่อ (รำสกัด)	6

ตารางที่ 14 แสดงคุณค่าทางโภชนะของวัตถุดิบหลักในสูตรอาหาร

วัตถุดิบ	โปรตีน	ไขมัน	เยื่อใย	เถ้า
ปลาป่น	60.12	6.83	0.7	18.12
กากถั่วเหลือง	43.81	1.99	4.25	7.86
ปลายข้าว	7.1	0.68	0.08	0.61
รำ	13.93	14.81	4.01	7.18
เปลือกกุ้งป่น	37.62	3.1	4.27	35.2

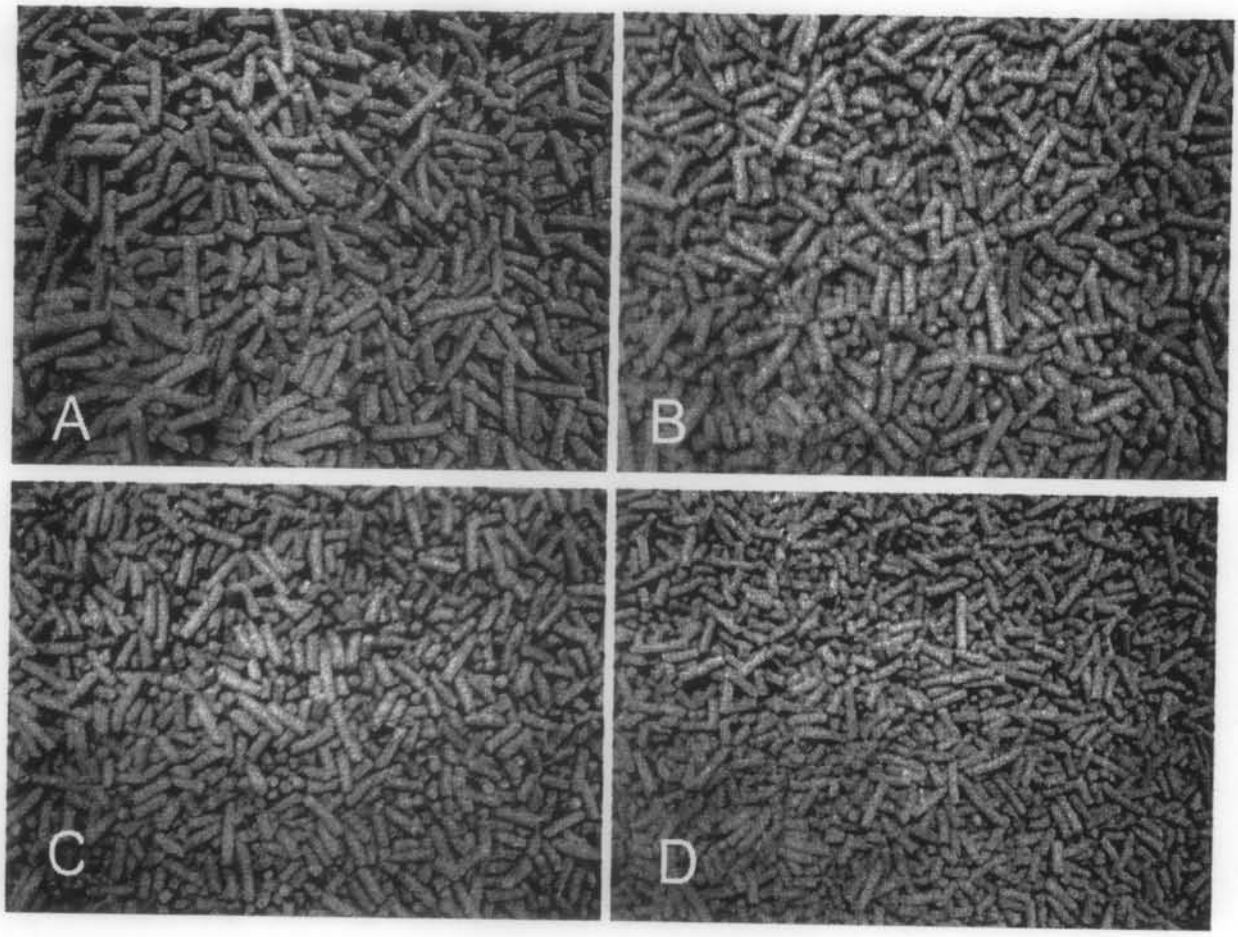
ตารางที่ 15 คุณค่าทางโภชนะของอาหารกุ้งสูตรควบคุม

คุณค่าทางโภชนะ	จากการวิเคราะห์
โปรตีน (%)	39.96
ไขมัน (%)	6.19
กาก (%)	2.00
เถ้า (%)	12.94
พลังงานรวม (กิโลแคลลอรีต่อกรัม)	5.02

ตารางที่ 16 แสดงสัดส่วนวัตถุดิบของอาหารกุ้งสูตรควบคุมและสูตรที่เสริมด้วยสารสกัดฟ้าทะลายโจร

สูตรอาหาร	ปริมาณสารสกัดฟ้าทะลายโจรแกรนูล (กรัม/กิโลกรัมอาหาร)	ปริมาณสื่อ (รำสกัด) (กรัม/กิโลกรัมอาหาร)
ควบคุม	0	60
ฟ้าทะลายโจร 417 พีพีเอ็ม (เท่ากับ MIC)	14.28	45.72
ฟ้าทะลายโจร 834 พีพีเอ็ม (เท่ากับ MBC)	28.56	31.44
ฟ้าทะลายโจร 1668 พีพีเอ็ม (เท่ากับ 2 เท่าของ MBC)	57.12	2.88

อาหารที่เตรียมขึ้นเองมีสัดส่วนปลาป่นและกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพดีค่อนข้างสูง แต่การเสริมสมุนไพรฟ้าทะลายโจร โดยเฉพาะที่ 1668 พีพีเอ็มซึ่งเกินกว่า 5% ของน้ำหนักวัตถุดิบในสูตรอาหารก็อาจมีผลต่อความน่ากินและคุณค่าของโภชนะในสูตรอาหาร



รูปที่ 14 แสดงตัวอย่างอาหารกุ้งที่ไม่ผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร (A) ตัวอย่างอาหารที่ผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 417 พีพีเอ็ม (B) ตัวอย่างอาหารที่ผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 834 พีพีเอ็ม (C) และตัวอย่างอาหารที่ผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 1,668 พีพีเอ็ม (D)

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila*

ในการทดสอบประสิทธิภาพฟ้าทะลายโจรในการต้านเชื้อแบคทีเรียในกุ้งพบว่า หลังการให้อาหารคลุกสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียแอโรโมนาสไฮโดรฟิลาในกุ้งเคลือบด้วยแป้งข้าวโพดซึ่งดีกว่าสารอีก 2 ชนิดคือ ไคโตซาน และน้ำมันตับปลาหมึก พบว่าปริมาณการกินอาหารของกุ้งในช่วง 3 วันแรกลดลง ทั้งนี้คงเนื่องจากกลิ่นและรสชาดอาหารที่เปลี่ยนไป ในการทดสอบในกุ้งครั้งต่อมาผู้วิจัยได้ทดลองใช้สารกระตุ้นการกินในอาหาร (palatability enhancer) ที่จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ควบคู่กับการทดลองสมุนไพรฟ้าทะลายโจร แต่ก็ยังพบการลดลงของการกินอาหารคลุกสมุนไพรในกุ้งในช่วง 2-3 วันแรกของการทดลองก่อนกลับเข้าสู่ระดับปกติ

ในการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในช่วงแรกของการศึกษา หลังกุ้งกินอาหารผสมฟ้าทะลายโจรนาน 2 สัปดาห์ (ไม่รวมระยะเวลาในการปรับสภาวะความคุ้นเคยต่อการกินอาหารผสมฟ้าทะลายโจรในช่วง 3-4 วันแรก) คณะผู้วิจัยได้ใส่เชื้อเป็นปริมาณ 9 x 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 20 มิลลิลิตรต่อน้ำเลี้ยงกุ้ง 20 ลิตร วันเว้นวัน นาน 2 สัปดาห์ พบว่า

ไม่มีกุ้งตาย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยนวิธีการทดสอบการต้านเชื้อจากการใส่เชื้อในน้ำมาเป็นการฉีดเข้ากล้ามเนื้อลำตัวในขนาด 0.5 x 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

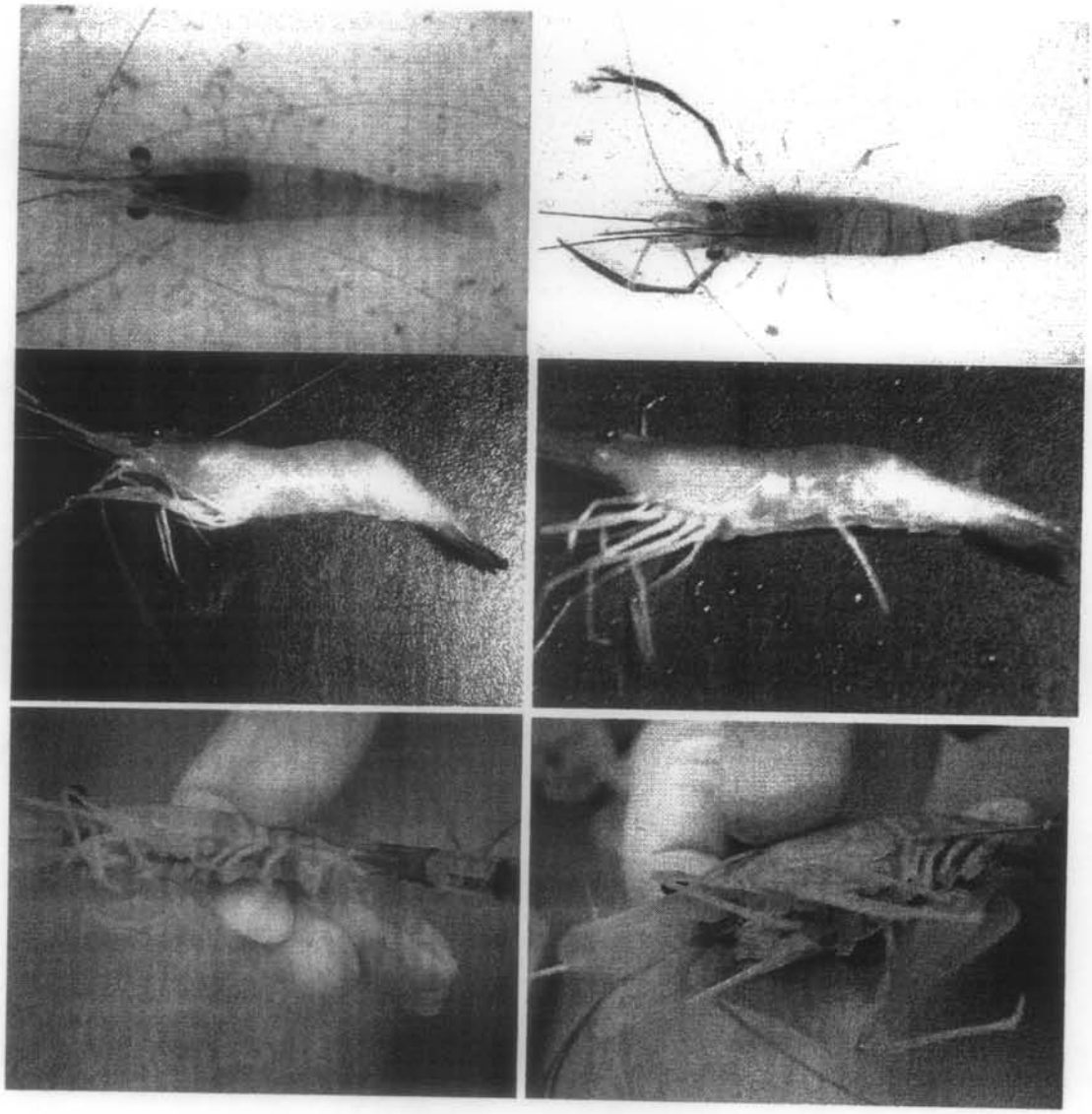
จากการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการต้านเชื้อ โดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ชนิดเป็นเข้ากล้ามเนื้อลำตัวพบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีขนาดสารออกฤทธิ์ andrographolides 417 พีพีเอ็ม มีอัตราตายต่ำที่สุดที่ 12.96% (มีอัตรารอดสูงสุดที่ 87.04%) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากขนาดสารออกฤทธิ์ที่ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม) 834 และ 1668 พีพีเอ็ม ซึ่งทั้ง 3 ระดับพบว่าทำให้กุ้งมีอัตรารอดใกล้เคียงกันในช่วง 53-65% และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 17 และ รูปที่ 15) ทั้งนี้คงเนื่องจากระดับสารออกฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรในอาหารในระดับที่สูงขึ้นน่าจะทำให้อาหารมีกลิ่นรสชาติเปลี่ยนไป มีความน่ากินน้อยลง และกุ้งกินอาหารลดลง ซึ่งจะส่งผลให้กุ้งมีสุขภาพอ่อนแอและมีอัตราตายสูงขึ้น หลังการฉีดเชื้อแบคทีเรียแอโรโมนาสเข้ากล้ามเนื้อลำตัว อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพฟ้าทะลายโจรในการต้านเชื้อแบคทีเรียในกุ้งในระดับหนึ่ง กุ้งที่ตายผู้วิจัยได้ทำการแยกพิสูจน์ชนิดเชื้อจากตับ และพบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila*

ตารางที่ 17 อัตรารอดกุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เข้ากล้ามเนื้อลำตัว

ปริมาณ andrographolide ผสมในอาหาร (ppm)	อัตราตาย (%) ±SD	อัตรารอด (%) ±SD
0 (สูตรควบคุม)	37.04± 8.49 [a]	62.96± 8.49 [a]
417 (MIC)	12.96± 3.21 [b]	87.04± 3.21 [b]
834 (MBC)	35.19± 3.21 [a]	64.81± 3.21 [a]
1668 (2x MBC)	48.15± 6.42 [a]	53.70± 6.42 [a]

[ab] ตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาระดับสารออกฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรที่ชัดเจนต่ออัตราตายของกุ้งระหว่างขนาดสารออกฤทธิ์ andrographolidesที่ 208.5 417 และ 625.5 พีพีเอ็ม จากการทดลองพบว่าสารออกฤทธิ์ที่ 417 พีพีเอ็ม ทำให้กุ้งมีอัตรารอดสูงสุดที่ 83.33% สารออกฤทธิ์ระดับ 625.5 พีพีเอ็ม ทำให้กุ้งมีอัตรารอดปานกลางที่ 72.23% และสารออกฤทธิ์ระดับ 208.5 พีพีเอ็ม ทำให้กุ้งมีอัตรารอดต่ำสุดที่ 66.66% เนื่องด้วยระยะเวลาในการศึกษาที่จำกัด จึงทำการทดลองในกุ้งได้เพียง 18 ตัว อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในข้างต้นพอจะสรุปได้ว่าขนาดสารออกฤทธิ์ andrographolides ในฟ้าทะลายโจรที่ 417 พีพีเอ็ม น่าจะเป็นขนาดที่เหมาะสม ในการต้านแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในกุ้งก้ามกราม



รูปที่ 15 แสดงตัวอย่างกุ้งและการฉีดเชื้อแบคทีเรียเข้ากล้ามเนื้อลำตัว เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ผลการศึกษาทั้งหมดในข้างต้นแสดงถึงประสิทธิภาพฟ้าทะลายโจรในการต้านเชื้อแบคทีเรียในกุ้ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ สถาพรและคณะ (2539) ได้รายงานว่าสมุนไพรหลายชนิดรวมทั้งสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio spp.* ในห้องปฏิบัติการได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Citarasu และคณะ (2003) ได้รายงานว่าลูกกุ้งกุลาดำ (postlarvae) กินไรทะเลที่ได้รับสมุนไพร 3 ชนิดรวมทั้งฟ้าทะลายโจร แล้วเลี้ยงลูกกุ้งในน้ำทะเลที่มีเชื้อ *Pseumonas aeroginosa, Salmonella typhi, Staphylococcus sp.* และ *Vibrio sp.* พบว่าลูกกุ้งมีอัตรารอดเกิน 50% และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Speicic Growth Rate) 12.43% เมื่อเปรียบเทียบกับลูกกุ้งที่กินไรที่ไม่มีสมุนไพรมีอัตรารอด 10-30% และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 8.42-9.1% จากการศึกษาของ Chen และคณะ (2003) ที่ได้ทดลองใช้สมุนไพรร่วมกัน 4 ชนิด ซึ่งมีฟ้าทะลายโจรเป็น

ส่วนผสมพบว่าสมุนไพรมีฤทธิ์เพิ่มการเก็บกินทำลายแบคทีเรีย (phagocytosis) ในปลาไน และจากการศึกษาของ Singha et al. (2003) ที่พบว่าฟ้าทะลายโจรสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ รวมทั้ง Direkbusarakom (2000) พบว่าในประเทศจีนมีการนำสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมาใช้ผสมอาหารปลาเพื่อควบคุมภาวะลำไส้อักเสบ (enteritis)

Panossian และคณะ (2002) ได้รายงานถึงบทบาทสารออกฤทธิ์ andrographolide ในฟ้าทะลายโจรในการสร้าง cytokines และสารกระตุ้นภูมิตัวอื่นๆ และจากการศึกษาของ Limsong และคณะ (2004) พบว่า ฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 0.5% (w/v) สามารถยับยั้งความสามารถในการจับเกาะของแบคทีเรีย *Streptococcus mutan* ได้ และ Kumar และ Gopal (999) พบว่าฟ้าทะลายโจรสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำได้ นอกจากฟ้าทะลายโจรแล้วปัจจุบันได้มีรายงานการใช้ในสมุนไพรชนิดอื่นๆ ในสัตว์น้ำ เช่น ลูกใต้ใบ (*Phylanthus amarus*) ที่พบว่าสามารถต่อต้านแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ (ภัสสรและคณะ, 2540) สารสกัดจากสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*) ต่อต้านการเจริญของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคเรืองแสงในกุ้ง (สถาพรและคณะ, 2544) พญายอ (*Clinacanthus nutaus*) ช่วยป้องกันการติดเชื้อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้ง (ลิลาและคณะ, 2543) กระเทียม (*Allium sativum*) ช่วยกำจัดโปรโตซัว gregarine ในลำไส้กุ้ง (วรวุฒิและคณะ, 2546) สาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*) ช่วยเพิ่มอัตรารอดจากโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (ปิยาลัย และคณะ, 2547) สมุนไพร Astragalus กระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล (Yin et al., 2006) ข่ามีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา (Dugenci et al., 2003) และใช้สมุนไพรรวมของจีนหลายชนิดช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลากะรัง (Sivaram et al., 2004) และปลาหางเหลือง (Jian and Wu, 2004)

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจวิเคราะห์และหาความคงตัวของสารออกฤทธิ์ andrographolide และ total lactone ของฟ้าทะลายโจรในสารสกัดและที่ผสมในอาหาร และการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการต้านเชื้อแบคทีเรียแอโรโมนาส ไฮโดรฟิลา พบว่า

1. ปริมาณ andrographolide ในสารสกัดน้ำเข้มข้นและในสารสกัดฟ้าทะลายโจรรูปแกรนูลมีค่า 6.27% และ 2.71% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ส่วนค่า total lactone ในสารสกัดน้ำเข้มข้นและในสารสกัดฟ้าทะลายโจรรูปแกรนูลมีค่า 5.85% และ 95.53 mg% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ andrographolide ในตัวอย่างอาหารมีความเหมาะอยู่ในระดับเกณฑ์ที่ดี

2. การทดสอบความคงตัวของน้ำสกัดฟ้าทะลายโจร ในอาหารกุ้งที่เก็บไว้ในสภาวะเร่ง ณ อุณหภูมิ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ความต่างของการสลายตัวจากวันเริ่มต้นจะน้อยกว่า 15% แต่จากการคำนวณหาอายุของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ 2 ชนิดที่เหลืออยู่ พบว่าถ้าเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศา andrographolide จะคงตัวอยู่นาน 15.5 ปี และ total lactones จะคงตัวอยู่นาน 4.8 ปี

3. ปริมาณ andrographolide ในอาหารกุ้งที่เก็บไว้ในสภาวะเร่ง ณ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% พบว่าอาหารทุกสูตรที่ผสมฟ้าทะลายโจรสามารถเก็บได้นานไม่เกิน 2 เดือน

4. การทดลองในห้องปฏิบัติการโดยวิธี microplate agglutination พบว่าสารออกฤทธิ์ andrographolide ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ มีขนาด 417 และ 834 พีพีเอ็ม ตามลำดับ

5. เมื่อนำสารสกัดฟ้าทะลายโจรในขนาดสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ไปผสมในอาหารให้กุ้งกินนาน 2 สัปดาห์ ก่อนการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ชนิดเป็นเข้ากล้ามเนื้อลำตัวเพื่อทดสอบการต้านเชื้อในกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงในตู้กระจกพบว่า กุ้งที่กินอาหารผสมฟ้าทะลายโจรที่มีขนาด andrographolide 417 พีพีเอ็ม มีอัตราตายต่ำที่สุดที่ 12.96% ซึ่งแตกต่างจากขนาดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ข้อเสนอแนะ

1. ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) ของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรที่ผสมในอาหารกุ้งควรมีการศึกษาซ้ำและพัฒนาต่อ ก่อนการจดอนุสิทธิบัตรและ/หรือสิทธิบัตรต่อไป

2. ควรมีการศึกษาหาขนาดสารออกฤทธิ์ andrographolide ที่ผสมในอาหารในกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดินในสภาพการเลี้ยงจริง ก่อนการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

3. ควรทำการแยกพิสูจน์ชนิดเชื้อจากกุ้งที่ได้รับอาหารผสมฟ้าทะลายโจรและรอดชีวิตหลังการฉีดด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ชนิดเป็นเข้ากล้ามเนื้อ

4. ควรมีการวิเคราะห์ประโยชน์และต้นทุนกำไรในเชิงพาณิชย์ ก่อนการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของเกษตรกร

5. ควรมีการศึกษาผลกระทบต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของกุ้ง หลังการใช้ฟ้าทะลายโจรในปริมาณสูง