บทที่ 1
บทนำ (Introduction)

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นกลุ่มสารสำคัญซึ่งพบทั่วไปในพืชและที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้วมีมากกว่า 4,000 ชนิด (Middleton, Kandaswami et al. 2000) รายงานการศึกษาวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่า flavonoids หลายชนิด เช่น catechins ในชาเขียว, genistein และ daidzin ในถั่วเหลือง, quercetin, kempferol, myricetin, apigenin เป็นต้น มีประสิทธิภาพสูงในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Haslam 1996; Middleton, Kandaswami et al. 2000) และหลักฐานที่ได้จากการศึกษาทางระบาดวิทยา การศึกษาในผู้ป่วย และในสัตว์ทดลองชี้ชัดว่า catechins และ genistein สามารถป้องกัน(Middleton, Kandaswami et al. 2000; Aidoo, Bishop et al. 2005; Albertazzi, Steel et al. 2005; Jeschke, Briese et al. 2005; Jeune, Kumi-Diaka et al. 2005; Nakaya, Tachibana et al. 2005; Nhan, Anderson et al. 2005; Rowell, Carpenter et al. 2005; Kijkuokool, Parhar et al. 2006) โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด (Mojzisova and Kuchta 2001; Gottstein, Ewins et al. 2003; Penotti, Fabio et al. 2003; Squadrito, Altavilla et al. 2003; Sbarouni, Iliodromitis et al. 2006; Siriviriyakul, Khemapech et al. 2006; Polini, Rauschemberger et al. 2007; Je and Sohn 2009; Villa, Costantini et al. 2009) และโรคความเสื่อมของระบบประสาทส่วนกลาง เช่น Alzheimer's diseases (Kim, Xia et al. 2000; Jefremov, Zilmer et al. 2007) นอกจากนี้ genistein ยังสามารถจับกับ estrogen receptor และมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนด้วย (Glazier and Bowman 2001; Ren, Kuhn et al. 2001; Squadrito, Altavilla et al. 2003; Aidoo, Bishop et al. 2005; Sbarouni, Iliodromitis et al. 2006) ในปัจจุบัน genistein และ daidzin เป็นสารที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในวงการแพทย์สำหรับการป้องกันโรค และนำมาใช้เป็น phytoestrogen ทดแทนฮอร์โมนเพศในสตรีที่หมดประจำเดือน

จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ในการป้องกันและเสริมสร้างสุขภาพของสารสกัดจากสมุนไพรต่างๆ ดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มที่มีฤทธิ์เป็น phytoestrogen ได้สร้างกระแสการพัฒนาสารสกัดที่ได้ในกลุ่ม phytoestrogen เพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพ (Glazier and Bowman 2001; Messina, Gardner et al. 2002) จะเห็นได้จากการที่คณะกรรมการอาหารและยาของ ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้อนุญาตอย่างเป็นทางการให้ใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมสุขภาพและระบุสรรพคุณในการลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจโคโรนารี ตั้งแต่ พ.ศ.2542 เป็นต้นมา นอกจากนั้นยังมีการวิจัยยืนยันการใช้สารกลุ่ม phytoestrogen ในการทดแทนฮอร์โมนในสตรีวัยหมดประจำเดือนว่า มีประสิทธิภาพในการลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง ปัญหาของระบบหัวใจและหลอดเลือดจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ (Mojzisova and Kuchta 2001; Ren, Kuhn et al.

2001; Penotti, Fabio et al. 2003; Squadrito, Altavilla et al. 2003; Sbarouni, Iliodromitis et al. 2006; Siriviriyakul, Khemapech et al. 2006; Polini, Rauschemberger et al. 2007; Je and Sohn 2009) อย่างไรก็ตาม การบริโภคอาหารเสริมสุขภาพในประเทศไทยนั้น แพร่หลายในกลุ่มผู้บริโภคที่มีฐานะดีเท่านั้น เนื่องจากอาหารเสริมสุขภาพส่วนใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาค่อนข้างสูง อีกทั้งการพัฒนาการผลิตอาหารเสริมที่ได้จากสมุนไพรในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศยังขาดมาตรฐานกระบวนการผลิตที่ดี เพื่อควบคุมปริมาณสารสำคัญ ความปลอดภัยและความคงสภาพในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

ถึงแม้จะมีการใช้สารสกัดถั่วเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพอย่างแพร่หลาย แต่ในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศไทยยังขาดมาตรฐานกระบวนการผลิตสารสกัดถั่วเหลืองที่ดีเพื่อควบคุมปริมาณสารสำคัญ ความปลอดภัยและความคงสภาพในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมสกัดจากถั่วเหลืองในรูปแบบผงให้มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีและสามารถเทียบเคียงหาปริมาณของสารสำคัญ genistein ได้อย่างถูกต้อง สำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดถั่วเหลืองบรรจุแคปซูลที่มีประสิทธิภาพในการเสริมสุขภาพ มีความปลอดภัยในการใช้และมีความคงสภาพในการเก็บรักษา เพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพและเป็นแหล่งทดแทนฮอร์โมนเอสโตรเจน อันเป็นการทดแทนการนำเข้าและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของทรัพยากรธรรมชาติของประเทศ และนำมาซึ่งการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เป็นภูมิปัญญาของคนไทย นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการส่งเสริมให้ประชาชนได้เลือกใช้สมุนไพรที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพเพื่อการป้องกันโรคอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาตำรับสารสกัดถั่วเหลืองบรรจุแคปซูลให้มีลักษณะน่าใช้ และมีความคงสภาพทั้งทางเคมีและจุลชีววิทยา
2. ศึกษาปัจจัยในกระบวนการผลิตที่มีผลต่อความคงสภาพของสารสกัดถั่วเหลืองบรรจุแคปซูลในทางเคมีและจุลชีววิทยา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. พัฒนาศักยภาพการวิจัยทางเภสัชศาสตร์และเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพที่หาได้ง่ายในประเทศ ซึ่งเป็นผลดีต่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศ
2. เป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์เพื่อวิจัยและพัฒนายาที่มีคุณสมบัติในการป้องกันและบำบัดโรค (Chemopreventive medicine) เช่น โรคมะเร็ง โรคไขมันอุดตันในหลอดเลือด และโรคหัวใจ เป็นต้น
3. เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการกำหนดมาตรฐานของกระบวนการผลิตอาหารเสริมสุขภาพรูปแบบแคปซูลจากสารสกัดจากถั่วเหลือง
4. เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาหาอายุและวิธีเก็บรักษาสารสกัดถั่วเหลืองบรรจุแคปซูล

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

คณะเภสัชศาสตร์ หน่วยงานภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร หน่วยงานด้านสาธารณสุข และประชาชนทั่วไป

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม (Literature Review)

ปัจจุบันสารสกัดถั่วเหลืองได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพสำหรับการป้องกันโรคและนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในสตรีวัยหมดประจำเดือน (Glazier and Bowman 2001; Messina, Gardner et al. 2002) เนื่องจากมีการศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า genistein ในถั่วเหลืองซึ่งเป็นสารในกลุ่ม isoflavonoids มีประสิทธิภาพสูงในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Haslam 1996; Middleton, Kandaswami et al. 2000; Ren, Kuhn et al. 2001; Siriviriyakul, Khemapech et al. 2006; Jefremov, Zilmer et al. 2007) สามารถป้องกันความเสื่อมของระบบประสาทส่วนกลางเช่น Alzheimer's , Huntington's และ Parkinson's disease ทั้งนี้ genistein ยังสามารถจับกับ estrogen receptor ทำให้มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนด้วย (Kim, Xia et al. 2000; Aidoo, Bishop et al. 2005; Jeune, Kumi-Diaka et al. 2005; Nhan, Anderson et al. 2005; Rowell, Carpenter et al. 2005; Kijkuokool, Parhar et al. 2006)บางงานวิจัยยืนยันว่า การใช้สารกลุ่ม phytoestrogen ในการทดแทนฮอร์โมนในสตรีวัยหมดระจำเดือนนั้นมีประสิทธิภาพในการลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง จากฤทธิ์ estrogenic effect และมีหลักฐานที่ได้จากการศึกษาทางระบาดวิทยา ซึ่งเป็นการศึกษาในผู้ป่วยและสตรีทดลองที่ชี้ชัดว่า genistein สามารถป้องกันโรคมะเร็งได้ (Middleton, Kandaswami et al. 2000; Rowell, Carpenter et al. 2005)

นอกจากนั้น ยังมีรายงานข้อมูลว่า phytoestrogen ช่วยแก้ไขปัญหาของระบบหัวใจและหลอดเลือดจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนได้อีกด้วย (Lissin and Cooke 2000; Glazier and Bowman 2001; Mojzisova and Kuchta 2001; Ren, Kuhn et al. 2001; Gottstein, Ewins et al. 2003; Wei, Saladi et al. 2003,Lissin, 2000 #39; Souzeau, Belanger et al. 2005; Sbarouni, Iliodromitis et al. 2006; Carlson, Peng et al. 2008; Villa, Costantini et al. 2009)แม้ว่าจะมีข้อมูลจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของ phytoestrogen แต่ทั้งนี้ยังไม่มีข้อมูลยืนยันได้ชัดเจนว่า ขนาดการใช้เท่าใดจึงจะให้ประสิทธิภาพตามที่ต้องการ โดยพบว่ามีการระบุปริมาณที่ใช้แตกต่างกันไปแต่ละพื้นที่ เช่น มีข้อมูลว่าในประเทศญี่ปุ่น ควรบริโภค soy isoflavone ในปริมาณที่มากกว่า 30-50 mg/day ในภูมิภาคเอเชียระบุไว้เท่ากับ 25-45 mg/day ขณะที่ประเทศแถบตะวันตกกลับให้บริโภคในปริมาณที่น้อยกว่า 5 mg/day (Djuric, Chen et al. 2001; Tsangalis, Wilcox et al. 2005; Vergne, Bennetau-Pelissero et al. 2008)

Phytoestrogen

เนื่องจากถั่วเหลืองมีสารเคมีในกลุ่ม Phytoestrogen ซึ่งเป็นสารธรรมชาติที่ได้จากพืช มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารกลุ่ม Phenols ประเภท isoflavones และ lignans สามารถจับกับ mammalian estrogen ได้ จึงแสดงฤทธิ์คล้ายกับ estrogen ซึ่งสาร isoflavone มีโครงสร้างทางเคมีอยู่ในรูปแบบที่แตกต่างกันหลายชนิด ที่รู้จักกันดีคือ genistein, daidzein, glycitein (รูปที่ 1) (Doerge, Chang et al. 2000; Lissin and Cooke 2000)สารทั้งสามชนิดพบมากในถั่วชนิดต่างๆ เช่น ถั่วเหลือง ถั่วลันเตา โดย isoflavone จะออกฤทธิ์เป็น contibutor ของ phytoestrogen

รูปที่ 1 โครงสร้างสารกลุ่ม isoflavone ที่ออกฤทธิ์ในถั่วเหลือง ที่มา: (Doerge, Chang et al. 2000)

Genistein

Genistein เป็นสารในกลุ่ม isoflavone ที่สามารถสกัดได้จากถั่วเหลือง มีลักษณะเป็นรูปผลึกทรงหกเหลี่ยม ได้จากสารสกัดในส่วนของ alcohol extracts มีจุดหลอมเหลวประมาณ 297-298^{o}C สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ไม่ละลายในน้ำ โดยปริมาณ genistein ที่ได้จากถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม มีประมาณ 300-2000 มิลลิกรัม (Wang and Murphy 1994) นอกจากนั้นถึงแม้ว่า genistein จะค่อนข้างทนต่อความร้อน แต่กระบวนการในการแปรรูปอาจจะมีผลทำให้สูญเสียปริมาณสารตัวนี้ได้ ผลจากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง พบว่า การบริโภค Soy isoflavone เป็นอาหารเสริมสุขภาพนั้น ไม่ควรบริโภคเกินกว่าวันละ 100 มิลลิกรัม (aglycone unit) โดยสามารถแบ่งขนาดในการรับประทานได้มากกว่า 1 ครั้ง

ประโยชน์ของ Phytoestrogen

ประโยชน์ทางอาหารและโภชนาการ

อาหารประเภทถั่วเหลืองและถั่วต่างๆ เป็นแหล่งของโปรตีน และได้มีหลักฐานบ่งชี้ว่า phytoestrogen ในอาหารมีส่วนสัมพันธ์กับอาการต่างๆ ของสตรีวัยทอง พบว่า อาหารที่สามารถบรรเทาอาการของสตรีวัยทองได้แก่ อาหารประเภทถั่ว ข้าวซ้อมมือ ปลา ซึ่งอาหารเหล่านี้มักเป็นองค์ประกอบอยู่ในอาหารของชาวเอเชีย เป็นเหตุผลที่ว่า หญิงชาวญี่ปุ่นจำนวนเพียงร้อยละ 10-15 เท่านั้นที่มีอาการหมดประจำเดือนของสตรีวัยทอง ขณะที่พบอาการเหล่านี้ในสตรีอเมริกันถึงร้อยละ 80-85 (Kim, Xia et al. 2000; Lissin and Cooke 2000; Glazier and Bowman 2001; Penotti, Fabio et al. 2003; Squadrito, Altavilla et al. 2003; Wu, Wang et al. 2004; Aidoo, Bishop et al. 2005; Albertazzi, Steel et al. 2005; Nhan, Anderson et al. 2005; Tsangalis, Wilcox et al. 2005; Williamson-Hughes, Flickinger et al. 2006; Carlson, Peng et al. 2008; Pop, Fischer et al. 2008; Villa, Costantini et al. 2009)

ประโยชน์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

มีรายงานเป็นจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า Flavonoids หลายชนิด เช่น catechins ในชาเขียว genistein และ daidzin ในถั่วเหลือง quercetin, kempferol, myricetin, apigenin เป็นต้น มีประสิทธิภาพสูงในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Haslam 1996; Middleton, Kandaswami et al. 2000) เนื่องจาก isoflavone เป็นสารกลุ่ม polyphenol ซึ่งสามารถเป็น reducing agent ที่ดี สามารถต้านอนุมูลอิสระในเส้นเลือดและสามารถช่วยลดระดับการออกซิเดชันของ LDLโคเลสเตอรอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Wei, Bowen et al. 1995; Middleton, Kandaswami et al. 2000; Djuric, Chen et al. 2001; Mojzisova and Kuchta 2001; Ren, Kuhn et al. 2001; Wei, Saladi et al. 2003; Sbarouni, Iliodromitis et al. 2006; Jefremov, Zilmer et al. 2007; Kwon, Kang et al. 2007; Nielsen and Williamson 2007)

ประโยชน์เกี่ยวกับโรคกระดูกพรุน

ผลการวิจัยในหนูพบว่า genistein ให้ผลคล้ายกับ estrogen โดยสามารถลดการสูญเสียเนื้อกระดูกที่เกิดจากการขาดฮอร์โมนจากรังไข่ของหนูที่ถูกตัดรังไข่ทิ้ง สำหรับข้อมูลในคน มีบางงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่ามีการสูญเสียมวลกระดูกน้อยกว่าหรือเพิ่มมวลกระดูกมากกว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับ isoflavone เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Potter, Baum et al. 1998; Lissin and Cooke 2000; Kritz-Silverstein and Goodman-Gruen 2002; Messina, Gardner et al. 2002; Wu, Wang et al. 2004; Albertazzi, Steel et al. 2005; Wang, Sun et al. 2006; Metzner, Frank et al. 2009)

ประโยชน์ในการบรรเทาอาการของภาวะหมดประจำเดือน

ปัจจุบันการรักษาแบบแพทย์ทางเลือก โดยรับประทานถั่วซึ่งมี isoflavone เป็นส่วนประกอบเป็นแนวทางหนึ่งที่รับความนิยมอย่างมากสำหรับผู้หญิงที่ไม่ต้องการใช้ฮอร์โมนทดแทน มีหลายงานวิจัยที่ทำการศึกษาในกลุ่มหญิงวัยหมดประจำเดือน พบว่า genistein ช่วยลดอาการร้อนวูบวาบ ที่เกิดจากภาวะหมดประจำเดือนได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยฤทธิ์ดังกล่าวสัมพันธ์กับขนาดของ genistein ที่ได้รับ (Potter, Baum et al. 1998; Williamson-Hughes, Flickinger et al. 2006)

ประโยชน์ในการป้องกันการเกิดมะเร็ง

จากข้อเท็จจริงที่ว่า isoflavone มีฤทธิ์อ่อนกว่า estrogen estradiol ถึง 1,000 เท่า โดยสามารถเป็นได้ทั้ง estrogenic effect และ antiestrogenic effect ซึ่งการออกฤทธิ์เป็น antiestrogenic effect เกิดขึ้นเมื่อร่างกายมี estrogen ในปริมาณที่มาก การให้ isoflavone เข้าไปทำให้เกิดการแย่งจับกับ receptor เดียวกัน จึงนำมาใช้ป้องกันการเกิดมะเร็ง มีหลายงานวิจัยที่พบว่า isoflavone มีผลป้องกันการเกิดโรคมะเร็งที่ต่อมลูกหมากและเต้านม โดยพบว่า genistein เป็นสารสำคัญ ซึ่งมีความสำคัญในการป้องกันมะเร็งดังกล่าว มีรายงานว่า genistein มีความจำเพาะและความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ protein tyrosine kinase ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์และการแบ่งเซลล์ ดังนั้นจึงสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งของเซลล์ต่าง ๆ ที่สัมพันธ์กับฮอร์โมน estrogen ได้ (Wei, Bowen et al. 1995; Lissin and Cooke 2000; Middleton, Kandaswami et al. 2000; Alhasan, Aranha et al. 2001; de Lemos 2001; Djuric, Chen et al. 2001; Glazier and Bowman 2001; Messina and Loprinzi 2001; Ren, Kuhn et al. 2001; Messina, Gardner et al. 2002; Hewitt and Singletary 2003; Hussain, Banerjee et al. 2003; Wei, Saladi et al. 2003; Linseisen, Piller et al. 2004; Sartippour, Rao et al. 2004; Sonee, Sum et al. 2004; Aidoo, Bishop et al. 2005; Jeune, Kumi-Diaka et al. 2005; Nhan, Anderson et al. 2005; Rowell, Carpenter et al. 2005; Touillaud, Pillow et al. 2005; Kijkuokool, Parhar et al. 2006; Duffy, Perez et al. 2007; Halm, Ashburn et al. 2007; Nielsen and Williamson 2007; Lambert, Kwon et al. 2008; Zhou, Hu et al. 2008)

ประโยชน์เกี่ยวกับภาวะโรคหัวใจและหลอดเลือด

มีการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่า ประชากรที่รับประทานอาหารที่มีโปรตีนจากพืชสูงจะมีอุบัติการณ์ของการเป็นโรคหัวใจขาดเลือดและความชุกของภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดในสูง ต่ำกว่าประชากรที่รับประทานอาหารที่มีโปรตีนจากสัตว์สูง ซึ่งองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา และสมาคมแพทย์โรคหัวใจของอเมริกาได้แนะนำให้รับประทานโปรตีนจากถั่วเหลือง 25 มิลลิกรัมต่อวัน และกำหนดให้โปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นส่วนหนึ่งของอาหารที่มีไขมันอิ่มตัวและโคเลสเตอรอลต่ำ ซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ (Baum, Teng et al. 1998; Potter 1998; Potter, Baum et al. 1998; Lissin and Cooke 2000; Glazier and Bowman 2001; Mojzisova and Kuchta 2001; Ren, Kuhn et al. 2001; Gottstein, Ewins et al. 2003; Wei, Saladi et al. 2003; Souzeau, Belanger et al. 2005; Sbarouni, Iliodromitis et al. 2006; Carlson, Peng et al. 2008; Zhou, Hu et al. 2008; Villa, Costantini et al. 2009)

ปริมาณในการบริโภคถั่วเหลือง

แม้มีผลการวิจัยยืนยันประโยชน์ของ phytoestrogen ที่มีหลายประการ แต่ก็ยังไม่มีข้อมูลยืนยันชัดเจนว่า ขนาดการใช้เท่าใดจึงจะให้ประสิทธิภาพตามที่ต้องการโดยไม่ก่อให้เกิดผลที่ไม่พึงประสงค์ ทั้งนี้มีการศึกษาเพื่อระบุปริมาณที่แตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ เช่น มีข้อมูลยืนยันว่าในประเทศญี่ปุ่น ควรบริโภค soy isoflavone ในบริมาณที่มากกว่า 30-50 มิลลิกรัมต่อวัน ในภูมิภาคเอเชียมีการระบุไว้เท่ากับ 25-45 มิลลิกรัมต่อวัน ขณะที่ประเทศแถบตะวันตกกลับให้บริโภคในปริมาณที่น้อยกว่า 5 มิลลิกรัมต่อวัน สมาคมแพทย์โรคหัวใจในอเมริกา ได้ระบุว่าขนาดการรับประทาน 25 มิลลิกรัมต่อวัน จะช่วยลดความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจและหลอดเลือดได้ มีบางการศึกษาที่พบว่า ปริมาณที่พอเหมาะคือ 20-30 มิลลิกรัมต่อวัน และได้มีงานวิจัยที่ศึกษากับหญิงไทยที่พบว่าปริมาณ สาร Genistein ที่ควรบริโภคเพื่อเกิดประโยชน์ต่อร่างกาย คือเท่ากับ 150-200 มิลลิกรัมต่อวัน อย่างไรก็ตามปัจจุบันนั้นยังมีหลักฐานที่ยืนยันแน่ชัดว่าการบริโภคถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มี isoflavone เท่าใดจึงจะฤทธิ์ที่เป็น negative hormone effect แต่ทั้งนี้ได้มีรายงานว่า การบริโภค isoflavone ในปริมาณที่มากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อวัน จะเพิ่มอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง โดยปริมาณที่น่าจะบริโภคได้อย่างปลอดภัยควรอยู่ในช่วง 35-55 มิลลิกรัมต่อวันของ isoflavone โดยบางงานวิจัยแนะนำว่าปริมาณสูงสุดที่ควรบริโภคในแต่ละวันคือ 100 mg (Xu, Wang et al. 1994; Wei, Bowen et al. 1995; Potter, Baum et al. 1998; Coldham and Sauer 2000; Alhasan, Aranha et al. 2001; de Lemos 2001; Messina and Loprinzi 2001; Gottstein, Ewins et al. 2003; Hewitt and Singletary 2003; Chua, Anderson et al. 2004; Albertazzi, Steel et al. 2005; Jeschke, Briese et al. 2005; Jeune, Kumi-Diaka et al. 2005; Nhan, Anderson et al. 2005; Tsangalis, Wilcox et al. 2005; Zhan and Ho 2005; Sbarouni, Iliodromitis et al. 2006; Siriviriyakul, Khemapech et al. 2006; Williamson-

Hughes, Flickinger et al. 2006; Halm, Ashburn et al. 2007; Jefremov, Zilmer et al. 2007; Joshi, Vaidya et al. 2007; Kwon, Kang et al. 2007; Nielsen and Williamson 2007; Pop, Fischer et al. 2008; Zhou, Hu et al. 2008; Andres, Donovan et al. 2009; Gardner, Chatterjee et al. 2009; Metzner, Frank et al. 2009; Sepehr, Cooke et al. 2009)

ผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ในการบริโภคถั่วเหลือง

ได้มีการศึกษาพบว่า การบริโภคโปรตีนจากถั่วเหลือง ก่อให้เกิดผลข้างเคียงน้อยและไม่รุนแรง โดยมากมักจะเป็นอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องอืด แน่นท้อง ท้องผูก มีรายงานที่มีการบงชี้ว่า มีการแพ้โปรตีนจากถั่วเหลือง ซึ่งมักเกิดกับเด็กที่มีประวัติเป็นโรคหอบหืดหรือรายที่แพ้ถั่วและผลิตภัณฑ์จากถั่วอย่างรุนแรง นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า ทารกที่ดื่มนมถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียวมีโอกาสที่ต่อมไทรอยด์จะทำงานต่ำกว่าปกติได้ จึงพบว่า ปัจจุบันมีการเติมไอโอดีนลงไปผลิตภัณฑ์เพื่อป้องกันภาวะดังกล่าว (Doerge, Chang et al. 2000; de Lemos 2001; Messina and Loprinzi 2001; Hussain, Banerjee et al. 2003; Squadrito, Altavilla et al. 2003; Albertazzi, Steel et al. 2005; Metzner, Frank et al. 2009)

การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมสารสกัดถั่วเหลือง

โครงการการสกัดและแยกบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง ซึ่งเป็นงานวิจัยนำร่องในการสกัดสาร genistein จากถั่วเหลืองซึ่งเป็นการศึกษาในระดับปฏิบัติการ โดย ผศ.ดร.จารุวรรณ ธนวิรุฬห์ ได้สกัดสาร genistein จากถั่วเหลืองโดยอาศัยหลักการ Percolation ซึ่งใช้ Methanol 35 ส่วน เป็นตัวทำละลาย และใช้ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 ส่วน เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำการ เขย่า 3 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 80 ^{o}C เมื่อกรองให้ได้สารละลายใสและนำไปวัดปริมาณสาร genistein ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าได้ Genistein บริสุทธิ์ 38.4 mg ต่อถั่วเหลือง 1 g นอกจากนี้มีบางงานวิจัยที่พบว่าการนำถั่วเหลืองไปเขย่ากับน้ำ 4 ชั่วโมง จะทำให้ได้ปริมาณส่วนของอะไกลโคนเพิ่มขึ้น ซึ่งหมายถึงส่วนที่เป็นไกลโคไซด์ลดลง (Chiou and Chean,2002)

อย่างไรก็ตามในการพัฒนาสารสกัดจากถั่วเหลืองเพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพนั้น กระบวนการสกัดสารสำคัญต้องใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่รับประทานได้และปลอดภัยต่อสุขภาพ หรือต้องสามารถพิสูจน์ได้ว่า ไม่มีสารที่เป็นพิษตกค้างอยู่ในสารสกัดดังกล่าว กระบวนการสกัดที่กล่าวมาข้างต้นนั้น มีการใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่เป็นสารอันตรายต่อสุขภาพและมีสภาพความเป็นกรดสูง อีกทั้งสามารถทำการสกัดได้ในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น จึงไม่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ผู้วิจัยมีความสนใจในการพัฒนากระบวนการผลิตที่สามารถประยุกต์ได้กับผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร อีกทั้งมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป โดยสารสกัดผงแห้ง จะถูกนำไปศึกษาลักษณะทางกายภาพของผงยาที่เกี่ยวข้องกับขบวนการการผลิต

แคปซูล ได้แก่ คุณสมบัติการไหล (Flow ability) ความหนาแน่นของผงยา (Density) เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการบรรจุผงยาลงในแคปซูล ซึ่งเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เนื่องจากเป็นรูปแบบที่สามารถป้องกันและรักษาความคงสภาพของสารสำคัญได้ดี ผู้ใช้สามารถรับประทานและพกพาได้สะดวก นอกจากนั้นยังสามารถปรับรูปแบบให้น่ารับประทานได้ง่าย และสามารถผลิตให้มีขนาดรับประทานที่แตกต่างกันได้ และเมื่อนำผงยามาบรรจุแคปซูลแล้ว ก็จะควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะภายนอกของแคปซูล การแตกตัว (Disintegration) ความสม่ำเสมอของน้ำหนักผงยา (Weight variation) นอกจากนั้นเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความปลอดภัยทางจุลชีววิทยาและมีความคงสภาพทางจุลชีววิทยาได้ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์แคปซูลจะถูกนำผ่านการฆ่าเชื้อโดยอาศัยการฉายรังสีแกมมา และทดสอบความคงสภาพทั้งทางเคมีและจุลชีววิทยาของผงยาและแคปซูล โดยอาศัยการศึกษาความคงสภาพแบบเร่ง เพื่อเป็นข้อมูลในการประมาณอายุการใช้งานชั่วคราวของผลิตภัณฑ์ต่อไป

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย (Methodology)

โครงการวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลืองสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจากงานวิจัยนำร่องในการสกัดสาร Genistein จากถั่วเหลือง เป็นการศึกษาในระดับปฏิบัติการโดยอาศัยหลักการ Percolation ซึ่งใช้ Methanol 35 ส่วนเป็นตัวทำละลาย และใช้ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 ส่วน เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำการเขย่า 3 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 80°C เมื่อกรองได้จะให้สารละลายใสและนำไปวัดปริมาณสาร genistein ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าได้ genistein บริสุทธิ์ 38.4 mg ต่อถั่วเหลือง 1 g แต่พบว่าการใช้ Methanol เป็นตัวทำละลาย และใช้ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น ทำให้ไม่สามารถนำไปผลิตต่อในกระบวนการถัดไปได้ ซึ่งจะทำให้เกิดปัญหาในการพัฒนาเพื่อผลิตในระดับอุสาหกรรมหลายประการ เช่น การใช้ Methanol เป็นตัวทำละลายนั้นอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ที่นำไปบริโภคได้

ผู้วิจัยจึงได้ทำการเปลี่ยนตัวทำละลายเป็น ethanol ซึ่งมีค่า polarity ใกล้เคียงกัน อีกทั้งยังสามารถใช้ในตำรับยารับประทานได้และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค สำหรับการนำ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ซึ่งเป็นกรดแก่มาใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะต้องใช้ในปริมาณมาก อาจยังคงหลงเหลือความเป็นพิษค่อนข้างสูง ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ที่นำไปบริโภคได้ ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับกรดอะซิติก ซึ่งเป็นกรดที่สามารถนำมารับประทานได้อย่างปลอดภัยและมีการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังราคาถูก ซึ่งจะช่วยประหยัดต้นทุนที่ใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการพัฒนาวิธีการเตรียมสารสกัดจากถั่วเหลือง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดสาร genistein จากถั่วเหลือง

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในการสกัดสาร genistein จากถั่วเหลือง

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาหากระบวนการที่เหมาะสมในเตรียมสารสกัดจากถั่วเหลือง

ขั้นตอนที่ 4 การศึกษาคุณสมบัติของผงสารสกัดถั่วเหลือง (Derived properties of soybean extracted powder)

ขั้นตอนที่ 5 การประเมินแคปซูลสารสกัดถั่วเหลือง

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องบดแห้ง
2. Aluminium foil
3. ถาด Aluminium
4. Water bath
5. ตู้อบ
6. โกร่งกระเบื้อง
7. แร่งเบอร์ 40
8. Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL และขนาด 500 mL
9. เครื่องเขย่า
10. Funnel
11. Petri dish
12. ไม้บรรทัด
13. เครื่อง Suction
14. กระดาษกรองเบอร์ 42
15. Beaker
16. เครื่องเคาะผงยา Venkel®
17. กระบวกตวงขนาด 100 mL
18. เครื่อง Disintegration test Erweka® รุ่น ZT52
19. Thermometer
20. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
21. ถุงมือ
22. กระจกนาฬิกา

สารเคมี

1. ถั่วเหลือง
2. แคปซูลชนิดเจลาตินเปลือกแข็ง
3. Hexane
4. Purified talcum
5. 70% ethanol
6. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น
7. กรดอะซิติก
8. น้ำกลั่น

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดสาร genistein จากถั่วเหลือง

การศึกษาในส่วนนี้เป็นการศึกษาเพื่อที่จะหากรดที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลืองเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งในงานวิจัยนำร่องได้ใช้ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเป็นกรดที่มีความเป็นพิษสูง อาจจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ หากมีการตกค้างของกรดดังกล่าวเหลืออยู่ ดังนั้นการศึกษาในส่วนนี้จึงต้องการศึกษาหาตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลืองและสามารถใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วิธีทดลอง

1. ชั่งถั่วเหลืองที่บดแห้ง 100 g ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 mL
2. เติม Stock solution ปริมาตร 250 mL ซึ่งประกอบด้วย 70% ethanol 35 ส่วน และตัวเร่งปฏิกิริยาที่ศึกษา (กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น หรือ 2 N กรดอะซิติก) 4 ส่วน
3. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าโดยใช้อุณหภูมิที่ 70 $^{\circ}$C ความเร็วรอบที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
4. เมื่อเขย่าเสร็จและเย็นแล้ว กรองให้ได้สารละลายใส
5. นำสารละลายใสที่กรองได้บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทป้องกันแสงและเก็บในตู้เย็นเพื่อรอในการนำไปทดสอบหาปริมาณ genistein ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป
6. เปรียบเทียบผลการสกัดสารจากถั่วเหลืองที่ได้ระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยา กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น กับ 2 N กรดอะซิติก โดยใช้เทคนิค HPLC

HPLC Condition

HPLC column: Water symmetry RP C18, 5 µm, 3.90 x 150 mm
Mobile phase: 0.1% Phosphoric acid Solution, Acetonitrile
Flow rate: 1 mL/min
Injection volume: 20 µL
Detection wavelength: 255 nm
Running time: 65 minute

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดสาร genistein จากถั่วเหลือง

หลังจากที่ได้ชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมจากการศึกษาในขั้นตอนที่ 1 แล้ว การศึกษาในส่วนนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสกัดของตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะมีการเปรียบเทียบปริมาณ genistein จากการสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ของตัวเร่งปฏิกิริยาที่เลือกใช้เพื่อหาความเข้มข้นที่จะทำให้ได้ปริมาณ genistein ที่มากที่สุดและเหมาะในการสกัดในระดับอุตสาหกรรม

วิธีทดลอง

1. ชั่งถั่วเหลืองที่บดแห้ง 100 g ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 mL
2. เติมตัวเร่งปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นต่างๆ (2 N, 5 N และ 10 N กรดอะซิติก) โดยทำศึกษาความเข้มข้นละ 3 ครั้งโดยจะสกัดซ้ำ 3 รอบ การสกัดรอบที่ 1 ใช้ stock solution ปริมาตร 250 mL รอบที่ 2 และ 3 ใช้ stock solution ปริมาตร 150 mL ตามลำดับ
3. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าโดยใช้อุณหภูมิที่ 70 $^{\circ}$C ความเร็วรอบที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
4. นำขวดที่เขย่าเสร็จและเย็นแล้ว กรองให้ได้สารละลายใส
5. นำสารละลายที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ genistein ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

HPLC Condition

HPLC column: Water symmetry RP C18, 5 µm, 3.90 x 150 mm
Mobile phase: 0.1% Phosphoric acid Solution, Acetonitrile
Flow rate: 1 mL/min
Injection volume: 20 µL
Detection wavelength: 255 nm
Running time: 65 minute

6. เปรียบเทียบปริมาณ genistein ที่ได้จากการสกัดสารจากถั่วเหลืองระหว่างความเข้มข้นต่างๆ ของตัวเร่งปฏิกิริยาที่ศึกษา

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาหากระบวนการที่เหมาะสมในเตรียมสารจากถั่วเหลือง

การศึกษาในส่วนนี้เป็นการศึกษาเพื่อให้กระบวนที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลืองได้จริงในการผลิตระดับอุตสาหกรรม โดยการศึกษาจะใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการศึกษาในขั้นตอนที่ 2 ซึ่งกระบวนการทั้งหมดที่จะทำให้ได้มาซึ่งผงสารสกัดถั่วเหลืองนั้น ประกอบไปด้วย

1. ขั้นตอนการสกัดถั่วเหลือง โดยใช้ 70% ethanol เป็นตัวละลายและอาศัย 5 N กรดอะซิติก เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสาร genistein อันได้มาจากได้จากการทดลองขั้นตอนที่ 2) เขย่าที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการสกัดซ้ำ 3 รอบ แล้วนำไปกรองเอาสารละลายใส

2. ขั้นตอนการระเหยตัวทำลาย โดยนำสารละลายใสที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออก โดยอังบน Water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. ขั้นตอนการละลายไขมันที่หลงเหลือในสารสกัด โดยอาศัย Hexane เป็นตัวละลายไขมัน แล้วทำการระเหย Hexane โดยอังบน Water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ขั้นตอนการขจัดความชื้นในสารสกัดโดยใช้สารดูดซับความชื้น โดยขั้นตอนนี้จะทำการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารดูดซับ ต่อ สารสกัดหนึ่งส่วน ซึ่งพิจารณาเลือก Purified talcum เป็นสารดูดซับ เนื่องจากเป็นสารมีคุณสมบัติของอนุภาคที่มีความพรุนสูง มีความสามารถดูดซับความชื้นได้ดี และมีความปลอดภัยในการใช้รับประทาน ทดสอบในอัตราส่วนสารดูดซับต่อสารสกัดเท่ากับ 1:1 1:2 และ 1:3 หลังจากนั้นนำมาผ่านแร่งเบอร์ 40 แล้วนำไปอบแห้ง จะได้ผงสารสกัดถั่วเหลือง

วิธีทดลอง

1. จากสารละลายใสที่กรองได้ในการทดลองที่ 2 นำมาระเหยตัวทำละลายออก โดยอังบน Water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้สารสกัดที่มีลักษณะเหนียวข้นค่อนข้างเป็นมันคล้ายกับมีไขมันหลงเหลืออยู่
2. ทำการละลายไขมันที่เหลือโดยอาศัย Hexane เป็นตัวทำละลาย แล้วทำการระเหย Hexane โดยอังบน Water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารสกัดที่มีลักษณะค่อนข้างเหนียวแต่มีความมันลดลงจากเดิม
3. บดผสม Purified talcum ซึ่งเป็นสารดูดซับ ให้เข้ากับสารสกัดในอัตราส่วน1:1 1:2 และ 1:3 เพื่อหาอัตราส่วนที่พอเหมาะ ที่ทำให้เกิดส่วนผสมที่มีลักษณะเป็น dump mass เพื่อให้สามารถนำไปผ่านกระบวนการแร่งต่อไป
4. นำส่วนผสมที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
5. นำส่วนผสมที่อบแห้งแล้วมาผ่านแร่ง เบอร์ 40 จะได้ผงสารสกัดถั่วเหลือง
6. บรรจุผงสารสกัดถั่วเหลืองในภาชนะที่ปิดสนิท เพื่อรอการทดสอบคุณสมบัติของผงสารสกัด และนำไปบรรจุแคปซูลต่อไป

ขั้นตอนที่ 4 การศึกษาคุณสมบัติของผงสารสกัดถั่วเหลือง (Derived properties of soybean extracted powder)

1. การศึกษาคุณสมบัติในการไหล

คุณสมบัติในการไหล (Flow property) มีความสำคัญอย่างมากในทางเภสัชกรรม เมื่อเทผงยาลงบนพื้นจะมีการกองของผงยาขึ้นซึ่งจะมีมุมระหว่างผิวเอียงของกองผงยากับแนวราบที่มีค่าคงที่ มุมนี้เรียกว่า angle of repose ค่าของมุมนี้ขึ้นกับความเสียดทานซึ่งกันและกันระหว่างผิวอนุภาค หากผงยามี angle of repose สูง บอกถึงว่าแรงเสียดทานมีค่ามาก ดังนั้นการไหลจะไม่ดี ค่า angle of repose ส่วนมากอยู่ที่ 34-48 องศา

วิธีทดลอง

ค่อยๆ เทผงยาผ่านกรวยกรองลงใน Petri dish จนขอบของผงยาสัมผัสกับเส้นรอบวงของ Petri dish จากนั้นจึงวัดความสูงของผงยาและรัศมีของ Petri dish แล้วคำนวณหา angle of repose ตามสูตรดังนี้

$$\text{Angle of repose} = \tan^{-1}(h/r)$$

เมื่อ h = ความสูงของกองผงยา

r = รัศมีของกองผงยา

2. การศึกษาความหนาแน่นของผงสารสกัดถั่วเหลือง

ทำการศึกษาความหนาแน่นของสารสกัดถั่วเหลืองใน 3 ลักษณะ คือ True density, Bulk density และ Tapped density

วิธีทดลอง

การหา Bulk density

1. ชั่งผงยามา 10 g ใส่กระบอกตวงแห้งขนาด 100 mL
2. เคาะกระบอกตวง 3 ครั้ง โดยยกกระบอกตวงสูงจากพื้น 1 นิ้วแล้วปล่อยลงพื้นโต๊ะ
3. อ่านค่าที่ได้เป็นมิลลิลิตรแล้วคำนวณหาค่า Bulk density (m/v) ทำซ้ำ 3 ครั้งหา Bulk density เป็นค่าเฉลี่ย

การหา Tapped density

1. ชั่งผงยามา 10 g ใส่กระบอกตวงแห้งขนาด 100 mL
2. เคาะ 500 ครั้งด้วยเครื่องเคาะ Tapped density
3. อ่านค่าที่ได้เป็นมิลลิลิตรแล้วคำนวณหาค่า Tapped density (m/v) ทำซ้ำ 3 ครั้งหา Tapped density เป็นค่าเฉลี่ย
4. หา % Compressibility จากสูตร

$$\% \text{ Compressibility} = \frac{\text{tapped density} - \text{bulk density}}{\text{tapped density}}$$

การหา True density

1. ชั่งน้ำหนักเปล่าของ Pycnometer
2. เติม Acetone ลงไปจนเต็ม ชั่งอีกครั้งเพื่อหาน้ำหนัก Acetone ใน Pycnometer
3. เท Acetone ออกแล้วทำความสะอาด Pycnometer จนแห้งสนิท
4. ชั่งน้ำหนักผงยามา 0.5 g ใส่ลงใน Pycnometer
5. ใส่ Acetone ลงไปพอประมาณ เขย่าเบาๆ แล้วเติม Acetone จนเต็ม
6. นำ Pycnometer ไปชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณตามสูตร และทำซ้ำ 3 ครั้งหาค่าเฉลี่ย หน่วยเป็น g/mL

$$P = W2 \times W3 / 10 (W2 - W4 + W3)$$

โดย P = True density
W2 = Solvent weight in Pycnometer
W3 = Sample weight
W4 = Granule - Solvent mixture weight in Pycnometer

3. การศึกษาลักษณะภายนอก

การศึกษาลักษณะภายนอกจะอาศัยประสาทสัมผัสทั้งห้า คือ รูป รส กลิ่น เสียง และสัมผัส เป็นวิธีที่จะบอกลักษณะของผงสมุนไพรได้อย่างคร่าวๆ แบ่งการตรวจสอบเป็นรูปร่างและขนาด สี และลักษณะอื่นๆ ที่สังเกตได้ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบด้วยการสังเกตรูปร่าง ขนาดผงสมุนไพร สี ดมกลิ่นและชิมรสชาติของผงสารสกัดถั่วเหลือง

ขั้นตอนที่ 5 การประเมินแคปซูลสารสกัดถั่วเหลือง

1. การศึกษาลักษณะภายนอกของแคปซูล

วิธีทดลอง

1. นำแคปซูลที่ผ่านการบรรจุสารแล้วมาแยกเป็นแคปซูลของแต่ละตำรับลงใน beaker
2. ทำการประเมินรูปลักษณ์ของแคปซูลโดยการสังเกตซึ่งมีเกณฑ์ดังนี้

   \+ คือ ไม่ดี ++ คือ ปานกลาง +++ คือ ดี

2. การทดสอบระยะเวลาในการแตกตัว (Disintegration)

วิธีทดลอง

1. เติมน้ำกลั่นใน beaker ที่ใช้เฉพาะกับเครื่อง Disintegration test Erweka® รุ่น ZT52 ขนาด 1 L
2. ตั้งอุณหภูมิน้ำกลั่นให้อยู่ที่ 37°C
3. นำแคปซูลที่ต้องการทดสอบจำนวน 6 แคปซูลใส่ลงใน basket rack ช่องละ 1 แคปซูล โดยใส่ Disk ลงไปด้วยเพื่อป้องกันการลอยตัวของแคปซูล
4. เริ่มการทำงานของเครื่องสังเกตการแตกตัวของแคปซูล
5. บันทึกเวลาที่แคปซูลแตกตัวหมด

การประเมินผล

ตามเกณฑ์ของ USP 25 กำหนดไว้ว่าแคปซูลที่เตรียมได้ต้องเข้ามาตรฐานการแตกตัวของอนุภาคสารสำคัญ การทดสอบโดยนำ 6 แคปซูลมาทดสอบการแตกตัวด้วยเครื่อง Basket-rack assembly 6 glass tubesใช้ disintegration medium เป็นน้ำกลั่น อัตราการเคลื่อนที่ขึ้นลงของ basket 29-32 cycle/min ระยะทาง 5.3-5.7 cm อุณหภูมิ 37°C basket เคลื่อนที่ 2.5 cm จากบน-ล่าง สารสำคัญต้องมีการแตกตัวออกมาจากแคปซูลทั้ง 6 แคปซูลและต้องไม่มีสารสำคัญค้างบน basket ยกเว้นเปลือกแคปซูลเท่านั้นจึงถือว่า ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ถ้า 1-2 แคปซูลแตกตัวไม่สมบูรณ์ให้ทำเพิ่มอีก 12 แคปซูล และไม่น้อยกว่า 16 ใน 18 แคปซูลที่แตกตัวอย่างสมบูรณ์จึงจะถือว่าผ่านการประเมิน

3. การประเมินความแปรปรวนของน้ำหนักแคปซูล (Weight variation)

วิธีทดลอง

1. ชั่งแคปซูลที่บรรจุผงยาที่ละ 1 แคปซูล จำนวน 20 แคปซูล
2. หาค่าเฉลี่ยและความเบี่ยงเบน

การประเมินผล

ตามวิธีการทดสอบโดยยึดเกณฑ์มาตรฐาน BP ทำได้โดย สุ่มแคปซูล 20 แคปซูลมาจากแคปซูลทั้งหมด แล้วนำแคปซูลชั่งน้ำหนักทีละเม็ดจนครบ แล้วหาค่าเฉลี่ย ผลที่ได้ต้องมีไม่เกิน 2 แคปซูลที่น้ำหนักผิดไปจากค่าที่กำหนด (target weight) ต้องมีไม่เกิน 2 แคปซูลที่มีน้ำหนักเกินค่าเบี่ยงเบนที่กำหนดและต้องไม่มีเม็ดใดเลยที่มีน้ำหนักเกิน 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนที่กำหนด

บทที่ 4
ผลการทดลอง (Results)

การศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีเตรียมสารสกัดจากถั่วเหลือง เพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) มุ่งเน้นให้สามารถนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มารับประทานได้อย่างปลอดภัยและพัฒนาใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการพัฒนาวิธีการเตรียมสารสกัดจากถั่วเหลือง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ขั้นตอน และนำเสนอผลการวิจัยตามลำดับขั้นตอนการวิจัย ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ผลการศึกษาชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อการสกัดสาร genistein จากถั่วเหลือง

การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาชนิดของตังเร่งปฏิกิริยาที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่ได้จากการสกัดสารจากถั่วเหลือง ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยาที่ศึกษามี 2 ชนิด คือ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นและ 2 N กรดอะซิติก ผลการวิจัยพบว่า การใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจะให้สารสกัดที่มีลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ (รูปที่ 2) โดยสารสกัดที่ได้จากการสกัดจะมีลักษณะเหนียวข้นคล้ายวุ้น สีดำเข้มและไม่สามารถกรองผ่านกระดาษกรองได้ และนอกจากนี้ยังพบว่าในสารสกัดที่ได้ยังหลงเหลือสภาพความเป็นกรดค่อนข้างสูงอีกด้วย ส่วนสารสกัดที่ได้จากกรดอะซิติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะพบว่า สารสกัดที่ได้มีลักษณะที่พึงประสงค์ (รูปที่ 3) คือมีลักษณะสารละลายเป็นของเหลวขุ่น สีเหลือง อีกทั้งยังสามารถกรองผ่านกระดาษกรอง เพื่อนำไปทำการผลิตในกระบวนการต่อไปได้

รูปที่ 2 ลักษณะสารสกัดที่ได้จากการใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลือง

รูปที่ 3 ลักษณะสารสกัดที่ได้จากการใช้ 2 N กรดอะซิติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลือง

ขั้นตอนที่ 2 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อการสกัดสารจากถั่วเหลือง

จากผลการทดลองจากการศึกษาในขั้นตอนที่ 1 จึงเลือกใช้กรดอะซิติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลือง ซึ่งการศึกษาในตอนที่ 2 จะทำการเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญที่ได้จากการใช้กรดอะซิติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ 3 ความเข้มข้น คือ 2 5 และ 10 N โดยตรวจหาปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 1 2 3 และ 4

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสำคัญที่ได้จากการสกัดถั่วเหลืองด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 2 N จากการตรวจหาด้วยเครื่อง HPLC

ความเข้มข้น (N)	สกัดครั้งที่	flask ที่	run ที่	Amplitude	Genistein ในสารสกัด 20 µL	ปริมาณ Genistein ในถั่วเหลือง 100 g
2	1	1	1	1.56495	56.99	4.5600
2	1	1	2	1.52555	55.56	4.4450
2	1	1	3	1.54127	56.13	4.4900
2	1	2	1	1.54190	56.15	4.4925
2	1	2	2	1.57111	57.21	4.5775
2	1	2	3	1.49183	54.33	4.3475
2	2	1	1	0.91043	33.19	1.5930
2	2	1	2	0.92744	33.27	1.5975
2	2	1	3	0.91681	33.42	1.6035
2	2	2	1	0.80429	29.33	1.4085
2	2	2	2	0.90021	32.82	1.5750
2	2	2	3	0.81634	29.77	1.4295
2	3	1	1	0.37847	13.85	0.6645
2	3	1	2	0.44632	16.31	0.7830
2	3	1	3	0.46544	17.01	0.8160
2	3	2	1	0.50277	18.37	0.8820
2	3	2	2	0.53887	19.68	0.9450
2	3	2	3	0.53639	19.59	0.9405

ตารางที่ 2 ปริมาณสารสำคัญที่ได้จากการสกัดถั่วเหลืองด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 5 N จากการตรวจหาด้วยเครื่อง HPLC

ความเข้มข้น (N)	สกัดครั้งที่	flask ที่	run ที่	Amplitude	Genistein ในสารสกัด 20 µL	ปริมาณ Genistein ในถั่วเหลือง 100 g
5	1	1	1	1.57338	57.30	4.5850
5	1	1	2	1.59024	57.91	4.6325
5	1	1	3	1.55806	56.74	4.5400
5	1	2	1	1.69915	61.87	4.9500
5	1	2	2	1.70548	62.85	5.0275
5	1	2	3	1.68935	61.51	4.9200
5	2	1	1	0.84973	30.98	1.4865
5	2	1	2	0.89490	32.63	1.5660
5	2	1	3	0.91504	33.36	1.6020
5	2	2	1	0.88482	32.26	1.5480
5	2	2	2	0.92693	33.79	1.6215
5	2	2	3	0.93761	34.18	1.6395
5	3	1	1	0.50024	18.27	0.8775
5	3	1	2	0.53313	19.47	0.9345
5	3	1	3	0.51325	18.75	0.9000
5	3	2	1	0.80739	29.44	1.4130
5	3	2	2	0.81449	29.70	1.4250
5	3	2	3	0.85582	31.20	1.4970

ตารางที่ 3 ปริมาณสารสำคัญที่ได้จากการสกัดถั่วเหลืองด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 N จากการตรวจหาด้วยเครื่อง HPLC

ความเข้มข้น (N)	สกัดครั้งที่	flask ที่	run ที่	Amplitude	Genistein ในสารสกัด 20 µL	ปริมาณ Genistein ในถั่วเหลือง 100 g
10	1	1	1	1.24513	45.36	3.6300
10	1	1	2	1.26235	45.97	3.6775
10	1	1	3	1.36362	49.67	3.9225
10	1	2	1	1.33136	48.50	3.8800
10	1	2	2	1.46385	53.31	4.2650
10	1	2	3	1.53905	56.05	4.4850
10	2	1	1	0.79006	28.81	1.3830
10	2	1	2	0.90463	32.98	1.5825
10	2	1	3	0.89940	32.79	1.5735
10	2	2	1	0.97594	35.57	1.7070
10	2	2	2	1.07086	39.02	1.8735
10	2	2	3	1.08355	39.49	1.8960
10	3	1	1	0.55913	20.42	0.9795
10	3	1	2	0.55869	20.40	0.9795
10	3	1	3	0.56641	20.68	0.9930
10	3	2	1	0.73144	26.77	1.2855
10	3	2	2	0.74349	27.12	1.3020
10	3	2	3	0.74136	27.04	1.2975

ตารางที่ 4 ปริมาณสารสำคัญที่ได้จากการสกัดถั่วเหลืองด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 2 N 5 N และ10 N

ความเข้มข้นของ กรดอะซิติก	สกัดครั้งที่	ปริมาณ Genistein (mg) ต่อถั่วเหลือง 1 g
2N	1	44.854
	1+2	60.199
	1+2+3	**67.009**
5N	1	47.775
	1+2	63.577
	1+2+3	**75.322**
10N	1	39.767
	1+2	56.460
	1+2+3	**67.855**

ขั้นตอนที่ 3 ผลการศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการสกัดสาร genistein จากถั่วเหลือง

ในขั้นตอนการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลือง จะพบว่า สารสกัดที่ได้หลังจากนำไประเหย Hexane ออกแล้ว มีลักษณะที่เหนียวข้น ดังนั้นเพื่อให้ได้เป็นผงแห้งของสารสกัดถั่วเหลือง จึงได้นำสารสกัดที่ได้มาผสมกับสารดูดซับ คือ Purified talcum ในสัดส่วนต่างๆ เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสม ผลที่ได้เป็นดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ Purified talcum ต่อสารสกัดถั่วเหลือง

Purified talcum : สารสกัดถั่วเหลือง	ลักษณะของส่วนผสมที่ได้
1 : 1	จับเป็นก้อนเหนียว คล้ายกับยังดูดซับสารไม่หมด
2 : 1	ได้ผงที่มีลักษณะเป็น dump mass
3 : 1	ได้ผงร่วนและเหลือปริมาณ talcum อยู่มาก

ขั้นตอนที่ 4 ผลการศึกษาคุณสมบัติของผงสารสกัดถั่วเหลือง (Derived properties of powder)

หลังจากได้ผงสารสกัดจากถั่วเหลืองแล้ว ผู้วิจัยได้มีการนำมาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของผงสารสกัดถั่วเหลืองในด้านต่างๆ ซึ่งได้ผลการวิจัยเป็นดังนี้

1. ผลการศึกษาลักษณะภายนอกของผงสารสกัดถั่วเหลือง

ผลการสกัดสารจากถั่วเหลืองด้วยวิธี Percolation จะได้ผงสารสกัดที่มีลักษณะเป็นผงเนื้อละเอียดสีเหลืองนวล ขนาดเฉลี่ยประมาณ 425 ไมโครเมตรมีกลิ่นคล้ายกรดหลงเหลืออยู่ ดังรูปที่ 4

รูปที่ 4 ลักษณะผงสารสกัดจากถั่วเหลือง

2. ผลการศึกษาคุณสมบัติในการไหลของผงสารสกัดถั่วเหลือง

ผลการศึกษาคุณสมบัติการไหลของผงสารสกัดถั่วเหลือง โดยทำการศึกษา 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย พบว่า ผงสารสกัดถั่วเหลืองมีการไหลที่ดี โดยมีค่า Angle of repose เฉลี่ยเท่ากับ 30.00 องศา ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาคุณสมบัติในการไหล

	ครั้งที่			เฉลี่ย
	1	2	3	
ความสูงของกองผงสารสกัดถั่วเหลือง (cm)	2.80	2.75	2.85	2.80
รัศมีของกองผงสารสกัดถั่วเหลือง (cm)	4.85	4.85	4.85	4.85
Angle of repose (°)	30.00	29.55	30.44	**30.00**

3. ผลการศึกษาความหนาแน่นของผงสารสกัดถั่วเหลือง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความหนาแน่นของผงสารสกัดถั่วเหลืองใน 3 ลักษณะ คือ Bulk density Tapped density และ True density ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในแต่ละลักษณะ พบว่า ผงสารสกัดถั่วเหลืองที่ได้ มีค่าเฉลี่ยของ Bulk density, Tapped density และ True density เป็น 0.973, 1.208 และ 2.387 g/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 7 และ 8

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาความหนาแน่นของผงสารสกัดถั่วเหลืองแบบ Bulk density

	ครั้งที่			เฉลี่ย
	1	2	3	
น้ำหนักของผงสารสกัดถั่วเหลือง (g)	40.184	40.293	40.219	40.232
Bulk volumn (mL)	41.000	41.500	41.500	41.333
Bulk density (g/mL)	0.980	0.970	0.969	**0.973**

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาความหนาแน่นของผงสารสกัดถั่วเหลืองแบบ Tapped density

	ครั้งที่			เฉลี่ย
	1	2	3	
น้ำหนักของผงสารสกัดถั่วเหลือง (g)	40.233	40.356	40.250	40.280
Tapped volumn (mL)	33.000	33.500	33.500	33.333
Tapped density (g/mL)	1.219	1.205	1.201	**1.208**

ตารางที่ 9 ผลการศึกษาความหนาแน่นของผสารสกัดถั่วเหลืองแบบ True density

	ครั้งที่			เฉลี่ย
	1	2	3	
น้ำหนักเปล่าของ pycnometer (g)	11.475	11.463	11.450	11.463
น้ำหนักของ acetone + pycnometer (g)	20.117	20.185	20.156	20.153
น้ำหนักของ acetone + pycnometer + ผงสารสกัดถั่วเหลือง (g)	20.480	20.451	20.481	20.471
น้ำหนัก acetone (g)	8.642	8.722	8.706	8.690
น้ำหนัก acetone + ผงสารสกัดถั่วเหลือง (g)	9.005	8.988	9.031	9.008
ความหนาแน่น (g/mL)*	3.154	1.864	2.487	**2.387**

หมายเหตุ * คำนวณจากสูตร P = (W2 x W3) / 10 (W2 –W4+W3)

เมื่อ P = True density

W2 = Solvent weight in pycnometer

W3 = sample weight

W4 = Granule – solvent mixture weight in pycnometer

ขั้นตอนที่ 5 ผลการประเมินแคปซูลสารสกัดถั่วเหลือง

หลังจากได้ผงสารสกัดถั่วเหลืองแล้ว ทำการบรรจุผงสารสกัดถั่วเหลืองในแคปซูลใน 2 ขนาด คือ 150 และ 200 มิลลิกรัม โดยใช้ Lactose เป็นสารเพิ่มปริมาณ ทำการบรรจุแคปซูลด้วยเครื่อง Semiautomatic capsule filling หลังจากนั้นได้ทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของแคปซูลที่เตรียมได้ในด้านต่างๆ ผลการวิจัยเป็นดังนี้

1. ผลการศึกษาลักษณะภายนอกของแคปซูลสารสกัดถั่วเหลือง

การวิจัยนี้ได้ทำการประเมินคุณลักษณะภายนอกของแคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองทั้ง 2 ตำรับ ผลการวิจัยพบว่า แคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองที่ได้มีลักษณะภายนอกที่ดี (ตารางที่ 10) คือ ผิวแคปซูลเรียบเนียน ไม่บุ๋ม ไม่มีรอยปริแตกของเปลือกแคปซูล ทั้ง 2 ตำรับ ดังแสดงในรูปที่ 5

รูปที่ 5 ลักษณะแคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองที่เตรียมได้ขนาด 150 (แคปซูลเปลือกใส) และ 200 มิลลิกรัม (แคปซูลเปลือกสีเหลือง-ดำ)

ตารางที่ 10 ลักษณะแคปซูลของสารสกัดถั่วเหลืองทั้ง 2 ตำรับ

ตำรับ	ลักษณะของแคปซูลที่ได้
แคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองขนาด 150 มิลลิกรัม	+++
แคปซูลสารสกัดถั่วเหลือง 200 มิลลิกรัม	+++

หมายเหตุ เกณฑ์การประเมินรูปลักษณ์ของแคปซูลโดยการสังเกตมีดังนี้
\+ คือ ไม่ดี ++ คือ ปานกลาง +++ คือ ดี

2. ผลการทดสอบระยะเวลาในการแตกตัว (Disintegration)

จากการทดสอบแคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองเกี่ยวกับระยะเวลาในการแตกตัวของแคปซูล โดยทดสอบครั้งละ 6 แคปซูล ตามมาตรฐาน USP 25/NF 20 พบว่า แคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองทั้ง 2 ตำรับ มีระยะเวลาในการแตกตัวที่สมบูรณ์ตรงตามมาตรฐานการแตกตัวของอนุภาคสารสำคัญตามเกณฑ์ของ USP 25/NF 20 โดยแคปซูลทั้ง 6 แคปซูล สามารถแตกตัวได้ภายในเวลา 30 นาที ผลเป็นดังตารางที่ 11 และ 12 ตามลำดับ

ตารางที่ 11 ระยะเวลาในการแตกตัวของแคปซูลสารสกัดถั่วเหลือง ขนาด 150 มิลลิกรัม

แคปซูลที่	ระยะเวลาที่แตกตัวสมบูรณ์ (วินาที)
1	146
2	182
3	198
4	200
5	237
6	242

จากตารางจะเห็นว่า แคปซูลสารสกัดถั่วเหลือง ขนาด 150 มิลลิกรัม มีค่าการแตกตัวสมบูรณ์ภายใน 30 นาที ทั้ง 6 แคปซูลที่ทดสอบ โดยระยะเวลาในการแตกตัวสมบูรณ์เฉลี่ยเป็น 200 วินาที หรือ 3 นาที 20 วินาที (SD เท่ากับ 35.70 วินาที)

ตารางที่ 12 ระยะเวลาในการแตกตัวของแคปซูลสารสกัดถั่วเหลือง ขนาด 200 มิลลิกรัม

แคปซูลที่	ระยะเวลาที่แตกตัวสมบูรณ์ (วินาที)
1	164
2	164
3	200
4	206
5	212
6	241

จากตารางจะเห็นว่าแคปซูลสารสกัดถั่วเหลือง ขนาด 200 มิลลิกรัม มีค่าการแตกตัวสมบูรณ์ภายใน 30 นาที ทั้ง 6 แคปซูลที่ทดสอบ โดยระยะเวลาในการแตกตัวสมบูรณ์เฉลี่ยเป็น 197 วินาที หรือ 3 นาที 17 วินาที (SD เท่ากับ 29.75 วินาที)

3. ผลการประเมินความแปรปรวนของน้ำหนักแคปซูล (Weight variation)

จากการทดสอบแคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองเกี่ยวกับความแปรปรวนของน้ำหนักแคปซูลจะพบว่าแคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองทั้ง 2 ตำรับ มีความแปรปรวนของน้ำหนัก ไม่ผ่านตามมาตรฐานในเภสัชตำรับBP โดยผลที่ได้เป็นดังตารางที่ 13 และ 14 ตามลำดับ

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบ Weight variation ของแคปซูลขนาด 150 มิลลิกรัม

แคปซูลที่	**น้ำหนัก (mg)**	**แคปซูลที่**	**น้ำหนัก (mg)**
1	605	11	605
2	606	12	609
3	603	13	609
4	606	14	610
5	605	15	610
6	605	16	611
7	606	17	611
8	606	18	613
9	605	19	612
10	604	20	612

ค่าน้ำหนักเฉลี่ย 20 แคปซูล คือ 607.53 mg (SD เท่ากับ 3.09)

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบ Weight variation ของแคปซูลขนาด 200 มิลลิกรัม

แคปซูลที่	**น้ำหนัก (mg)**	**แคปซูลที่**	**น้ำหนัก (mg)**
1	589	11	603
2	595	12	604
3	593	13	603
4	594	14	606
5	597	15	607
6	598	16	608
7	597	17	609
8	598	18	610
9	601	19	612
10	600	20	613

ค่าน้ำหนักเฉลี่ย 20 แคปซูล คือ 601.10 mg (SD เท่ากับ 6.59)

หมายเหตุ Target weight ทั้ง 2 ตำรับ เท่ากับ 600 mg ดังนั้น น้ำหนักแคปซูลที่ผ่านมาตรฐานตาม BP จะอยู่ในช่วง 592.5-607.5 mg (600 ± 7.5 mg)

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย (Discussion and Conclusions)

งานวิจัยนี้ได้พัฒนามาจากงานวิจัยนำร่องเกี่ยวกับการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลืองในระดับปฏิบัติการ ซึ่งเป็นการสกัดสาร genistein จากถั่วเหลืองด้วยวิธี Percolation ซึ่งใช้ methanol 35 ส่วน เป็นตัวทำละลาย และใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 ส่วน เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (เขย่า 3 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 80 °C) ผลพบว่า ได้สารสำคัญ genistein บริสุทธิ์ 38.4 mg ต่อถั่วเหลือง 1 g ซึ่งเมื่อพิจารณาขั้นตอนดังกล่าวในขนาดการผลิตที่มากขึ้น อาจจะเกิดปัญหาในหลายประการ ประการแรก การใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย จะเห็นได้ว่า methanol เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง ไม่สามารถรับประทานได้ อีกทั้งในระดับอุตสาหกรรมจะต้องใช้ในปริมาณมาก อาจจะเกิดความพิษจากที่ตกค้างได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เปลี่ยนตัวทำละลายให้เหมาะสมมากขึ้นสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม นั่นคือ ได้เลือกใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายแทน เนื่องจาก มีความมีขั้วที่ใกล้เคียงกัน สามารถรับประทานได้ และราคาถูก ประการที่สอง การใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ซึ่งเป็นกรดแก่ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัด ดังนั้นการนำมาใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมซึ่งจะต้องใช้ในปริมาณมาก จึงทำให้หลงเหลือความกรดได้ค่อนข้างสูง ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ที่นำไปบริโภคได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับกรดอะซิติก ซึ่งเป็นกรดที่สามารถนำมารับประทานได้อย่างปลอดภัยและมีการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังราคาถูก ซึ่งจะช่วยประหยัดต้นทุนที่ใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ ประการที่สาม การสกัดในงานวิจัยนำร่องนั้นจะทำการสกัดเพียง 1 ครั้ง ซึ่งจะต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณที่มากซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองวัตถุดิบหากนำมาเป็นกระบวนการผลิตจริงในระดับอุตสาหกรรม ผู้วิจัยจึงพัฒนาให้เป็นการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งใช้ปริมาณของตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อลดปัญหาดังกล่าว โดยจะสกัดซ้ำ 3 รอบ ซึ่งจะช่วยลดปริมาณตัวทำละลายที่ต้องใช้ในการสกัดลงได้

การศึกษาชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อการสกัดสารจากถั่วเหลือง

การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาชนิดของตังเร่งปฏิกิริยาที่มีผลต่อปริมาณของสารสำคัญที่ได้จากการสกัดสารจากถั่วเหลือง ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยาที่ศึกษาในครั้งนี้มี 2 ชนิด คือ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น และกรดอะซิติก จากผลการวิจัยพบว่า การใช้ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะให้สารสกัดที่มีลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ และยังทำให้หลงเหลือความเป็นพิษค่อนข้างสูงในสารสกัดอีกด้วย โดยสารสกัดที่ได้มีลักษณะเหนียวข้น สีดำเข้มเหมือนไหม้ กลิ่นฉุนกรด ทั้งนี้อาจเกิดจากการใช้ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ซึ่งเป็นกรดแก่ร่วมกับการใช้ความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดในครั้งนี้เป็นผลให้เกิดการสกัดสารอื่นที่นอกเหนือจากสารสำคัญออกมาด้วย เช่น สารที่เกิดจากการเผาไหม้ หรือสลายตัวของโปรตีนในถั่วเหลือง เป็นต้น สารสกัดที่ได้จึงมีลักษณะเป็นวุ้นเหนียวสีดำ ไม่สามารถกรองผ่านกระดาษกรอง จึงไม่สามารถ

ตรวจหาปริมาณสารสำคัญจากถั่วเหลืองด้วยเครื่อง HPLC และไม่สามารถนำไปผลิตต่อในกระบวนการถัดไปได้ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากกรดอะซิติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะพบว่า กรดอะซิติกจะให้สารสกัดที่มีลักษณะที่พึงประสงค์มากกว่า มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองที่สามารถกรองผ่านกระดาษกรองนำไปผลิตตามกระบวนการต่อไปได้ และหลงเหลือความเป็นพิษที่น้อยกว่า อีกทั้งยังสามารถตรวจหาปริมาณสารสำคัญจากการสกัดถั่วเหลืองด้วยเครื่อง HPLC ได้ เมื่อเทียบจากคุณสมบัติของกรดที่ใช้ จะพบว่า กรดอะซิติกมีความเป็นกรดที่แรงน้อยกว่ากรดไฮโดรคลอริก จึงทำให้สารสกัดที่ใช้กรดอะซิติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจึงมีลักษณะที่ดีกว่าและไม่เกิดการไหม้จากกรดขึ้นด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้กรดอะซิติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดครั้งนี้

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อการสกัดสารจากถั่วเหลือง

จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 1 ผู้วิจัยจึงเลือกใช้กรดอะซิติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลือง สำหรับการศึกษาในขั้นตอนที่ 2 นี้ ทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญที่ได้จากการใช้กรดอะซิติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ 3 ความเข้มข้น คือ 2 5 และ 10 N โดยตรวจหาปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งจะเห็นได้ว่า การใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 5 N จะได้ปริมาณสารสำคัญรวมจากการสกัดทั้ง 3 รอบ มากที่สุด คือ จากถั่วเหลืองบดแห้ง 1 g จะได้ genistein เท่ากับ 75.32 mg ส่วนการใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 2 และ 10 N จะได้ปริมาณสารสำคัญรวมจากการสกัดทั้ง 3 รอบเป็น 67.00 mg และ 67.85 mg ตามลำดับ ทั้งนี้จากการสกัดโดยใช้กรดอะซิติกที่ 2 และ 10 N เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งได้ปริมาณ genistein ที่น้อยกว่า อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นมากหรือน้อยเกินไป ทำให้ปริมาณ genistein ที่สกัดได้มีน้อยกว่า นอกจากนี้ จากผลการศึกษาครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นว่ากรดอะซิติกสามารถเพิ่มผลผลิตในการสกัดได้มากกว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริก ดังจะเห็นได้จากผลการใช้กรดอะซิติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไม่ว่าจะเป็นที่ความเข้มข้นที่เท่าใดก็ตาม จะให้ปริมาณ genistein ที่สกัดได้ในปริมาณที่มากกว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (genistein 38.4 mg : ถั่วเหลือง 1 g) ดังนั้นกรดอะซิติกจึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการสกัดครั้งนี้และความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดคือความเข้มข้น 5 N

การศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการสกัดสาร genistein จากถั่วเหลือง

จากกระบวนการสกัดสาร หลังจากได้ระเหย Hexane ซึ่งเป็นสารสกัดไขมันส่วนเกินออกแล้ว พบว่า สารสกัดที่ได้ยังคงมีลักษณะเป็นของเหลวที่หนืดข้นอยู่ ดังนั้นเพื่อให้สารสกัดที่ได้อยู่ในลักษณะผงแห้ง ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้สารดูดซับช่วยเพื่อให้เกิดเป็นผงสารสกัดถั่วเหลืองดังที่ต้องการ โดยสารดูดซับที่เลือกใช้ในครั้งนี้ ได้เลือกใช้ Purified talcum เนื่องจากเป็นสารที่มีความสามารถในการดูดซับค่อนข้างดี สามารถรับประทานได้อย่างปลอดภัย อีกทั้งยังให้ผงสารสกัดที่มีขนาดพอเหมาะและมีการไหลที่ดีอีกด้วย ซึ่งอัตราส่วนที่ใช้ในการดูดซับครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการทดลองใช้ในอัตราส่วน 3 อัตราส่วนเปรียบเทียบผลกัน พบว่า การใช้ Purified talcum ต่อสารสกัดในอัตราส่วน 2 : 1 ให้ส่วนผสมในลักษณะที่ต้องการ คือมีลักษณะเป็น Dump mass ซึ่งเหมาะต่อการในไปผลิตในขั้นตอนต่อไป ส่วนลักษณะของส่วนผสมในอัตราส่วนอื่นๆ จะพบว่า มีลักษณะที่ไม่เหมาะต่อการนำไปผลิตในกระบวนการต่อไป ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากอัตราส่วนดังกล่าวใช้ Purified talcum ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมพอ นั่นคือ ที่อัตราส่วน 1 : 1 ส่วนผสมที่ได้มีลักษณะที่จับเป็นก้อนเหนียวซึ่งเป็นลักษณะที่ Purified talcum ยังดูดซับสารไม่เพียงพอ ส่วนที่อัตราส่วน 3 : 1 ส่วนผสมที่ได้มีลักษณะเป็นผงที่แห้งเกินไปและมี Purified talcum หลงเหลืออยู่ค่อนข้างมากดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปผลิตในขั้นต่อไป

การศึกษาคุณสมบัติของผงสารสกัดถั่วเหลือง (Derived properties of powder)

หลังจากได้ผงสารสกัดจากถั่วเหลืองแล้ว ผู้วิจัยได้นำมาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพทั้งการประเมินลักษณะภายนอกของผงสารสกัดที่ได้ การหาความหนาแน่นใน 3 ลักษณะ คือ Bulk density Tapped density และ True density การหาคุณสมบัติในการไหลของผงสารสกัดถั่วเหลือง ซึ่งจากผลการประเมินลักษณะภายนอกของผงสารสกัดถั่วเหลืองที่ได้ พบว่า มีลักษณะเป็นผงเนื้อละเอียด สีเหลืองนวล ขนาดเฉลี่ยประมาณ 425 ไมโครเมตร มีกลิ่นคล้ายกรดหลงเหลืออยู่ หลังจากนั้นได้ตรวจสอบคุณสมบัติด้านการไหลของผงสารสกัดจากถั่วเหลืองจะพบว่ามีการไหลที่ดี คือมี ค่า angle of repose เฉลี่ยเท่ากับ 30.00° ซึ่งเป็นผลมาจากขั้นตอนการผลิตผงสารสกัดที่มีการนำ Purified talcum มาเป็นสารดูดซับประกอบกับได้มีการบดผสมและแร่งทั้งเปียกและแห้ง ก่อนนำไปอบแห้ง ทำให้ได้ขนาดอนุภาคผงมีขนาดใกล้เคียงกันและพอเหมาะ ซึ่งมีผลทำให้มีการไหลที่ดีตามมาด้วย ส่วนคุณสมบัติในด้านความหนาแน่นของผงสารสกัดจากถั่วเหลืองจะพบว่า Bulk density มีค่าเท่ากับ 0.973 g/mL Tapped density มีค่าเท่ากับ 1.208 g/mL และ True density มีค่าเท่ากับ 2.387 g/mL

การประเมินแคปซูลสารสกัดถั่วเหลือง

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการบรรจุผงสารสกัดถั่วเหลืองในแคปซูล 2 ขนาด คือ 150 และ 200 มิลลิกรัม หลังจากนั้นได้ทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของแคปซูลที่เตรียมได้ในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น ลักษณะภายนอกของแคปซูล ความแปรปรวนของน้ำหนักแคปซูล (Weight variation) ระยะเวลาในการแตกตัว (Disintegration) ซึ่งจากผลการศึกษาลักษณะภายนอกของแคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองทั้ง 2 ตำรับ พบว่า แคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองที่ได้มีลักษณะภายนอกที่ดี คือ ผิวแคปซูลเรียบเนียน ไม่บุ๋ม ไม่มีรอยปริแตกของเปลือกแคปซูล ผลการทดสอบระยะเวลาในการแตกตัว (Disintegration) ของแคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองทั้ง 2 ตำรับพบว่า มีการแตกตัวสมบูรณ์ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานการแตกตัวของอนุภาคสารสำคัญของ USP 25/NF 20 โดยแคปซูลทั้ง 6 แคปซูล สามารถแตกตัวได้ภายในเวลา 30 นาที ทั้ง 2 ตำรับ ส่วนผลการประเมินความแปรปรวนของน้ำหนักแคปซูล (Weight variation) พบว่า แคปซูลสารสกัดถั่วเหลืองทั้ง 2 ตำรับ มีความแปรปรวนของน้ำหนักไม่ผ่านตามมาตรฐานในเภสัชตำรับ BP ทั้งนี้ถึงแม้ว่าความสามารถในการไหลของผงสารสกัดจะอยู่ในเกณฑ์ที่ดี แต่อาจเนื่องมาจากขั้นตอนในการบรรจุผงสารสกัดลงในแคปซูลเป็นการบรรจุแบบกึ่งอัตโนมัติ แรงเกลี่ยและแรงอัดผงสารสกัดที่ไม่สม่ำเสมอกันก็อาจทำให้เกิดความแปรปรวนของน้ำหนักแคปซูลที่เตรียมได้ นอกจากนี้อาจมีสาเหตุมาจากการดูดความชื้นของผงสารสกัดถั่วเหลืองที่ทำให้ความสามารถในการไหลขณะบรรจุลงในแคปซูลเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลต่อความแปรปรวนของน้ำหนักที่ได้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อการสกัดสาร genistein จากถั่วเหลือง พบว่า กรดอะซิติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลืองในระดับอุตสาหกรรมและที่ 5 N เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถให้สารสกัด genistein ปริมาณที่มากที่สุด คือ 75 g ต่อถั่วเหลือง 1 g โดยในกระบวนการสกัดจะพบว่า สารสกัดที่ได้หลังจากระเหย Hexane ออกแล้วมีลักษณะที่ข้นหนืด ดังนั้นจึงมีการใช้สารดูดซับช่วยในการทำให้สารสกัดที่ต้องการอยู่ในลักษณะผงแห้ง ซึ่งสารดูดซับที่เลือกมาใช้คือ Purified talcum อัตราส่วนของ Purified talcum ต่อสารสกัดถั่วเหลือง พบว่า ที่อัตราส่วน 2 : 1 จะให้ส่วนผสมในลักษณะเหมาะสมต่อการผลิตเพื่อให้ได้ผงสารสกัดถั่วเหลือง นอกจากการใช้ Purified talcum ในขั้นตอนการดูดซับสารสกัดแล้ว อาจจะเลือกสารดูดซับชนิดอื่นมาศึกษาเปรียบเทียบด้วย เช่น Starch เนื่องจากเป็นสารดูดซับที่มีคุณสมบัติในการดูดซับที่ดีและยังสามารถรับประทานได้อย่างปลอดภัย เช่นเดียวกัน โดยผงสารสกัดถั่วเหลืองที่ได้หลังจากใช้ Purified talcum ดูดซับแล้ว พบว่า มีลักษณะเป็นผงเนื้อละเอียด สีเหลืองนวล ขนาดผงเฉลี่ยประมาณ 425 ไมโครเมตร มีกลิ่นฉุนคล้ายกรด มีคุณสมบัติการไหลอยู่ในเกณฑ์ที่ดี มี Bulk density เท่ากับ 0.973 g/mL Tapped density เท่ากับ 1.208 g/mL และ True densityเท่ากับ 2.387 g/mL หลังจากนั้นนำผงสารสกัดที่ได้ไปบรรจุแคปซูล จะได้แคปซูลผงสารสกัดถั่วเหลืองที่ได้มีลักษณะภายนอกที่ดี คือ ผิวเรียบ ไม่บุ๋ม ไม่มีรอย ทั้ง

2 ตำรับ (150 mg และ 200 mg) มีระยะเวลาในการแตกตัวที่สมบูรณ์ตรงตามมาตรฐานเกณฑ์ของ USP 25/NF 20 แต่พบว่าทั้ง 2 ตำรับ มีความแปรปรวนของน้ำหนักไม่ผ่านตามมาตรฐาน BP

เนื่องด้วยกระบวนการสกัดที่ได้ในงานวิจัยนำร่อง ไม่สามารถนำมาประยุกต์ในการสกัดสารเพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้ ทำให้งานวิจัยนี้จำเป็นต้องปรับกระบวนการใหม่ทั้งหมด ให้มีความเหมาะสมทั้งในการนำมาบริโภคและในกระบวนการผลิต วัตถุประสงค์ของงานวิจัยจึงแตกต่างไปจากเดิม อีกทั้งข้อจำกัดด้านระยะเวลา ทำให้ในงานวิจัยนี้ยังทำการทดสอบผงสารสกัดถั่วเหลืองไม่ครบตามข้อกำหนด Thai Herbal Pharmacopoeia ดังนั้นจึงควรทดสอบหาการปนเปื้อนทั้งทางชีวภาพและทางเคมี เช่น การหาความชื้นในผงสารสกัดถั่วเหลือง การหาเปอร์เซ็นต์ของ ethanol ที่หลงเหลืออยู่ การหา Hexane residual ที่หลงเหลืออยู่ เป็นต้น ส่วนด้านการศึกษาแคปซูลสารสกัดที่เตรียมได้ ยังขาดการศึกษาเกี่ยวกับการปลดปล่อยสาร genistein ออกจากแคปซูลและการศึกษาเกี่ยวกับความคงตัวของแคปซูล ดังนั้นเพื่อให้งานวิจัยนี้เป็นประโยชน์มากยิ่งขึ้นควรทำการศึกษาเรื่องดังกล่าวในงานวิจัยครั้งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Aidoo, A., M. E. Bishop, et al. (2005). "Effects of daidzein, genistein, and 17beta-estradiol on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mutagenicity and uterine dysplasia in ovariectomized rats." Nutr Cancer 53(1): 82-90.

Albertazzi, P., S. A. Steel, et al. (2005). "Effect of pure genistein on bone markers and hot flushes." Climacteric 8(4): 371-379.

Alhasan, S. A., O. Aranha, et al. (2001). "Genistein elicits pleiotropic molecular effects on head and neck cancer cells." Clin Cancer Res 7(12): 4174-4181.

Andres, A., S. M. Donovan, et al. (2009). "Soy isoflavones and virus infections." J Nutr Biochem 20(8): 563-569.

Baum, J. A., H. Teng, et al. (1998). "Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women." Am J Clin Nutr 68(3): 545-551.

Carlson, S., N. Peng, et al. (2008). "Effects of botanical dietary supplements on cardiovascular, cognitive, and metabolic function in males and females." Gend Med 5 **Suppl A**: S76-90.

Chua, R., K. Anderson, et al. (2004). "Quality, labeling accuracy, and cost comparison of purified soy isoflavonoid products." J Altern Complement Med 10(6): 1053-1060.

Coldham, N. G. and M. J. Sauer (2000). "Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health." Toxicol Appl Pharmacol 164(2): 206-215.

de Lemos, M. L. (2001). "Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth." Ann Pharmacother 35(9): 1118-1121.

Djuric, Z., G. Chen, et al. (2001). "Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women." Cancer Lett 172(1): 1-6.

Doerge, D. R., H. C. Chang, et al. (2000). "Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry." Drug Metab Dispos 28(3): 298-307.

Duffy, C., K. Perez, et al. (2007). "Implications of phytoestrogen intake for breast cancer." CA Cancer J Clin 57(5): 260-277.

Gardner, C. D., L. M. Chatterjee, et al. (2009). "Effects of isoflavone supplements vs. soy foods on blood concentrations of genistein and daidzein in adults." J Nutr Biochem 20(3): 227-234.

Glazier, M. G. and M. A. Bowman (2001). "A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy." Arch Intern Med 161(9): 1161-1172.

Gottstein, N., B. A. Ewins, et al. (2003). "Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function." Br J Nutr 89(5): 607-616.

Halm, B. M., L. A. Ashburn, et al. (2007). "Isoflavones from soya foods are more bioavailable in children than adults." Br J Nutr 98(5): 998-1005.

Haslam, E. (1996). "Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action." J Nat Prod 59(2): 205-215.

Hewitt, A. L. and K. W. Singletary (2003). "Soy extract inhibits mammary adenocarcinoma growth in a syngeneic mouse model." Cancer Lett 192(2): 133-143.

Hussain, M., M. Banerjee, et al. (2003). "Soy isoflavones in the treatment of prostate cancer." Nutr Cancer 47(2): 111-117.

Je, H. D. and U. D. Sohn (2009). "Inhibitory effect of genistein on agonist-induced modulation of vascular contractility." Mol Cells 27(2): 191-198.

Jefremov, V., M. Zilmer, et al. (2007). "Antioxidative effects of plant polyphenols: from protection of G protein signaling to prevention of age-related pathologies." Ann N Y Acad Sci 1095: 449-457.

Jeschke, U., V. Briese, et al. (2005). "Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on production of human chorionic gonadotropin in term trophoblast cells in vitro." Gynecol Endocrinol 21(3): 180-184.

Jeune, M. A., J. Kumi-Diaka, et al. (2005). "Anticancer activities of pomegranate extracts and genistein in human breast cancer cells." J Med Food 8(4): 469-475.

Joshi, J. V., R. A. Vaidya, et al. (2007). "Plasma levels of genistein following a single dose of soy extract capsule in Indian women." Indian J Med Res 125(4): 534-541.

Kijkuokool, P., I. S. Parhar, et al. (2006). "Genistein enhances N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumorigenesis." Cancer Lett 242(1): 53-59.

Kim, H., H. Xia, et al. (2000). "Attenuation of neurodegeneration-relevant modifications of brain proteins by dietary soy." Biofactors 12(1-4): 243-250.

Kritz-Silverstein, D. and D. L. Goodman-Gruen (2002). "Usual dietary isoflavone intake, bone mineral density, and bone metabolism in postmenopausal women." J Womens Health Gend Based Med 11(1): 69-78.

Kwon, S. H., M. J. Kang, et al. (2007). "Comparison of oral bioavailability of genistein and genistin in rats." Int J Pharm 337(1-2): 148-154.

Lambert, J. D., S. J. Kwon, et al. (2008). "Effect of genistein on the bioavailability and intestinal cancer chemopreventive activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate." Carcinogenesis 29(10): 2019-2024.

Linseisen, J., R. Piller, et al. (2004). "Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study." Int J Cancer 110(2): 284-290.

Lissin, L. W. and J. P. Cooke (2000). "Phytoestrogens and cardiovascular health." J Am Coll Cardiol 35(6): 1403-1410.

Messina, M., C. Gardner, et al. (2002). "Gaining insight into the health effects of soy but a long way still to go: commentary on the fourth International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease." J Nutr 132(3): 547S-551S.

Messina, M. J. and C. L. Loprinzi (2001). "Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature." J Nutr 131(11 Suppl): 3095S-3108S.

Metzner, J. E., T. Frank, et al. (2009). "Study on the pharmacokinetics of synthetic genistein after multiple oral intake in post-menopausal women." Arzneimittelforschung 59(10): 513-520.

Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, et al. (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer." Pharmacol Rev 52(4): 673-751.

Mojzisova, G. and M. Kuchta (2001). "Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease." Physiol Res 50(6): 529-535.

Nakaya, M., H. Tachibana, et al. (2005). "Isoflavone genistein and daidzein up-regulate LPS-induced inducible nitric oxide synthase activity through estrogen receptor pathway in RAW264.7 cells." Biochem Pharmacol 71(1-2): 108-114.

Nhan, S., K. E. Anderson, et al. (2005). "Effect of a soymilk supplement containing isoflavones on urinary F2 isoprostane levels in premenopausal women." Nutr Cancer 53(1): 73-81.

Nielsen, I. L. and G. Williamson (2007). "Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans." Nutr Cancer 57(1): 1-10.

Penotti, M., E. Fabio, et al. (2003). "Effect of soy-derived isoflavones on hot flushes, endometrial thickness, and the pulsatility index of the uterine and cerebral arteries." Fertil Steril 79(5): 1112-1117.

Polini, N., M. B. Rauschemberger, et al. (2007). "Effect of genistein and raloxifene on vascular dependent platelet aggregation." Mol Cell Endocrinol 267(1-2): 55-62.

Pop, E. A., L. M. Fischer, et al. (2008). "Effects of a high daily dose of soy isoflavones on DNA damage, apoptosis, and estrogenic outcomes in healthy postmenopausal women: a phase I clinical trial." Menopause 15(4 Pt 1): 684-692.

Potter, S. M. (1998). "Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy." Nutr Rev 56(8): 231-235.

Potter, S. M., J. A. Baum, et al. (1998). "Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women." Am J Clin Nutr 68(6 Suppl): 1375S-1379S.

Ren, M. Q., G. Kuhn, et al. (2001). "Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties." Eur J Nutr 40(4): 135-146.

Rowell, C., D. M. Carpenter, et al. (2005). "Chemoprevention of breast cancer, proteomic discovery of genistein action in the rat mammary gland." J Nutr 135(12 Suppl): 2953S-2959S.

Sartippour, M. R., J. Y. Rao, et al. (2004). "A pilot clinical study of short-term isoflavone supplements in breast cancer patients." Nutr Cancer 49(1): 59-65.

Sbarouni, E., E. K. Iliodromitis, et al. (2006). "The effect of the phytoestrogen genistein on myocardial protection, preconditioning and oxidative stress." Cardiovasc Drugs Ther 20(4): 253-258.

Sepehr, E., G. M. Cooke, et al. (2009). "Effect of glycosidation of isoflavones on their bioavailability and pharmacokinetics in aged male rats." Mol Nutr Food Res 53 **Suppl** 1: S16-26.

Siriviriyakul, P., S. Khemapech, et al. (2006). "The vascular effect of genistein: what is its mechanism, nitric oxide or PGI2?" Clin Hemorheol Microcirc 34(1-2): 97-101.

Sonee, M., T. Sum, et al. (2004). "The soy isoflavone, genistein, protects human cortical neuronal cells from oxidative stress." Neurotoxicology 25(5): 885-891.

Souzeau, E., S. Belanger, et al. (2005). "Dietary isoflavones during pregnancy and lactation provide cardioprotection to offspring rats in adulthood." Am J Physiol Heart Circ Physiol 289(2): H715-721.

Squadrito, F., D. Altavilla, et al. (2003). "Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled study." Am J Med 114(6): 470-476.

Touillaud, M. S., P. C. Pillow, et al. (2005). "Effect of dietary intake of phytoestrogens on estrogen receptor status in premenopausal women with breast cancer." Nutr Cancer 51(2): 162-169.

Tsangalis, D., G. Wilcox, et al. (2005). "Bioavailability of isoflavone phytoestrogens in postmenopausal women consuming soya milk fermented with probiotic bifidobacteria." Br J Nutr 93(6): 867-877.

Vergne, S., C. Bennetau-Pelissero, et al. (2008). "Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of a soya-based supplement than a soya-based food in young healthy males." Br J Nutr 99(2): 333-344.

Villa, P., B. Costantini, et al. (2009). "The differential effect of the phytoestrogen genistein on cardiovascular risk factors in postmenopausal women: relationship with the metabolic status." J Clin Endocrinol Metab 94(2): 552-558.

Wang, H. and P. A. Murphy (1994). "Isoflavone composition of Americans and Japanese soybeans in Iowa: effect of variety, crop year, and location." J Agricult Food Chem 42.

Wang, Z. L., J. Y. Sun, et al. (2006). "Pharmacological studies of the large-scaled purified genistein from Huaijiao (Sophora japonica-Leguminosae) on anti-osteoporosis." Phytomedicine 13(9-10): 718-723.

Wei, H., R. Bowen, et al. (1995). "Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein." Proc Soc Exp Biol Med 208(1): 124-130.

Wei, H., R. Saladi, et al. (2003). "Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology." J Nutr 133(11 Suppl 1): 3811S-3819S.

Williamson-Hughes, P. S., B. D. Flickinger, et al. (2006). "Isoflavone supplements containing predominantly genistein reduce hot flash symptoms: a critical review of published studies." Menopause 13(5): 831-839.

Wu, J., X. Wang, et al. (2004). "Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and bone loss in ovariectomized mice." Metabolism 53(7): 942-948.

Xu, X., H. J. Wang, et al. (1994). "Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women." J Nutr 124(6): 825-832.

Zhan, S. and S. C. Ho (2005). "Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile." Am J Clin Nutr 81(2): 397-408.

Zhou, S., Y. Hu, et al. (2008). "Dose-dependent absorption, metabolism, and excretion of genistein in rats." J Agric Food Chem 56(18): 8354-8359.