รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

“การพัฒนาวัตถุดิบอาหารเสริมโปรตีนไฮโดรไลเสท จากพืชสมุนไพรสำหรับผู้สูงอายุ”

“Development of Protein Hydrolysate Raw Materials from Thai Medicinal Plants for the Elderly”

จัดทำโดย

ศาสตราจารย์ ดร. ภก.จีรเดช มโนสร้อย และคณะ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2555

โครงการวิจัย

เรื่อง

“การพัฒนาวัตถุดิบอาหารเสริมโปรตีนไฮโดรไลเสท จากพืชสมุนไพรสำหรับผู้สูงอายุ”

“Development of Protein Hydrolysate Raw Materials from Thai Medicinal Plants for the Elderly”

เสนอโดย

ศาสตราจารย์ ดร. ภก. จีรเดช มโนสร้อย

หัวหน้าโครงการวิจัย

หน่วยวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อการแพทย์แผนไทย

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โทร : 053 – 894806, 053 – 944338 โทรสาร : 053 – 894169

E-mail : pmpti006@chiangmai.ac.th/jiradej.manosroi8@gmail.com

คำนำ

ในปัจจุบัน ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโปรตีนไฮโดรไลเสทได้รับความนิยมสูง โดยเชื่อว่าจะสามารถบำรุงกำลัง บำรุงสมอง และฟื้นฟูสุขภาพผู้สูงอายุและผู้ป่วยได้ ในขณะนี้ มีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโปรตีนไฮโดรไลเสทจำหน่ายในท้องตลาดประเทศไทยจำนวนมากและล้วนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศเกือบทั้งหมด ซึ่งผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโปรตีนไฮโดรไลเสทสามารถผลิตได้จากพืชและสัตว์ โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากสัตว์ เช่น ไก่ อาจเกิดการแพ้และไม่เหมาะกับผู้ที่เป็นมังสวิรัติ ตลอดจนอาจเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อไข้หวัดนก เนื่องจากไก่จัดเป็นสัตว์ปีกที่มีอัตราเสี่ยงของการทำให้เกิดโรคไข้หวัดนก (Bird Flu) สูง โครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาการผลิตวัตถุดิบโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสมุนไพรไทยต่างๆ ได้แก่ เมล็ดถั่วพู เมล็ดถั่วแปะยี เมล็ดถั่วเขียว เมล็ดถั่วลิสง เมล็ดถั่วลันเตา และเมล็ดถั่วเหลือง โดยโปรตีนไฮโดรไลเสทที่พัฒนาได้นี้เป็น short-chain peptide ซึ่งได้รับการยอมรับให้ใช้ในเภสัชตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกาแล้วในการใช้สำหรับฟื้นฟูสุขภาพ ทั้งนี้โปรตีนไฮโดรไลเสทที่โครงการวิจัยพัฒนาได้จะสามารถนำไปพัฒนาต่อในรูปแบบรับประทาน ซึ่งนอกจากมีโปรตีนไฮโดรไลเสทแล้วยังมีสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการอื่นๆ โดยมีโปรตีน และแคลเซียมสูง ซึ่งเหมาะสำหรับผู้ที่มีแนวโน้มขาดแคลเซียมเมื่ออายุเพิ่มขึ้นอีกด้วย วัตถุดิบโปรตีนไฮโดรไลเสทเสริมอาหารที่พัฒนาได้นอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อผู้สูงอายุ ผู้ที่ขาดโปรตีนและคนทั่วไปแล้วยังสามารถนำเทคโนโลยีที่ได้ไปผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศซึ่งจะช่วยเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทยและลดการนำเข้าวัตถุดิบดังกล่าวจากต่างประเทศและสามารถส่งออกไปขายยังต่างประเทศ อันจะเป็นการนำเงินตราต่างประเทศเข้ามาช่วยพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทยได้ ทั้งนี้เทคโนโลยีที่ได้เป็นกรรมวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยากซึ่งจะสามารถดึงดูดผู้ประกอบการที่จะเข้ามาลงทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ง่าย นอกจากนี้ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นนอกเหนือจากเป็นแหล่งของโปรตีนไฮโดรไลเสทแล้วยังจะช่วยส่งเสริมการขายได้อีกทางหนึ่งด้วย

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดินปีพ.ศ. 2554 ให้โครงการวิจัย “การพัฒนาวัตถุดิบอาหารเสริมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชสมุนไพรสำหรับผู้สูงอายุ” นี้

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ได้คัดเลือกสมุนไพรที่มีโปรตีนสูงจากฐานข้อมูลตำรับยาสมุนไพร Manosroi II โดยใช้ชื่อสมุนไพร “ถั่ว” เป็นคำสำคัญในการสืบค้น จากนั้นจึงทำการคัดเลือกถั่วมา 6 ชนิดซึ่งได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วพู ถั่วลันเตา ถั่วลิสง ถั่วแปะยี และถั่วเขียว โดยพิจารณาจากความสะดวกในการหาซื้อในท้องตลาด และมีราคาถูก จากนั้นได้สกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ โดยเปรียบเทียบการสกัดด้วยวิธีการใช้กรดไฮโดรคลอลิกและการใช้คลื่นความถี่สูง39% amplitude เป็นเวลา 60 นาที โดยได้สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท จำนวน 12 ตัวอย่าง จากนั้นนำสารสกัดไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยวิธี Bradford พบว่าสารสกัดจากถั่วที่ให้ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทสูงสุด 3 ลำดับแรก คือ ถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (527.67 µg/ml) ถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (489.33 µg/ml) และถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (473.78 µg/ml) เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทในสารสกัดจากถั่วต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าถั่วทั้ง 6 ชนิดที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีปริมาณสูงของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 25 – 50 kDa มากกว่าถั่วที่สกัดด้วยการใช้กรดไฮโดรคลอลิก ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี ซึ่งพบว่าสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีสารพฤกษเคมีบางชนิดเป็นองค์ประกอบซึ่งได้แก่ สเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ กลูโคส ฟลาโวนอยด์และซาโปนิน แล้วนำไปตรวจสอบ specification ทางกายภาพ พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 (0.1% ในน้ำกลั่น) สามารถละลายได้ดีในน้ำร้อน (60°C) และน้ำเย็น (25°C) แต่ละลายได้ไม่ดีในตัวทำละลายอื่นๆ แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีความคงตัวในสภาวะทางเคมีแตกต่างกันด้วย หลังจากนั้นจึงนำสารสกัดทั้ง 3 ตัวอย่างไปจัดทำ HPLC fingerprint เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในท้องตลาดที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีลักษณะโครมาโทแกรมคล้ายกับผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทในท้องตลาด ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารสกัดมีโปรตีนไฮโดรไลเสทหรือเปปไทด์ชนิดใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในท้องตลาด ดังนั้นจึงได้นำถั่วทั้ง 3 ชนิดซึ่งได้แก่ ถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันมาสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงโดยใช้ระยะเวลาในการสกัดที่ต่างกัน คือ 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 50°C พบว่าชนิดของถั่วที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต (%yield) สูงสุด ได้แก่ ถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาเรียงจากมากไปน้อยตามลำดับ และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดนานขึ้นจะให้เปอร์เซ็นต์

ผลผลิตสูงขึ้น จากนั้นจึงได้นำสารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงที่ระยะเวลาต่างๆ จำนวน 15 ตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยวิธี Bradford พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยระยะเวลาต่างๆ มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 115.58–194.83, 121.74–310.31 และ 191.02–347.69 µg/ml ตามลำดับ โดยสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดเป็นเวลานาน 60, 90 และ 60 นาที ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดจากน้อยไปมากตามลำดับ จึงได้คัดเลือกสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี พบว่าสารสกัดจากถั่วลันเตาประกอบด้วยซูโครสและซาโปนิน ในการทดสอบ specification ทางกายภาพ พบว่าสารสกัด 0.1% ในน้ำกลั่นของถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที มีลักษณะสีเขียวอ่อนและขุ่นเมื่อกระจายตัวในน้ำกลั่นและมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 สามารถละลายได้ดีในน้ำร้อน (60°C) และน้ำเย็น (25°C) แต่ละลายได้ไม่ดีใน propylene glycol, glycerin, mineral oil, เอธานอลและเมธานอล สารสกัดจากถั่วลันเตาไม่คงตัวในด่างแก่ กรดอ่อน และเกลือของกรดอ่อน แต่คงตัวในกรดแก่ ด่างอ่อน oxidizing agent และ reducing agent ในการตรวจสอบ HPLC fingerprint ของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาทีเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 40 kDa และ 50 – 75 kDa พบว่าโครมาโทแกรมของสารสกัดถั่วลันเตาปรากฏ peak ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 40 kDa และ 50 – 75 kDa โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ของ peak เท่ากับ 64.1 และ 6% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับซุปไก่สกัดแบรนด์และเปปทีนพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่พัฒนาได้จากถั่วลันเตามีราคาต่ำกว่า 8 และ 2 เท่าตามลำดับ ผลจากงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที ประกอบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 40 – 75 kDa และมีราคาต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาด ซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้ต่อไป

Abstract

The medicinal plants which contained high protein contents were selected from Thai/Lanna medicinal plant recipe database "Manosroi II". The keyword of "legume" was used to search. The six types of legumes including soy bean (*Glycin max* (Linn.) Merrill.), garden pea (*Pisum sativum* Linn.), peanut (*Arachis hypogaea* Linn.), hyacinth bean (*Dolichos lablab* Linn.), green bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) and winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* Linn.) were selected according to their convenient sources and low cost. Each type of the legumes was extracted by hydrochlolic acid and probe sonicator processes. The obtained protein hydrolysate extracts (12 extracts) were analyzed for the protein contents using the Bradford assay. The peanut, hyacinth bean and green bean which were extracted by the probe sonicator process gave the highest protein contents at 527.67, 489.33 and 473.78 µg/ml, respectively. All legume extracts were then tested for molecular weight using the SDS – PAGE assay. The molecular weight of the protein hydrolysates containing in the sample extracted by the probe sonicator process were in the range of 25 – 50 kDa which gave higher protein contents than the hydrochloric acid process. Therefore, the peanut, hyacinth bean and green bean extracts prepared by the probe sonicator process were selected to the phytochemical analysis. The selected legumes exhibited some phytochemical constituents including steroid, alkaloid, glucose, flavonoid and saponin. For the specification, the pH values of the peanut, hyacinth bean and green bean extracts prepared by probe sonicator process (0.1% dispersed in distilled water) were 6. These three extracts were soluble in hot (60°C) and cold (25°C) water, but insoluble differently in other solvents. In addition, the selected extracts were also stable in different chemical conditions. The HPLC fingerprint profiles of the three selected extracts showed the chromatograms similar to the commercial food supplement containing the protein hydrolysate from soy bean. Hence, the peanut, hyacinth bean and green bean were selected to prepare using the probe sonicator process by varying the extracting times at 30, 45, 60, 90 and 120 mins with the controlled the extracting

temperature at 50°C. The highest percentage yields of the extracts from low to high were peanut, green bean and hyacinth bean, respectively. The percentage yields were higher with longer extracting time. All extracts were subsequently investigated for the protein contents using the Bradford assay. The peanut, green bean and hyacinth bean with the extracting times at 60, 90 and 60 mins demonstrated the highest protein contents (from low to high), respectively. The hyacinth bean extract with the extracting time at 60 min was selected. For the phytocehmical constituents, this selected extract composed of sucrose and saponin. For the specification, 0.1% of the extract dispersed in distilled water was in light green colour and cloudy with the pH value of 6. This extract was soluble in hot (60°C) and cold (25°C) water, but insoluble in propylene glycol, glycerin, mineral oil, ethanol and methanol. This extract was stable in strong acid, weak acid, oxidizing agent and reducing agent, but was unstable in strong base, weak acid and salt of weak acid. The HPLC fingerprint profile of the selected extract showed the similar chromatogram to the protein markers at 40 kDa and 50 – 75 kDa. The percentages of the peak area of the extract at 40 kDa and 50 – 75 kDa were 64.1 and 6%, respectively. In cost estimation, the developed protein hydrolysate had the cost lower than the brand chicken extract and the peptien of 8 and 2 times, respectively. The results from this study indicated that hyacinth bean extract prepared by the probe sonicator process for 60 min composed of the high contents of the protein hydrolysates with the molecular weight of 40 – 75 kDa and lower cost than the products available in the market, which can be further developed as a food supplement.

สารบัญเรื่อง

ลำดับที่	รายการ	หน้า
1.	คำนำ	ก
2.	กิตติกรรมประกาศ	ข
3.	บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
4.	บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	จ
5.	สารบัญเรื่อง	ช
6.	สารบัญตาราง	ญ
7.	สารบัญภาพ	ฎ
8.	รายละเอียดของรายงานฉบับสมบูรณ์	1
9.	ความสำคัญและที่มาปัญหา	1
10.	วัตถุประสงค์	3
11.	ขอบเขตการวิจัย	3
12.	การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	4
13.	วิธีดำเนินการวิจัย	11
14.	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	12
15.	สรุปผลการทดลอง	20
16.	ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	21
17.	การประยุกต์ผลงานวิจัยที่ได้	22
18.	บรรณานุกรม	23

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

ลำดับที่		รายการ	หน้า
19	ภาคผนวก		28
	ภาคผนวก 1	การคัดเลือกตัวอย่างสมุนไพรเพื่อใช้เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสท	29
	ภาคผนวก 2	การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากตัวอย่างสมุนไพรที่คัดเลือกมา	129
	ภาคผนวก 3	การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ของสารสกัดจากสมุนไพร	134
	ภาคผนวก 4	การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ ด้วยวิธี SDS – PAGE	140
	ภาคผนวก 5	การศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ	148
	ภาคผนวก 6	Specification ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	163
	ภาคผนวก 7	การจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	170
	ภาคผนวก 8	การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียวด้วยคลื่นความถี่สูงที่ใช้ระยะเวลาต่างๆ	177

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

ลำดับที่	รายการ	หน้า
ภาคผนวก 9	การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford และ การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS – PAGE ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ ที่สกัดด้วยวิธี sonication ที่เวลาต่างๆ	180
ภาคผนวก 10	การศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที	189
ภาคผนวก 11	Specification ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที	204
ภาคผนวก 12	การจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที	210
ภาคผนวก 13	การคำนวณต้นทุนการผลิตของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่คัดเลือกมา	216

สารบัญตาราง

ลำดับที่	รายการ	หน้า
1	**ตารางที่ 1** คุณค่าทางโภชนาการของพืชเมล็ดและผลิตภัณฑ์(คุณค่าทางอาหารต่อ 100 กรัมของสมุนไพร)	7
2	**ตารางที่ 2** คุณค่าทางโภชนาการของรากและหัวของพืช (คุณค่าทางอาหารต่อ 100 กรัมของสมุนไพร)	8
3	**ตารางที่ 3** คุณค่าสารอาหารในธัญพืชและผลิตภัณฑ์ (คุณค่าทางอาหารต่อ 100 กรัมของสมุนไพร)	9
4	**ตารางที่ 4** การเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดจากถั่วต่างๆ โดยการสกัดด้วยกรดและคลื่นความถี่สูง	12
5	**ตารางที่ 5** การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากถั่วทั้ง 6 ชนิดที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกและคลื่นความถี่สูง	13
6	**ตารางที่ 6** เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa ของสารสกัดจากถั่วต่างๆ ที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	14
7	**ตารางที่ 7** ลักษณะทางกายภาพและเปอร์เซ็นต์ yield ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วลันเตาและถั่วเขียวที่สกัดคลื่นความถี่สูงที่ใช้ระยะเวลาต่างๆ	16
8	**ตารางที่ 8** ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ชนิดที่เมื่อสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ	17
9	**ตารางที่ 9** เปอร์เซ็นต์พื้นที่ของ peak ของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ในโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที	19
10	**ตารางที่ 10** การเปรียบเทียบราคาของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่โครงการวิจัยพัฒนาได้และที่มีขายในท้องตลาด	19

สารบัญภาพ

ลำดับที่	รายการ	หน้า
1	**รูปที่ 1** วิธีดำเนินการวิจัยของโครงการวิจัย	11

รายละเอียดของรายงานฉบับสมบูรณ์

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบัน ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้รับความนิยมสูง โดยเชื่อว่าจะสามารถก่อให้เกิดผลดีต่อร่างกายในด้านต่างๆ สาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากสมุนไพรได้รับความนิยมเนื่องจากผู้บริโภคมีความเชื่อว่า ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวผลิตจากสารธรรมชาติไม่ใช่สารสังเคราะห์ซึ่งน่าจะมีความปลอดภัยกว่า นอกจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแล้ว พืชสมุนไพรจำนวนมากยังได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคทั้งในรูปสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์ มีการเตรียมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากสมุนไพรในรูปแบบต่างๆ ที่สะดวกต่อการใช้เช่น เม็ด แคปซูล เจลและครีม เป็นต้น ได้มีการศึกษาวิจัยในเชิงวิทยาศาสตร์ของสมุนไพรหลายชนิด พบว่ามีฤทธิ์ในการรักษาและสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเคียงกับยาแผนปัจจุบัน

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแม้มิได้มีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรค แต่เน้นสรรพคุณในการช่วยเสริมสุขภาพในด้านต่างๆ ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมักมีราคาสูงและมีรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่สะดวกในการใช้และสามารถดึงดูดความสนใจของผู้บริโภค ขณะนี้มีผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจำนวนมากในท้องตลาด เช่น ผลิตภัณฑ์ที่มีข้อบ่งใช้ในการลดความอ้วน ซึ่งได้แก่ Chitosan, Glucomannan ผลิตภัณฑ์จากส้มแขก ผลิตภัณฑ์ที่มีข้อบ่งใช้ในการเสริมสุขภาพที่เตรียมจากน้ำมันปลาและผลิตภัณฑ์จากผึ้ง เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์กลุ่มเสริมอาหารนี้ดูเหมือนว่ายังไม่เพียงพอต่อความต้องการของท้องตลาดอีกทั้งส่วนใหญ่ยังไม่มีข้อมูลเชิงวิชาการในการสนับสนุนสรรพคุณ

มีการนำสมุนไพรไทยหลายชนิดมาใช้เป็นยาบำรุงกำลัง เสริมสร้างความแข็งแรง และชะลอความแก่ โดยทำให้ร่างกายกระปรี้กระเปร่าหรือเสริมสมรรถภาพทางเพศซึ่งล้วนเป็นสมุนไพรที่มีการใช้อย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลาหลายชั่วอายุคนและที่มีปรากฏในตำรายาพื้นบ้านรวมทั้งที่มีรายงานการใช้ในต่างประเทศ ตลอดจนในรายงานของบทความวิจัยต่างๆ สมุนไพรเหล่านี้ได้แก่ พญาช้างเผือก กำลังช้าง*สาร Cistanche salsa, Cuscuta japonica, Schisandra chinensis, Polygala tennifolia, Nelumbo mucifera* และ *Withania somnifera* เป็นต้น

โปรตีนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสัตว์ พืชและสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อต่างๆ ในพืชซึ่งโดยทั่วไปจะมีโครงสร้างหลักเป็น carbohydrate แต่จะพบโปรตีนสูงในบางส่วนของพืช เช่น เมล็ด ตัวอย่างสมุนไพรที่มีปริมาณโปรตีนสูง เช่น เมล็ดกระถินและถั่วต่าง ๆ เช่น ถั่วพูและถั่วแปะยี เป็นต้น

โครงการวิจัยนี้เป็นการนำเทคโนโลยีมาสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับสินค้าเกษตรของไทยซึ่งเป็นพืชที่มีโปรตีนในปริมาณสูง โดยหัวใต้ดินของถั่วพูมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 20–30 เมล็ดถั่วพูมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 29–37 กระถินมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 20.2 และถั่วแปะยีมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 21.5 ถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 34 ทั้งนี้ยังไม่มีการนำถั่วพู กระถินถั่วแปะยีและถั่วเหลืองมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีขนาดความยาวที่เหมาะสมในเชิงการค้า

ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากถั่วเหลืองที่มีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาดจะมีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูง โดยจากผลการสุ่มตรวจตัวอย่างส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 35,000 – 200,000 dalton : ซึ่งมีขนาดใหญ่ดูดซึมยากทั้งนี้ Protein hydrolysate ที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้และดูดซึมได้ดี ควรมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำช่วง 1,000 – 2,000 dalton[56-57] ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดจึงไม่สามารถดูดซึมได้ดีและต้องการการย่อยโดยเอนไซม์ในทางเดินอาหารก่อน อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์จะไม่เน้นเฉพาะผู้ที่เป็นมังสวิรัติเพียงกลุ่มเดียวสามารถใช้กับผู้ป่วยหลังพักฟื้น เด็ก คนชราและนักกีฬา ได้อีกด้วย โดยจะคำนึงถึงรสชาติและรูปแบบของผลิตภัณฑ์ เช่น เป็นเม็ดแกรนูลหรือรูปแบบที่เหมาะสมได้

โครงการวิจัยได้ควบคุมคุณภาพทั้งวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์โดยจัดทำ Specification ตามมาตรฐานสากล เช่น US FDA, US Pharmacopoeia เป็นต้น ทั้งนี้ เพื่อการนำไปต่อยอดให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพมีความปลอดภัยและได้มาตรฐานต่อไป

กล่าวโดยสรุป โครงการวิจัยนี้มีความใหม่คือ เป็นการผลิต protein hydrolysate จากพืชซึ่งต่างจากที่มีจำหน่ายในท้องตลาดที่ผลิตจากสัตว์ เช่น ไก่ ซึ่งอาจเกิดการแพ้และไม่เหมาะกับผู้ที่เป็นมังสวิรัติตลอดจนอาจเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อไข้หวัดนก เนื่องจากไก่จัดเป็นสัตว์ปีกที่มีอัตราเสี่ยงของการทำให้เกิดโรคไข้หวัดนก (Bird Flu) สูง ในส่วนวิธีการสกัดจะแตกต่างจากที่เคยมีรายงานมาแล้วโดยจะเป็นการใช้จากกรดเจือจางหรือน้ำร่วมกับการให้ความร้อนโดยวิธีใหม่ เช่น microwave และมีการควบคุมสภาวะในขั้นตอนต่างๆ เพื่อให้ได้ปริมาณ protein hydrolysate สูงสุด โครงการวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นศักยภาพในการแข่งขันกับผลิตภัณฑ์ที่มีจำแหน่ายในท้องตลาด โดยจะใช้วัตถุดิบพืชที่หาได้ในประเทศและได้ปริมาณ protein hydrolysate ที่มีต้นทุนต่ำ มีกรรมวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยากดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้ข้อได้เปรียบที่สำคัญอีกประการหนึ่งของโครงการที่เสนอมานี้คือ จะได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารที่มีฤทธิ์เป็น chelating agent ช่วยชะลอความแก่และให้ผลดีโดยรวมต่อสุขภาพ ทั้งนี้ สารกลุ่มดังกล่าวได้รับความนิยมเป็นอย่างสูงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ ซึ่งพบมากในพืชสมุนไพร ทั้งนี้ การมีกรรมวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยากจะทำให้หาผู้ประกอบการที่จะเข้ามาลงทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น นอกเหนือจากเป็นแหล่งของโปรตีนจะช่วยในการส่งเสริมการขายได้อีกด้วย

โครงการวิจัยได้เตรียมวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร protein hydrolysate จากสมุนไพรไทยที่คัดเลือกมาซึ่งได้แก่ เมล็ดถั่วพู เมล็ดถั่วแปะยี เมล็ดกระถินและเมล็ดถั่วเหลือง โดย protein hydrolysate นี้เป็น short-chain peptide สารดังกล่าวนี้ได้รับการยอมรับให้ใช้ในเภสัชตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกาแล้ว โดยใช้สำหรับฟื้นฟูสุขภาพ ทั้งนี้ได้มีการเตรียมอยู่ในรูปของยาฉีด Protein Hydrolysate Injection ทั้งนี้ protein hydrolysate ที่โครงการวิจัยเตรียมได้จะนำมาพัฒนาต่อโดยเตรียมอยู่ในรูปแบบรับประทานโดยเตรียมจากสมุนไพรที่มีคุณค่าทางโภชนาการ มีโปรตีนสูง หาได้ง่าย ราคาไม่สูงคือ ถั่วแปะยี ถั่วพู เมล็ดกระถินและเมล็ดถั่วเหลือง โดยสมุนไพรเหล่านี้นอกจากจะมีโปรตีนสูงแล้วยังมี calcium สูงซึ่งจะเหมาะกับผู้สูงอายุที่โดยทั่วไปจะขาด calcium อีกด้วย ผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นจะนำมาทดสอบเกี่ยวกับคุณภาพ ปริมาณ ความปลอดภัย ตลอดจนการทดสอบ Protein Biological Adequacy Test ซึ่งเป็นวิธีการมาตรฐานใน USP 23 วัตถุดิบของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่พัฒนาได้นอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อผู้สูงอายุ ผู้ที่ขาดโปรตีนและคนทั่วไปแล้ว การผลิตในเชิงธุรกิจเพื่อการจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศยังจะช่วยเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทยและลดการนำเข้าวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจากต่างประเทศซึ่งล้วนมีราคาสูงอันจะเป็นการนำเงินตราต่างประเทศเข้ามาช่วยเศรษฐกิจของประเทศไทยได้อีกทางหนึ่งด้วย ในท้องตลาดประเทศไทยปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร protein hydrolysate มากมายและล้วนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศทั้งหมด โดยยังไม่มีวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโปรตีนไฮโดรไลเสทใดที่จำหน่ายในท้องตลาดซึ่งเตรียมจากพืชที่คณะผู้วิจัยได้คัดเลือกมา

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสมุนไพรไทยสำหรับผู้สูงอายุเพื่อให้ย่อยง่ายและดูดซึมง่าย โดยพัฒนาวิธีการสกัดที่สะดวกและต้นทุนต่ำเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีขอบเขตการวิจัยคือ

1. คัดเลือกสมุนไพรที่มีหลักฐานว่ามีปริมาณโปรตีนสูง 6 ชนิดซึ่งได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วพู ถั่วแปะยี ถั่วลันเตาและถั่วลิสง
2. พัฒนาวิธีการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยวิธีการใช้กรดไฮโดรคลอลิกและคลื่นความถี่สูง (probe sonicator)

3. ศึกษาสมบัติต่างๆ ของสารสกัดที่เตรียมได้ เช่น ปริมาณโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน องค์ประกอบทางพฤกษเคมีและความคงตัวทางเคมีและการละลายของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท
4. คัดเลือกถั่ว 3 ชนิด ที่มีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทสูงสุด
5. เตรียมสารสกัดจากถั่วด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลา 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที
6. ศึกษาสมบัติต่างๆ ของสารสกัด จำนวน 15 ตัวอย่าง เช่น ปริมาณโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน องค์ประกอบทางพฤกษเคมีและความคงตัวทางเคมีและการละลายของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจัดทำ specification ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท
7. คำนวณต้นทุนการผลิต
8. เขียนรายงาน / เสนอผลงานวิจัย / ตีพิมพ์ผลงานวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

โปรตีนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสัตว์ พืชและสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อต่างๆ ในพืชซึ่งโดยทั่วไปจะมีโครงสร้างหลักเป็น carbohydrate แต่จะพบโปรตีนสูงในบางส่วนของพืช เช่น เมล็ด ตัวอย่างสมุนไพรที่มีปริมาณโปรตีนสูง เช่น เมล็ดกระถินและถั่วต่าง ๆ เช่น ถั่วพูและถั่วแปะยี เป็นต้น

โปรตีนสามารถจัดกลุ่มออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ [1]

1. Simple protein

พบโปรตีนนี้ตามธรรมชาติ ซึ่งเมื่อนำมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะเกิด α–amino acid หรืออนุพันธ์ของมันเท่านั้น ตัวอย่างโปรตีนกลุ่มนี้ เช่น phosphoprotein, glycoprotein และ lipoprotein เป็นต้น

2. Conjugated protein

Conjugated protein เป็นโปรตีนซึ่งตามธรรมชาติจะรวมกับสารที่ไม่ใช่ protein ตัวอย่างโปรตีนกลุ่มนี้ ได้แก่ phosphoprotein, glycoprotein และ lipoprotein เป็นต้น

3. Derived protein

เป็นโปรตีนที่ได้จากการนำ simple หรือ conjugated protein มาทำปฏิกิริยากับกรดด่าง ความร้อน น้ำ เอนไซม์หรือ mechanical shock เป็นต้น ซึ่ง สามารถแบ่งกลุ่มย่อยออกเป็นดังนี้ :

3.1 Primary derived protein

3.1.1 Proteans เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในตัวทำละลาย ตัวอย่างโปรตีนชนิดนี้ ได้แก่ fibrin และ myosin

3.1.2 Metaprotein เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในตัวทำละลาย เช่น กรด–ด่างเจือจาง ตัวอย่างโปรตีนชนิดนี้ ได้แก่ alkali albuminate

3.2 Secondary derived protein

3.2.1 Proteose เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสุด ละลายได้ในน้ำ

3.2.2 Peptone เป็นกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า proteose

3.2.3 Peptide เป็น small hydrolytic fragment ของโปรตีนตั้งต้น ประกอบด้วย amino acid 2–20 ตัว เชื่อมต่อด้วย amide linkage peptide ละลายได้ในน้ำ ไม่ coagulate เมื่อถูกความร้อนและไม่ตกตะกอนเมื่อทำให้อิ่มตัวด้วย ammonium sulfate

ในผู้สูงอายุ ซึ่งโดยทั่วไปจะนับตั้งแต่ผู้ที่มีอายุ 65 ปีขึ้นไปนั้น โภชนาการนับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อสุขภาพในช่วงวัยนี้ ร่างกายของผู้สูงอายุมีความต้องการสารอาหารเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ [2–3] ผู้สูงอายุมีความต้องการพลังงานลดลงและมี Basal Metabolic Rate (BMR) ลดลง 10–20% เมื่อเทียบกับตอนหนุ่มสาว [4] ในคนที่มีอายุ 60 ปี จะมีการสังเคราะห์โปรตีนลดลง 40% เมื่อเทียบกับคนอายุ 30 ปี และจะลดลง 7 และ 8% เมื่ออายุ 70 และ 80 ปี ตามลำดับ ผู้สูงอายุจะไม่สามารถย่อยและดูดซึมอาหารที่มีโปรตีนสูงได้ดีเหมือนคนหนุ่มสาว ทั้งนี้ ผู้สูงอายุยังคงมีความต้องการโปรตีนใกล้เคียงกับคนหนุ่มสาว บางรายต้องการโปรตีนสูงขึ้นเพื่อรักษาสมดุลในร่างกาย [5–8] จากการศึกษาวิจัยพบว่า ปริมาณโปรตีนที่ควรได้รับเพื่อให้ผู้สูงอายุมีสุขภาพดี ควรเป็นประมาณ 1 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม [9–10] ส่วนในเด็กจะมีความต้องการมากกว่า 2–3 เท่าของผู้ใหญ่ ขนาดที่ควรได้รับของคนปกติคือ 1.5 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ผู้สูงอายุซึ่งรับประทานอาหารน้อยและรับประทานโปรตีนน้อยจะทำให้กล้ามเนื้อเล็กลง การเจ็บป่วยอาจทำให้สูญเสียโปรตีนได้ ดังนั้น จะต้องให้โปรตีนเข้าไปทดแทน [11] ปัญหาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารที่พบบ่อยในผู้สูงอายุคือ อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ อาหารไม่ย่อยและท้องผูก การได้รับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ประกอบด้วย protein hydrolysate ซึ่งมีจำนวนหมู่กรดอะมิโนต่อสายน้อยลงและมีสายสั้นลงกว่าโปรตีน จะทำให้ย่อยง่ายกว่าและช่วยให้ผู้สูงอายุสามารถนำ amino acid หรือ short–chain peptide ที่มีอยู่ใน protein hydrolysate ไปใช้ได้โดยตรงโดยไม่ต้องใช้พลังงานในการย่อย

คุณค่าทางอาหารของโปรตีนจะขึ้นกับคุณภาพและปริมาณของโปรตีนด้วย มนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ amino acid ที่ร่างกายต้องการได้ทั้งหมด Amino acid ที่ต้องรับประทานเข้าไปเรียกว่า “essential amino acid” ซึ่งได้แก่ leucine, isoleucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan และ valine

ถึงแม้โปรตีนจะพบมากในสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น ไข่ เนื้อสัตว์และนม ซึ่งถือว่ามีคุณค่าทางอาหารดีที่สุด อย่างไรก็ตาม การรับประทานโปรตีนจากอาหารดังกล่าวมีข้อจำกัดเนื่องจากจะทำให้ระดับ cholesterol ในผู้ที่มีระดับ cholesterol ในเลือดสูง ซึ่งมักพบในผู้สูงอายุสูงขึ้นได้

คนทั่วไปต้องรับประทานโปรตีนให้เพียงพอที่จะให้ได้ปริมาณโปรตีนต่อวันตามที่ร่างกายต้องการ การขาดโปรตีนอาจเนื่องจากรับประทานน้อยหรือได้รับโปรตีนที่มีคุณภาพไม่ดี ปริมาณโปรตีนที่ได้รับอาจมีผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ เช่น การขับออกจากร่างกายสูงจากปัญหาเกี่ยวกับโรคไตและการสูญเสียเลือดหรือมีความต้องการสูงขึ้นเนื่องจากโรคของต่อม thyroid หรือการมีไข้สูง คนที่ขาดโปรตีนจะมีอาการน้ำหนักลด บวมและมีการเปลี่ยนแปลงของผิวหนัง การขาดโปรตีนอาจทำให้เกิดความต้านทานต่อการติดเชื้อลดลง เนื่องจากโปรตีนจะมีความสำคัญในการสร้าง antibody และเม็ดเลือดขาว การเกิดอุบัติเหตุ การตั้งครรภ์และสตรีที่ให้นมบุตรก็อาจเกิดการขาดโปรตีนได้ ในคนไข้ที่การย่อยโปรตีนไม่ดี ได้มีการรักษาโดยการให้โปรตีนที่อยู่ในรูปของ hydrolysate หรือส่วนผสมของ amino acid

ในทวีปยุโรป การให้สารอาหารประเภทโปรตีนนิยมให้โปรตีนจากพืช เช่น 10% soybean emulsion (Intralipid) โดยได้พัฒนาและใช้มาตั้งแต่ปี คศ. 1961 [9] ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมี osmolarity เท่ากับ 280 mOsM/L และสามารถให้ทาง peripheral vein ได้ ซึ่งปัจจุบันมีจำหน่ายในประเทศสหรัฐอเมริกาเช่นกัน

พืชต่างชนิดกันจะมีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน ปริมาณโปรตีนและคุณค่าของสารอาหารในธัญพืช ราก หัวและเมล็ดของพืชสมุนไพรต่างๆ ได้แสดงไว้ใน**ตารางที่ 1-3** [12-14] จะเห็นว่าถั่วแปะยี (*Dolichos lablab* Linn.) ถั่วพู (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC) เมล็ดกระถิน (*Leucaena leucocephala (lamk) de Wit.*) และถั่วเหลือง (*Giycine max* (L.) Merr.) มีโปรตีนสูงและมีปริมาณไขมันไม่สูงเกินไป ในขณะที่ถั่วลิสงแม้มีปริมาณโปรตีนสูงแต่ก็มีปริมาณไขมันสูงด้วย นอกจากนี้ถั่วแปะยี ถั่วพูและเมล็ดกระถินยังมีปริมาณแคลเซียมสูงด้วย

โปรตีนไฮโดรไลเสทมีองค์ประกอบหลักเป็น di- และ tri-peptides ซึ่งสามารถดูดซึมได้ง่ายและเร็วกว่ากรดอะมิโนและโปรตีนโมเลกุลใหญ่[15] ทำให้ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากกว่า โครงการนี้จะทำการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชสมุนไพร เช่น ถั่วพู ถั่วแปะยี เมล็ดกระถินและถั่วเหลือง ซึ่งตามที่ได้ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับพืชที่คัดเลือกมานี้ พบว่ามีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพรวมถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ถั่วพูมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านมะเร็งจากองค์ประกอบในกลุ่ม triterpenes[16], ถั่วแปะยีมีฤทธ์ต้านออกซิเดชันและต้านไวรัสบางชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในสารสกัดจากเมล็ดกระถินมีองค์ประกอบจำพวกแอลคาลอยด์ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ สารในกลุ่มโพลีฟีนอลหลายชนิด ซึ่งสามารถให้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น การต้านออกซิเดชัน ต้านอักเสบและฝาดสมาน[17] โดยสารประกอบเหล่านี้สามารถสกัดออกมาได้พร้อมกับการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทในโครงการวิจัยนี้ คาดว่าจะสามารถผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีฤทธิ์ทางทางชีวภาพและ/หรือฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเหล่านี้ร่วมด้วย ซึ่งสามารถใช้เป็นจุดเด่นและเป็นจุดเสริมการขายผลิตภัณฑ์ได้อีกทางหนึ่งด้วย

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของพืชเมล็ดและผลิตภัณฑ์ (คุณค่าทางอาหารต่อ 100 กรัมของสมุนไพร) ข้อมูล : กองโภชนาการ กรมอนามัย 2530, 2535

รายการ	Energy	Pr	Fat	CHO	Ca	P	Fe	A	B_1	B_2	Niacin
	Kcal	กรัม			มก.			IU	มก.		
งาขาว	658	23.5	56.2	7.2	91	714	19.4	22	0.78	1.45	3.5
งาขี้ม้อน	533	16.7	46.5	12.0	–	–	–	–	0.66	0.22	1.3
งาดำ	553	21.9	46.3	12.1	1100	570	16.0	35	0.82	0.28	4.1
ถั่วเขียว	329	23.4	1.3	55.9	125	340	5.2	80	0.38	0.21	2.6
ถั่วแดง	315	22.4	1.2	53.7	–	253	–	51	0.73	0.23	–
ถั่วดำ	332	23.8	0.3	58.5	57	476	16.5	–	0.19	0.12	1.5
ถั่วพุ่ม	352	26.6	2.4	56.2	0	31	3.8	–	0.23	0.34	3.7
ถั่วนางหอม	335	22.6	1.4	58.0	227	28	4.5	–	0.31	0.56	3.9
ถั่วแปะยี	345	**31.1**	0.8	53.2	**33**	398	8.4	–	0.52	0.35	4.1
ถั่วแระ	157	15.3	6.7	8.8	28	19	3.4	4,337	0.57	0.26	1.1
ถั่วลาย	342	28.1	2.2	52.3	–	41	5.2	–	0.35	1.35	5.9
ถั่วลิสง	530	29.7	38.7	15.6	20	455	15.8	115	0.59	0.09	2.2
ถั่วเล็บมือนาง	330	19.9	1.2	59.9	13	56	2.2	–	0.53	0.5	5.2
ถั่วหรั่ง	171	84	3.8	25.9	20	143	tr.	–	0.16	0.37	2.9
ถั่วเหลือง	411	**34.0**	18.7	26.7	**245**	500	10.0	–	0.73	0.19	1.5
เต้าหู้ขาวอ่อน	16	4.3	1.9	2.9	250	53	14.0	7	0.04	0.18	0.7
เต้าหู้แข็ง	148	13.5	6.7	8.5	160	230	14.0	71	0.03	0.18	0.8
เต้าหู้ยี้	140	8.6	4.2	17.1	–	15	1.7	–	0.02	0	1.6
ถั่วเน่า	152	17.9	6.6	5.3	198	203	6.1	328	0.04	0.45	1.6
เมล็ดกระถิน	366	**36.0**	9.1	35.1	**79**	336	12.4	–	0.2	1.67	4.3
เมล็ดขนุน	146	5.5	0.2	30.6	0	105	2.9	22	1.74	0.02	3.2
เมล็ดเงาะ	368	7.3	24.2	30.3	19	117	2.9	129	0.04	0.97	0.4
เมล็ดถั่วแขก	370	18.5	6.0	60.6	13	253	–	–	0.22	0.73	2.1
เมล็ดถั่วพู	294	**26.6**	14.8	13.6	**36**	–	5.4	–	0.57	3.96	4.4
เมล็ดบัว	339	14.2	2.3	65.3	335	342	19.5	–	0.32	0.11	1.3
มะม่วงหิมพานต์	290	11.8	23.0	9.0	11	223	0.1	–	0.36	0.2	0.9

ตารางที่ 2 คุณค่าทางโภชนาการของรากและหัวของพืช (คุณค่าทางอาหารต่อ 100 กรัมของสมุนไพร)[14]

รายการ	Energy	Fat	CHO	Pr	Fiber	Ca	P	Fe	A	B_1	B_2	Niacin	C
	Kcal	กรัม		กรัม		มิลลิกรัม			IU.	มิลลิกรัม			
กระจับ	117	0.3	23.9	4.7	–	20	150	0.8	20	–	0.01	0.6	–
กลอย	140	0.1	32.2	2.5	0.9	22	32	1.8	+0.85	tr	0.2	1	–
บุก	81	0.2	18.4	2.0	0.7	38	38	2.4	0.06	0.02	1.7	6	–
เผือก	940.4	21.0	2.2	0.8	34	62	1.2	–	0.12	0.04	1.0	8	–
มันแกว	35	0.1	7.6	0.9	0.6	9	16	0.5	170.03	0.01	3.0	9	–
มันขี้หมูหัวเล็ก	76	0.6	17.0	0.5	0.7	19	32	tr.	–	0.04	0.01	1.8	4
มันเทศหัวขาว	108	0.3	25.6	1.0	0.8	21	50	0.9	580.14	0.05	0.7	21	–
มันเทศหัวเหลือง	115	0.3	27.1	1.2	0.8	36	56	0.9	28000	0.12	0.05	0.6	30
มันฝรั่ง	71	0.2	14.9	2.5	0.4	16	50	1.7	267	0.12	0.04	1.0	41
มันมือเสือ	102	0.2	23.9	1.5	0.6	12	35	0.8	–	0.10	0.01	0.8	15
มันเสา	87	0.2	19.9	0.9	0.6	38	28	1.1	80.10	0.04	0.5	6	–
สาคูขาว	81	0.3	17.9	1.7	–	6	66	0.8	–	0.17	0.02	–	16
หัวผักกาดขาว	20	tr.	4.1	0.8	0.7	43	20	tr.	–	0.01	0.02	0.5	26
มันสำปะหลัง	129	0.2	30.9	0.8	2.1	33	10	0.6	0	0.79	0.24	tr.	60
แห้วทรงกระเทียม	68	0.3	16.1	0.9	0.6	18	72	0.5	0	0.01	0.03	0.3	6
แครอท	55	0.4	12.4	1.3	60	28	1.7	18520	–	–	0.6	9	

ตารางที่ 3 คุณค่าสารอาหารในธัญพืชและผลิตภัณฑ์ (คุณค่าทางอาหารต่อ 100 กรัมของสมุนไพร)[14]

รายการ	พลังงาน	Pr.	Fat	CHO	DF	Ca	P	Fe	B_1	B_2	Niacin
	Kcal	กรัม				มิลลิกรัม			มิลลิกรัม		
ข้าวเจ้าไม่ขัดสี	352	7.8	3.4	72.6	3.4	4	1.7	–	0.61	0.15	–
ข้าวเจ้าขัดสี	353	6.4	0.9	79.8	–	0	130	0.9	0.26	0.25	1.6
รำข้าว	276	13.3	15.8	52.9	11.5	76	1386	19.4	1.26	0.25	29.8
ข้าวซ้อมมือ	351	6.6	2.3	75.8	1.7	–	66	–	0.34	0.11	–
ข้าวมันปู	347	5.9	2.9	74.3	4.0	16	120	tr.	0.44	0.18	–
ข้าวเม่า	347	5.9	2.9	74.3	4.0	16	120	tr.	0.44	0.18	–
ข้าวเหนียวไม่ขัดสี	360	7.4	2.1	77.1	0.8	21	243	3.4	0.30	0.12	5.0
ข้าวเหนียวหมัก	164	1.8	0.1	37.7	0.3	12	29	0.6	0.01	0.03	0.8
ข้าวโพดเหลือง	188	1.0	1.9	39.3	4.9	4	116	0.4	0.26	0.15	1.5
ข้าวสาลี	348	1.2	1.5	71.2	1.2	50	320	5.3	0.54	0.12	5.0
รำข้าวสาลี	211	19.4	5.6	20.7	36.8	–	–	–	2.14	1.21	–
ข้าวโอ๊ต	374	13.1	6.1	67.4	5.8	59	425	4.6	0.35	0.09	2.2
ข้าวฟ่าง	357	7.6	2.4	74.7	–	17	196	3.6	0.10	0.03	3.0
บะหมี่แห้ง	357	10.2	0.8	75.0	tr.	42	105	1.9	0.18	0.04	2.6
มักโรนี	369	13.5	1.2	75.2	0.3	27	162	2.9	0.88	0.37	6.0
ลูกเดือย	306	12.0	6.7	64.9	0.8	46	148	0.7	0.41	0.10	2.3

หมายเหตุ : Tr. = trace

ปริมาณโปรตีนที่พบในเมล็ดกระถิน เมล็ดถั่วแปะยีและเมล็ดถั่วพูใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนที่พบในถั่วเหลือง โดยเป็น digestible protein ในปริมาณมากกว่า 80% และมีค่า biological value ซึ่งแสดงถึงการนำโปรตีนที่ได้รับไปใช้จริงในร่างกายที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่มีปริมาณไขมันน้อยกว่า จึงเป็นแหล่งโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับผู้สูงอายุซึ่งมักมีปัญหาเกี่ยวกับระบบย่อยอาหาร และโรคในระบบหลอดเลือดต่างๆ[18-19] นอกจากนี้อาหารเสริมโปรตีนจากถั่วเหลืองยังมีรายงานว่าอาจมีสารในกลุ่ม isoflavone เช่น daidzein และ genistein ซึ่งมีฤทธิ์เป็น weak estrogen และอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น การขยายตัวของเต้านมในเพศชาย หรือการกระตุ้นให้เกิดมะเร็งบางชนิดได้ [20] จากข้อเสนอแนะเกี่ยวกับปริมาณของวัตถุดิบที่คัดเลือกมาเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองนั้น แม้จะมีปริมาณน้อยกว่าแต่เป็นพืชที่สามารถใช้บริโภคได้ในทุกส่วน และมีงานวิจัยสนับสนุนว่านอกจากในฝักแก่แล้ว ในส่วนประกอบอื่นๆ เช่น ใบ ดอก และฝักอ่อนก็ยังมีปริมาณโปรตีนสูงใกล้เคียงกัน[21] จึงไม่น่าจะทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับแหล่งของวัตถุดิบ และจากการสืบค้นข้อมูลเพิ่มเติม พบว่าโปรตีนจากถั่วพูนั้นมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นและเกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมน และเอนไซม์

หลายชนิด รวมไปถึงเกี่ยวข้องกับการดูดซึมแคลเซียม การสร้างกล้ามเนื้อ และการฟื้นตัวจากอาการบาดเจ็บต่างๆ[19]

การเตรียม protein hydrolysate สามารถเตรียมโดยการทำให้โปรตีนเกิด hydrolysis ซึ่งสามารถทำโดยการใช้กรด HCl หรือ enzyme ที่เหมาะสมเช่น trypsin, pepsin หรือ chymotrypsin เป็นต้น โดยทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสม amino acid บางชนิดจะสลายตัวในระหว่างการ hydrolysis ด้วยกรด เช่น tryptophan จะสลายตัวเกือบทั้งหมด กรณีของ carboxymethyl–cysteine จะสลายตัว 50–60% ส่วน threonine และ serine สลายตัว 5–10%

การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชจะมีข้อดีกว่าจากสัตว์คือ นอกจากจะได้โปรตีนไฮโดรไลเสทแล้ว พืชหลายชนิดยังมีองค์ประกอบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น flavonoids เป็นต้น ซึ่งเป็นสาร antioxidant ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอีกด้วยและยังเหมาะสำหรับผู้บริโภคที่เป็นมังสวิรัติหรืออิสลามหรือยิวถ้าหากไม่ต้องการบริโภคโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมจากหมู ในขณะที่การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเนื้อสัตว์อาจมีองค์ประกอบที่ทำให้เกิดการแพ้ในผู้บริโภคบางรายหรืออาจมีองค์ประกอบของไขมันหรือ cholesterol อยู่ด้วยซึ่งไม่ดีต่อสุขภาพโดยเฉพาะในผู้สูงอายุ โครงการวิจัยนี้จะทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชสมุนไพรไทยโดยเลือกจากพืชที่มีโปรตีนสูง 4 ชนิด ได้แก่ เมล็ดถั่วพู เมล็ดถั่วแปะยี เมล็ดกระถินและเมล็ดถั่วเหลือง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกตัวอย่างสมุนไพรเพื่อใช้เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสท
(ถั่วต่างๆ 6 ชนิดซึ่งได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วพู ถั่วแปะยี ถั่วลันเตา ถั่วเขียวและถั่วลิสง)

⩛

2. การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากตัวอย่างสมุนไพรที่คัดเลือกมา
วิธีการสกัด แบ่งเป็น 2 วิธี คือ การสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกและการสกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

⩛

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ของสารสกัดจากสมุนไพร
(ตรวจสอบปริมาณโปรตีนของสารสกัด จำนวน 12 ตัวอย่าง)

⩛

4. การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ ด้วยวิธี SDS – PAGE
(คัดเลือกวิธีการสกัดและชนิดของถั่วที่ให้ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทสูงสุด 3 ชนิด)

⩛

5. การศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ
(ตรวจสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากถั่วที่คัดเลือกมา 3 ตัวอย่าง)

⩛

6. Specification ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง
(ตรวจสอบความคงตัวและการละลายของสารสกัดจากถั่วที่คัดเลือกมา 3 ตัวอย่าง)

⩛

7. การจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตา ที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง
(จัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดจากถั่วที่คัดเลือกมา 3 ตัวอย่าง)

⩛

8. การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วลันเตาและถั่วเขียวด้วยคลื่นความถี่สูงที่ใช้ระยะเวลาต่างๆ
(เตรียมสารสกัดจากถั่วที่คัดเลือกมาที่ใช้ระยะเวลาต่างๆ จำนวน 15 ตัวอย่าง)

⩛

9. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford และ การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS – PAGE ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆที่สกัดด้วยวิธีคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ
(คัดเลือกวิธีการสกัดและชนิดของถั่วที่ให้ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทสงสด 1 ตัวอย่าง)

⩛

10. การศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที
(ตรวจสอบสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากถั่วที่คัดเลือกมา 1 ตัวอย่าง)

⩛

11. Specification ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที
(ตรวจสอบความคงตัวและการละลายของสารสกัดจากถั่วที่คัดเลือกมา 1 ตัวอย่าง)

⩛

12. การจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตา ที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที (จัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดจากถั่วที่คัดเลือกมา 1 ตัวอย่าง)

⩛

13. การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที
(การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดจากถั่วที่คัดเลือกมา)

รูปที่ 1 วิธีดำเนินการวิจัยของโครงการวิจัย

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลองได้แยกตามขั้นตอนการวิจัยต่าง ๆ ดังนี้

1. ผลการสืบค้นข้อมูลและการคัดเลือกสมุนไพร 6 ชนิดซึ่งได้แก่ ถั่วลันเตา ถั่วลิสง ถั่วแป๊ะยี ถั่วเขียว ถั่วพู และถั่วเหลืองโดยข้อมูลของสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดได้แสดงใน**ภาคผนวก 1**

2. ผลการสกัดถั่วชนิดต่างๆ ด้วยวิธีการใช้กรดไฮโดรคลอลิกและคลื่นความถี่สูงได้แสดงใน**ภาคผนวก 2** พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกให้ปริมาณสารสกัดสูงสุดดังแสดงใน**ตารางที่ 4**

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดจากถั่วต่างๆ โดยการสกัดด้วยกรดและคลื่นความถี่สูง

ที่	สารสกัด	ลักษณะที่ได้	% yield (w/w)
1	สารสกัดจากถั่วเหลืองที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	ผงสีน้ำตาลอ่อน	53.80
2	สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	ผงสีขาว	60.10
3	สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	ผงสีขาว	50.10
4	สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	ผงสีขาว	30.70
5	สารสกัดจากถั่วพูที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	ผงสีขาว	34.90
6	สารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	ผงสีขาว	45.90
7	สารสกัดจากถั่วเหลืองที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	ผงสีขาว	47.10
8	สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	ผงสีขาว	53.10
9	สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	ผงสีเหลืองอ่อน	25.20
10	สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	ผงสีน้ำตาลอ่อน	17.90
11	สารสกัดจากถั่วพูที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	ผงสีน้ำตาลอ่อน	34.60
12	สารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	ผงสีเขียว	23.20

หมายเหตุ:%yield (w/w) = [ปริมาณสารสกัด (กรัม) / ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัด (กรัม)] × 100

3. ผลการตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ของสารสกัดจากถั่วทั้ง 6 ชนิดที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกและคลื่นความถี่สูงได้แสดงใน**ภาคผนวก 3** พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง และสารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง มีปริมาณของโปรตีน เท่ากับ 527.67, 489.33 และ 473.78 µg/ml ตามลำดับ ดังแสดงใน**ตารางที่ 5**

นอกจากนี้สารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกให้ปริมาณโปรตีนต่ำกว่าสารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$, t-test) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้คลื่นความถี่สูง

ในการสกัดทำให้ผนังเซลล์ของถั่วแตกได้มากกว่าการใช้กรดไฮโดรคลอลิกซึ่งทำให้สามารถสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วได้ในปริมาณสูงกว่า นอกจากนี้โปรตีนยังอาจถูกกรดทำลายไปด้วย

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากถั่วทั้ง 6 ชนิดที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกและคลื่นความถี่สูง

ที่	สารสกัด	ความเข้มข้นของโปรตีน (µg/ml)
1	สารสกัดจากถั่วเหลืองที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	-
2	สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	146.56
3	สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	99.33
4	สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	191.00
5	สารสกัดจากถั่วพูที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	321.56
6	สารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	291.00
7	สารสกัดจากถั่วเหลืองที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	352.67
8	สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	527.67
9	สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	473.78
10	สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	489.33
11	สารสกัดจากถั่วพูที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	403.22
12	สารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	316.00

หมายเหตุ : ความเข้มข้นของโปรตีน **(µg/ml)** คำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟที่ plot ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น **(µg/ml)** ของ bovine serum albumin

4. ผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทในสารสกัดจากถั่วทั้ง 6 ชนิด เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดด้วยวิธี SDS-PAGE ได้แสดงใน**ภาคผนวก 4** พบว่าวิธีสารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTEiN® มีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทน้อยมากจนไม่สามารถมองเห็นแถบสีของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE ได้ ส่วนผลิตภัณฑ์ภัณฑ์เครื่องดื่ม BRAND® ปรากฏแถบสีน้ำเงินเข้มขนาดใหญ่ ซึ่งอาจเนื่องจากมีความเข้มข้นสูงเกินไปและมีปริมาณโปรตีนที่ได้จากสัตว์หลายชนิดที่อาจมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่สามารถแยกแถบได้ชัดเจน

นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทในสารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง พบว่าสารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงทั้ง 6 ตัวอย่างปรากฏแถบสีเข้มที่สุดที่น้ำหนักโมเลกุลในช่วง 50 – 75 kDa และสารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

(HB_So) ยังปรากฏแถบสีเข้มที่น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 20 – 25 kDa สารสกัดที่พบแถบสีอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุด ได้แก่ สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (PN_So) ซึ่งปรากฏแถบสีฟ้าที่น้ำหนักโมเลกุลในช่วง 13 – 15 kDa อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTEiN® ไม่ปรากฏแถบสี ในขณะที่ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม BRAND® ปรากฏแถบสีน้ำเงินเข้มขนาดใหญ่

นอกจากนี้การสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงยังสามารถสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ ได้ในปริมาณค่อนข้างสูง โดยโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa ที่ตรวจสอบด้วย gel electrophoresis/gel documentation มีปริมาณอยู่ในช่วง 43.83 – 83.70% ของโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งหมด สารสกัดจากถั่วพูและถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa สูงสุด (83.70 และ 83.20% ตามลำดับ) และถั่วแปะยีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa ต่ำสุด (43.83%) ดังแสดงใน **ตารางที่ 6**

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa ของสารสกัดจากถั่วต่างๆ ที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

สารสกัด	**เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไฮโดรไลเสท ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa (%)**
1. ถั่วเหลืองที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	75.10%
2. ถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	65.40%
3. ถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	83.20%
4. ถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	62.39%
5. ถั่วพูที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	83.70%
6. ถั่วแปะยีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	43.83%

หมายเหตุ : % ของโปรตีนไฮโดรเลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa = [(พื้นที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa ×ความหนาแน่นของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa) / (พื้นที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งหมด × ความหนาแน่นของโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งหมด)] × 100

5. จากผลการทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ของสารสกัดจากถั่วต่างๆ สารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด จึงคัดเลือก แล้วนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี ซึ่งได้แสดงใน**ภาคผนวก 5** พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีสเตียรอยด์สูง มีอัลคาลอยด์และกลูโคสเล็กน้อย สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัด

ด้วยคลื่นความถี่สูงมีอัลคาลอยด์และซาโปนินสูง มีกลูโคสและฟลาโวนอยด์เล็กน้อย สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีสเตียรอยด์และกลูโคสเล็กน้อย มีอัลคาลอยด์และซาโปนินสูง

6. ผลการทดสอบความคงตัวในสารเคมีต่างๆ ของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสงมีความคงตัวในสารเคมีต่างๆ สูงสุด เนื่องจากไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบด้วยสารเคมีต่างๆ แต่สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงไม่คงตัวในด่างแก่ กรดอ่อนและเกลือของกรดอ่อนและถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงไม่คงตัวในด่างอ่อนและด่างแก่

สารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ชนิด มีค่า pH เท่ากับ 6 (0.1% ในน้ำกลั่น) สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีลักษณะสีขาวขุ่น สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีลักษณะสีเขียวอ่อนและขุ่น และสารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีลักษณะสีเหลืองอ่อนและขุ่น สารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ตัวอย่างละลายได้เล็กน้อยในน้ำร้อน (60C) น้ำเย็น (25C) propylene glycol และ glycerol แต่ไม่ละลายลายในเอธานอล เมธานอล และ mineral oil

7. ผลการวิเคราะห์โปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN® และ BRAND® ได้แสดงใน **ภาคผนวก 7** พบว่าโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ตัวอย่างปรากฏ peak ที่เวลา 31–33 นาที ถั่วเขียวและถั่วลันเตาปรากฏ sharp peak ที่เวลา 8 – 12 นาที ถั่วลิสงและถั่วลันเตาปรากฏ peak ที่เวลา 25 – 27 นาที ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN® ที่ระบุว่ามีปริมาณของ soy peptide เท่ากับ 5.3% ต่อขวด ปรากฏ sharp peak ที่เวลา 30 นาที ซึ่งอาจเป็น peak ของ soy peptide ส่วนผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม BRAND® ที่ระบุว่ามีปริมาณของไก่สกัด 99.7% ต่อขวด ไม่ปรากฏ peak เหมือนเช่นโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN®

เมื่อเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN® พบว่า peak ที่เวลาใกล้เคียงกัน มีลักษณะเฉพาะเจาะจงที่ใกล้เคียงกัน อาจเป็นเพราะมีสารสกัดจากถั่วที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสทหรือเปปไทด์เป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกันกับเครื่องดื่ม PEPTiEN® อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วและผลิตภัณฑ์ BRAND® พบว่ามีลักษณะแตกต่างกัน อาจเนื่องจากผลิตภัณฑ์ BRAND® เป็นสารสกัดจากไก่ที่มีโปรตีนที่ได้จากสัตว์ แต่สารสกัดจากถั่วมีโปรตีนที่ได้จากพืช โปรตีนที่สกัดได้จึงมีลักษณะแตกต่างกัน รวมทั้ง BRAND® อาจไม่มีส่วนประกอบของโปรตีนใน chain สั้นเหมือนจากถั่วที่ได้จากการใช้คลื่นความถี่สูง

8. ผลการสกัดถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียวใน**ภาคผนวก 8** พบว่าระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารสกัดที่ได้ เมื่อใช้เวลานานขึ้นจะได้ผลผลิตของสารสกัดสูงขึ้น โดยถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาให้ปริมาณสารสกัดจากสูงไปต่ำตามลำดับ สารสกัดที่ได้มีค่า pH เป็นกรดอ่อนอยู่ในช่วง pH 5.98 – 6.48 ดังแสดงใน**ตารางที่ 7**

ตารางที่ 7 ลักษณะทางกายภาพและเปอร์เซ็นต์ yield ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วลันเตาและถั่วเขียวที่สกัดคลื่นความถี่สูงที่ใช้ระยะเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	เวลาที่ใช้ในการสกัด	ลักษณะของสารสกัด	pH	%yield (w/w)
ถั่วลิสง	30นาที	ผงสีขาวนวล	6.05	42.68%
	45นาที	ผงสีขาวนวล	6.09	48.65%
	60นาที	ผงสีขาวนวล	5.98	47.92%
	90นาที	ผงสีขาวนวล	6.30	46.57%
	120นาที	ผงสีขาวนวล	6.53	52.68%
ถั่วลันเตา	30นาที	ผงสีเขียวอ่อน	6.05	12.49%
	45นาที	ผงสีเขียวอ่อน	6.36	17.28%
	60นาที	ผงสีเขียวอ่อน	6.33	18.08%
	90นาที	ผงสีเขียวอ่อน	6.45	18.76%
	120นาที	ผงสีเขียวอ่อน	6.48	18.92%
ถั่วเขียว	30นาที	ผงสีเหลืองอ่อน	6.25	15.70%
	45นาที	ผงสีเหลืองอ่อน	6.32	20.61%
	60นาที	ผงสีเหลืองอ่อน	6.43	22.75%
	90นาที	ผงสีเหลืองอ่อน	6.37	22.29%
	120นาที	ผงสีเหลืองอ่อน	6.38	24.27%

หมายเหตุ:%yield (w/w) = [ปริมาณสารสกัด (กรัม) / ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัด (กรัม)] × 100

9. ผลการทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ของสารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ชนิดเมื่อสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับ bovine serum albumin ได้แสดงใน**ภาคผนวก 9** พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยเวลาต่างๆ มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 115.58–194.83, 121.74–310.31 และ 191.02–347.69 µg/ml ตามลำดับ โดยสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดเป็นเวลานาน 60, 90 และ 60 นาที ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9.1 ในขณะที่เครื่องดื่มเปปไทด์จากถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีนน้อยเพียง 183.44 µg/ml ส่วนซุปไก่สกัดมีปริมาณโปรตีน 178.64 µg/ml ทั้งนี้เนื่องจากเครื่องดื่มเปปไทด์จากถั่วเหลืองประกอบด้วยกรดอะมิโนเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้น Bradford จึงไม่สามารถวิเคราะห์กรดอะมิโนได้ ซึ่งทำให้มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าสารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ชนิดดังแสดงใน**ตารางที่ 8**

พืชแต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันเนื่องจากมีความสามารถถูกย่อยได้ต่างกัน โดยเวลาที่ใช้สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนานขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณโปรตีนมากขึ้น แต่หากให้เวลานานเกินไปโปรตีนจะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโน ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford ได้

ตารางที่ 8 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ชนิดที่เมื่อสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ

สารสกัด	**ความเข้มข้นของโปรตีน** (μg/ml)
1. ถั่วลิสง	
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30 นาที	126.26
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 45 นาที	171.74
- **สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที**	**194.83**
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 90 นาที	142.45
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 120 นาที	115.58
2. ถั่วเขียว	
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30 นาที	121.74
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 45 นาที	143.64
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที	252.93
- **สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 90 นาที**	**310.31**
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 120 นาที	230.31
3. ถั่วลันเตา	
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30 นาที	314.83
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 45 นาที	323.64
- **สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที**	**347.69**
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 90 นาที	207.92
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 120 นาที	191.02
เครื่องดื่มเปปไทด์จากถั่วเหลือง (PEPTiNE®) *	183.44
ซุปไก่สกัด (BRAND®)	178.64

หมายเหตุ : 30, 45, 60, 90 และ 120 คือเวลาที่ใช้ในการสกัด

* ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTEiN® เข้มข้น 0.022 mg/ml

10. ผลการทดสอบหาพฤกษเคมีของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงนาน 60 นาทีได้แสดงใน**ภาคผนวก 10** ซึ่งพบสารพฤกษเคมีบางชนิด ได้แก่ ซูโครสและซาโปนิน ทั้งนี้ซูโครส

เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้ง่ายและช่วยเพิ่มพลังงาน ทำให้รู้สึกสดชื่น นอกจากนี้มีงานวิจัยรายงานว่าซาโปนินบางชนิดมีประโยชน์ในเชิงป้องกันและบำรุงร่างกาย เช่น เสริมภูมิคุ้มกัน ยับยั้งเนื้องอก และช่วยเพิ่มกระบวนการเผาผลาญ เป็นต้น จึงเหมาะสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาหรือเสริมอาหาร

11. จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารสกัดถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลานาน 60 นาที พบว่ามีโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำปริมาณสูงที่สุดจึงคัดเลือกแล้วนำไปทดสอบความคงตัวในสารเคมีต่างๆ ดังแสดงใน**ภาคผนวก 11** พบว่าสารสกัดจากถั่วลันเตาไม่คงตัวในด่างแก่ กรดอ่อน และเกลือของกรดอ่อน สารสกัด (0.1% ละลายในน้ำกลั่น) มีลักษณะสีเขียวอ่อนและขุ่น ค่า pH เท่ากับ 6 นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดละลายได้ดีในน้ำร้อน (60°C) และน้ำเย็น (25°C) ละลายได้ไม่ดีใน propylene glycol, glycerin, mineral oil, เอธานอลและเมธานอล

12. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาทีเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของเจลาติน A (น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 40 kDa) และ Perfect Protein Markers™ (Novagen®, EMD Chemicals, Inc., CA, USA) (น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 – 225 kDa) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน ได้แสดงใน**ภาคผนวก 12** พบว่าโครมาโทแกรมของ Perfect Protein Markers™ ปรากฏ peak ของส่วนประกอบอื่นมาบดบัง ซึ่งได้แก่ สีย้อมและบัฟเฟอร์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามโครมาโทแกรมของโปรตีนมาตรฐานปรากฏ peak ที่แยกชัดเจนที่เวลา 36, 38 และ 47 นาที ซึ่ง Perfect Protein Markers™ ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน แต่โปรตีนมาตรฐานยี่ห้อดังกล่าว (Novagen®) ระบุว่าจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ชนิดอื่นจะปรากฏ peak ที่เวลา 37, 38 และ 45 นาทีซึ่งเป็น peak ของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50, 75 and 100 kDa ตามลำดับ ดังนั้น peak นาที ที่ปรากฏในโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่เวลา 37-38 ที่เหมือนกับโครมาโทแกรมของ Perfect Protein Markers™ อาจมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 50-75 kDa นอกจากนี้โครมาโทรแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตายังปรากฏ peak ที่เวลา 27-29 นาทีเช่นเดียวกันกับโครมาโทรแกรมของเจลาติน A ดังนั้นสารสกัดจากถั่วลันเตาจึงอาจมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 40 kDa เช่นเดียวกับเจลาติน A ซึ่งผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วย HPLC มีความสอดคล้องกับการทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วย gel electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 12.2 ปริมาณของโปรตีนที่ได้จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นพื้นที่ (% Area) ของ peak ในช่วงเวลาต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 12.1 โดย peak ที่เวลา 29-32 นาที เป็นกลุ่ม peak หลัก มีปริมาณ 64% ของพื้นที่ของ peak ทั้งหมดที่ปรากฏในโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตา ในขณะที่ peak ที่เวลา 37-39 นาที เป็นกลุ่ม peak รอง และมีปริมาณ 6% ของพื้นที่ของ peak ทั้งหมดที่ปรากฏในโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตา จากผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า peak ที่ปราฏในโครมาโทแกรมของสาร

สกัดจากถั่วลันเตามีน้ำหนักโมเลกุล 40, 50 และ 75 kDa ดังแสดงใน**ตารางที่ 9** ซึ่งสอดคล้องกับแถบโปรตีนที่ปรากฏใน gel electrophoresis

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์พื้นที่ของ peak ของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ในโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที

เวลา (retention time)	เปอร์เซ็นต์พื้นที่ของ peak	น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight)
6 – 8 นาที	18.3	–
24 นาที	7.3	–
29 – 32 นาที	64.1	40 kDa
37 – 39 นาที	6.0	50–75 kDa
อื่นๆ	4.3	–
รวม	100	–

13. การผลิตสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง นาน 60 นาที ปริมาณ 1 กิโลกรัมต้องใช้ต้นทุนการผลิต 1,301 บาท ซึ่งได้แสดงใน**ภาคผนวก 13** เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนไฮโดรไลเสทของโครงการวิจัยและที่มีขายในท้องตลาด จะเห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่โครงการวิจัยพัฒนาได้มีราคาถูกกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทในท้องตลาด โดยในราคาต่อกิโลกรัมต่ำกว่าเครื่องดื่มซุปไก่สกัด (Brand's®) และเครื่องดื่มเปปทีน (Peptien®) 8 และ 2 เท่าตามลำดับ ดังแสดงใน**ตารางที่ 10**

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบราคาของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่โครงการวิจัยพัฒนาได้และที่มีขายในท้องตลาด

ตัวอย่าง/บริษัทผู้ผลิต	**คุณลักษณะ**	**น้ำหนักโมเลกุล** (kDa)	**ราคาต่อกิโลกรัม (บาท/กก.)**	**หมายเหตุ**
โปรตีนไฮโดรไลเสท ที่โครงการวิจัยพัฒนาได้	เตรียมจากสารสกัดจากถั่วลันเตา โดยใช้คลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที	40 – 75	1,301	–
เครื่องดื่มซุปไก่สกัด ยี่ห้อ Brand's® บริษัท เซเรบอส (ประเทศไทย) จำกัด	ซุปไก่สกัด 1 ขวด ปริมาตร 42 มล. ได้น้ำหนักผงแห้ง 3.7 กรัม (เตรียมโดยวิธี freez dry)	ไม่ระบุ	10,000	ราคาขวดละ 37 บาท (42 มล.)
เครื่องดื่มเปปทีน Original soy peptide 4000 ยี่ห้อ Peptien® บริษัท โอสถสภา จำกัด	เปปทีน 1 ขวด ปริมาตร 100 มล.ได้น้ำหนักผงแห้ง 14.0 กรัม (เตรียมโดยวิธี freez dry)	ไม่ระบุ	2,357	ราคาขวดละ 33 บาท (100 มล.)

สรุปผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

- ได้คัดเลือกสมุนไพรที่มีโปรตีนสูงจากฐานข้อมูลตำรับยาสมุนไพร Manosroi II โดยใช้ชื่อสมุนไพร “ถั่ว” เป็นคำสำคัญในการสืบค้น จากนั้นจึงทำการคัดเลือกถั่วมา 6 ชนิดซึ่งได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วพู ถั่วลันเตา ถั่วลิสง ถั่วแปะยี และถั่วเขียว โดยพิจารณาจากความสะดวกในการหาซื้อในท้องตลาดและมีราคาถูก

- ได้สกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ โดยเปรียบเทียบการสกัดด้วยวิธีการใช้กรดไฮโดรคลอลิกและการใช้คลื่นความถี่สูง39% amplitude เป็นเวลา 60 นาที ได้สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจำนวน 12 ตัวอย่าง

- ได้นำสารสกัดไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยวิธี Bradford พบว่าสารสกัดจากถั่วที่ให้ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทสูงสุด 3 ลำดับแรก คือ ถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (527.67 µg/ml) ถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (489.33 µg/ml) และถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (473.78 µg/ml)

- เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทในสารสกัดจากถั่วต่างๆ ด้วยวิธี SDS–PAGE พบว่าถั่วทั้ง 6 ชนิดที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 25 – 50 kDa สูงกว่าถั่วที่สกัดด้วยการใช้กรดไฮโดรคลอลิก

- ได้คัดเลือกสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเนื่องจากให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดแล้วจึงนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี ซึ่งพบว่าสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีสารพฤกษเคมีบางชนิดเป็นองค์ประกอบซึ่งได้แก่ สเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ กลูโคส ฟลาโวนอยด์และซาโปนิน

- เมื่อตรวจสอบ specification ทางกายภาพ พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 (0.1% ในน้ำกลั่น) สามารถละลายได้ดีในน้ำร้อน (60°C) และน้ำเย็น (25°C) แต่ละลายได้ไม่ดีในตัวทำละลายอื่นๆ แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีความคงตัวในสภาวะทางเคมีแตกต่างกันด้วย

- ได้จัดทำ HPLC fingerprint เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในท้องตลาดที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีลักษณะโครมาโทแกรมคล้ายกับผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทในท้องตลาด ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารสกัดมีโปรตีนไฮโดรไลเสทหรือเปปไทด์ชนิดใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในท้องตลาด

- ได้คัดเลือกถั่วทั้ง 3 ชนิดซึ่งได้แก่ ถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันมาสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงโดยใช้ระยะเวลาในการสกัดที่ต่างกัน คือ 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 50°C

พบว่าชนิดของถั่วที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต (%yield) สูงสุด ได้แก่ ถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาเรียงจากมากไปน้อยตามลำดับ และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดนานขึ้นให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูงขึ้น

- ได้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยวิธี Bradford ของสารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงที่ระยะเวลาต่างๆ จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยระยะเวลาต่างๆ มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 115.58–194.83, 121.74–310.31 และ 191.02–347.69 µg/ml ตามลำดับ โดยสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดเป็นเวลานาน 60, 90 และ 60 นาที ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดจากน้อยไปมากตามลำดับ

- ได้คัดเลือกสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที เนื่องจากมีโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำปริมาณสูงที่สุด เมื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี พบว่าสารสกัดจากถั่วลันเตาประกอบด้วยซูโครสและซาโปนิน

- ในการทดสอบ specification ทางกายภาพ พบว่าสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที มีลักษณะสีเขียวอ่อนและขุ่นเมื่อกระจายตัวในน้ำกลั่นและมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 (0.1% ในน้ำกลั่น) สามารถละลายได้ดีในน้ำร้อน (60°C) และน้ำเย็น (25°C) แต่ละลายได้ไม่ดีใน propylene glycol, glycerin, mineral oil, เอธานอลและเมธานอล สารสกัดจากถั่วลันเตาไม่คงตัวในด่างแก่ กรดอ่อน และเกลือของกรดอ่อน แต่คงตัวใน กรดแก่ ด่างอ่อน oxidizing agent และ reducing agent

- ในการตรวจสอบ HPLC fingerprint ของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาทีเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 40 kDa และ 50 – 75 kDa พบว่าโครมาโทแกรมของสารสกัดถั่วลันเตาปรากฏ peak ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 40 kDa และ 50 – 75 kDa โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ของ peak เท่ากับ 64.1 และ 6% ตามลำดับ ผลจากงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที ประกอบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 40 – 75 kDa

- ต้นทุนการผลิตสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง นาน 60 นาที ปริมาณ 1 กิโลกรัม คือ 1,301 บาท ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสทที่โครงการวิจัยพัฒนาได้มีราคาถูกกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทในท้องตลาด โดยมีราคาต่อกิโลกรัมต่ำกว่าเครื่องดื่มซุปไก่สกัด (Brand's®) 8 เท่าและเครื่องดื่มเปปทีน (Peptien®) 2 เท่า

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

ควรทำการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ตรวจสอบคุณภาพหรือมาตรฐานด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาทีประกอบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสทที่คัดเลือกมาก่อนนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในรูปแบบต่างๆ ต่อไป

การประยุกต์ผลงานวิจัยที่ได้

ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะช่วยให้ได้วัตถุดิบเสริมอาหารโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วชนิดใหม่ที่จะสามารถนำไปพัฒนาต่อในรูปแบบรับประทาน ซึ่งนอกจากมีโปรตีนไฮโดรไลเสทแล้วยังมีสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการอื่นๆ โดยมีโปรตีน และแคลเซียมสูง ซึ่งเหมาะสำหรับผู้ที่มีแนวโน้มขาดแคลเซียมเมื่ออายุเพิ่มขึ้นอีกด้วย วัตถุดิบโปรตีนไฮโดรไลเสทเสริมอาหารที่พัฒนาได้นอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อผู้สูงอายุ ผู้ที่ขาดโปรตีนและคนทั่วไปแล้ว ยังสามารถนำเทคโนโลยีที่ได้ไปผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศซึ่งจะช่วยเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทยและลดการนำเข้าวัตถุดิบดังกล่าวจากต่างประเทศและสามารถส่งออกขายยังต่างประเทศอันจะเป็นการนำเงินตราต่างประเทศเข้ามาช่วยพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทยได้ ทั้งนี้เทคโนโลยีที่ได้เป็นกรรมวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยากซึ่งจะสามารถดึงดูดผู้ประกอบการที่จะเข้ามาลงทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นนอกเหนือจากเป็นแหล่งของโปรตีนไฮโดรไลเสทแล้วยังจะช่วยส่งเสริมการขายได้อีกทางหนึ่งด้วย

บรรณานุกรม

1. Gennaro A.R. 1990. Remington' s Pharmaceutical Sciences 18th Edition, Mack Printing Company, Pennsylvania, USA.
2. Ausman L.M. and Russell R.M. 1994. **Nutrition in the elderly**. Modern Nutrition in Health and Disease. Vol 1, 8th ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
3. Munro H.M. 1992. **Nutrition of the elderly:Introduction.** Nutrition of the Elderly. New York: Raven Press : 1–5.
4. McGandy. R.B., Barrows C.H. and Spanias A. 1996. ***J. Gerontol***; 21:581–7.
5. Cheng A., Gomez A. and Bergan J. 1978. Comparative nitrogen balance study between young and aged adults using three levels of protein intake from combination wheat–soy–milk mixture. ***Am. J. Clin. Nutr.*** 31:12–22.
6. Zanni E., Calloway D. and Zezulka A. 1979. Protein requirements of elderly men. ***J. Nutr.*** 109: 513.
7. Scrimshaw NS. 1976. Strengths and weaknesses of the committee approach an analysis of past and present recommeded dietary allowances for protein in health and disease. ***N. Engl. J. Med.*** 294:136.
8. Munro H. and Young V. 1978. Protein metabolism in the elderly. ***Postgrad. Med.*** 63:143.
9. Tuttle SG., Bassett S.H., Griffith W.H. Mulcare D.B. and Swendseid M.E. 1965 Further observations on amino acid requirements of older men II. Methionine and lysine. ***Am. J. Clin. Nutr.*** 16: 229–31.
10. Munro H.N., McGandy R.B. and Hartz S.C. et al. 1987. Am. J. Clin. Nutr. 46: 586–92.
11. Suitor C.N. and Crowley M.F. Nutrition principles and application in health promotion, 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott Co., 1984.
12. กองโภชนาการ กรมอนามัย. **ตารางแสดงคุณค่าอาหารในส่วนที่กินได้ 100 กรัม**, 2530.
13. กองโภชนาการ กรมอนามัย. **คุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย**, 2535.
14. ศิริวรรณ สุทธจิตต์. **ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อสุขภาพ เล่ม 1.** ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2540.

15. Di Pasquale M.G. 1997. Amino acids and proteins for the athlete: The anabolic edge. Boca Raton, FL: CRC Press.
16. Patent: Bernard P. and Berthon J.Y. 2005. Procede with obtaining with extracts of leguminosees (fabacees) of type *Psophocarpus tetragonolobus* like agents anti-inflammatory drugs, antiviral and anticarcinogene. Fr. Demande. 15pp.
17. Ademola IO, Akanbi AI and Idowa S.O. 2005. Comparative Nematocidal Activity of Chromatographic Fractions of *Leucaena leucocephala*. Seed Against Gastrointestinal Sheep Nematodes. Pharmaceutical biology. 43 (7): 599-604.
18. Rolls and Philips P.A. 1990. *Aging and disturbances of thirst and fluid balance*, Nutrition Reviews 48 : 137-144.
19. Mnembuka B.V and Eggum BO. 1995. Comparative nutritive value of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC) and other legumes grown in Tanzania. Plant foods for human nutrition. 47 (4): 333-339.
20. [Soy: Health Claims for Soy Protein]. Available online at http://www.fda.gov/Fdac/features/ 2000/300_soy.html [Accessed on June 11, 2010].
21. Yamada N. 1977. Winged bean plant as promising tropical crops. Netiia Noken Shuho. 30: 15-23 (in Japanese).
22. [ถั่วพู] available on line at www.mytho-fleurs.com/ images/jardins_botanique
23. [ถั่วพู] available on line at www.nishioo.jp/kobana/ m_10/sikakumame.htm
24. [ถั่วพู] available on line at http://www.kasetporpeang.com/forums/index.php?topic=4297.0
25. Patanjali S. R. Sajjan S. U. and Surolia A. 1988. Erythrocyte-binding studies on an acidic lectin from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*). Biochemical Journal. 252(3): 625-31.
26. Ezaka M., Matsubara N. and Hayakawa H. 1994. A novel hydroxyproline-rich glycoprotein from winged bean cells. Kokai Tokkyo Koho. 4 pp.
27. [*Leucaena leucocephala*] available online at www.agkc.lib.ku.ac.th
28. [*Leucaena leucocephala*] available online at www.kanchanapisek.or.th
29. [*Leucaena leucocephala*] available online at http://lib2.dss.go.th/elib/cgi-bin/opacexe.exe?

30. Poonam S. and Pushpa R. K. 1994. **Chemical composition of *Leucaena leucocephala* seeds.** International Journal of Food Sciences and Nutrition. 45 (1) 5 – 13.

31. [*Dolichos lablab*] available online at http://th.wikipedia.org/wiki

32. Xiang D. and Huang, H. 2003. Fengying on method of heat treatment to inactivte trypsin of dolichos lsblab. Collge of Food and Bio-engineering , Huanan Univercity of science and Technology, Guangzhou. Peop. Rep. Chian. Shipin kexue (Beijing , China) : 40-43.

33. ***Patent :*** Tsuji I., Kinji O. Y., Maeda T. Matsumoto K. and Yamamoto T. Topical preparations containing crude drug extracts for hair growth stimulation. JP 2003221315:15pp.

34. อุดม รุ่งเรืองศรี.พจนานุกรมล้านนา-ไทย ฉบับแม่ฟ้าหลวง (ฉบับปรับปรุงครั้งที่1). ภาควิชาภาษาไทย คณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.เชียงใหม่; 2547. หน้า 307.

35. เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2 (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ.2544). สำนักพิมพ์ประชาชน.กรุงเทพฯ;2544.หน้า 257.

36. นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร.สมุนไพรไม้พื้นบ้าน(2). สำนักพิมพ์ประชาชน.กรุงเทพฯ;2541.หน้า 209.

37. วุฒิ วุฒิธรรมเวช.สารานุกรมสมุนไพร-รวมหลักเภสัชกรรมไทย. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.กรุงเทพฯ;2540.หน้า 224.

38. วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม.พจนานุกรมสมุนไพรไทย.พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ประชุมทองการพิมพ์.กรุงเทพฯ;2536.หน้า 337.

39. จีรเดช มโนสร้อย, อรัญญา มโนสร้อย และอุดม รุ่งเรืองศรี. รายงานโครงการวิจัยการรวบรวมเลือกสรรและปริวรรตคัมภีร์ตำราแพทย์แผนไทยล้านนาและตำราสมุนไพรล้านนา. ระยะที่ 1-3 (ปีงบประมาณ 2546-2548) สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 337.

40. Tsuruki Takahiro, Takahata, Kyoya. And Yoshikawa M. 2005. Anti-alopecia mechanisms of soymetide-4, an immunostimutating peptide derived from soy β-conglycinin. Peptides 26(5):707-711.

41. Rozot Roger. and Boulle. 2004. Compositions containing 2-alkylideneaminooxyacetamides for stimutation of hair growth and/or for slowing down hair loss. Patent: Fr. Demande. 2004:35pp.

42. Tsuruki T. Yoshikawa M. and Takahata K. 2003. Anti–alopecia effect of an fMLP agonist peptide derived from soybean protein. Fragrance Journal. 31(2):46–50.
43. Park H.S. Hair–growing composition and production there of. 2003. Patent: Korean KongKae Tacho Kongbo.
44. Park, U. S. 2002. Production of hair tonic for purpose of promotion of hair growth, prevention of depilation and clecning of scalp. Patent: Korean Kongkae Tacho Kongbo.
45. Kubota K. 2000. Oral compositions containing soy isoflavones to stimcelate hair growth. Patent: Jpn. Kokai Tokkyo Koho. 3pp
46. Segelman A.B. 2000. Use of isoflavones to prevent hair loss and preserve the integrity of existing hair. Patent: U.S. 2000:5pp.
47. Akihisa T. Kumura Y. Roy K. Ghosh P., Thakur S. and Tamura T. 1994. Triterpene alcohols and 3–oxo steroids of nine Leguminosae seeds.Phytochemistry 35(5):1309–13.
48. Seo A. ad Morr C.R. 1984. Improved higperformance liquid chromatographic analysis of phenolic acids and isoflavonoids from soybean probean products. J Agr Food Chem 32(3):530–3.
49. Carter M.W, Smat Jr W.W.G. and Matrone G. 1953. Estimation of estrogenic activity of genistein obtained from soybean meal.Proc Soc Exp Biol Med 84:506
50. Uhlenbruck G, and Dahr W. 1971. Lection with a broad agglutination spectrum.XII. N–Acetyl–D–galactosamine–specific lectins from the seeds of *Soja hispida, Bauhinia pupurea, Iberis amara, Molucella laevis* and *Vicia g.* Vox Sang 21:338.
51. Sanada M., Tashiro T. and Mashima Y. 1987. Lipid metabolism after administration of 10% and 20% intralipid. The effects after lipoprotein–X administration. Nippon Jomyaku, Keicho Eiyo Kenkyukaishi 2 : 160–3.
52. Yoga Latha L., Sasidharan S., Zuraini Z., Suryani S., Shirley L., Sangetha S. and Daveselvi M. 2007. **Antimicrobial Activities and Toxicity of Crude Extract of the *Psophocarpus Tetragonolobus* Pods.** Afr. J. Trad. CAM, 4(1) : 59 – 63.
53. Anila L. and Vijayalakshmi N.R. 2000**. Beneficial Effects of Flavonoids from *Seasamum indicum, Emblica officinalis* and *Momordica charantia***. Phytotherapy research, 14, 592–595.

54. Fereidoon S., Chandrika M. L.P. and Dana S. W. (2006). **Antioxidant activity of white and black seasame seeds and their hull fractions**. Food Chemistry. 99, 478– 483.

55. Comprehensive Analytical Chemistry volume 51. **Food Contaminants and Residue Analysis**, Yolanda Pico. Wilson and Wilson's. 2008.

56. Nerissa V., Anthony R. and Dolores D. 2008. **Intracerebroventricular Administration of Soy Protein Hydrolysates Reduces Body Weight without Affecting Food Intake in Rats.** Plant Foods Hum Nutr. 63:41–46.

57. Liu L.J., Zhu C. and Zhao Z. 2008. **Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates**. Food and Bioproducts Processing. 86: 1–6.

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1
การคัดเลือกตัวอย่างสมุนไพร
เพื่อใช้เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสท

การคัดเลือกตัวอย่างสมุนไพรเพื่อใช้เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสท

การคัดเลือกสมุนไพร 6 ชนิด ซึ่งได้แก่ ถั่วลันเตา ถั่วลิสง ถั่วแป๊ะยี ถั่วเขียว ถั่วพู และถั่วเหลือง โดยข้อมูลของสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด มีดังนี้

ถั่วลันเตา

1. **ชื่อสมุนไพร (Name)** : ถั่วลันเตา
2. **ชื่ออื่น ๆ (Synonyms)** : ถั่วลันเตาเปลือกหนา, ถั่วลันเตา [1]

   ชื่อในตำรับยาล้านนา (Lanna recipes) :

   ชื่อในท้องถิ่นอื่น (Vemacular names) :

   1. ภาคเหนือ : ถั่วน้อย (พายัพ) [1]
   2. ภาคกลาง : ถั่วลันเตา [1]
   3. ต่างประเทศ : ห่อหลั่นเตา (จีน) [2]

   ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) : *Pisum sativum* Linn. [2]

   ชื่อภาษาอังกฤษ (Englisg name) : Sweet peas, peas, Garden peas [3]

   ชื่อสามัญ (Common name) : Sugar pea ,Garden Pea และอื่น ๆ [2]

   ชื่อวงศ์ (Family name) : PAPILIONEAE [1]
3. **ลักษณะทางพฤษศาสตร์ (Description)**

   ไม้เถาใบประกอบรูปขนนก ที่ยอดมีมือเกาะและที่ฐานใบมีหู ใบย่อยบางใบเปลี่ยนเป็นมือเกาะ ดอกออกด้านข้างเป็นดอกช่อชนิดติดดอกสลับมีดอกย่อย 1 – 2 ดอก กลีบรองกลีบเดียวสีเขียว มี 5 กลีบ เชื่อมติดกัน กลีบดอกสีขาว ม่วง หรือชมพู ผลเป็นฝัก มีเมล็ด 3 – 11 เมล็ด เมล็ดกลม หรือย่น [3]

   ภาพประกอบ (Figures)

รูปที่ 1.1 ต้นและฝักถั่วลันเตา [4]

รูปที่ 1.2 ฝักและเมล็ดถั่วลันเตา [6]

รูปที่ 1.3 ดอกของถั่วลันเตา สีม่วง [7]

4. **ส่วนที่ใช้ (Plant material of interest)** : เถา และ ฝัก [1]
   ลักษณะทางกายภาพทั่วไป (Genaral appearance) :
   ลักษณะของสี – กลิ่น – รส (Organoleptic properties) : รสหวาน [4]
5. **การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ (Geographical Distribution)** :
6. **สารสำคัญที่มีในสมุนไพร (Major chemical constituents)** : abscisic acid ;[3] agmatine ;[3] agmatine,N–6– methyl :;[3] allantoin ;[3] α – amyrin ;[3] β–amyrin ;[3] antheraxanthin ;[3] arachidic acid ;[3] ascorbic acid ;[3] biotin ;[3] butyrospermol ;[3] cadaverine ;[3] caffeic acid–4–O–β–D–glucoside ;[3] calcium oxalate ;[3] campesterol ;[3] carotene ;[3] α–carotene ;[3] β–carotene ;[3] choline ;[3] chromosaponin I ;[3] coniferyl alcohol ;[3] p–coumaroyl, β–D–glucose: ;[3] coumestrol ;[3] β–crypto–xanthin ;[3] cycloaranol,24 –methylene :;[3] cycloartenol ;[3] cyclobranol ;[3] dammara–dienol ;[3] dammarenol,24–methylene :;[3] ergosta–4–6–dien–3–one ;[3] ergostenone ;[3] euphol ;[3] ferulic acid ;[3] feruloyl,1–0–β–D–glucose :;[3] galactopinitol ;[3] giberellin A–1;;[3] gibberellin A–12 ;[3] gibberellin A–12,7–aldehyde ;[3] gibberellin A–5, gibberllin A–8, gibberellin A–19 ;[3] gibberellin A–20 ;[3] gibberellin A–29 ;[3] glycine ;[3] histamine ;[3] hydroquinone,meta–xylo : ;[3] indolyl–3 acetate,methyl –4–chloro : ;[3] inositol,myo :;[3] isoxazolin–5–one,3 : 2–β–D–glucoside ;[3] kaempferol ;[3] kaempferol–3–coumaroyl–triglucoside ;[3] kaempferol–3–feruloyl–triglucoside ;[3]

kaempferol–3–triglucoside ;[3] lanosterol,24–dihydro: 24–methylene :;[3] linoleic acid ;[3] linolenic acid ;[3] lupeol ;[3] lutein ;[3] mesoxalic acid ;[3] mevalonic acid ;[3] neoxanthin,cis–9 :;[3] nicotinamide ;[3] nicotinic acid ;[3] oleic acid ;[3] ononitol ;[3] oxalic acid ;[3] palmitic acid ;[3] parkeol ;[3] parkeol,24–dihydro : 24–methylene : ;[3] parkeol,24–dihydro : cis–24–ethylidene : ;[3] phytic acid ;[3] phytohemagglutinin ;[3] phytopercipitin ;[3] (+)–pisatin ;[3] (+)–pisatin,2–hydroxy ;[3] Pisum sativum lectin : polysthicol : pterocarpan, 2–3–9–trimethoxy : ;[3] ptero–carpan, 3–hydroxy–2–9–dimethoxy : ;[3] pterocarpan, 4–hydroxy–2–3–9–trimethoxy : ;[3] putrescine ;[3] pyrrole–2–carbo–xyaldehyde, 1–(3–(4–5–dihydro–2–furanone)–5–(hydroxyl–methyl) : ;[3] quercetin ;[3] quercetin–3–coumaroyl–triglucoside ;[3] quercetin–3–feruloyl–triglucoside ;[3] quercetin–3–triglucoside ;[3] simiarenol ;[3] sinapyl alcohol ;[3] sinapoyl ;[3] 1–0–β–D–glucose : ;[3] β–sitosterol : ;[3] sophorol ;[3] soyasaponin I ;[3] spermidine ;[3] spermidine, homo : ;[3] spermine ;[3] squalene ;[3] starch ;[3] stearic acid ;[3] stigmasta–4–22–dien–3–one ;[3] stigmasta–4–6–dien–3–one ;[3] stig–mastenone ;[3] stigmasterol ;[3] synthetase, dihydrofolate : ;[3] taraxasterol,pseudo : ;[3] taraxerol ;[3] tirucalla–7–24–dien–3–β–ol ;[3] tirucallol ;[3] trigonelline ;[3] tryptamine,5–hydroxy : ;[3] verbascose ;[3] vicilin ;[3] cis–9–violaxanthin : ;[3] trans–9–violaxanthin .[3]

7. การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical analysis)

7.1 การทดสอบความบริสุทธิ์ (Purity test)

7.2 ปริมาณความชื้น (Moisture)

7.3 ค่าการละลาย (Solubility)

7.4 ปริมาณเถ้า (Total ash)

7.5 การตกค้างของยาฆ่าแมลง (Pesticide residues)

7.6 การตกค้างของสารกัมมันตรังสี (Radioactive residues)

7.7 ปริมาณโลหะหนัก (Heavy metal)

7.8 การทดสอบความบริสุทธิ์อื่น ๆ (Other purity test)

8. การนำไปใช้ทางการแพทย์ (Medicinal uses)

8.1 ข้อบ่งใช้ทางการแพทย์แผนไทย (Traditional medicine)

เถา : แก้ตับทรุด ตับพิการ และชักตับ [3]

ฝัก : ฝักอ่อน เอามาคั้นเฉพาะน้ำประมาณครึ่งแก้ว ดื่มกินกับน้ำอุ่น ๆ วันละ 2 ครั้ง จะช่วยลดความดันโลหิตสูง บำรุงหัวใจ [4]

ไม่ระบุส่วนที่ใช้ : เป็นยาขับปัสสาวะ ลดอาการอักเสบจากฝีหนอง ลดน้ำตาลในเลือด รักษาโรคเบาหวาน ลดความดันโลหิตสูง บำรุงหัวใจ [4]

8.2 การนำไปใช้ทางการแพทย์แผนปัจจุบัน (Medicine)

9. การนำไปใช้ทางเภสัชวิทยา (Pharmacology)

9.1 ข้อบ่งใช้ทางเภสัชกรรมล้านนา (Lanna pharmaceutical)

9.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological activity) : ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด ลดปริมาณไขมันในเลือด ฤทธิ์เหมือนเอสโตรเจน กระตุ้นการบีบตัวของมดลูก เหนี่ยวนำให้เกิดเอนไซม์ quinine reductase มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ ต้านมาลาเรีย เพิ่มไขมันในเลือด คุมกำเนิด ทำให้เม็ดเลือดจับตัวเป็นกลุ่ม ต้าน oxidation ทำให้เซลล์น้ำเหลืองจับตัว ยับยั้งการสังเคราะห์ฮอร์โมน gonadotropin ยับยั้งฮอร์โมน progesterone ลดความดันโลหิต กระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบ ยับยั้งคอหอยพอก ยับยั้งเอนไซม์ trypsin กระตุ้นการเจริญเติบโตของปลาคาร์ฟ กระตุ้นการหลั่งของตับอ่อน .[3]

9.3 การทดสอบทางเภสัชวิทยา (Experimental pharmacology)

9.4 การทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity test)

9.5 การทดสอบทางเภสัชกรรมคลินิก (Clinical pharmacology)

9.6 รูปแบบการใช้ยา (Posology)

9.7 ข้อห้ามใช้ (Contraindications)

9.8 ข้อควรระวัง (Precautions)

9.9 คำเตือน (Warnings)

9.10 อันตรกิริยาของยา (Drug interaetions)

9.11 อาการอันไม่พึงประสงค์จากการใช้ (Adverse reactions)

10. รูปแบบผลิตภัณฑ์ (Dosage forms)

10.1 รายละเอียดของผลิตภัณฑ์ (Description) : Actiwhite สารสกัดจากถั่วลันเตา Pisum sativum Pea มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนส ทุกกลไกในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินอย่างได้ผล และปลอดภัย Actiwhite Action on The maturation of melanosome Enzyme catalyzing melanin synthesis ACTIWHITETM มีค่านัยสำคัญที่ทำให้ผิวขาวขึ้นหลังจากใช้ [5]

10.2 ผลิตภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาด (Marketing products) : ACTIWHITE [5]

10.3 ภาพประกอบ (Figures)

รูปที่ 1.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดที่ผสมสารสกัดจากถั่วลันเตา

11. ข้อมูลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Other research)

11.1 เดลเบิร์ต แกรงเกอร์ ได้ทดสอบกับตัวเองว่า การดื่มน้ำจากฝักถั่วลันเตาทำให้หายจากโรคเลือดชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Superficial Thromboplebitis น้ำถั่วลันเตา ซึ่งเป็นเครื่องดื่มละลายลิ่มเลือด ที่มีการเล่าต่อ ๆ กันมา ยังไม่มีการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์.[8]

12. เอกสารอ้างอิง (References)

1. ดร.วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม พจนานุกรมสมุนไพรไทย www.samunpri.com/herbs/?p=485
2. agrimedia.agritech.doae.go.th/book/book-veg/VS%20058.pdf (กลุ่มสื่อส่งเสริมการเกษตร สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร)
3. หนังสือสมุนไพร....ไม้พื้นบ้าน (2) : หน้าที่ 176 -178
4. สมุนไพรไทย ภูมิปัญญาไทย www.amazing-thai-herbs.blogspot.com/2011/12/blog-post_09.html
5. www.weloveshopping.com/portal/plaza/detail.php?shopid=185557&productid=19874150
6. www.n3k.in.th/สมุนไพร/สรรพคุณถั่วลันเตา
7. www.bansuanporpeang.com
8. www.mohanamai.com/UserFiles/File/mnm 18-3/P.57-63.pdf

ถั่วลิสง

1. ชื่อสมุนไพร (Name) : ถั่วลิสง

2. ชื่ออื่น ๆ (Synonyms)

2.1 ชื่อในตำรับยาล้านนา (Lanna recipes) :

2.2 ชื่อในท้องถิ่นอื่น (Vernacular names) :

1.ภาคเหนือ : ถั่วดิน [1]

2.ภาคกลาง : ถั่วยี่สง [1]

3.ภาคใต้ : ถั่วคุด,ถั่วใต้ดิน [1]

4.ต่างประเทศ : เหลาะฮวยแซ (จีน–แต้จิ๋ว) [1]

2.3 ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) : *Arachis hypogaea* Linn.[1/2]

2.4 ชื่อภาษาอังกฤษ (Common name) : groundnut, peanut, goober, monkeynut.[1/2]

2.5 ชื่อวงศ์ (Family name) : Papilionaceae,[1] Leguminosae[2]

3. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Description)

ไม้ล้มลุก อายุไม่เกิน 1 ปี ใบประกอบดอกสีเหลืองออกตรงง่ามใบกับต้น ดอกเป็นแบบพืชสกุลถั่ว ผลเป็นฝักเจริญแทงลงไปในดิน เปลือกผลเป็นสีเหลืองอ่อน ภายในฝักมีเมล็ดสีน้ำตาลหรือม่วง 1–6 เมล็ด เมื่อออกผลแล้วต้นจะตาย[2]

ภาพประกอบ (Figures)

รูปที่1.5 Arachis hypogaea Linn (ถั่วลิสง) ส่วนเมล็ด

(http://www.rakbankerd.com/kaset/Fertilizer/22_1.jpg)

รูปที่ 1.6 Arachis hypogaea Linn (ถั่วลิสง) ส่วนใบและดอก

(http://www.biogang.net /upload_img/biodiversity/biodiversity–79893–1.jpg)

รูปที่ 1.7 Arachis hypogaea Linn (ถั่วลิสง) ส่วนลำต้น

(http://cms-showcase.com /ipst/images/stories/article/bean.jpg)

4. ส่วนที่ใช้ (Plant material of interest) : ก้านและใบ1 เมล็ด1 น้ำมันใช้เป็นยา[1]

4.1 ลักษณะทางกายภาพทั่วไป (General appearance)

4.2 ลักษณะของสี-กลิ่น-รส (Organoleptic properties)

5. การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ (Geographical Distribution) :

6. สารสำคัญที่มีในสมุนไพร (Major chemical constituents) : aesculetin[2] ; agmatine,N-6-methyl:[2]; α-amyrin[2] ; β-amyrin[2] ; apigenin[2] ; arachidic acid[2]; arachin; arachine[2] ; arachis alkyl-bis-phenol ethers[2] ; Arachis hypogaeavallergen P-1[2] ; Arachis hypogaea lectin[2] ; Arachis hypogaea protease inhibitor A-I^2 ; Arachis hypogaea protease inhibitor A-Π^2 ; Arachis hypogaea protease inhibitor B-I^2 ; Arachis hypogaea protease inhibitor B-Π^2 ; Arachis hypogaea protease inhibitor B-III^2 ; Arachis hypogaea saponin[2] ; avenasterol,7-dehydro[2] ; behenic acid[2] ; benzoic acid,O-(malonyl-amino)[2] ; benzoic acid,para-hydroxy[2] ; biotin[2] ; caffeic acid[2] ; campesterol[2]; (+)-catechin[2] ; catechin,(-)-epi[2] ; catechin,epi[2] (4β,8)-catechin[2] ; catechin,epi: (4β,8: 2β-O-7)-epi-catechin[2] ; catechin,epi: (4β,8: 2-β-O-7)-catechin[2] ; (-)-chicoric acid[2] ; chicoric acid,meso[2] ; chlorogenic acid[2] ; chromone,5,7-dihydroxy[2] ; chrysoeriol[2]; coumaric acid,para[2] ; daidzein[2] ; daucosterol[2] ; eicosamonoenoic acid[2] ; eriodictyol [2]; ferulic acid[2] ; flavones, 5,7-dihydroxy-iso[2] ; formononetin[2] ; fucosterol,iso[2] ; gentisic acid[2] ; lignoceric acid[2] ; linoleic acid[2] ; luteolin[2]; medicarpin[2] ; (+)-medicarpin[2] ; medicarpin,demethyl[2] ; myristic acid[2] ; oleic acid [2]; oxalic acid[2] ; palmitic acid[2] ; phloretic acid[2] ; pinitol [2]; pratensein[2] ; protease inhibitor A-I(peanut)[2]

; protease inhibitor A–Π(peanut) [2] ; protease inhibitor B–ΙΙΙ(peanut) [2] ; protocatechuic acid[2] ; quercetin[2] ; quercitrin,iso: [2] ; quinic acid[2] ; α–resorcylic acid[2] ; resveratrol [2]; rutin[2] ; salicylic acid[2] ; scopoletin[2] ; shikimic acid[2] ; β–sitosterol[2] ; soyasaponinΙ[2] ; squalene[2] ; stearic acid[2] ; stilbene, 3′,4,5′–trihydroxy–3–iso–pentadienyl: [2] ; stilbene,cis–3,4′,5–trihydroxy–4–iso–pentenyl: [2] ; stilbene, trans–3,4′,5–trihydroxy–4–iso–pentenyl: [2] ; stilbene,4–(3–methyl–but–1–enyl)–3,3′,4′,5–tetrahydroxy: [2] ; stilbene,4–(3–methyl–but–1–enyl)–3,4′,5–trihydroxy: [2] ; stilbene,4–(3–methyl–but–2–enyl)–3,4′,5–trihydroxy: [2] ; stizolamine[2] ; tannic acid[2] ; taxifolin[2] ; α – tocopherol[2] ; triglycerols[2] ; trigonelline[2] ; vanillic acid.[2]

7. การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical analysis)

7.1 การทดสอบความบริสุทธิ์ (Purity test)

7.2 ปริมาณความชื้น (Moisture)

7.3 ค่าการละลาย (Solubility)

7.4 ปริมาณเถ้า (Total ash)

7.5 การตกค้างของยาฆ่าแมลง (Pesticide residues)

7.6 การตกค้างของสารกัมมันตรังสี (Radioactive residues)

7.7 ปริมาณโลหะหนัก (Heavy metal)

7.8 การทดสอบความบริสุทธิ์อื่น ๆ (Other purity test)

8. การนำไปใช้ทางการแพทย์ (Medicinal uses)

8.1 ข้อบ่งใช้ทางการแพทย์แผนไทย (Traditional medicine)

ก้านและใบ : แก้แผลหกล้มกระทบกระแทก แก้แผลมีหนองเรื้อรัง ลดความดันเลือดสูง[2]

เมล็ด : บำรุงไขข้อ บำรุงร่างกาย บำรุงเส้นเอ็น ให้ความอบอุ่นแก่ร่างกาย สมานกระเพาะอาหาร แก้ไอแห้ง แก้ปลายเท้าเป็นเหน็บชา บำรุงน้ำนมในสตรีหลังคลอดที่มีน้ำนมน้อย บำรุงกำลัง[2]

น้ำมันจากเมล็ด หล่อลื่นลำไส้ เป็นยาระบาย[2]

8.2 การนำไปใช้ทางการแพทย์แผนปัจจุบัน (Medicina)

9. การนำไปใช้ทางเภสัชวิทยา (Pharmacology)

9.1 ข้อบ่งใช้ทางเภสัชกรรมล้านนา (Lanna pharmaceutical)

9.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological activity)

ต้านเชื้อรา ต้านยีสต์ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ลดความดันโลหิต ยับยั้งการงอกของสปอร์ทำให้แพ้ ต้านการอักเสบ จับกับอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดออกซิเดชัน ต้านไวรัส ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ต้านธัยรอยด์ เป็นพิษต่อเซลล์ fibroblast เป็นพิษต่อเซลล์ thymocyte ฤทธิ์เหมือนฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้ไม่อยากอาหาร กระตุ้นการเจริญของ E. coli ทำให้เกิดมะเร็ง มีผลต่อระบบไหลเวียนของโลหิต ใช้ในการทำเครื่องสำอาง ยับยั้งการเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เกิดนิ่วในถุงน้ำดี ทำให้เกิดอาการคอหอยพอก ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช กระตุ้นกาเจริญเติบโตของพืช ห้ามเลือด ไล่แมลง ฆ่าแมลง กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน กระตุ้นเอนไซม์ lipoxygenase ฆ่าไส้เดือน กระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว ยับยั้งโรคพืช ยับยั้งการจับตัวของเกร็ดเลือด ยับยั้งการส่ง ethchlorvynol ไปยังสมอง กระตุ้น UDP-glucuronyl transferase ต้านการเกิดไขมันอุตตัน ลอคอเลสเตอรอล ยับยั้งเอนไซม์ desaturase elastase lipase trypsin, reverse transcriptase diamine oxidase amylase เพิ่มการดูดซึม ยาฆ่าแมลงทำให้เป็นพิษมากขึ้น เพิ่มกาดูดซึมของ β-carotene ฆ่าสาหร่าย ทำให้ดลหิตจาง ใช้รักษาแผลเน่าเปื่อย รักษาสิว รักษาริดสีดวงทวาร กระตุ้นการสร้างไขมัน และยับยั้งการสลายไขมัน ต้านการก่อกลายพันธุ์ ป้องกันรังสี ต้านมะเร็ง ใช้ในผู้ป่วยที่ขากโปรตีน มี lectin ซึ่งสามารถจับกับเซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แบคทีเรีย เซลลีไต เซลล์ของต่อมธัยมัส เซลล์ของตัวอ่อน เซลล์ผิวหนัง จับกับเซลล์สมองหนู จับกับ Papilloma จับกับเซลล์ตับอ่อน จับกับเซลล์มดลูก จับกับ fibroblast จับกับ lipprotein จับกับเซลล์ที่ผลิตอสุจิ จับกับเซลล์ตับ จับกับเซลล์กระดูก จับกับเซลล์เม็ดเลือดแดง จับกับเซลล์เม็ดเลือดขาว จับกับเซลล์มะเร็ง จับกับ antibody[2]

9.3 การทดสอบทางเภสัชวิทยา (Experimental pharmacology)

9.3.1 การทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity test)

พบว่าเมื่อฉีดสารสกัดต้นถั่วทั้งต้นด้วยอัลกอฮอล์และน้ำ (1:1) เข้าช่องท้องหนูถีบจักรขนาดที่ทำให้หนูตายครึ่งหนึ่งมีค่ามากกว่า 1.0 ก/กก และการศึกษาความเป็นพิษเมื่อผสมอาหารหนู 10% ให้หนูกินเป็นเวลา 90 วัน ไม่พบพิษ

เมื่อนำน้ำมันซึ่งผ่านความร้อน 200C นาน 40 นาที ผ่านความร้อนซ้ำ 15 ครั้ง ผสมในอาหารหนู 15% เมื่อหนูกินไปเป็นเวลา 3 เดือน ไม่พบพิษ แอกกลูตินินจากถั่วยับยั้ง acetylcholinesterase ในสมองหนู กากถั่วเป็นพิษต่อลูกหนู และทำให้กระต่ายท้องเสีย เป็นพิษต่อตับอ่อนของหนู และทำให้ปริมาณ γ-globulin เพิ่มขึ้นในหนู[2]

9.4 การทดสอบทางเภสัชกรรมคลินิก (Clinical pharmacology)

9.5 รูปแบบการใช้ยา (Posology)

9.6 ข้อห้ามใช้ (Contraindications)

9.7 ข้อควรระวัง (Precautions)

9.8 คำเตือน (Warnings)

9.9 อันตรกิริยาของยา (Durg interactions)

9.10 อาการอันไม่พึงประสงค์จากการใช้ (Adverse reactions)

10. รูปแบบผลิตภัณฑ์ (Dosage form)

10.1 รายละเอียดของผลิตภัณฑ์ (Description)

10.2 ผลิตภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาด (Marketing products)

10.3 ภาพประกอบ (Figures)

11. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Other research)

12. เอกสารอ้างอิง (Rrferences)

1. วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ประชุมทองการพิมพ์ ; 2536. หน้า 334–337

2. นันทวัน บุญยะประภัทรม อรนุช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรพื้นบ้าน (2). สำนักพิมพ์ประชาชน กรุงเทพฯ ; หน้า 183–185

ถั่วแป๊ะยี

1. ชื่อสมุนไพร (Name) : ถั่วแป๊ะยี

2. ชื่ออื่นๆ (Synonyms)

2.1 ชื่อในตำรับยาล้านนา (Lanna recipes) : มะยอแหย[4]

2.2 ชื่อในท้องถิ่นอื่น (Vernacular names) : ถั่วแปป , ถั่วแปยี , ถั่วมะแปกี , ถั่วแล้ง , ถั่วหญิง , ถั่วหนัง , มะแปน[2]

1. ภาคเหนือ : มะแปบ , มะแปป[4]
2. ภาคกลาง : ถั่วแปบ[2]
3. ภาคอีสาน : ถั่วแปบน้อย[4]

2.3 ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) : *Dolichos lablab* Linn.[1]

2.4 ชื่อภาษาอังกฤษ (Common name) : Bonavist bean, Hyacinth bean, Lablab bean.[1]

2.5 ชื่อวงศ์ (Family name) : Leguminosae / Fabaceae[1]

3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Description)

ไม้เลื้อย ใบติดเรียงสลับ ใบประกอบ 1 ใบมีใบย่อย 3 ใบ ใบย่อยรูปไข่ค่อนข้างกว้าง ผิวใบเกลี้ยง ดอกเป็นช่อ ติดที่ซอกใบ ดอกมีสีตั้งแต่ขาว ชมพู แดง หรือม่วง เกสรตัวผู้มี 10 อัน เชื่อมรวมกันเป็น 2 กลุ่ม ฝักค่อนข้างแบนตรงหรือโค้ง ฝักมักมีเมล็ด 3–6 เมล็ด เมล็ดรูปไข่[1]

ภาพประกอบ (Figures)

รูปที่ 1.8 Dolichos lablab Linn. (ถั่วแป๊ะยี) ส่วนลำต้นและใบของถั่วแป๊ะยี
http://th.wikipedia.org/wiki/ถั่วแปบ_พืช[5]

รูปที่ 1.9 Dolichos lablab Linn. (ถั่วแป๊ะยี) ส่วนเมล็ดของถั่วแป๊ะยี
www.google.com/ค้นรูป/ ถั่วแป๊ะยี[6]

4. ส่วนที่ใช้ (Plant material of interrest) : เมล็ดของถั่วแป๊ะยี

4.1 ลักษณะทางกายภาพทั่วไป (Genaral appearance)

ลำต้น : ไม้เลื้อยมีอายุหลายปี เนื้ออ่อน ทอดเลื้อยยาวได้ไกล 5–6 เมตร สีเขียว และมีขนปกคลุมประปราย[4]

ใบ : ใบย่อย3ใบ ออกเรียงสลับ ก้านใบประกอบยาว 12–13 ซม. ใบย่อยตอนปลายรูปไข่กว้าง ส่วนใบย่อยด้านข้างเป็นรูปไข่เบี้ยว กว้างและยาว 4–12 ซม. ปลายใบแหลม โคนใบเรียวแคบเป็นรูปลิ่ม มีขนบางๆปกคลุมใบทั้งสองด้าน และมีหูใบ[4]

ดอก : ออกดอกเป็นช่อกระจะตั้งตรงตามซอกใบ ก้านช่อดอกยาว 5–30 ซม. หรือมากกว่า มีดอกย่อยจำนวนมาก ดอกรูปดอกถั่ว สีม่วง สีชมพู หรือสีขาว ออกดอกในราวเดือน พ.ย. – ม.ค.[4]

ผล : เป็นฝักแบนยาวและโค้งงอ กว้าง 3–4 ซม. ยาว 5–10 ซม. ปลายเป็นจงอยขอบหยักเป็นซี่ฟันถี่ มีเมล็ด 2–6 เมล็ด สีขาว สีเหลือง สีน้ำตาล สีดำ หรือมีลาย[4]

4.2 ลักษณะของสี–กลิ่น–รส (Organoleptic properties)

5. การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ (Geographical Distribution)

มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบขึ้นตามป่าเบญจพรรณชื้น ออกดอกติดผลระหว่างเดือนกรกฎาคม–พฤศจิกายน[4]

6. สารสำคัญที่มีในสมุนไพร (Major chemical constituents)

Aminoethanol[1],n–(3–amino–propyl)[1];aminopropanol[1],n–(3–amino–propyl)[1]:; brassinolide[1]; castasterone[1] ; castaaterone[1], 6–deoxo[1]: ; cholesterol[1] ; dolicholide[1]; dolicholide[1],homo[1]: ; dolichos[1] lablab[1] β–D–galactan PS–I[1] ; dolichos[1] lablab[1] lectin[1] ; dolichosterone[1] ; dolicho–sterone[1],6–deoxo[1]: ; dolichosterone[1],homo[1]: ; gibberellin[1] A–13–O–β–D–glucosid[1]e ; hydrocyanic[1] acid[1] ; jasmonic[1] acid[1] ; jasmonic[1] acid[1] ; lablab[1] saponin[1] I ; lanosterol[1] ; lectin[1] DLA[1]; lectin[1] LNA[1] ; –D–ononitol[1]; ononitol[1],galactosyl[1]: ; phytic[1] acid[1] ; propane[1],diamino[1]; putrescine[1]; β–sitosterol[1]: ; spermidine[1] ; spermidine,homo[1]: amino–propyl[1]; spermine[1] ; stigmasterol[1] ; thermospermine[1]

7. การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical analysis)

7.1 การทดสอบความบริสุทธิ์ (Purity test)

7.2 ปริมาณความชื้น (Moisture)

7.3 ค่าการละลาย (Solubility)

7.4 ปริมาณเถ้า (Total ash)

7.5 การตกค้างของยาฆ่าแมลง (Pesticide residues)

7.6 การตกค้างของสารกัมมันตรังสี (Radioactive residues)

7.7 ปริมาณโลหะหนัก (Heavy metal)

7.8 การทดสอบความบริสุทธิ์อื่นๆ (Other purity test)

8. การนำไปใช้ทางการแพทย์ (Medicinal uses)

8.1 ข้อบ่งใช้ทางการแพทย์แผนไทย (Traditional medicine)

ฝัก : บำรุงกำลัง แก้อ่อนเพลีย[1]

เมล็ด : แก้โรคตา แก้เสมหะ แก้ไข้ บำรุงกำลัง บำรุงสายตา[1]

ไม่ระบุส่วนที่ใช้ : แก้ไข้สัมประชวร แก้เสมหะ แก้ลมมีพิษให้ผายธาตุ แก้โรคตา[1]

8.2 การนำไปใช้ทางการแพทย์แผนปัจจุบัน (Medicine)

9. การนำไปใช้ทางเภสัชวิทยา (Pharmacology)

9.1 ข้อบ่งใช้ทางเภสัชกรรมล้านนา (Lanna pharmaceutical)

9.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological activity)

ยับยั้งเชื้อไวรัส ยับยั้งารเจริญเติบโตของพืช มีฤทธิ์เหมือนฮอร์โมนพืช ต้านอักเสบ ต้านออกซิเดชั่น ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ตกตะกอนเม็ดเลือดแดง ต้านไธรอยด์ ฆ่าพยาธิ ให้คุณค่าทาง

โภชนาการ ลดการดูดซึมเอธานอล เร่งการขับถ่ายและออกซิเดชั่นของเอธานอล ต้านเอนไซม์ trypsin และ aldehyde dehydrogenase[1]

9.3 การทดสอบทางเภสัชวิทยา (Experimental pharmacology)

9.3.1 การทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity test)

9.4 การทดสอบทางเภสัชกรรมคลินิก (Clinical pharmacology)

9.5 รูปแบบการใช้ยา (Posology)

9.6 ข้อห้ามใช้ (Contraindications)

9.7 ข้อควรระวัง (Precautions)

9.8 คำเตือน (Warnings)

9.9 อันตรกิริยาของยา (Drug interactions)

9.10 อาการอันไม่พึงประสงค์จากการใช้ (Adverse reactions)

10. รูปแบบผลิตภัณฑ์ (Dosage forms)

10.1 รายละเอียดของผลิตภัณฑ์ (Description)

10.2 ผลิตภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาด (Marketing products)

10.3 ภาพประกอบ (Figures)

11. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Other research)

12. เอกสารอ้างอิง (References)

1. นันทวัน บุญยะประภัทรม อรนุช โชคชัยเจริญพร.สมุนไพรพื้นบ้าน (1).สำนักพิมพ์ประชาชน กรุงเทพฯ ; หน้า 161–162

2. จันทนา บุญประภาพิทักษ์, ศรีสุดา เตชะสาน กลุ่มส่งเสริมการผลิตพืชน้ำมันและพืชตะกูลถั่ว

3. 0ยุกตนันท์ จำปาเทศ. รายงานแมลงศัตรูถั่ว,ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม

4. หนังสือพรรณไม้สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 2

5. 1http://th.wikipedia.org/wiki/ถั่วแปบ_พืช

6. www.google.com/ค้นรูป/ ถั่วแป๊ะยี

ถั่วเขียว

1. **ชื่อสมุนไพร (Name) : ถั่วเขียว**
2. **ชื่ออื่นๆ (Synonyms)**

2.1 ชื่อในตำรับยาล้านนา (Lanna recipes) : ถั่วจิม[1],ถั่วถิม (จากฐานข้อมูล)

2.2 ชื่อในท้องถิ่นอื่น (Vernacular names) :

1. ภาคเหนือ : ถั่วมุม[1]

2. ภาคกลาง : ถั่วดำ , ถั่วทอง[1]

2.3 ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) : *Vigna radiata Wilczek*[2]

ชื่อพ้องทางวิทยาศาสตร์ : *Phaseolus aureus* Roxb.[2]

ชื่อภาษาอังกฤษ (Common name) : Mung Bean, Red gram, Green Gram, Golden Gram[2]

ชื่อวงศ์ (Family name) : Fabaceae[2]

3. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Description)

ไม้ล้มลุก มักแต่กิ่งก้านออกจากโคนต้น ใบที่งอกออกมาชุดแรกมี 2 ใบ เป็นใบเดี่ยวติดตรงกันข้าม ใบต่อๆ มาเป็นใบประกอบมีใบย่อย 3 ใบ ติดเรียงสลับกัน ใบย่อยรูปไข่จนถึงสามเหลี่ยมด้านเท่า ขอบใบเรียบ ดอกมีขนาดใหญ่ สีเขียวจนถึงเหลือง ออกเป็นกระจุก ฝักเรียวยาวค่อนข้างตรง เมล็ดรูปรี สีเขียวหรือเหลือง จนอาจถึงน้ำตาลหรือดำ[2]

ภาพประกอบ (Figures)

รูปที่ 1.10 Vigna radiate Wilczek. (ถั่วเขียว) ส่วนเมล็ดของถั่วเขียว
www.n3k.in.th/สมุนไพร/ประโยชน์ของถั่วเขียว[5]

รูปที่ 1.11 Vigna radiate Wilczek. (ถั่วเขียว) ส่วนลำต้น และ ใบของถั่วเขียว
it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=33[6]

4. ส่วนที่ใช้ (Plant material of interrest) : เมล็ดของถั่วเขียว

4.1 ลักษณะทางกายภาพทั่วไป (Genaral appearance)

ต้น : เป็นพรรณไม้ล้มลุกเนื้ออ่อน และจะมีอายุนานเพียงไม่เกิน 1 ปี ลำต้นจะมีขนเป็นสีน้ำตาล และจะแตกกิ่งก้านสาขา[1]

ใบ : เป็นใบรวมประกอบด้วยใบย่อยประมาณ 3 ใบ ฐานใบนั้นจะกว้างตรงปลายใบจะแหลม[1]

ดอก : ดอกนั้นจะเป็นสีเหลือง[1]

เมล็ด : ผลนั้นจะออกเป็นฝักและมีขนเป็นสีน้ำตาลอยู่ทั่วฝัก ฝักจะมีความยาวประมาณ 6–10 ซม. ส่วนเมล็ดถั่วเขียวจะมีสีแตกต่างกัน จะเป็นสีเขียวหรือสีเหลืองก็ได้ สีเหลืองก็คือถั่วทองที่เราเรียกกันนั้นเอง[1]

5. การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ (Geographical Distribution)

พรรณไม้นี้มักจะปลูกกันทั่วไปในเขตร้อน โดยเฉพาะ ประเทศจีน อินเดีย และมาเลเซีย ในประเทศไทยบางท้องถิ่นก็นิยมปลูกกันในนา หลังจากที่เก็บเกี่ยวข้าวเสร็จแล้ว[1]

6. สารสำคัญที่มีในสมุนไพร (Major chemical constituents)

Acetylcholine[2]; adipic[2] acid,α–amino[2]:; alanine,phenyl[2]: γ–glutamyl[2]: ; allantoin[2]; aspartic[2] acid,γ–glutamyl[2]: ; aureol[2]; biochanin[2] A; chlorogenic[2] acid[2]; chlorogenic[2] acid,neo[2]:; cysteine,S–dicarboxy–ethyl[2]:; cysteine,S–methy[2]l: γ–glutamyl[2]: γ–glutamyl[2]:; cysteine,S–methyl[2]: γ–glutamyl[2]: cysteine,S–methy[2]l: sulphoxide[2] γ–glutamyl[2]: daidzein[2]; daidzin[2]; dalbergiodin[2]; dehydrogenase,prephenate[2]:; dehydrogenase,pretyrosine[2]: ; ethano–lamine,O–acetyl[2]: ; formononetin[2]; genistein[2]; genistein,2–hydroxy[2]: glutamic[2] acid[2], γ–glutamyl[2]: ; glutathione,homo[2]: ; glutathione,homo:S–methyl[2]: ; inositol,myo[2]:β–D–glucoside[2]; inositol,myo[2]: di–O–β–D[2]–giucoside[2]; kaempferol[2]: kaempferol–3–O–β–D–glucuronide[2]; kievitone[2]; kievitone[2], cyclo[2]: ; kievitone,2,3–dehydro[2]; kievitone[2], 5 deoxy[2] ; lectin; leucine[2], γ–glutamyl[2]: ; leucine,iso[2]: γ–glutamyl[2]: ; ononin[2] ; ornithine[2],N–delta–acetyl[2]: γ–glutamyl[2]: ; pangamic[2] acid[2] ; phaseol[2]; phytic[2] acid[2] ;(–)–pipecolic[2] acid[2] ; pratensein[2] ; pyrophosphatase[2], nucleotide[2] ; quercetin[2] ; quercetin–3–O–β–D–glucuronide[2]; quercetin–3–O–sophoroside[2]; quercitrin,iso[2]: ; raffinose[2]; scopoletin,iso[2]: ; β–sitosterol[2]: ; stachyose[2] ; stathmin[2] ; sterols[2]; sterols,4–4–dimethyl[2]: ; sterols,4–monomethyl[2]: ; stigmasterol[2] ; tartronic[2] acid,trans–caffeoyl[2]: ; tartronic[2] acid,trans[2]–feruloyl[2]: ; tartronic[2] acid[2], trans–para–coumaroyl[2]: ; transferase,amino[2]: 4–hydroxy–phenyl–pyruvate[2]: ; transferase,amino[2]: prephenate[2]: ; triacontan–1–ol[2] ; L–tyrosine[2] ; umbelliferone[2] ; verbascose[2] ; vitamin B–2[2] ; vitexin[2] ; vitexin,iso[2]; vitexin[2], iso:6”–O–rhamnoside.[2]

7. การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical analysis)

7.1. การทดสอบความบริสุทธิ์ (Purity test)

7.2. ปริมาณความชื้น (Moisture)

7.3. ค่าการละลาย (Solubility)

7.4. ปริมาณเถ้า (Total ash)

7.5. การตกค้างของยาฆ่าแมลง (Pesticide residues)

7.6. การตกค้างของสารกัมมันตรังสี (Radioactive residues)

7.7. ปริมาณโลหะหนัก (Heavy metal)

7.8. การทดสอบความบริสุทธิ์อื่นๆ (Other purity test)

8. การนำไปใช้ทางการแพทย์ (Medicinal uses)

8.1. ข้อบ่งใช้ทางการแพทย์แผนไทย (Traditional medicine)

เมล็ด : นำมาต้มแล้วกินเป็นยาขับปัสสาวะ สำหรับคนที่เป็นโรคเหน็บชา ส่วนถั่วเขียวที่ดิบ หรือที่ต้มสุกแล้วใช้ตำพอกเป็นยารักษาภายนอกช่วยบ่มหนองให้ฝีสุก และยังใช้โรคอื่นๆ ได้เช่นการคลอดลูกยาก โรคท้องมาน ท้องร่วง แก้ข้อขัด บำรุงร่างกาย และบำรุงกำลัง[2]

เปลือกเมล็ด : แก้พิษฝีต่างๆ แก้ร้อนใน[2]

ไม่ระบุส่วนที่ใช้ : แก้เลือดออกตามไรฟัน รักษาโรคฝี[2]

อื่น ๆ : ถั่วเขียวเป็นพรรณไม้ที่ให้ประโยชน์มาก ทั้งทางด้านอาหารและในด้านที่ใช้เป็นยา ถั่วเขียวนี้เมื่อนำมาเพาะ เป็นถั่วงอก จะให้วิตามินเอ บี และซีสูงมาก สำหรับในด้านที่ใช้เป็นยานั้น ถึงแม้จะพบว่าใช้ได้ผลในการรักษาโรคต่างๆ นั้น แต่ก็ไม่มีผลการทดลองที่ยืนยันว่ารักษาได้ผลที่แน่นอน[3]

8.2. การนำไปใช้ทางการแพทย์แผนปัจจุบัน (Medicine)

9. การนำไปใช้ทางเภสัชวิทยา (Pharmacology)

9.1. ข้อบ่งใช้ทางเภสัชกรรมล้านนา (Lanna pharmaceutical)

เป็นส่วนประกอบในตำรับยารักษาพิษทั้งมวล, ปวดศีรษะ, ตาฟาง, ปิสันนิบาต, จุกเสียด, ท้องอืด, สันนิบาต, ไข้, ไข้สะดุ้ง, ไข้สันนิบาต, มะเร็งคุด, ลมขึ้นศีรษะ, ปี, สันนิบาตไข้ดิ้น, ปีกระด้าง, ปีร้อน, ปีแง้น, ปีคางคับ, ปีสะแก, ปีเสียบ, ปีแอ่น, สันนิบาตหกคลอง, สันนิบาตไหม้, เกี่ยวตกท้อง, กระสับกระส่าย, เจ็บตา, ไข้เรื้อรัง, เกี่ยวไฟตกท้อง, รับประทานอาหารมีพิษ, สันนิบาตเสียด, สันนิบาตขาง[4]

9.2. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological activity)

ต้านเชื้อรา ทำให้เม็ดเลือดแดงเลือดเกาะกลุ่ม ลดไขมันในเลือด ลดคอเลสเตอรอลในเลือด ต้านเชื้อไวรัส HIV ต้านไวรัสที่ทำให้เกิดโรคพืช มีฤทธิ์เหมือนฮอร์โมนเอสโตรเจน ยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนที่ผนังมดลูก ต้านออกซิเดชั่น ยับยั้งภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง จับกับอินซูลิน ขับปัสสาวะและลดอาการเกร็งของลำไส้ ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์ มีคุณค่าทางโภชนาการ เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง ทำให้เกิดภาวะทุพโภชนาการ ต้านเอนไซม์ trypsin subtilisin[2]

9.3. การทดสอบทางเภสัชวิทยา (Experimental pharmacology)

9.3.1. การทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity test)

พบว่าสารสกัดส่วนเหนือดินด้วย 50% เอธานอล มีขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง เท่ากับ 681 มก/กก เมื่อฉีดสารสกัดเข้าทางช่องท้อง และพบว่าสัตว์ทดลองมีภาวะตับอ่อนโตกว่าปกติ หลังจากได้รับถั่วเขียวเป็นอาหารติดต่อกันเป็นเวลานาน[2]

9.4. การทดสอบทางเภสัชกรรมคลินิก (Clinical pharmacology)

9.5. รูปแบบการใช้ยา (Posology)

9.6. ข้อห้ามใช้ (Contraindications)

9.7. ข้อควรระวัง (Precautions)

9.8. คำเตือน (Warnings)

9.9. อันตรกิริยาของยา (Drug interactions)

9.10. อาการอันไม่พึงประสงค์จากการใช้ (Adverse reactions)

10. รูปแบบผลิตภัณฑ์ (Dosage forms)

10.1. รายละเอียดของผลิตภัณฑ์ (Description)

10.2. ผลิตภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาด (Marketing products)

10.3. ภาพประกอบ (Figures)

11. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Other research)

12. เอกสารอ้างอิง (References)

1. วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ประชุมทองการพิมพ์; 2536. หน้า 325–326

2. นันทวัน บุญยะประภัทรม อรนุช โชคชัยเจริญพร.สมุนไพรพื้นบ้าน (1).สำนักพิมพ์ประชาชน กรุงเทพฯ ; หน้า 151–153

3.ข้อมูลจาก กรีนไฮเปอร์มาร์ท: สารานุกรมผลิตผลและผลิตภัณฑ์จากพืช ในซุปเปอร์มาร์เก็ต, 2546

4.จีรเดช มโนสร้อย และอรัญญา มโนสร้อย โปรแกรมมโนสร้อย2 “ฐานข้อมูลตำรายาสมุนไพรไทย”2555

5. www.n3k.in.th/สมุนไพร/ประโยชน์ของถั่วเขียว

6. it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=33

ถั่วพู

1. **ชื่อในตำรับยาล้านนา** : ถั่วพู[1]
2. **ชื่อในท้องถิ่นอื่น**

2.1 ทั่วไป : ถั่วพู[1-5]

2.2 ภาคเหนือ

– แม่ฮ่องสอน : บอบ่ะปะหลี (กะเหรี่ยง)[2,3]

2.3 ไม่ระบุ : ถั่วพูจีน[5] ถั่วพูใหญ่[5] ถั่วพูตะขาบ[5]

3. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.[1-5]

4. ชื่อภาษาอังกฤษ : Goa Bean[2-4], Manila Pea[2-4], Asparagus Pea[3], Wild Spider Flower[3], Winged Bean[3], Four-Angled Bean[4]

5. ชื่อวงศ์ : LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE[2]

6. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุกเลื้อยพัน อายุหลายปี มีรากสะสมอาหารเป็นหัวใต้ดิน ใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ ใบย่อยทรงรูปไข่กว้าง เบี้ยว ปลายแหลม 3 ใบ ใบเป็นสีเขียว ดอกออกที่ซอกใบ รูปดอกถั่ว กลีบดอกสีม่วง แกมน้ำเงินหรือขาว ผลเป็นฝักแบน มีครีบ 4 ครีบตามยาว เมล็ดจะเรียบเป็นมันสีขาวน้ำตาลแกมเหลืองหรือดำ[3-5]

7. ส่วนที่ใช้ : ราก[3,4] หัว[3-5] ใบ[3-5] ฝัก[3-5] เมล็ด[3,5]

8. ข้อบ่งใช้ทางเภสัชกรรมล้านนา : เป็นส่วนผสมในตำรับยา รักษาโรคมะเร็ง[6] มะเร็งลมเลือด[6] โรคสานเนื้อไหม้[6] แก้อาการจุกเสียดหน้าอก[6] โรคสานตำรับหลวง[6] โรคสันนิบาตมีอาการมือและเท้ากระตุก พูดไม่ได้[6] โรครากสาดเกิดร่วมกับสันนิบาต มีอาการปัสสาวะเป็นสีแดง[6] โรคขางมีอาการตัวแอ่นตัวโค้งงอ[6]

9. ข้อบ่งใช้ทางการแพทย์แผนไทย

ราก : แก้ฝีดาษ[3] แก้ลมและโลหิต[3] แก้ดีพลุ่งพล่าน[3] แก้ปวดมวนท้อง[3,4]

หัว : ชูกำลัง[3-5] ทำให้ดวงจิตแช่มชื้น[4] แก้อ่อนเพลีย[3-5] แก้ไข้กาฬ[3,4] บำรุงครรภ์รักษา[3] แก้ไข้[3] พยุงหัวฝีและถอนไส้ฝี[3] แก้ร้อนใน[3] คุมกำเนิด[3] แก้ร้อนในกระหายน้ำ[4]

ใบ : แก้หูด[3] มีโปรตีนสูง[5] ช่วยย่อยอาหารพวกกรดไขมันที่อิ่มตัว[4]

ฝัก : แก้ไข้ร้อน[3] แก้หอบ[3] บำรุงกำลัง[3,4] แก้ร้อนในให้หอบ[4]

เมล็ด : บำรุงกำลัง[3] แก้ไข้[3] แก้หอบ[3] แก้อ่อนเพลีย[3] ช่วยในการย่อยกรดไขมันอิ่มตัวและช่วยเสริมวิตามิน A ให้กับร่างกาย[5]

ไม่ระบุส่วนที่ใช้ : บำรุงหัวใจ[3]

10. ข้อมูลการใช้ทางคลินิค –

11. ข้อมูลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

11.1 Patanjali, Sankhavaram R. และคณะ (1988)[7] ศึกษาถึงการจับกับเม็ดเลือดแดงของสาร acidic lectin จากถั่วพู โดย acidic lectin (WBA II) ซึ่งแยกได้จากสารสกัดหยาบของเมล็ดถั่วพู โดยวิธี Chromatography ซึ่งใช้ lactosylaminoethyl Bio-Gel โดยการจับของ WBA II กับเม็ดเลือดแดงกรุ๊ป A,B,O ถึง 10^5 receptor cell ซึ่งเป็นอัตราที่สูง (พบ 10^6-10^8 M^{-1}) มีการศึกษาถึงการแย่งจับกับ blood-group$^-$ specific lectin โดยพบว่า WBA II จะจับกับ H- และ T-antigenic determinant ในเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ โดยมีการศึกษาถึง affinity ด้วยวิธี Chromatography โดยใช้ A-, B-, H- และ T-antigenic determinant ซึ่งจับคู่กับ insoluble complex เพื่อยืนยันความจำเพาะ WBA II ต่อ H-, T-antigenic determinant โดยพบการยับยั้งการจับของ WBA II โดยใช้โมเลกุลน้ำตาล ซึ่งได้แก่ N-acetyl galactosamine และ T-antigenic disaccharide (Thomsen-Friendenreich antigen, Gal beta 1-3 Gal NAc) ซึ่งจับเป็นตัวยับยั้งที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ ที่มีฤทธิ์แรงสุด นอกจากนี้ยังพบการยับยั้งการจับ WBA II กับ intestine H-fucolipid ในเม็ดเลือดแดงสุนัขจึงพิสูจน์ได้ว่า lectin นั้นจับกับ H-antigenic determinant ได้

11.2 Bernard, Philippe และ Berthon, Jean Yves (2005)[8] ศึกษาการได้รับสารสกัดสมุนไพรถั่วพูที่ใช้เป็นตัว agents ในยา anti-inflammatory, antiviral และ anticarcinogene จากการรายงานการใช้สารสกัดทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับสาร triterpenes ในถั่วพู และพืชในตระกูลนี้ ซึ่งใช้เป็น agent anti-inflammatory และ anti carcrinogenes เช่นเดียวกับที่ใช้ในเครื่องสำอาง โรคที่เกี่ยวกับผิวหนังหรือส่วนประกอบของยา

11.3 Ezaka, Muneharu และคณะ (1994)[9] ศึกษาสาร hydroxyproline-rich glycoprotein จากเซลล์ถั่วพู โดยการเพิ่มปริมาณ glycoprotein ใน culture และแยกเอา glycoprotien ใน culture broth ซึ่ง hydroxyproline-rich glycoprotein จะใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับเครื่องสำอาง และยา

12. สารสำคัญที่มีในสมุนไพร

adipic acid, α-amino:[3,10]; agmatine; agmatine, N-6-methyl:[3,11]; alanine, phenyl: γ-glutamyl:[3,10]; apigenin-4'-7-O-β-D-rhamnoglucoside; apigenin-4'-O-rhamno-glucoside[3,12]; arachidic acid[3,13-15]; behenic acid[3, 13-16]; betulinic acid[3,17]; butyric acid, α-amino: ; butyric acid, γ-amino:[3,10]; cadaverine[3,11]; campesterol[3,15]; ethanolamine[3,10]; fatty acids[3,18]; flavone, 4'-7-dihydroxy: 4'-7-O-rhamnoglucoside; foeniculin[3,12]; glycolipids[3,18]; kaempferol-7-O-arabinoside[3,12]; lignoceric acid[3,15]; linoleic acid; linolenic acid[3,13-15]; luteolin-7-O-β-D-diglycoside; malvidin-3-O-rhamnosyl-5-O-β-D-glucoside; maritimetin[3,12]; myristic acid[3,14]; oleic acid;

palmitic acid[3,13-16]; palmitoleic acid[3,14]; phaseollidin[3,19,20]; phospholipids[3,18]; psophocarpin B-1[3,21]; posphocarpus lectin psophocarpus; tetragonolobus lectin (WBTL)[3,22]; pterocarpan 9-hydroxy-3-methoxy:[3,20]; putrescine[3,11]; quercetin, 3'-4'-5-7-tetramethoxy: 3-O-L-arabinoside; quercetin-3-O-β-D-glycoside; quercetin-3-O-rhamnoglucoside[3,12]; saccharopine[3,10]; β-sitosterol[3,15,17]; spermidine; spermidine, homo: ; spermine[3,11]; stachyose[3,23]; stearic acid[3,13-16]; stigmasterol[3,15]; α-tocopherol; β-tocopherol; δ-tocopherol[3,24]; trigonelline[3,25]; tyrosine, γ-glutamyl:[3,10]; verbacose[3,23]; vitexin; vitexin, iso:[3,12]; winged bean acidic lectin[3,26].

13. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ฤทธิ์ทำให้แพ้เหมือนฮีสตามีน กระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบ[3,27] ต้านออกซิเดชั่น[3,28] มีฤทธิ์จับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง[3,22,29-33] ยับยั้งเอนไซม์ chymotrypsin[3,34,35] trypsin[3,30,35-37] และ amylase[3,36] มีคุณค่าทางโภชนาการ[3,36,38-40] ทำให้ผายลม[3,41] การทดสอบความเป็นพิษ พบว่า เมื่อป้อนสารสกัดรากด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ (1:1) หรือฉีดเข้าใต้ผิวหนังให้หนูถีบจักร ขนาด 10 ก./กก. ไม่พบพิษ[3,42] เมื่อป้อนน้ำมันจากเมล็ด ให้หนูถีบจักรในขนาด 20 ก./กก. ไม่พบพิษเช่นกัน[3,14] เมล็ดดิบเป็นพิษต่อหนูขาว[3,29,38] ทำลายเยื่อบุทางเดินอาหาร โดยคาดว่าสาร lectin ไปจับกับเยื่อบุลำไส้[3,29]

14. ผลิตภัณฑ์ที่มีขายตามท้องตลาด

14.1.1 ชื่อผลิตภัณฑ์: -

14.1.2 บริษัทผู้ผลิต/ที่อยู่: -

14.1.3 บริษัทผู้จำหน่าย/ที่อยู่: -

14.1.4 ข้อบ่งใช้/ข้อควรระวัง: -

14.1.5 ปริมาณบรรจุ: -

14.1.6 ราคา: -

14.1.7 ปริมาณสารสำคัญ/สูตรผลิตภัณฑ์: -

14.1.8 ภาพประกอบของผลิตภัณฑ์: -

15. ภาพประกอบ

รูปที่ 1.12 *Psophocarpus tetragonolobus* (ถั่วพู) แสดงส่วนดอก[43]

รูปที่ 1.13 *Psophocarpus tetragonolobus* (ถั่วพู) แสดงส่วนผล[43]

รูปที่ 1.14 *Psophocarpus tetragonolobus* (ถั่วพู) แสดงส่วนทั้งต้น[44]

16. เอกสารอ้างอิง

1. อุดม รุ่งเรืองศรี.พจนานุกรมล้านนา-ไทย.ฉบับแม่ฟ้าหลวง (ปรับปรุงครั้งที่1). ภาควิชาภาษาไทย คณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่;2545.หน้า 296.
2. เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2 (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ.2544). สำนักพิมพ์ประชาชน.กรุงเทพฯ;2544.หน้า 436.
3. นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน(2). สำนักพิมพ์ประชาชน.กรุงเทพฯ;2541.หน้า 168-170.
4. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพร-รวมหลักเภสัชกรรมไทย. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ;2540.หน้า 223.
5. วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ประชุมทองการพิมพ์.กรุงเทพฯ;2536.หน้า 329-330.

6. จีรเดช มโนสร้อย, อรัญญา มโนสร้อย และอุดม รุ่งเรืองศรี. รายงานโครงการวิจัยการรวบรวมเลือกสรรและปริวรรตคัมภีร์ตำราแพทย์แผนไทยล้านนาและตำราสมุนไพรล้านนา. ระยะที่ 1-3 (ปีงบประมาณ 2546-2548) สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
7. Patanjali, Sankhavaram R.; Sajjan, S. Umadevi; Surolia, Avadhesha. Erythrocyte-binding studies on an acidic lectin from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*). Biochemical Journal. 1988; 252(3):625-31.
8. Bernard, Philippe; Berthon, Jean Yves. Procede with obtaining with extracts of leguminosees (fabacees) of type *Psophocarpus tetragonolobus* like agents anti-inflammatory drugs, antiviral and anticarcinogene [Machine Translation]. Patent: Fr. Demande. 2005:15pp.
9. Ezaka, Muneharu; Matsubara, Naomi; Hayakawa, Hiromi. A novel hydroxyproline-rich glycoprotein from winged bean cells. Patent: Kokai Tokkyo koho. 1994:4pp.
10. Ogawa T, Oka y, Sasaoka K. Free amino acids and related compounds in seeds and sprouts of winged bean *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. J Food Sci 1985;50(5):1503-4.
11. Matsuzaki S, Hamana K, Isobe K. Occurrence of N-6-methylagmatine in seeds of leguminous plants. Phytochemistry 1990;29(4):1313-5.
12. Lachman J, Rehakova V, Hubacek J, Pivec V. Flavonoid substances and saccharides in the seeds of winged bean *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. Sci Agric Bohemoslov 1982;14(4):265-78.
13. Devapalin V, Tanchararaux R, Arai K. Studies on untouched oil and fat resources in Thailand: *Psophocarpus tetragonolobus* L. (DC.) (winged bean). NRCT-JSPS Rattanakosin Bicentennial Joint Seminar On Chemistry Of Natural Products, Bangkok, Thailand, August, 2-6, 1982:41.
14. Famanvongse S, Munsakul S, Sthapitanonda K. Chemistry and processing characteristics of winged bean seed oil. J Natl Res counc Thailand 1982;14:93-103.
15. Fernando T, Bean G. A Comparison of the fatty acids and sterols of seeds of weedy and vegetable species of *Amaranthus spp.* J Amer Oil Chem Soc 1985;62(1):89-91.
16. Wijesundera RC, Wickeramage C. Fatty acids of winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. J Natl Sci Counc Sri Lanka 1983; 11(1):143-7.

17. Bunyarakwanich A. Isolation of organic compounds from *Psophocarpus tetragonolobus* DC. roots. MS Thesis, Chulalongkorn Univ, 1972.
18. Khor HT. Lipids and fatty acid composition of developing winged bean seeds. Phytochemistry 1985;24(4):856–7.
19. Ingham JL. Phaseollidin, a phytoalexin of *Psophocarpus tetragonolobus* Ibid 1978; 17: 165.
20. Preston NW. Induced pterocarpans of *Psophocarpus tetragonolobus*. Ibid 1977;16:2044–5.
21. Roy A, Singh M. Psophocarpin B–1, a storage protein of *Psophocarpus tetragonolobus*, has chrymotrypsin inhibitory activity. Ibid 1988; 27(1):31–4.
22. Shet MS, Murugiswamy B, Madaiah M.A lectin from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) tubers. Indian J Biochem Biophys 1985; 22(5):313–5.
23. Puwastien P, King RD. Changes in raffinose, stachyose, verbascose and α–galactosidose activity in germination winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC) Lebensm Wiss Technol 1984; 17(6):336–8.
24. De Lumen Bo, Fiad S. Tocopherols of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) oil. J Agr Food Chem 1982; 30(1):50–3.
25. Evan LS, Tramontano WA. Trigonelline and promotion of cell arrest in G2 of various legumes. Phytochemistry 1984;23(9):1837–40.
26. Hignchi M, Ohtani Y, Iwai K. Purification and characterization of acidic lection from winged bean seed. Agr Biochem 1986; 50(7):1847–53.
27. Mokkhasmit M, Ngarmwathana W, Sawasdi mongkol K, Permphiphat U. Pharmacological evaluation of Thai medicinal plants. (continued). J Med Ass Thailand 1971;54(7):490–504.
28. Tsuda T, Makino Y, Kato H, Osawa T, Kawakishi S. Screening for antioxidative activity of edible pulses. Biosci Biotech Biochem 1993;57(9):1606–8.
29. Higuchi M, Suga M, Iwai K. Participation of lection in biological effects of raw winged bean seeds in rats. Agric Biol Chem 1983;47(8):1879–86.
30. Beltran PG, Alberto SP, Arim RM. Anti–nutritional factors in some local beans. Philipp J Nutr 1983;36(2):76–82.
31. Du M–H, Spohr U, Lemieux RU. Molecular recognition. XV. The recognition of three different epitopes of the H–type human group and *Psophocarpus tetragonolobus* (winged bean). Glycoconjugate J 1994;11(5):443–61.
32. Bhatia HM, Allem Jr FH. Nonspecific seed agglutinins and blood–group specificity, a study of fifteen lectins. Vox Sanguinis 1962;7:83–5.

33. อัญชลี ตัณฑ์ศุภศิริ นรีรัตน์ กิตติมานนท์ กานดา วัฒโนกาส แฉล้ม จันทรศรี. สารเล็คทินจากพืชที่มีศักยภาพในการพิสูจน์เชื้อเบต้า-ฮีโมลัยติคสเตร็ปโตค็อคกับกลุ่มที่สำคัญทางการแพทย์. รามาธิบดีสาร 2535;15(1):54-62.
34. Tan NH, Rahim ZHA, Khor HT, Wong KC. Chymotrypsin inhibitor activity in winged beans (*Psophocarpus tetragonolobus*). J Agr Food Chem 1984;32(1):163-6.
35. Kortt AA. Comparative studies on the storage proteins and antinutritional factors from seeds of *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC from five South-East Asian countries. Qual Plants-Plant Foods Hum Nutr 1983;33(1):29-40.
36. Jaffe WG, Korte R. Nutritional characteristics of the winged bean in rats. Nutr Rep Int 1976;14(4):449-55.
37. Chan J, De Lumen BO. Biological effects of isolated trypsin inhibitor from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) on rats. J Agric Food Chem 1982;(1):46-50.
38. Rao PU, Belavady B. Chemical composition and biological evaluation of goa beans (*Psophocarpus tetragonolobus*). and their tubers. J Plant Foods 1979;3(3):169-74.
39. De Lumen BO, Gerpacio AL, Vohra P. Effects of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) meal on broiler performance. Poult Sci 1982; 61(6)1099-106.
40. Cheeke PR, Telek L, Carlsson R, Evans J. Nutritional evaluation with rats of leaf protein concentrates prepared from Amaranthus species and tropicalforages. Proc, Annu Meet-Am Soc Anim Sci, West Sect 1980;31:106-9.
41. Ravindran G. A study on the flatus potential of dietary fiber from some legumes. J Natl Sci Counc Sri Lanka 1990;18(2):127-32.
42. Mokkhasmit M, Swatdimongkol K, Satrawaha P. Study on toxicity of Thai medicinal plants. Bull Dept Med Sci 1971;12(2/4):36-65.
43. www.mytho-fleurs.com/ images/jardins_botanique...
44. www.nishioo.jp/kobana/ m_10/sikakumame.htm

ถั่วเหลือง

1. **ชื่อในตำรับยาล้านนา** : ถั่วเน่า[1]
2. **ชื่อในท้องถิ่นอื่น**
   - **2.1 ภาคเหนือ** : มะถั่วเน่า[2,3,5] ถั่วหนัง[3-5] ถั่วเน่า[3-5]
   - **2.2 ภาคกลาง** : ถั่วพระเหลือง[2-5] ถั่วแระ[2,4,5] ถั่วเหลือ[2-5]
   - **2.3 จีนแต้จิ๋ว** : เฮ็กตั่วเต่า[5] ฮึ่งตั่วเต่า[5]

3. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Glycine max* (L.) Merr.[1-5]

4. ชื่อภาษาอังกฤษ : Soybean[3], Soya bean[3-5]

5. ชื่อวงศ์ : LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE[2]

6. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : เป็นพืชล้มลุก ใบเป็นใบประกอบมีใบย่อย 3 ใบ ใบและต้นมีขน ดอกสีขาว หรือม่วงแดง ขนาดเล็กผล เป็นฝักมีขน และห้อยจากลำต้น ในฝักมีเมล็ด เมล็ดรูปไข่สีของเมล็ดมีได้ต่างๆ กัน ตั้งแต่เกือบขาว เขียวอมเหลืองถึงดำปนน้ำตาล[3-5]

7. ส่วนที่ใช้ : ราก[6] ใบ[3-5] ดอก[3-5] เมล็ด[3-5] เปลือกเมล็ด[3-5] กากเมล็ด[5]

8. ข้อบ่งใช้ทางเภสัชกรรมล้านนา –

ราก : เป็นยาถ่ายพยาธิ[6] แก้ถ่ายอุจจาระไม่ออก[6]

9. ข้อบ่งใช้ทางการแพทย์แผนไทย

ใบ : แก้เลือดออกบ่อยหรือหยุดยาก[3,5] แก้งูกัด[3-5] ห้ามเลือด[4]

ดอก : แก้ต้อกระจก[3-5]

เมล็ด : บำรุงม้าม[3-5] หล่อลื่นลำไส้เป็นยาระบาย[3-5] ขับปัสสาวะ[3-5] แก้ตานขโมย[3,5] แก้บิด[3-5] แก้สตรีมีครรภ์โดนพิษเฉียบพลัน[3,5] แก้แผลมีหนองเรื้อรัง[3,5] แก้บาดแผลภายนอกมีเลือดออก[3,5] ห้ามเลือด[4] บำรุงร่างกาย[4] เป็นอาหารสำหรับผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน[4]

เปลือกเมล็ด : บำรุงเลือด[3-5] ขับปัสสาวะ[3-5] แก้เหงื่อออกมาก[3,5] แก้วิงเวียนปวดศีรษะ[3-5] แก้แผลเปื่อยเน่าจากการนอนแช่ปัสสาวะ[3,5]

กากเมล็ด : กินแทนเนื้อสัตว์ป้องกันการอุดตันของไขมันในเส้นเลือด[5]

ไม่ระบุส่วนที่ใช้ : บำรุงไขมัน และทำให้เกิดกำลัง[3]

10. ข้อมูลการใช้ทางคลินิก

1. รักษาสตรีที่มีครรภ์ได้รับพิษอย่างเฉียบพลัน นอกจากน้ำนมถั่วเหลืองยังมีปริมาณแคลเซียมน้อย เกลือแร่น้อยส่วนวิตามินบีหนึ่ง และกรดนิโคตินิคค่อนข้างมาก จึงทำให้ความดันเลือดลดลง และขับปัสสาวะด้วย[5]

2. รักษาแผลที่มีหนองเรื้อรังที่เท้า โดยการเอาถั่วเหลืองล้างให้สะอาด เอาสิ่งเจือปนออกให้หมด แล้วนำไปบดให้ละเอียด ใส่สารกันบูดเล็กน้อย ก่อนที่จะทาต้องทำความสะอาดแผลก่อน แล้วจึงทาบนผ้าพันแผล ปิดแผล และเปลี่ยนยาวันละครั้ง ไม่ว่าจะเป็นแผลเรื้อรังที่นานก็สามารถหายได้[5]

3. รักษาโรคหูด โดยการเอาถั่วเหลืองมาเพาะให้แตกรากนำมาต้นกินจืดๆ วันละ 3 มื้อติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน และในวันที่สี่ก็ให้กินอาหารเป็นปกติ แล้วก็กินถั่วงอกเป็นอาหารเสริมได้ ผลปรากฏว่าไม่มีโรคอีก[5]

11. ข้อมูลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

11.1 Tsuruki, Takahiro และคณะ (2005)[7] ศึกษาการทำงานของ soymetide-4 ในการต้านโรคหัวล้าน ซึ่งเกิดจากสารเคมีในยาต้านมะเร็ง เหมือนกับ fMLP ที่แสดงผลเช่นเดียวกัน

11.2 Rozot, Roger และ Boulle, Christophe (2004)[8] ทำโลชั่นสำหรับผมที่มีส่วนผสมของสารประกอบ 2-alkylideneaminooxy acetamides สำหรับกระตุ้นให้ผมขึ้นหรือทำให้ผมร่วงน้อยลง

11.3 Tsuruki, Takahiro และคณะ (2003)[9] ศึกษาผลในการต้านโรคหัวล้านของ fMLP agonist peptide ที่ได้จากโปรตีนถั่วเหลือง

11.4 Park, Hyun Suk. (2003)[10] วิธีการเตรียมส่วนผสมสำหรับผมยาวโดยใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติ เช่น sweet potato, ถั่วเหลือง, ใบชาเขียว และไข่เป็ด เป็นต้น ซึ่งส่วนผสมที่เตรียมได้จะช่วยป้องกันผมร่วงและทำให้มีผมยาวสวย

11.5 Park, Ui Seok (2002)[11] ทำผลิตภัณฑ์บำรุงผมเพื่อกระตุ้นให้ผมขึ้นป้องกันผมร่วงและช่วยทำความสะอาดหนังศีรษะ ซึ่งเตรียมจากส่วนผสมของสมุนไพร เช่น ขิง กระเทียม เมล็ดหัวผักกาดขาว งาดำ ถั่วเหลือง และแครอท เป็นต้น

11.6 Kubota, kaneyoshi (2000)[12] การให้ยาด้วยการับประทานที่มีส่วนผสมของ soybean isoflavones สำหรับกระตุ้นให้ผมขึ้นซึ่งจากการทดลองกับผู้ชายที่หัวล้านและผมหงอกพบว่า สามารถป้องกันปัญหานี้ได้

11.7 Segelman, Alvin B. (2000)[13] ทำ hair lotion สำหรับป้องกันและรักษาผมร่วง ซึ่งมีส่วนผสมของ isoflavone ที่ได้จากการสกัดถั่วเหลือง ซึ่งมีฤทธิ์เหมือนฮอร์โมน estrogen

12. สารสำคัญที่มีในสมุนไพร

abscisic acid[3,14]; acetaldehyde; acetone[3,15]; adenine[3,16]; agmatine; agmatine, N-6-methyl:[3,17]; alanine; alanine, phenyl:[3,18]; allantoic acid[3,19]; allantoin[3,18,19]; amine, dimethyl: ; amine, iso-propyl: ; amine, methyl: ; amine, N-butry:[3,20]; α-amyrin[3,21]; β-amyrin[3,21,22]; antheraxanthin[3,23]; arabinitol, 2-carboxy:[3,24]; arginine; aspartic acid[3,18]; astragalin[3,25,26]; avenasterol, 7-dehydro:[3,27]; bacchara-12, 21-dien-3-β-ol[3,28]; benzofuro-(3-2-C)-furo-(3-2-

G)–(1)–benzopyran, 1,2,6(a),11,(a)–α–tetrahydro–6–(H): 6(a)––α–9–dihydroxy–2β–iso–propenyl): ; benzofuro–(3–2–C)–pyrano–(2–3–H)–(1)–benzopyran–6(a), 9–(11a–H)–diol–2, 2–dimethyl–2–(H)–6–(H): ; benzofuro–(3–2–C)–pyrano–(3–2–9)–(1)–benzopyran–7(a), 10–(12a–H)–diol, 3–3–dimethyl–3(H)–7–(H):[3,29]; benzoic acid, para–hydroxy:[3,30]; benzyladenine–3–O–β–D–glucoside; benzyladenine–7–O–β–D–glucoside[3,31]; biochanin A[3,32]; biotin[3,33]; bornesitol[3,34]; Bowman–Birk protease inhibitor[3,35–37]; butyrospermol[3,21,22]; cadaverine[3,17]; caffeic acid[3,30]; campesterol[3,38]; carboxylase, ribose–1, 5–diphosphate:[3,39]; carotene[3,23]; β–carotene[3,40,41];β–carotene, neo:[3,41]; chlorogenic acid; chlorogenin acid, neo:[3,42,43];chlorophyll[3,44]; choline[3,45]; choline, phosphatidyl:[3,46]; α–conglycinin[3,47]; β–conglycinin[3,47–49]; γ–conglycinin[3,50]; coproporphyrin[3,51]; coumaric acid, iso: p–coumaric acid:[3,30,42,43]; coumestrol[3,52–55]; croctin[3,23]; cycloartanol[3,21]; cycloartanol, 24–methylene; cycloartenol[3,21,22]; cyclobranol[3,21]; cystine[3,18]; daidzein[3,30,32,42,43,53,56–72]; daidzin[3,25,30,32,49,58,60,61,63–65,67,69–71,73–79]; daidzin, 6”–O–acetyl:[3,58,70,74,76,77]; daidzin, 6”–O–malonyl:[3,58,76,77,80]; daidzin, 6’–O–acetyl:[3,69];daidzin, acetyl:[3,64]; daidzin, malonyl:[3,64,81]; daizusaponin[3,82]; dammaradienol; dammarenol, 24–methylene:[3,21]; edi–pro–A[3,83]; ergost–4–en–3, 6–dione; ergost–4–en–3–one; ethylamine[3,20]; ethylene[3,85]; euphol[21]; ferulic acid[3,30,42,43]; ferulic acid, iso:[3,30]; ficaprenol 10; ficaprenol 11; ficaprenol 12[3,86]; fisetin[3,26]; flavone, 4’, 5, 7–triacetoxyiso: ; flavone, 4’, 5, 7–trimethoxyiso: ; flavone, 4’, 7–diacetoxyiso: ; flavone, 4’, 7–dimethoxyiso:[3,61]; flavonol–3–O–β–D–glucoside[3,87]; flazin[3,88];formononetin[3,32,42,43]; fructose[3,89]; fucosterol, iso:[3,27]; galactopinitol[3,90]; genistein[3,30,32,42,43,53,56–61,63–72,76,77,79,91,92]; genistin[25,30,32,49,58,60–65,67,69–71,73–75,77–79,93,94]; genistin, 6”–O–acetyl:[3,58,70,74,76,77,95]; genistin, 6”–O–malonyl:[3,58,76,77,80]; genistin:[3,64]; genistin, malonyl:[3,64,81]; gentisic acid[3,30]; glucose[3,89]; β–D–glucose: 1–O–feruloyl: ; β–D–glucose: 1–O–p–coumaroyl[3,96]; glutamic acid[3,18]; gly–M–BD–3–K[3,97]; glyceollin IV[3,98]; glycetin[3,58];Glycine max lectin[3,99–101]; Glycine max trypsin inhibitor[3,102]; glycine oligosaccharide[3,103]; glycinin[3,47,49]; glycinoprenol 9, glycinoprenol 10; glycinoprenol 11;[3,86]; glycitein[3,77]; glycitein–7–O–β–D–(6”–O–acetyl)–glucoside[3,74]; glycitein–7–O–β–D–glucoside[3,49,67,74]; glycitin[3,58,60,64,76,77]; glycitin, 6”–O–acetyl:[3,58,76,77];glycitin, 6”–O–malonyl:[3,58,76,77,80]; glycitin, acetyl: glycitin, malonyl:[3,64]; gossypol[3,104]; hexan–1–al[3,15]; hispidol[3,105]; histidine[3,18]; hydroxylase, cinnamic acid 4:[3,106]; indole–3–acetic acid[3,14,107]; inositol, chiro:[3,108]; inositol, myo:[3,89,108]; invertase, acid:[3,109]; isoenzyme, Co–A–ligase 1: ; isoenzyme, Co–A–ligase 2:[3,110]; isozyme, para–coumarate[3,106]; jasmonic acid[3,111]; kaempferol[3,26,32,42,43,112]; kaempferol–3–O–β–D–2–(glucosyl–gentiobioside); kaempferol–3–O–β–D–2–(glucosyl–rutinoside); kaempferol–

3-O-β-D-2-(rhamnosyl-gentiobioside); kaempferol-3-O-β-D-gentiobioside[3,87]; kaempferol-3-O-β-D-rutinoside[3,25]; kaempferol-3-O-gentiobiside; kaempferol-3-O-glucosyl-gentiobioside; kaempferol-3-O-glucosyl-rutinoside; kaempferol-3-O-neohesperidoside; kaempferol-3-O-rhamnosyl-gentiobioside; kaempferol-3-O-rhamnosyl-rutinoside; kaempferol-3-O-rutinoside; kaempferol-E-O-β-D-neohesperidoside[3,87]; lanosterol; lanosterol, 24-methylene-24-dihydro:[3,21]; leucine; leucine, iso:[3,18]; lignin[3,113]; linoleic acid[3,114-117]; linolenic acid[3,114,116,117]; lipoxygenase[3,15]; liquiritingenin, iso:[3,118]; lupeol[3,21,22]; lutein[3,23]; lyase, phenylalanine-ammonia:[3,106]; lysine[3,18]; methanol[3,15]; methionine[3,18]; neoxanthin[3,23]; nicotianamine[3,119]; nicotiflorin[3,87]; nitrogenase[3,120]; nodulin26[3,121]; oleic acid[3,44-117]; ononin[3,25]; ononitol[3,108]; (+)-D-onoitol[3,35]; oxalic acid[3,122]; palmitic acid[3,114,116]; parkeol; parkeol, 24-methylene-24-dihydro:[3,21]; pentan-1-al; pentane[3,15]; perlolidin[3,88]; phaseic acid, dihydro: aldopyranoside[3,123]; phenethylamine, N-methyl:[3,20]; phytic acid[3,124-126]; phytohemagglutinin[3,127]; pinitol[3,108]; (+)-pinitol[3,89,128]; proline[3,18]; propanol[3,15]; protein[3,129]; protocatechuic acid[3,30]; pterocarpan, (6 ar, 11 ar)-3, 6(a), 9-trihydroxy:[3,98]; purine, 6-(4-O-β-D-glucosyl-3-methyl-trans-but-2-enyl-amino):[3,130]; putresicne[3,17]; quercetin[3,42,43]; quercetin-3-O-β-D-2-(glucosyl-rutinoside)[3,87]; quercetin-3-O-β-D-sophoroside[3,87]; quercetrin, iso:[3,25]; raffinose[3,79,131]; rutin[3,25]; salicylic acid[3,30]; sapogenol C[3,132]; sequoyitonl[3,34]; serine[3,18]; simiraenol[3,21]; sinapic acid[3,30]; Soja hispida isoflavone glucoside D; hispida isoflavone glucoside E[3,62]; Soja hispida lectin[3,133]; Soja hispida saponin C; Soja hispida saponin C-1; Soja hispida saponin C-2[3,62]; sojagol[3,55]; sophoraflavanoloside[3,87]; soyasapogenol A[3,134-136]; soyasapogenol B[3,78,134-137]; soyasapogenol B-1[3,134,138]; soyasapogenol C[3,134]; soaysapogenol E[3,134,135]; soyasaponin A-1[3,136,139-147]; soyasaponin A-1, acetyl:[3,148,149]; soyasaponin A-2[3,136,141-147]; soyasaponin A-2, acetyl;[3,148,149]soyasaponin A-3[3,136,146]; soyasaponin A-3, acetyl:[3,149]; soyasaponin A-4[3,136]; soyasaponin A-4, acetyl;[3,148,150]; soyasaponin A-5[3,136]; soyasaponin A-5, acetyl:[3,148,150]; soyasaponin A-6[3,136]; soyasaponin A-6, acetyl:[3,150]; soyasaponin A-C; soyasaponin A-D[3,148]; soyasaponinα-G[3,151]; soyasaponin B-1[3,80,144]; soyasaponin B-B[3,80]; soyasaponin B-D; soyasaponin B-E[3,152]; soyasaponin β-A[3,151]; soyasaponin β-G[3,153]; γ-soyasaponin G; soyasaponin γ-G[3,151]; soyasaponin I[3,78,135,142,143-147,149,150,152,154-159]; soyasaponin II, soyasaponin III[3,78,135,142-147,149,150,152,154-159]; soyasaponin IV[3,146,160]; soyasaponin V[3,136,146,152]; soyasaponin VI[3,158]; soyatoxin[3,161]; soybean 7-(S)-A-antigen[3,50,161]; soybean 7-(S)-B-antigen[3,50]; soybean lectin[3,162]; soybean saponin A-1[3,79]; soybean saponin AA; soybean saponin AB[3,79,163]; soybean saponin AG[3,163;] soybean saponin BA; soybean saponin BB[3,79,163]; soybean saponin

BEA[3,164]; soybean saponin BG[3,163]; spermidine; spermidine, homo; spermine[3,17]; squalene[3,165]; stachyose[3,79,131,166]; starch[3,167]; stearic acid[3,116]; stigmast-4-en-3, 6-dione; stigmast-4-en-3-one; stigmasta-4, 22-dien-3-6-dione; stigmasta-4, 22-dien-3-one[3,84]; stigmasta-4, 6-dien-3-one; stigma-stenone[3,21]; stigmasterol[168]; syringic acid[3,30]; tannic acid[3,122]; taraxasterol; taraxasterol, pseudo; taraxerol[3,21]; threonine[3,18]; tirucalla-7, 24-dien-3, β-ol; tirucallol[3,21]; α-tocopherol; β-tocopherol; δ-tocopherol; δ-tocopherol:[3,71]; trigonelline[3,169-171]; tyrosine[3,18]; UDP-glucose; UDP-xylose[3,172]; uroporhyrin[3,51]; vanillic acid[3,30]; violaxanthin[3,23]; vitamin A[3,173]; vitamin B-2[3,174]; vitamin E[3,168]; zeatin riboside, O-β-D-glucosyl-dihydro: ; zeatin riboside, O-β-D-glucosyl: ; zeatin, O-β-D-glucosyl-dihydro: ; zeatin, O-β-D-glucosyl:[3,175.]

13. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

มีฤทธิ์ของเลคติน[3,176-241] ทำให้เซลล์รวมตัวเป็นก้อน[3,131,235,242-257] ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด[3,258-260] ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด[3,261] ยับยั้งการแข็งตัวของเลือด[3,262,263] เพิ่มการสลายตัวของ fibrin[3,264] มีคุณค่าทางโภชนาการ[3,265-544] กระตุ้นการเจริญเติบโต[3,331,339,341,342,545-561] เพิ่มการหลั่ง growth hormone[3,562,563] กระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นไม้[3,546-566] กระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย[3,567-569] ทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น[3,570-572] กระตุ้นการแบ่งเซลล์[3,573] กระตุ้นการพัฒนาของเซลล์เม็ดเลือดขาว[3,574] กระตุ้น differentiation ของ macrophage[3,575] มีสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ[3,576-580] ทำให้น้ำหนักตัวลด[3,581-583] ยับยั้งการเจริญเติบโต[3,584-594] ยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง[3,595] ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช[3,596,597] ยับยั้งการสร้าง DNA[3,598,599] ลด growth hormone[3,600] ทำให้ชีวิตยืนยาวขึ้น[3,598] มีผลต่อการพัฒนาของอวัยวะต่างๆ[3,601] ป้องกันการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ[3,341] ลดคอเลสเตอรอลในเลือด[3,363,563,581,602-719] ยับยั้งภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง[3,720-728] เพิ่มคอเลสเตอรอลในเลือด[3,589-724,729-739] ลดไขมันในเลือด[3,468,721,722-745] เพิ่มไขมันในเลือด[3,589,724] ลดระดับ HDL (high density lipoprotein) ในเลือด[3,630,656,657,397,698,745] เพิ่มระดับ HDL ในเลือด[3,621,625-627,629,640,645,658,678,680,683,693,696,701,745,746] ลดระดับ LDL (low density lipoprotein) ในเลือด[3,619,621,622,625,639,640,645,657,674,676,683,701,704,709,712,745] เพิ่มระดับ LDL ในเลือด[3,734,736,737] เพิ่มระดับ VLDL (very low density lipoprotein) ในเลือด[3,747] ลดระดับ VLDL ในเลือด[3,682] ลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด[3,261,581,619,632,635,639,641,678,683,693,711,713,742,748-754] เพิ่มระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด[3,709,735,755,756] ลดระดับ phospholipids ในเลือด[3,640,641,678,709,713,735,742,743,751] เพิ่มระดับกรดไขมันในเลือด[3,755] ลดระดับไขมันในเนื้อเยื่อต่างๆ[3,741,743,751,757-761] เพิ่มระดับไขมันในเนื้อเยื่อต่างๆ[3,762-768] เพิ่มปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในตับ[3,756] ลดปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในตับ[3,633,690,696,713,750,754,768-770] เพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลในตับ[3,637,671,730,731,733] ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในตับ[3,612,613,621,633,641,666,673,674,713,759,771] ลดปริมาณ phopholipid ในตับ[3,772] มีผลต่อเมตาบอลิสมของ

คอเลสเตอรอล[3,614,615,654,666,671,736,747,773-797] และฤทธิ์อื่นๆ เช่น มีผลต่อเมตาบอลิสมของกรดไขมัน มีผลต่อเมตาบอลิสมของไขมัน ลดการสร้างไขมัน เพิ่มการสร้างไขมัน ยับยั้งเอ็นไซม์ lipase เพิ่มฤทธิ์ของเอ็นไซม์ lipase ลดระดับไขมันในน้ำนม เพิ่มระดับไขมันในน้ำนม เพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลในลำไส้ใหญ่ เพิ่มการขับทิ้งคอเลสเตอรอล ลดการดูดซึมคอเลสเตอรอล เพิ่มการขับทิ้งสารพวกsterol เพิ่มการดูดกลับเกลือน้ำดี เพิ่มการขับทิ้งกรดน้ำดี เพิ่มการขับทิ้งไขมัน เพิ่มการขับทิ้งไตรกลีเซอร์ไรด์ในน้ำดี ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในน้ำดี เปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของไขมันในน้ำดี ลดการเกิดนิ่วในถุงน้ำดี ลดการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน เพิ่มการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน เพิ่มการสร้างคีโตน ทำให้ตับโต ลดปริมาณ Apo-A-I เพิ่มปริมาณ Apo-A-I เพิ่มปริมาณ Apo-B ต้านการเป็นพิษต่อตับ เพิ่มการสะสมของคอเลสเตอรอลที่ผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดการตีบของหลอดเลือด ทำให้เกิดการตีบของหลอดเลือดลดลง ทำให้กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ เกิด fibrosisและเป็นแผล ทำให้หลอดเลือดขยาย ลดความดันโลหิต ลดแรงบีบตัวของหัวใจ ลดการสะสมคอเลสเตอรอลในหัวใจ เพิ่มการบีบตัวของหัวใจ เพิ่มความดันโลหิต ทำให้หลอดเลือดหดตัว เพิ่มระดับอินซูลินในเลือด ลดระดับน้ำตาลในเลือด เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด ยับยั้งการหลั่งอินซูลิน เพิ่มการหลั่งกลูคากอน ยับยั้งการหลั่งกลูคากอน ยับยั้นการดูดซึมกลูโคส กระตุ้นเมตาบอลิสมของกลูโคส เพิ่มการหลั่งsomatostatin เพิ่มระดับอัลบูมินในเลือด เพิ่มการสร้างน้ำนม กระตุ้นการหลั่งน้ำนม มีฤทธิ์เหมือนเอสโตรเจน มีฤทธิ์ต้านเอสโตรเจน กระตุ้นการพัฒนาอวัยวะเพศ มีฤทธิ์การต้านฮอร์โมนของต่อมธัยรอยด์ ทำให้ต่อมธัยรอยด์โต เพิ่มฤทธิ์ของธัยรอกซิน เป็นพิษต่อต่อมธัยรอยด์ กดการเกิดhyperparathyroidism เพิ่มระดับ Cytochrome P-450 ที่ตับ กระตุ้นฤทธิ์ของเอ็นไซม์aminopyrine-N-demethylase ยับยั้งฤทธิ์ของเอ็นไซม์NADH Cytochrome P-450 reductase กระตุ้นฤทธิ์ของเอ็นไซม์ glutathione-S-transferase ยับยั้นฤทธิ์ของเอ็นไซม์ glutathione-S-transferase กระตุ้นเอ็นไซม์ UDP-glucuronyl trans-ferase กระตุ้นฤทธิ์ของเอ็นไซม์ aniline hydroxylase กระตุ้นฤทธิ์ของเอ็นไซม์ epoxide hydroxylase tyrosine amino tranferase alkaline phosphatase และ ornithine transcarbamylase ยับยั้งเอ็นไซม์ ornithine decarboxylase alanine transaminase orotidine 5-phosphate decarboxylase และ ethoxy coumarin deethylase รักษาโรคตับ กระตุ้นการทำงานของตับ กระตุ้นการ regeneration ของตับ กระตุ้นการสร้างสารลดแรงตึงผิวที่ปอด ทำให้ตับอ่อนโต กระตุ้นเอ็นไซม์ของตับอ่อน กระตุ้นการหลั่ง cholecystokinin กระตุ้น pancreatopeptidase ลดฤทธิ์ของ pancreatic lipase กระตุ้นฤทธิ์ของ pancreatic amylase ยับยั้งฤทธิ์ amylase มีฤทธิ์ของ amylase ลดการหลั่งเอ็นไซม์จากตับอ่อน ยับยั้ง protease ยับยั้งเอ็นไซม์ trypsin ยับยั้งเอ็นไซม์ elastase มีผลต่อเมตาบอลิสมของพรอมสตาแกลนดิน ยับยั้งการอักเสบ กระตุ้น lipoxygenase กระตุ้นการสร้าง interleukin 1 กระตุ้นการสร้าง interleukin 2 ต้านฮีสตามีน ยับยั้ง kakkikrein ทำให้แพ้ กระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนในถั่วเหลือง กระตุ้น phagocytosis กระตุ้นการทำงานของ macrophage ยับยั้ง cathepsin G เพิ่มจำนวนของเกร็ดเลือด เพิ่ม fluidity ของผนังเกร็ดเลือด เสริมฤทธิ์ของ killer cell ยับยั้งการสร้าง complement C2 กระตุ้น chemotoxis ลดการทำงานของ

ระบบภูมิคุ้มกัน กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ยับยั้งการหลั่งสารของกระเพาะอาหาร ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร แก้ท้องเสี กระตุ้นการทำงานของแบคทีเรียในลำไส้ ทำให้ลำไส้เล็กใหญ่ขึ้น ลดการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก ยับยั้งการดูดซึมของลำไส้เล็ก มีผลต่อการพัฒนาของลำไส้เล็ก รักษาริดสีดวงทวาร รักษา homocystinuria เพิ่มระดับ BUN (blood urea nitrogen) เพิ่มความทนต่อภาวการณ์ขาดออกซิเจน ก่อให้เกิดมะเร็ง ส่งเสริมการเกิดเนื้องอก ยับยั้งเนื้องอก ยับยั้งมะเร็ง เพิ่มมวลของกล้ามเนื้อ ต้านการล้า เพิ่มแคลเซียมในกระดูก ลดแคลเซียมในกระดูก ลดการสะสมแคลเซียมที่ไต ลดกระดูกผุ ยับยั้งการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้เล็ก มีผลต่อเมตาบอลิสมของแร่ธาตุ เพิ่มวิตามินเอ ลดความเข้มข้นของวิตามินเอในเลือด ลดระดับวิตามินอี มีวิตามินบี มีวิตามินบี 12 ก่อกลายพันธุ์ ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ เป็นพิษต่อเซลล์ ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ มีฤทธิ์ superoxide dimutase กระตุ้น superoxide dismutase มีฤทธิ์ catalase ยับยั้งการสร้าง superoxide ต้านออกซิเดชั่น ป้องกันผลของรังสี กระตุ้น microsomal oxidase ของแมลง เปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเนื้อเยื่อประสาน ต้านบวม เพิ่มกรดยูริคในเลือด กระตุ้นฤทธิ์ของ urease ต้านเชื้อรา ต้านยีสต์ ต้านแบคทีเรีย ยับยั้งเอ็นไซม์ β-glucuronidase ในแบคทีเรีย ต้านจุลชีพ ต้านไวรัส เร่งการเจริญของ anaerobic yeast ต้านความเครียด เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้ ป้องกันฟันผุ รักษาเหงือกอักเสบ มีกลิ่นดูดหนู มี heat shock protein ต้านความแก่ ใช้เป็น antiaging cream ใช้ในเครื่องสำอาง การสร้างอสุจิบกพร่อง กระตุ้นเอ็นไซม์ cAMP phosphodiesterase กระตุ้นเอ็นไซม์ protein kinase กระตุ้น dopamine-β-hydroxylate ยับยั้ง Na+-K+ ATPase, adenylate cyclase และ cholinesterase เพิ่ม neurotensin เพิ่มระดับ biogenic amine ในสมองฆ่าหมัด

การทดสอบความเป็นพิษ พบว่า ฉีดสาร saponin ที่สกัดจากถั่วเหลืองเข้าช่องท้องหนูขาวขนาด 100 มก/กก ไม่เกิดพิษ มีผลต่อทารกในครรภ์ เป็นเพิษต่อตับ ทานน้ำมันถั่วเหลืองทำให้เกิดพิษ ถั่วเหลืองดิบใช้เป็นอาหารไก่ ลูกหมู หนู และแมลง จะเกิดพิษทำให้ชะลอการเจริญเติบโต และความผิดปกติกับอวัยวะภายใน สาร lysinolamine จากถั่วเหลือง เป็นพิษต่อไตหนูขาว สาร lectin มีผลต่อเมตาบอลิสมของไขมัน ทำให้เกิดเปอร์ออกซิเดชั่นของไขมันจนเกิดเป็นพิษ สารสกัดถั่วเหลืองด้วยกรดเกลือ สกัดด้วย trichloroethylene เป็นพิษ พิษของถั่วเหลืองทำให้ตายได้ ถั่วเหลืองเป็นพิษกับตัวอ่อนแมลง สารสกัดจากรากและใบเป็นพิษต่อพืชอื่นด้วย

14. ผลิตภัณฑ์ที่มีขายตามท้องตลาด

14.1 Shampoo, Soy Fragrance-Free, Organic[798]

14.1.1 ชื่อผลิตภัณฑ์:	Shampoo, Soy Fragrance-Free, Organic
14.1.2 บริษัทผู้ผลิต/ที่อยู่:	Shop Natural ™ 350 S. Toole Avenue Tucson, Arizona 85701 USA
14.1.3 บริษัทผู้จำหน่าย/ที่อยู่:	www.shopantural.com
14.1.4 ข้อบ่งใช้/ข้อควรระวัง:	ช่วยทำให้ผมแข็งแรง ช่วยซ่อมแซมผม

	และทำให้ผมมีชีวิตชีวา เป็นประกายเงางามใช้ได้กับทุกสภาพเส้นผม
14.1.5 ปริมาณบรรจุ:	12 oz.
14.1.6 ราคา:	–
14.1.7 ปริมาณสารสำคัญ/สูตรผลิตภัณฑ์:	Certified organic lemon verbena hydrosol, certified organic lavender hydrosol, infusion of certified organic marshmallow, horsetail, cucumber, witch hazel, chamomile, and echinacea, olefin sulfonate, cocamidopropyl betaine, sodium myreth sulfate, cocamide MEA, methyl glucose dioleate, hydrolyzed soy protein (non–GMO), certified organic aloe vera, certified organic yucca extract, panthenol (B5), hydrolyzed wheat protein, hydrolyzed wheat starch, soyamidopropalkonium chloride (soy – non–GMO), disodium EDTA, grapefruit seed extract
14.1.8 ภาพประกอบของผลิตภัณฑ์:	–

รูปที่ 1.14 ผลิตภัณฑ์ Shampoo, Soy Fragrance–Free, Organic จากสารสกัดถั่วเหลือง[798]

14.2 Derma e Papaya and Soy Milk Shampoo[799]

14.2.1 ชื่อผลิตภัณฑ์: Derma e Papaya and Soy Milk Shampoo

14.2.2 บริษัทผู้ผลิต/ที่อยู่: Clear Remedies, Inc. Toll Free: (866) 305-8728

14.2.3 บริษัทผู้จำหน่าย/ที่อยู่: www.crigifts.com

14.2.4 ข้อบ่งใช้/ข้อควรระวัง: ช่วยบำรุงเส้นผม ทำให้ผมงอกงาม สุขภาพแข็งแรงและช่วยทำให้ผมเสียกลับมามีสภาพที่ดีเหมือนเดิม มีคุณสมบัติอ่อนโยนสามารถสระได้ทุกวัน และยังช่วยรักษาสีผมด้วย

14.2.5 ปริมาณบรรจุ: 8 oz.

14.2.6 ราคา: $6.75

14.2.7 ปริมาณสารสำคัญ/สูตรผลิตภัณฑ์: Purified Water, Panthenol, Citric Acid, Cocamide DEA, Cocamidopropyl Betaine, Ammonium Lauryl Sulfate, Glycerin, Papaya Extract, Soy Milk, Lavender Oil, Rosemary Oil, Chamomile Extract, Tocopheryl Acetate (Vit. E), Sodium Chloride, Citricidal®, Phenoxyethanol, Fragrant Oils (Essential Oils).

14.2.8 ภาพประกอบของผลิตภัณฑ์: -

รูปที่ 1.15 ผลิตภัณฑ์ Derma e Papaya and Soy Milk Shampoo จากสารสกัดถั่วเหลือง[799]

15. ภาพประกอบ

รูปที่ 1.16 *Glycine max* (ถั่วเหลือง) แสดงส่วนของทั้งต้น[800]

16. เอกสารอ้างอิง

1. อุดม รุ่งเรืองศรี.**พจนานุกรมล้านนา-ไทย** ฉบับแม่ฟ้าหลวง (ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 1). ภาควิชาภาษาไทย คณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.เชียงใหม่;2547.หน้า 307.
2. เต็ม สมิตินันท์. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 2 (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ.2544). สำนักพิมพ์ประชาชน.กรุงเทพฯ;2544.หน้า 257.
3. นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร.**สมุนไพรไม้พื้นบ้าน(2)**. สำนักพิมพ์ประชาชน.กรุงเทพฯ;2541.หน้า 209.
4. วุฒิ วุฒิธรรมเวช.**สารานุกรมสมุนไพร-รวมหลักเภสัชกรรมไทย**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.กรุงเทพฯ;2540.หน้า 224.
5. วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม.**พจนานุกรมสมุนไพรไทย**.พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ประชุมทองการพิมพ์.กรุงเทพฯ;2536.หน้า 337.
6. จีรเดช มโนสร้อย, อรัญญา มโนสร้อย และอุดม รุ่งเรืองศรี. **รายงานโครงการวิจัยการรวบรวมเลือกสรรและปริวรรตคัมภีร์ตำราแพทย์แผนไทยล้านนาและตำราสมุนไพรล้านนา**. ระยะที่ 1-3 (ปีงบประมาณ 2546-2548) สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 337.
7. Tsuruki, Takahiro; Takahata, Kyoya; Yoshikawa, Masaaki. Anti-alopecia mechanisms of soymetide-4, an immunostimutating peptide derived from soy β-conglycinin. ***Peptides*** (New York, NY, United States). 2005; 26(5):707-711.

8. Rozot, Roger; Boulle, Christophe. Compositions containing 2–alkylideneaminooxyacetamides for stimutation of hair growth and/or for slowing down hair loss. **Patent**: Fr. Demande. 2004:35pp.
9. Tsuruki, Takahiro; Yoshikawa, Masaaki; Takahata, Kyoya. Anti–alopecia effect of an fMLP agonist peptide derived from soybean protein. ***Fragrance Journal***. 2003; 31(2):46–50.
10. Park, Hyun Suk. Hair–growing composition and production there of. **Patent**: Korean KongKae Tacho Kongbo. 2003.
11. Park, Ui Seok. Production of hair tonic for purpose of promotion of hair growth, prevention of depilation and clecning of scalp. **Patent**: Korean Kongkae Tacho Kongbo. 2002.
12. Kubota, Kaneyoshi. Oral compositions containing soy isoflavones to stimcelate hair growth. **Patent**: Jpn. Kokai Tokkyo Koho. 2000:3pp'
13. Segelman, Alvin B. Use of isoflavones to prevent hair loss and preserve the integrity of existing hair. **Patent**: U.S. 2000:5pp.
14. Murakami – Mizukami Y, Yamamoto Y, Yamaki S. Analyses of indoleacetic Acid and adscisic acid contents in nodules of soybean plants bearing va mycorrhizae. ***Soil Sci Plant Nutr*** (Tokyo) 1991; 37(2):291–8.
15. Honig DH,Rackis JJ. Volatile components of maturing soybeans. ***Cereal Chem*** 1975;52:396.
16. Yokozawa T, Nakagawa H, Oura H. Free adenine content of soybean cultivated in Hokkaido. ***Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*** 1985; 38(2):129–33.
17. Matsuzaki S,Hamana K, Isobe K. Occurrence of N6–methylagmatine in seeds of leguminous plants. ***Phytochemistry*** 1990;29(4):1313–5.
18. Seraya LM, Kovalev VN, Zhagunove GP,Khaleeva LD. Nitrogen–containing compounds of *Glycine hispida*. ***Khim Prir Soedin*** 1983;19(5):633.
19. Matsumoto T, Yatazawa M, Yamamoto Y. Distrubution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non–nodulating soybean plants. ***Plant Cell Physiol*** 1977;18:353.
20. Neurath GB,Dunger M,Pein FG, Ambrosius D, Schreiber O. Primary and secondary amines in the human environment. ***Food Cosmet Toxicol*** 1977;15:275–82.

21. Akihisa T,Kumura Y,Roy K, Ghosh P, Thakur S, Tamura T. Triterpene alcohols and 3–oxo steroids of nine Leguminosae seeds.***Phytochemistry*** 1994;35(5):1309–13.

22. Kajimoto G, Shibahara A. Changes in 4,4'–dimethylsterrol compositions in some oil seeds during maturation. ***Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*** 1983;36(6):499–505.

23. Takagi S. Determination of green leaf carote–noids by HPLC. ***Agr Biol Chem*** 1985;49(4):1211–3.

24. Moore BD,Isidoro E,Seemann JR. Distribution of 2–carboxyarabinitol among plants. ***Phytochemistry*** 1993;34(3):703–7.

25. Kovalev VN,Seraya LM. Flavonoids of *Glycine hispida*. ***Chem Nat comp*** 1984;20(5):626–7.

26. Gaynor JD,Buttery BR,Buzzell RI,Mac Tavish DC. HPLC separation and relative quantitation of kaempferol glycosides in soybean.***Chro–matographia*** 1988;25(12):1049–53.

27. Tiscornia E,Bertini GC.Composition of the sterol fractions of Arachis hypogaea and Soja hispida. ***Riv Soc Ital Sci Aliment*** 1974;3:109.

28. Akihisa T,Kimura Y, Tamura T.Bacchar 12, 21 –dien–3– β – ol from the seeds of *Glycine max*. ***Phytochemistry*** 1994;37(5):1413–5.

29. Lyne RL,Mulheirn LJ,Leworthy DP.New pterocarpinoid pkytoalexins of soybean.***Chem Commun*** 1976:497.

30. Seo A,Morr CR.Improved higperformance liquid chromatographic analysis of phenolic acids and isoflavonoids from soybean probean products. ***J Agr Food Chem*** 1984;32(3):530–3.

31. Van Staden J, Drewes FE.The stability and metabolism of benzyladenine glucosides in soybean callus.***J Plant Physiol*** 1992;140(1):92–5.

32. Nagem TJ, Albuqueque TTO, Miranda LCG,Silva MC.Flavonoids in cultivars of soybean:antioxidant action.***South Braz J Chem*** 1993;1(1):11–22.

33. Filippov V, Ii'ina M.The state of biotin in plant material.***Dokl Akad Nauk SSSR*** 1954;95:1267–70.

34. Binder RH, Haddon WF.Cyclitols of soybean leaves.***J Agr Food Chem*** 1984;32(3):85–7.

35. Kennedy AR,Szuhaj BF,Mewberne PM,Billings PC.Preparation and production of a cancer chemopreventive agent,Bowman–Birk inhibitor concentrate.***Nutr Cancer*** 1993;19(3):281–302.

36. Billings PC,Habres JM.A growth–regulated protease activity that is inhibited by the anticarcinogenic Bowman–Birk protease inhibitor.***Proc Nat Acad Sci***(USA)1992;89(7):3120–4.

37. Kennedy AR,Billings PC,Maki PA,Newberne P.Effects of various preparations of dietary protease inhibitors on oral carcinogenesis in hamsters induced by DMBA.***Nutr Cancer*** 1993;19:191–200.

38. Katagiri M, Katagiri C.Sterol composition of leguminous seeds.***Kiyo–Iida Joshi Tanki Daigaku*** 1988;9:34–8.

39. Yamaya T, Ojima K,Ohira K.Studies on the greening of cultured soybean and ruta cells. II. Photosynthetic activities of the cultured green calls.***Soil Sci Plant Nutr*** (Tokyo) 1977;23:59–66.

40. Baszynski T.Vegetabie oils as a Source of provitamin A (beta–carotene). ***Acta Soc Bot Pol*** 1954–23:17.

41. Rao CN.True vitamin A value of some vegetables.***J Nutr Diet*** 1967;4:10.

42. Seraya LM, Kovalev VN,Tymchuk NF,Phenolic compounds of *Glycine hispida*. ***Chem Nat Comp*** 1983;4:503–4.

43. Serya LM, Kovalev VN,Tymchuk NF.Phenolic compounds of *Glycine hispida*.***Khim Prir Soedin*** 1983;19(4):503–4.

44. Batlle AMDC, Tigier HA,Llambias EBC,Wider de Xifra EA.Biosynthesis of porphyrins in soybean callus. XIV.Changes in the activity of the δ–amino dehydrdratase with the growth conditions.***An Asoc Quim Argent*** 1975;63:305.

45. Mc Elroy LW,Rigney HA,Draper HH.Choline content of live stock feeds used in Western Cannda.***Sci Agr*** 1948;28:268–71.

46. Palaveea T,Gurdev M,Popov A.Lecithin from Bulgarian soybean.***I Maslo Sapunena Prom*** 1974;11:1.

47. Dreau D,Larre C,Lalles JP.Semi–quantitative purification and assessment of purity of three soybean proteins–glycinin,β–conglycinin and α–conglycinin–by SDS–page electrophoresis,densitometry and immunoblotting.***J Food Sci*** 1994;31(6):89–93.

48. Koshiyama I,Fukushima D.Identification of the 7S-globulin with β - conglycinin in soybean seeds. ***Phytochemistry*** 1976;15:157-9.

49. Cole KD,Cousin Jr SL. Size exclusion chro-matography of soybean proteins and isoflavones.***J Agr Food Chem*** 1994;42(12):2713-20.

50. Koshiyama I,Fukushima D.Purification and some properties of γ- conglycinin in soybean seeds.***Phytochemistry*** 1976;15:161-4.

51. Batlle AMDC,Liambias EBC,Wider De Xifra EA,Tigier HA. Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system.XV.Effect of growth conditions, ***Int J Biochem*** 1975;6:591.

52. Looknart GL,Finney KF,Finney PL.The liquid chromatographic analysis of an estrogen coumestrol,in germinated soybean and flours therefrom.**Liq Chromatogr Anal Food Beverages (Proc Symp Anal Foods Beverages)**,Chara-lambous G(Ed),Academic Press 1979;1:129-39.

53. Porter PM,Banwart WL,Hassett JJ.HPLC isolation and GC-MS identification of genistein,daidzein,and coumestrol from unhydrolyzed soybean root extracts.***Environ Exp Bot*** 1985;25 (3):229-32.

54. Hoelscher M. Exposure to phytoestrogens may surpass des residues. ***Feedstuffs*** 1979;51:54-68.

55. Farnsworth NR,Bingel AS, Cordell GA, Crane FA,Fong HHS.Potential value of plant as sources of new ant fertility agents.II. ***J Pharm Sci*** 1975;64(5):717-54.

56. Suganuma N,Satoh S.Contents of isoflavones and effect of isoflavones on root hair curling in nonnodulating (RJ-1 RJ-1) soybean plant.***Soil Sci Plant Nutr*** (Tokyo) 1991;37(1):163-6.

57. Dwyer J,Goldin BR,Saul N,Gualtieri L,Barakat S,Adlercreutz H.Tofu and soy drinks contain phytoestrogens.***J Amer Diet Assoc*** 1994;94(7):739-43.

58. Wang HJ,Murphy PA.Isoflavone content in commercial soybean foods.***J Agr Food chem***. 1994;42(8):1666-73.

59. Obata A,Matsura M,Hashimoto H.Isolation of isoflavone aglycones (as anticancer agents) from soybeans.**Patent**: japan Kokai Tokkyo Koho 01 258,669,1989:4pp.

60. kosuge T,Ishida KJ,Kitada ZZ.Extraction of isofavones from soybean. **Patent**:Japan Kokai Tokyo Koho 62 126,186 1987:3pp.

61. Ohta N,Mikumo K.Effect of soybean isoflavones on lipase of soybean sprouts.***Kumamoto Joshi Daigaku Gakujutsu Kiyo*** 1982;34:73–7.

62. Walz E.Mikumo K.Effect of soybean in Soja hispida.Ann Chem 1931;489:118.

63. Coward L,Barnes NC,Setchell Kdr,Barnes S.Genistein,daidzein,and their β–glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diete.***J Agr Food Chem*** 1993;41(11):1961–7.

64. Nguyenle T,Wang E,Cheung AP.An inver–tigation on the extraction and concentration of isoflavones in soy–based products.***J Pharm Biomed Anal*** 1995;14(1/2):221–32.

65. Kitada Y, Ueda Y, Yamamoto M,Lshikawa M,Nakazawa H, Fujita M. Determination of isoflavones in soy bean by high–performance liquid chromatography with amperometric detection.***J Chromatogr*** 1986;366:403–6.

66. Setchell KDR,Welsh MB,Lim CK.High–performance liquid chromatographic analysis with ultraviolet.Electrochemical and thermospray mass spectro–metric detection. ***J Chromatogr*** 1987;386:315–23.

67. Eldridge AC.Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates,and isolates.***J Agr Food Chem*** 1982;30:353–5.

68. Kitts DD,Krishnamurti CR,Kitts WD.Uterine weight changes and 3H–uridine in rats treated with phytoestrogens. ***Can J Anim Sci*** 1980;60:531–4.

69. Ohta N,Kuwata G, Akahori H,Watanabe T. Isoflavonid constituents of soybeans and isolation of a new acetyl daidzin. ***Agr Biol Chem*** 1979;43:1415–9.

70. Farmakalidis E, Murphy PA.Isolation of 6"–O–acetylgenistin and 6"–o–acetyldaidzin from toasted defatted soyflakes.***J Agr Food Chem*** 1985;33(3):385–9.

71. Tani T, Katsuki T,Kubo M,Arichi S,Kitagawa I. Histochemistry.VI. Tocopherols and isoflavones in soybeans (*Glycine max* Merrill, seeds). ***Chem Pharm Bull*** 1985;33(9):3834–7.

72. Sharma RD.Isoflavone content of Bengal gram (Cicer arietinum) at various stages of germination.***J Plant Foods*** 1981;3:259–64.

73. Farmakalidis E,Murphy PA.Semi–perpartive high–performace liquid chromatographic isolation of soybean isoflavones.***J Chromatogr*** 1984;295(2):510–4.

74. Kudou S,Shimoyamada M, Imura T,Uchida T,Okubo K.A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill),glycitein 7-O-β-D-(6"- O-acetyl)-glucopyranoside.***Agr Biol Chem*** 1991;55(3):859-60.

75. Kazakov AL, Kechatov EA, Chemerko VM.Isofavones of the oilcake of the seeds of *Glycine hispida*.***Chem Nat Comp*** 1975;11(2):264-5.

76. Kudou S, Fleury Y,Welti D,et al.Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). ***Agr Biol Chem*** 1991;55(9):2227-33.

77. Wang HJ, Murmphy PA.Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: effects of variety,crop year,and location.***J Agr Food Chem*** 1994;42(8):1674-7.

78. Kitagawa I, Yoshikawa M,Yosioka I.Saponin and sapogenol. XIII .Structures of three soybean: soyasaponin I,soy soyasaponin II,and soyasaponin III . ***Chem Pharm Bull*** 1976;24:121.

79. Okubo K, Iijima M,Kodou S.Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds.***Biosci Biotech Biochem*** 1992;56(1):99-103.

80. Okubo K, Kudou S,Uchida T,Yoshiki Y,Yoshikoshi M,Tonomura M.Soybean saponin and isoflavonoids: structure and antiviral activity against human immunodeficiency virus *in vitro*. ***Acs Symp Ser*** 1994;546:330-9.

81. Fleury Y, Welti DH,Philippossian G,Magnolato D.Soybean (malonyl) isoflavones. Charac-terization and antioxidant properties.***Acs Symp Ser*** 1992; 1992(507):98-113.

82. Yamahara J, Shintani Y,Konoshima T,Sawada T,Fujimura H. Biological active principles of the crude drugs. II .Antiulcerogenic and antinflammatoty actions of the crude drugs contained saponin. ***Yakugaku Zasshi*** 1975;95:1179.

83. Becker FF.Inhibition of spontaneous hepato-carcinogenesis in C3H/HEN mice by Edi Pro A, an isolated soy protein. Carcinogenesis 1981;12(11):1213-4.

84. Weber N.3-Ketosteroid in soja-suspension skulturen.***Phytochemistry*** 1977;16:1849-51.

85. La Rue Tag, Gamborg OL.Ethylene production by plant cell cultures: variation in production during growing cycle and in different plant species.***Plant Physiol*** 1971;48:394-8.

86. Suga T, Ohta S,Nakai A,Munesada K. Glycinoprenols:novel polyprenols possessing a phytyl residue from the leaves of soybean.***J Org Chem*** 1989;54(14):3390-3.

87. Buttery BR,Buzzell RI. Soybean flavonol glycosides. Identification and biochemical genetics. ***Can J Bot*** 1975;53:219.

88. Nakatsuka SI,Feng BN,Goto T, Kihara K. Stuctures of flazin and ,highly fluorescent compounds isolated from Japanese soy sauce. ***Tetrahedron Lett*** 1986;27(29):3399–402.

89. Kawai S, Kumazawa K.(+)–Pinitol as a major soluble carbohydrate in soybean plant. ***Soil Sci Plant Nutr*** (Tokyo) 1982;28:269–73.

90. Schweizer TF, Horman I, Wiirsch P. Low molecular weight carbohydrates from leguminous seeds, a new disaccharide: galactopinitol.***J Sci Food Agr*** 1978;29(2):148–54.

91. Carter MW, Smat Jr WWG, Matrone G. Estimation of estrogenic activity of genistein obtained from soybean meal.***Proc Soc Exp Biol Med*** 1953;84:506.

92. West LG, Birac PM, Pratt DE.Separation of the isoflavones from soybeans by high performance liquid chromatography. ***J Chromatogr*** 1978;150:266–8.

93. Walter ED.Genistin (an isoflavone glucoside) and its aglucose, genistein from soybeans.***J Amer Chem Soc*** 1941;63:3273.

94. Cheng E, Story CD, Yoder L, Hale WH, Burroughs W.Estrogenic activity of isoflavone derivative extracted and prepared from soybean oil meal.***Science*** 1953;118:164.

95. Otha N,Kuwata G,Akahori H,Watanabe T.Isolation of a new isoflavone acetyl glucoside 6"–O–acetyl genistin from soybeans.Agr Biol Chem 1980;44:469–70.

96. Reschke A, Herrmann K.Occurence of 1–O– hydroxycinnamyl –β–D–glucoses in vegetables.***Z lebensm–Unters Forsch*** 1982;174(1):5–8.

97. Tsuji H,Okada N,Yamanishi R,Bando N,Kimoto M,Ogawa T.Measurement of gly MBD 30k,a major soybean allergen,in soybean products by a sandwich enzyme–linked immunosobent.***Biosci Biotech Biochem*** 1995;9(1):150–1.

98. Lyne RL, Mulheirn LJ.Minor pterocarpinoids of soybean.***Tetrahedron Lett*** 1978:3127–8.

99. Allen HJ, Johnsor EAZ.The isolation of lections on soybean.***Tetrahedron Lett*** 1978:3127–8.

100. Satish J, Singh R.A possible mode of toxicity of lectins injected to albino rats.Abstr 3rd Congress of the Federation of Asian and Oceanian Biochemists, Bangkok Thailand,1983:86.

101. Namjuntra P, Chulavatnatol M.A survey of sperm agglutination activity in extracts from seeds of Thai fruits. Abstr 3rd Congress of the Federation of Thai fruits.Abstr 3rd Congress of the Fedderation of Asian and Oceanian Biochemists,Bankok Thailand,1983:97.

102. Ruengsinsuvit P,Rattanapanone V.Partial purification and characterization of trypsin inhibitor from soybean lead-tree and common mushroom.Abstr 10th conference of Science and Technology Thailand,Chiengmai Univ,Chiengmai,Thailand,1984:354-5.

103. Wang LI,Wang BJ,Xu LH,Liu L, Lin HT,Cheng X.New functional sweeteners-soybean oligosaccharides.***Zhongguo Tiaoweipin*** 1994;9:11-4.

104. Stipanovic RD,Donovan JC,Bell AA, Martin FW.Factors interfering in gossypol analysis of okra and glandless cottonseed using direct aniline extraction.***J Agr Food Chem*** 1984;32(4):809-10.

105. Wong E.Occurrence and biosynthesis of 4',6-dihydroxy-aurone in soybean.***Phytochemistry*** 1966;5:463-7.

106. Ebel J,Schaller-Hekeler B,Knobloch K,Wellman E,Grisebach H,Hahlbrok K.Coordinated changes in enzyme activities of phenylpropanoid metabolism during the growth of soybean cell suspension cultures.***Biochim Biophys Acta*** 1974;362:417.

107. Black RC,Hamilton RH.Indoleacetic acid synthesis in soybean cotyledon callus.***Plant Physiol*** 1976;57:437.

108. Streeter JG. Identification and distribution of ononitol in nodules of *Pisum sativum* and *Glycine max*. ***Phytochemistry*** 1985; 24(1):174-6.

109. Hisajima S,Arai Y,Ito T.Cell-bonud invertase of persimmon and soy bean callus cell.***Dempun Kagaku*** 1978;25:198-201.

110. Knobloch KH,Hahlbrock K.Isoenzymes of p-coumarate: Co-A ligase from soybean cell suspension cultures.***Plant Med Suppl*** 1975:102.

111. Meyer A,Miersch O,Buttner C,Dathe W,Sembdner G.Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants.***J Plant Growth Regul*** 1984;3:1-8.

112. Maroto B,Madoery R,Camusso C.purification of soybean lecithin.1.Selection of equipment and operting conditions.2.Equilibrium diagrams.***Grasas Aceites***(Seville) 1992;43(1):6–10.

113. Nimz H,Ebel J,Grisebach H.On the structure of lignin from soybean cell suspension cultures.***Z Naturforsch Ser C*** 1975;30:442.

114. Negishi T. Compositional change of lipids in soybean seedlings.***Obihiro Chikusan Daigaku Gakujutsu Kenkyu Hokoku Dai–1–Bu*** 1974;9:211.

115. Stearns Jr EM,Morton WT.Biosynthesis of fatty acids from acetate in soybean suspension cultures. ***Lipids*** 1975;10:597.

116. Geng QK.Removing palmitic acid and stearic acid from soybean oil.**Patent**:Faming Zhunali Shenqing Gongkai Shuomingshu 1,090,318,1994:6pp.

117. Saeedi–Ghomi MH,Garcia RM.Potential of the flora of arid zones.***Cienc Desarrollo*** 1983;47:98–109.

118. Kape R,Parniske M,Brandt S,Werner S,Werner D.Isoliquiritigenin a strong NOD gene–and glyceollin resistance–inducing flavonoid from soybean root exudates.***Appl Environ Microbiol*** 1992;58(5):1705–10.

119. Kinoshita E,Yamakoshi J, Kikuchi M.Purification and identification of an angiotensin I–covertinng enzyme inhibitor from soy sauce. ***Biosci Biotech Biochem*** 1993;57(7):1107–10.

120. Phillips DA.Promotion of acetylene reduction by rhizobium–soybean cell associations *in vitro*.***Plant Physiol*** 1974;54:654.

121. Verma DPS. Soybean nodulin–26: a channel protein conseered from bacteria to mammals. Transp Recept Proteins Plant Membr [Proc Long Ashton Int Symp] 12th, 1991:113–7.

122. Odumodu CU. Antinutrients content of some locally available legumes and cereals in Nigeria.***Trop Geograph Med*** 1992;44(3):260–3.

123. Setter TL, Brenner ML,Brum WA,Krick TP.Identification of a dihydrophaseic acid aldopyranoside from soybean tissue. ***Plant Physiol*** 1981;68:93–5.

124. Raboy V. Phytic acid in developing and mature seed of soybean (*Glycine max* (L) Merr.) and *Glycine soja* Sieb. & Zucc.***Diss Abstr INt B*** 1985;45(8):2393–4.

125. Blatny P, Kvasnicka F, Kenndler E.Deter–mination of phyic acid in cereral grains, legumes,and feeds by capillary isotachophoresis. ***J Agr food Chem*** 1995;43(1):129–33.

126. Lehrfeld J. HPLC separation and quantitation of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions.***J Agr Food Chem*** 1994;42(12):2726–31.

127. Rouge P. Contribution de l'etude immuno–chimique des phytohemagglutinines a laserotaxinomie des papilionacees. ***C R Acad Sci Ser D*** 1975;280:21.

128. Kajino M, Ichihara H,Suzuki H,Kasai T, Kawamura S. Isolation and identification of pinitol from (defatted) sotbean flakes.***Kagawa Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku*** 1983;34(2):163–8.

129. Anderson RL. Ultracentrifugation and binding studies of acid – sensitive soybean proteins. ***Cereal Chem*** 1974;51:707.

130. Horgan R. A new cytokinin metabolite.***Biochem Biophys Res Commun*** 1975;65:358.

131. Thorn KA, tinsley AM, Weber CW, Berry JW.Antinutritional factors in legumes of the Sonoran desert.***Ecology Food Nutrition*** 1983;13:251–6.

132. Nes WD, Benson M,Heftmann E.the location of the methylol groups in sapogenol C and erythrodiol and its biosynthetic singficance.***Phytochemistry*** 1981 ;20:2299–300.

133. Uhlenbruck G,Dahr W.Lection with a broad agglutination spectrum.XII. N–Acetyl–D–galactosamine–specific lectins from the seeds of *Soja hispida, Bauhinia pupurea, Iberis amara, Molucella laevis* and *Vicia g.* ***Vox Sang*** 1971;21:338.

134. Ireland PA,Dziedzic SZ.Analysis of soybean sapogenins by hing–performance liquid chromatography. ***J Chromatogr*** 1985;325(1):275–81.

135. Kitagawa I, Yoshikawa M, Wang HK,et al.Revised structures of soyasapogenols A,B,and E,oleanene–sapogenols from soybean.Structures of soyasaponins 1,2,and 3. ***Chem Pharm Bull*** 1982;30:2294–7.

136. Taniyama T,Toshikawa M, Kitagawa I, Saponin and sapogenol. XLIV. Soyasaponin composition in soybeans of various origins and soyasponin content in various organs of soybean. Structure of soyasaponin V from soybean hypocotyls.***Yakugaku Zasshi*** 1988;108(6):562–71.

137. Kudo S, Ookubo K.Isolation and purification of soyasaponins. **Patent**:Japan Kokai Tokyo koho 06 100,583,1994:5pp.
138. Ireland PA, Dziedzic SZ,Drew MGB,Forsyth GA.Structure S.Isolation of soyasapogenol B–1.***J Agr Food Chem*** 1987;35(6):971–3.
139. Yamamoto N,Nakajima H,Okubo K, Tamura T, Matsuda S. Isolation of soybean saponins for treatment of aids. **Patent**:Japan KoKai Tokkyo Koho 01 100 ,126,1989:10pp.
140. Kitagawa I, Saito M,taniyama T,Yoshikawa M.Saponin and sapogenol. XXXIX.Structure of soyasaponin A–1,a bisdesmoside of soyasapogenol A,from soybean,the seeds of *Glycine max* Merrill.***Chem Pharm Bull*** 1985;33(3):1069–76.
141. Anon. soyasaponins from soybean.**Patent**: Japan Kokai Tokkyo koho 59 55,895,1984:7pp.
142. Kitagawa I,Yoshikawa M,Hayashi T,taniyama T.Quantitative determination of soyasaponins in soybean of various origins and soybean products by means of high performance liquid chromatography.***Yakugaku Zasshi*** 1984;104(3):275–9.
143. Tani T,Katsuki T,kubo M,Aritagawa I.Histochemistry.V.Soyasaponins in soybeans (*Glycine max* Merrill,seeds).***Chem Pharm Bull*** 1985;33(9):3829–33.
144. Anon. Anticancer saponins from soybean.**Patent**: japan kokai Tokkyo koho 58 72,523,1983:8pp.
145. Kitagawa I,Yoshikawa M,Hayashi T,taniyama T. Characterization of saponin constituents in soybeans of various origins and quantitative analysis of soyasaponins by gas–liquid chromatography.***Yakugaku Zasshi*** 1984;104(2):162–8
146. Curl CL,Price KR,Fenwick GR. Soyasaponin A3,a new monodesmosidic saponin isolated from the seeds of *Glycine max*.***J Nat Prod*** 1988;51(1):122–4.
147. Kitagawa I, Saito M, Taniyama T,Yoshikawa M.Saponin and sapogeno. XXXVIII. Structure of soyasaponin A–2,a bisdesmoside of soyasapogenol A,from soybean,the seeds of *Glycine max* Merrill.***Chem Parm Bull*** 1985;33(2):598–608.
148. Shiriwa M,Kudo S,Shimoyamada M,Harada K,Okubo K.Composition and structure of "group A saponin" in soybean seed.***Agr Biol Chem*** 1991;55(2):315–22.
149. Kitagawa I,Taniyama T,Nagahama Y,okubo K,yamauchi F,Yoshikawa M. saponin and sapogenol. XLII.Structures of acetyl–soyasaponins A1, A2 and A3, astringent partially

acetylated bisdesmosides of soyasapogenol A, from American soybean, the seeds of *Glycine max* Merrill. ***Chem Pharm Bull*** 1988;36(8):2819–28.

150. Taniyama T, Nagahama Y, Yoshikawa M, Kitagawa I.Saponin and sapogenol.XLIIII. Acetyl–soyasaponins A4, A5 and A6, new astringent bisdesmosides of soyasapogenol A, from Japanese soybean, the seeds of *Glycine max* Merrill.***Chem Pharm Bull*** 1988;36(8):2829–39.
151. Kudou S, Tonomura M,Tsukamoto C, Uchida T, Yoshikoshi M, Okubo K.Structural elucidation and physiological properties of genuine soybean saponins.***Acs Symp Ser*** 1994;546:340–8.
152. Shiraiwa M, Harada K, Okubo K. Composition and structure of"group B saponin"in soybean seed.***Agr Biol Chem*** 1991;55(4):911–7.
153. Yoshiki Y, Kim JH, Okubo K, Nagoya I, Sakabe T, Tamura N. A saponin conjugated with 2,3–dihydro–2,5–dihyroxy–6–methyl–4H–pyran–4–one from Dolichos lablab. ***Phytochemistry*** 1995;38(1):229–31.–.
154. Nohara T,Takeshita T,Sakai T,Irino N.Isolation of soyasaponin I form soybean plants. **Patent**: Japan Kokaii Tokyo Koho 02 188,598,1990:4pp.
155. Kitagawa I,Wang HK, TaniyamaT, Yoshikawa M. Saponin and sapogenol.XLI.Reinvestigation of the structures of soyasapogenols A, B,and E,oleanene–sapogenols from soybean structures of soyasaponins A, B and E, oleanene–sapogenols from soybean structures of soyasaponins I, II and III. ***Chem Pharm Bull*** 1988;36(1):153–61.
156. Nishida M,Hyeon S,Lsogai A,Suzuki A.Isolation of soyasaponin I as inhibitor for glycolate oxidase.***Agr Biol Chem*** 1981;45:2637–8.
157. Takeshita T,Lto Y,Sakai Y,et al.Studies on the constituents of Abri Herba effective on experimental liver injuries.***J Pharmacobio Dyn*** 1990;13(3):S–54.
158. Massiot G,Lavaud C,Benkhaled M,Le Men–Oliver L. soyasaponin VI,a new maltol conjugate from alfalfa and soybean.***J Nat Prod*** 1992;55(9):1339–42.
159. Shoji J. Isolation of triterpenoidal saponins.**Adv Nat Prod Chem–Extraction & Isolation of Biologically Active compounds**.Natori S, Ikekawa n, Suzuki M(Eds.),Wiley N Y 1981:275–91.

160. Burrows JC, Price KR, Fenwick GR. Soyasaponin IV. An additional monodesmosidic saponin isolated from soybean.***Phytochemistry*** 1987;26(4):1214–5.

161. Vasconcelos IM, Trentim A, Guimaraes JA, Carlini CR. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin,a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). ***Arch Biochem Biophys*** 1994;12(2):357–66.

162. Bansal AK,Mehta J,Mehta M, Kumar R,Arora SK,Soni GL. *In vitro* effect of soybean (*Glycine max* L.Merr) lectin on lictin on lipid peroxidation in pyridoxine deficient albino rats.***Indian J Exp Biol*** 1987;25(11):800–1.

163. Shiraiwa M, Harada K, Okubo K. Composition and content of saponis in soybean seed according to variety,cultivation year and maturity.***Agr Biol Chem*** 1991;55(2):323–31.

164. Kudou S, Tonomura M, Tsukamoto C, Shimo–yamada M, Uchida T, Okubo K.Isolation and structural elucidation of the major genuine soybean saponin.***Biosci Biotech Biochem*** 1992;56(1):142–3.

165. Fitelson J. The occurrence of squalene in natural fats.***J Ass Offic Agr Chem*** 1943;26:506–11.

166. Archambault A.Hydration and rotatory power of stachyose.***Ann Pharm Fr*** 1956;14:514–5.

167. Miyamoto J, Nakajima T, Matsuda K.Isolation and characterization of starch from suspension cultured soybean cells. ***Plant Cell Physiol*** 1985;26(1):193–9.

168. Coppen JJW. Steroids: from plant to pills–the changing picture.***Trop Sci*** 1979;21(3):125–41.

169. Heeger V, Leienbach KW, Barz W.Metsbolism of nicotinic acid in plant cell suspension cultures.III.Formation anf metabolism of trigonelline.***Hoppe–Seyler's Z Physiol Chem*** 1976;357:1081.

170. Evans LS, Tramontano WA.Trigonelline and promotion of cell arrest in G2 of various legumes. ***Phytochemistry*** 1984;23(9):1837–40.

171. Willaman JJ, Schubert BG. Alkaloid bearing plants and their contained alkaloids. ARS, USDA, Tech Bull 1234,Supt Documents, Washington DC, Govt Print Off:1961.

172. Hayashi T, Matsuda K.Sugar nucleotides from suspension–cultured soybean cells.***Agr Biol Chem*** 1981;45(12):2907–8.

173. Sumida E, Morimoto H.The vitamin A content of various feeding stuffs.***Imp Zootech Expt Sta Tibia Japan Research Bull*** 1941;45:1–11.

174. Koop W, Barz W. Buildup of riboflavin in plant cell suspension cultures.***Phytochemistry*** 1976;15:1581–3.

175. Letham DS,Singh S.Quantification of cytokinin O–glucosides by negative ion mass spectrometry.***Plant Physiol*** 1989;89(1):74–7.

176. Allen PZ,Connelly MC,Apicella MA.Interaction of lectins with Neisseria gonorrhoeae.***Can J Microbiol*** 1980;26(4):468–74.

177. Jindal S,Soni GL,Singh R.Effects of injections of soybean lectin on major hepatic enzymes.***IRCS Med Sci:Libe Compend*** 1981;9(11): 1060–1.

178. Gibbons RJ,Dankers I.Inhibition of lectin–binding to saliva–treated hydroxyapatite,tobuccal epithelial cells,and to erythrocytes by salivary components.***Am J Clin Nutr*** 1982;36(2):276–83.

179. Faraggiana T,Shen S,Chids C,Strauss L,Churg J.Histochemical study of Hurler's disease by the use of peroxidase–labeled lectins.***Histochem J*** 1982;14(4):655–64.

180. Ferayorni LS,McMillan PN,Raines L,Gerhardt CO,Jauregui HO.Lectin binding to adult rat liver in situ,isolated hepatocytes,and hepatocytes,***Proc Int Symp*** 1982;217–6.

181. Kahn LD.Nonspecific and cooperative binding of lectins to microorganisms.***Physiol Chem Phys*** 1982;14(1):3–7.

182. Naim HY, Clemetson KJ,Luescher EF.Effects of galactose–binding lectins on human blood patelets:identity of the peanut agglutinin receptor with the von Willebrannd factor receptor.***Thromb Res*** 1982;26(6):431–41.

183. Mahmood A, Torres–Pinedo R.Postnatal changes in lectin binding to microvillus membranes from rat intestine.***Biochem Biophs Res Commun*** 1983;113(2):400–6.

184. Hanai K, Kitajima M.The effects of lectins on the feeding response in *Hydar japonica*.***Comp Biochem Physol A*** 1983;76A(2):238–7.

185. Maansson JE, Olofsson S.Binding specificities of the lectins from Helix pomatia, soybean and peanut against different glycosphingolipids in liposome membranes.***FEBS Lett*** 1983;156(2):249–52.

186. Blanks JC, Johnson LV.Selective lectin binding of the developing mouse retina.***J Comp Neurol*** 1983;221(1):31–41.

187. Strauchen JA.Lectin receptors as markers of lymphoid cells.I.Demonstration in tissue section by peroxidase technique.***Am J Pathol*** 1984;116(2):297–304.

188. Bell CM, Skerrow CJ.Factors affecting the binding of lectins to normal human skin.***Br J Dermatol*** 1984;111(5):517–26.

189. Malin–Berdel J, Valet G,Thiel E,Forrester JA,Guertler L.Flow cytometric analysis of the binding of eleven lectins to human T–and B–cells and to human T–and B–cell lines.***Cytometry*** 1984;(2):204–9.

190. Turpin E,Goussault Y,lis H,Sharon N.Nature of the receptor sites for galactosyl–specific lectins on receptor sites for galactosyl–specific lectins on human lymphocytes.***Exp Cell Res*** 1984;152(2):486–92.

191. Soderstrom KO,Malmi R,Karjalainen K.Binding of rat spermatogenic cell in tissue section by fixation in Bouin's fluid.***Histo–chemistry*** 1984;80(6):575–9.

192. Brennan MJ, Cisar JO, Vatter AE, Sandberg AL. Lectin–dependent attachment of Acti–nomyces naeslundii to receptors on epithelial cells.***Infect Immun*** 1984;46(2):459–64.

193. Tovey ER,Baldo BA.Standardization of allergens.Qualitative definition of house dust mite extracts following elecroblotting and detection of components with antibody and lectin probes.***Int Arch Allergy Appl Immunol*** 1984;75(4):322–9.

194. Pino RM.Ultrastructural localization of lectin receptors on the surface of the rat retinal pigment epithelium.***J Histochem Cytochem*** 1984;32(8):862–8.

195. Laden SA,Schulte BA,Spicer SS.Histo–chemical evaluation of secretory glycoproteins in human salivary glands with lectin–horserradish peroxidase conjugates. ***J Histochem*** 1984;32(9):965–72.

196. Walker RA.The binding of peroxidase–labeled lectins to human breast epithelium.I.Normal, Hyperplastic and lactating breast. ***J Pathol*** 1984;142(4):279–91.

197. Ohkubo K, Huntenburg CC, Ohkubo K, Kurimoto S, Yokoyama MM. Active T rosette formation of human T lymphocytes after stimulation with lectins.***J UOEH*** 1984;6(3):235–42.

198. Youn YL, Lee D, Paik SY. A study on lectin histochemistry in female genital organs.***Koryo Taehakkyo Uikwa Taehak Nonmunjip*** 1984;21(3):169–79.

199. McMillan PN, Ferayorni LS, Gerhardt CO, Jauregui HO. Light and electron microscope analysis of lectin binding to adult rat liver in situ. ***Lap Invest*** 1984;50(4):408–20.

200. Shinozuka T, Watanabe H, Takei S, Ohkuma S.ABO. MN antigenictiies and lectin receptor.***Nippon Hoigaku Zasshi*** 1984;38(4):397–402.

201. Oh CH,Kim Sn.A study of lectin histo–chemistry on normal skin of human, rat,rabbit and guinea pig.***koyo Taehakkyo Uikwa Tashak Nonmunjip*** 1985;22(3):219–32.

202. Born IA, Schwechheimer K, Maier H, Moeller P. Lectin binding patterns in normal human salivary glands. ***Lectins:Biol, Biochem, Clin Biochem*** 1985;4:127–36.

203. Rudolph M, Samtleben R. Comparative studies of different tumor cell lines and some D–type retroviruses with lectins.***Ibid*** 1985;4:653–62.

204. More J, Van Haverbeke G, Cabanie P, Benazet F, Sautet J. Secretory glycoproteins of major vestibular glands (Bartholin's glands) in female calves.Studies with usual histochemical methods and with lectin–horseradish peroxidase conjugates in normal animals and in animals implanted with anabolic drugs.***Acta Anat*** 1986;126(3):199–204.

205. Berliner LJ, Musci G, Maliarik M, Plessas NR, Goldstein IJ. Binding of N–acetylagalac–tosamine–specific lectins to spin–labeled galactosamine derivatives.***Biochemistry*** 1986;25(15):4457–61.

206. Kimoshita Y, Yamaga K, Kimura S, Nakai Y. Soybean lectin–responding cells in human tonsil.I. Separation of soybean lectin–responding cells and an alteration of the responsiveness of the separated cells by thymosin.***Cell Mol Biol*** 1986;32(4):399–406.

207. Kitagaki H, Matsumoto I, Seno N, Nagase S. Lectin binding sites related with rat ascites hepatoma cell adhesion.***J Biochem*** (Tokyo)1986;99(2):453–8.

208. Breborowicz J, Michalska A, Breborowicz D. Lectin histochemistry of colorectal carcinoma combined with lacalization of carcinoembryonic antigen and mucopolysaccharides.***Lectins:Biol, Biochem, Clin Biochem*** 1986;5:449–56.

209. Cuperlovic M, Cerovic G, Milosevic Z. Binding of PHA, WGA and SBA to the surface of rat intertinal epithelial cells *in vitro*.***Ibid*** 1986;5:493–8.

210. Doerner R, Sachs V.Precipitation of human serum glycoprotein with lectins.***Ibid*** 1986;5:599–607.

211. Kim HK,Kim HK,Choi JS.An immunoenzyme histological study of distribution of lectin receptors in various giant cells.***Koryo Taehakkyo Uikwa Taehak Nonmunjip*** 1986;23(1):85–93.

212. Hendriks HGCJM,Koninkx JFJG,Draaijer M, Van Dijk JE,Raaijmakers JAM, Mouwen JMVM.Quantitative determination of the lectin binding capacity of small intertinal brush–border membrane.An enzyme linked lectin sorbent assay (ELLSA).***Biochim Biophys Acta*** 1987;905(2):371–5.

213. Naves PVJM, Buron MI, Garcia–Herdugo G. Lectins as markers for plasma membrane differentiation of amphibian keratinocytes.***Biol Cell*** 1987;60(3):225–33.

214. Holm MS, Berger AE, Swanson K, Ficsor G, Ginsberg LC. Ethylnitrosourea treatment increases lectin binding to mouse germ cells.***Toxicology*** 1987 ;4693):28–94.

215. Sugita N,Niimura K,Oguchi Y,et al. Lectins from plant, and antiretroviral drugs containing the lectins as active ingredients. ***Acta Histochem, Suppl*** 1988;36:159–68.

216. Sinowatz F, Friess AE, Amselgruber W. Cytochemical detection of lectin–binding activity in epididymal spermatozoa. ***Acta Histochem, Suppl*** 1988;36:159–68.

217. Budde R, Klein PJ, Schaefer HE. Lectin–, immuno– and enzymic histochemical investigations on benign and neoplastic cells of the mononuclear phagocyte system. ***Ibid*** 1988;36:227–34.

218. Witt M, Reutter K. Compartive lectin histo–chemical investigation of the taste buds of different vertebrates. ***Ibid*** 1988;36:405–8.

219. Gaidar YA, Berezin VA, Filippov YA. Localization of glycoconjugates in mammalian tissues by labeled lectins. ***Arkh Anat, Gistol Embriol*** 1988;95(7):47–51..

220. Andrade PP, Schottelius J, Andrade CR. An enzyme–linked lectin assay for the study of lectin receptors of Leishmania. ***Braz J Med Biol Res*** 1988;21(3):517–21.

221. Truong LD, Phung VT, Yoshikawa Y, Mattioli CA. Glucoconjugates in normal human kidney. ***Histochemistry*** 1988;90(1):51–60.

222. Malmi R, Soderstrom KO. Lectin binding to rat spermatogenic cells: effects of different fixation methods and proteolytic enzyme treatment. ***Histochem J*** 1988;20(5):276–82.

223. Zschaebitz A, Stofft E. The lectin binding pattern of normal and pathologically altered synovial tissue. ***Histol Histopathol*** 1988;3(4):419–24.

224. Soderstrom KO. Lectin binding to serous ovarian tumours. ***J Clin Pathol*** 1988;41(3):308–13.

225. Ching CK, Black R, Helliwell T, Savage A, Barr H, Rhodes JM. Use of lectin histochemistry in pancreatic cancer. ***Ibid*** 1988; 41(3):324–8.

226. Hadad KMN. Sellens MH. Lectin receptors on mouse uterine tissues during the estrus cycle and early pregnancy. Lectins: Biol, Biochem, ***Clin Biochem*** 1988;6:227–31.

227. Xia X, Sun C, Shen Z Lectin receptors on the surface of ejaculated spermatozoa of fertile and sterile humans. ***Shengwu Huawue Yu Shengwu Wuli Xuebao*** 1988;20(6):599–606.

228. Schuenke M, Tillmann B, Brueck M, Mueller–Ruchholtz W. Lectin–binding in normal and osteoarthrotic articular cartilage from STR/1N–mouse knee joints. ***Virchows Arch, B*** 1988;54(6):327–33.

229. Stoica G, O'Leary M. Lectin binding sites in normal rat ovary and ENU–induced Sertoli cell tumors of the ovaries. ***Anticancer Res*** 1989;9(3):679–85.

230. Stoica G, Sowa BA. Lectin binding sites of cultured ovarian Sertoli cell tumors and follicular granulose cells. ***Ibid*** 1989;9(3):687–94.

231. Nagler A, Peacock M, Tantoco M, Lamons D, Okarma TB, Okrongly DA. Red blood cell depletion and enrichment of $CD34^{+}$ hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood using soybean agglutinin and CD34 immunoselection. ***Exp Hematol*** (Charlottesville, Va) 1994;22(12):1134–40.

232. Ferayorni LS, McMilla PN, Raines L. Gerhardt CO, Jauregui HO. Lectin binding to adult rat liver in situ, isolated hepatocytes, and hepatocyte cultures. Isol, Charact, Use Hepatocyte cultures. ***Isol, Charct, Use Hepatocytes, Proc Int Symp*** 1982:271–6.

233. Lee MC, Wu TC, Wan YJ, Damjanov I. Pregnancy–related changes in the mouse oviduct and uterus revealed by differential binding of fluoresceinated lectins. ***Histochemistry*** 1983;79(3):365–75.

234. อัญชลี ตัณฑ์ศุภศิริ นรีรัตน์ กิตติมานนท์ กานดา วัฒโนภาส แฉล้ม จันทรศรี. สารเล็คทินจากพืชที่มีศักยภาพในการพิสูจน์เชื้อเบต้า–ฮีโมลัยติค เสตร็ปโตค็อคคัยกลุ่มที่สำคัญทางการแพทย์. ***Rama Med J*** 1992;15(1):54–62.

235. Wongkham S, Boonsiri P, Trisonthi C, Simasathiansophon S, Wongkham C, Atisook K. Studies on lectins from Thai plants. ***J Sci Soc Thailand*** 1995;21:27–36.

236. Reimann J, Ehman D, Miller RG. Differential binding of lectins to lymphopoietic and myelopoietic cells in murine marrow as revealed by flow cytometry. ***Cytometry*** 1984;5(2):194–203.

237. Zurn AD. Cell–type–specific molecules: identification of glycolipid binding sites for soybean agglutinin and differences in the surface glycolipids of culture adrenergic and cholinergic sympathetic neurons. ***NATO ASI Ser, Ser A*** 1984; 77: 207–11.

238. Hosaka M, Murase N, Takai Y, Fukui S, Mori M. Lectin binding in oral mucosa of mammals. ***Acta Histochem Cytochem*** 1985;18(1):33–48.

239. Hooghe RJ, Vander–Meeren M, Vander Plaetse F, Greimers R. Experimental modification of N–linked sugars of membrane proteins in a lymphoma cell line affects the binding of soybean agglutinin but not of several other lectins. ***Carbohydr Res*** 1985;141(1):172–7.

240. Webb CG, Popliker M, Lis H, Sharon N. Erythrina cristagalli lectin is a new marker for undifferentiated embryonic cells. Cell Membr Cancer, Proc Int Workshop, 2nd, 1985:13–24.

241. Roholl PJM, Kleyne J, Elbers H, van der Vegt MCD, Albus–Lutter C, Van Unnik JAM. Characterization of tumor in comparison with malignant histiocytes. I. Immunohistochemical study on paraffin sections. ***J Pathol*** 1985; 147(2):87–95.

242. Osman HG, Jwanny EW. Serological and chemical investigations on the agglutinins of Phaseolus Montcalm. ***J Chem U A R*** 1963;6(2):191–204.

243. Krupe M, Wirth W, Nies D, Ensgraber A. Studies on the "mitogenic" effect of hemaglutinating extracts of various plants on the human small lymphocytes *in vitro*. ***Z Immunitatsforsch Allerg Klin Immunol*** 1968;135(1):19–42.

244. Den H, Malinzak DA, Keating HJ, Rosenberg A. Influence of concanavalin A, wheat germ agglutinin, and soybean agglutinin on the fusion of myoblasts *in vitro*. ***J Cell Biol*** 1975;67(3):826–34.

245. Patscheke H, Brossmer R, Woerner P. D–Galactose–binding lectins induce a differential response of blood platelets. ***Biochem Biophys Res Commun*** 1977;75(1):200–6.

246. do Prado VC, Antunes PL, Sgarbieri VC. Antinutrient occurrence and some physicochemical properties of the protein fractions of five Brazillian soybean varieties. ***Arch Lationam Nutr*** 1980;30(4):551–63.

247. Fett WF, Sequeira L. A new bacterial agglutinin from soybean. I. Isolation, partial purification, and characterization. ***Plant Physiol*** 1980;66(5):847–52.

248. Fett WF, Sequeira L. A new bacterial gaalutinin from soybean. II. Evidence against a role in determining pathogen specificity. ***Ibid*** 1980;66(5):853–8.

249. Barzilay M, Monsigny M, Sharon N. Interaction of soybean agglutinin with human peripheral blood lymphocyte subpoplations: evidence for the existence of a lectin–like substance on the lymphocyte surface. ***LectinsL Biol, Biochem, Clin Biochem*** 1982;2:67–81.

250. Freier S, Lebenthal E, Freier M, Shah PC, Park BH, Lee PC. IgE and IgD antibodies to cow milk and soyprotein in duodenal fluid: effects of pancreoxymin and secretin. ***Immunology*** 1983;49(1):69–75.

251. Yates LD, Sage HJ. Interaction of monomeric and oligomeric soybean agglutinins with pig lymphocytes and plasma membranes. ***Membr Biochem*** 1983;5(1):19–34.

252. Truchet GL, Dazzo FB, Vasse J. Agglutination of Rhizobium japonicum 3IIb110 by soybean lectin. ***Plant soil*** 1983;75(2):265–8.

253. Hulman G, Fuller M, Pearson HJ, Bell PRF. An accurate, simple and rapid test for detecting elevated levels of C–reactive protein in serum by agglutinationof fat emulsion. ***Clin Chim Acta*** 1986;156(3):337–40.

254. Goff WL, Johnson LW, Kuttler KL. Anaplasma marginale, Eperythrozoon wenyoni: lectin ractions with bovine erythrocytes. ***Exp Paraitol*** 1986;61(1):103–13.

255. Pereira MEA. Kabat EA, Sharon N. Immunochemical studies on the specificity of soybean agglutinin. ***Carbohydr Res*** 1974;37(1):89–102.

256. Adebiyi RF, Parnell G, Forrester JA, Davies AJS. Lectin binding by malaria–infected erythrocytes. Lectins: Biol, Biochem, ***Clin Biochem*** 1982;2:197–209.

257. de Souza AH. Vegetative agglutinins. ***Bol Ministerio Agr*** (Brazil) 1944;33(10):15–26.

258. Horvath AA. Changes in hen's blood produced by a diet of sprouted soybeans. ***Am J Physiol*** 1930;94:65–8.

259. Kinae N, Kouchiyama T, Matsushita K, Tomita I, Satou S. Interaction of lectins with animal platelets–agglutination of human platelets by soybean agglutinin. ***Yakuga Zasshi*** 1979; 99(11):1141–8.

260. Ravel A, Roussel AM, Alary J, Laturaze J. Effects of varaying dietary proteins on plasma lipids and rabbit patelet function. ***Tromb Res*** 1988;49(4):405–14.

261. Ogawa T, Gatchalian–Yee M, Sugano M, Kimoto M, Matsuo T, Hashimoto Y. Hypocholesterolemic effect of undigested fraction of soyben protein in rats fed no cholesterol. ***Biosci Biotech Biochem*** 1992;56(11):1845–8.

262. Rapaport SI, Asa K, Owren PA. Lipide inhibitor of brain: mechanism of its anticoagulant action and its comparison with the soybean inositol phosphatide inhibitor. ***J Lab clin Med*** 1954;44:364–73.

263. Kubo M, Matsuda H, Tani T, Namba K, Arichi S, Kitagawa I. Effects of soyasaponin on experimental disseminated intravascular coagulation. ***I. Chem Pharm Bull*** 1984;32(4):1467–71.

264. Sumi H, Banba T, Kishimoto N. Strong prourokinase activiators proved in Japanese soybean cheese natto. ***Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*** 1996;43(10);1124–7.

265. Mitchell HH, Villegas V. The nutritive value of the proteins of coconut meal, soy beans, rice bran and corn. ***J Dairy Sci*** 1923;6:222–36.

266. Rose MS, Macleod G, Bisbey B. Maintenance values for the proteins of milk, bread and milk, meat and soy bean curd in human nutrition. ***Proc Soc Exptl Biol Med*** 1923;212:143–4.

267. Venturi R. A few experimental considerations on the utilization of the bean for human nutrition. ***Biochem Terap Sper*** 1927;14:393–9.

268. Ducceschi V. Remarks on the note of Venturi on the utilization of the soy bean as human food. ***Ibid*** 1927;14:400–2.

269. Horvath AA. Soy–bean feeding and blood calcium. ***Japan Med World*** 1928;8:1–5.

270. Mitchell HH, Smuts DB. The amino acid deficiencies of beef, wheat, corn, oats and soy beans for growth in the white rat. ***J Biol Chem*** 1932;95:263–81.

271. Ogawa M. Nutritive value of canavanine. ***I. Agr Chem Soc Japan*** 1934;10:225–31.

272. Liu T, Chen C–Y. The nutritive value of soybean press cake. ***Science*** (China) 1934;18:636–48.

273. Schellong F. A new "soya–water bread" and the use of soybean meal in the treatment of diabetes and obesity. ***F Schellong Klin Wochschr*** 1935;14:487–90.

274. Sheets O. The value of seeds and leafy vegetables for hemoglobin regeneration. Proc 37th and 38th Ann conventions Assoc Southern Agr Workers 1936;3:42–3.

275. Agnoli R, Untersteiner L. Alimentary value of soybean flour in nutrition of young animals. ***Quaderni nutriz*** 1936;3:42–3.

276. Chen C–Y. A comparison of the nutritive value of beef, egg white and dried soybean curd with reference to vitamin B1. ***Nutrition Bull*** 1937;(4):1–11.

277. Viljoen NJ. The composition of the soybean in South Africa. Union S Agrica Dept Agr & Forestry, ***Sci Bull*** 1937;169:68pp.

278. Bunger H, Fissmer E, Reising F. Feeding experiments with rape residue to milk cows. ***Z Tierernahr Futtermittelk*** 1940;4:183–200.

279. Cheng LT, Li HC, Lan TH. Biological values of soybean–egg proteins in human subjects. ***Chinese J Physiol*** 1941;16(1):83–9.

280. Ligori M. The alimentary value of soybeans. Arch Farmacol Sper 1934;58:142–8.

281. Cheng W–K. The digestibility and biological value of raw soybean, and the soybean–milk clot. ***Biochem Bull*** (China) 1944 ; (41) : 1–3.

282. Heuser GF, Norris LC. Soybean–oil meal in chick rations. ***Cornell Univ Agr Expt Sta. Bull*** No. 810, 1944 : 3–22.

283. Carver JS, Brant AW, Evans RJ. Soybean–oil meal in the laying ration. ***Wash Agr Expt Sta. Bull*** No.15, 1944 : 4pp.

284. Mitchell HH, Hamilton TS, Beadles JR. The importance of commercial processing for the protein value of food products. ***J Nutrition*** 1945 ; 29 : 13–25.

285. Ershoff BH, Deuel Jr HJ. A comparison of the nutritive values of fats when fed alone or lactose. ***Am J Physiol*** 1947 ; 148 : 45–50.

286. Steele BF, Sauberlich HE, Reynolds MS, Baumann CA. Amino acids in the urine of human subjects fed eggs or soybeans. ***J Nutrition*** 1947 ; 33 : 209–20.

287. Sqiubb RL, Cannon CY, Allen RS. Effect of raw soybeans and of soybean oil on plasma carotene and on vitamin A as measured by activated glycerol dichlorohydrin. ***J Dairy Sci*** 1948 ; 31 : 421–7.

288. Clark TB, Bletner JK, Vanlandingham AH. Soybean–oil meal, solvent, and hydraulic cottonseed meals in chick diets. ***Poultry Sci*** (Research Notes) 1948 ; 27 : 644–6.

289. Squibb RL, Cannon CY, Allen RS. Effect of raw soybeans and soybean–oill meal on the vitamin A and carotene concentrations in the blood plasma and milk of lactating cows. ***J Dairy Sci*** 1949 ; 32 : 565–9.

290. Shaw JC, Moore LA, Sykes JF. The effect of raw soybeans on blood plasma carotene and vitamin A of calves. ***J Dairy Sci*** 1951 ; 34 : 176–80.

291. Schiller K. Effect of different protein sources in animal nutrition. III. A comparison of fishmeal, soybean meal, barley, and potato. ***Arch Tierernahr*** 1957 ; 7 : 244–9.

292. Schiller K. Biological value of corn protein–by–products and some supplementary mixtures with dried skim milk, fish meal, and soybean oil meal. ***Ibid*** 1957 ; 7 : 250–6.

293. Hanes CE, Wallace HD, Koger M. The value of soybean–oil meal. Low–gossypol (degossypolized) solvent–processed cottonseed meal, and various blends thereof in the ration of growing–fattening swine. ***J Animal Sci*** 1957 ; 16 : 12–9.

294. Woods WR, Gallup WD, Tillman AD. Comparative values for sheep of some protein supplements fed at three protein levels. ***Ibid*** 1958 ; 17 : 758–62.

295. Zucker H, Hays VW, Speer VC, Catron DV. Evaluation of pumpkin–seed meal as a source of protein for swine by using a depletion repletion technique. ***J Nutrition*** 1958 ; 65 : 327–34.

296. Borchers R. Effect of dietary level of raw soybean oil meal on the growth of weanling rats. ***Ibid*** 1958 ; 66 : 229–34.

297. Hashimoto T. The effect of heated soybean oil on the nutritional efficiency of rats. ***Eiyogaku Zasshi*** 1960 ; 18(6) : 375–88.

298. Evans RE. Protein–saving action of synthetic lysine and methionine. ***J Agr Sci*** 1961 ; 57 : 111–21.

299. Sell JL, Hodgson GC. Comparative value of dietary rapeseed oil, soybean oil, and animal tallow for chickens. ***J Nutr*** 1962 ; 76(2) : 113–8.

300. Borchers R. Digestibility of threonine and valine by rats fed soybean meal rations. ***Ibid*** 1962 ; 78(3) 330–2.

301. Brueggemann J, Giesecke D, Drepper K. Influence of various sources of nitrogen on composition and activity of the rumen flora. Z Tierphysiol, ***Tierernaehr Futtermittelk*** 1962 ; 17(3) : 162–88.

302. Kaneda T, Arai K. Comparison of nutritive value between methyl and ethyl esters of fatty acids for rats. ***Eiyo To Shokuryo*** 1963 ; 16(2) : 101–3.

303. Martin D. Relations of chemical constitution and bacteriostatic activity. V. Bacteriostatic properties of several thiocarbamic acid O–aryl esters (thiourethans). ***Pharmazie*** 1963 ; 18 : 544–9.

304. F. Hoffmann–La Roche & Co, A–G. The use of 8'–apo–β–carotenal as a feed additive for poultry. **Patent** : Ger 1, 168, 232, 1964 ; 2pp.

305. Placer Z, Slabochova Z. Metabolic effect of saturated and unsaturated fatty acids. I. Weight curves and fat resorption. ***Nahrung*** 1964 ; 8(4) : 291–303.

306. Kroening GH, Pond WG, Loosli JK. Dietary methionine–cystine requirement of the baby pig as affected by threonine and protein levels. ***J Animal Sci*** 1965 ; 24(2) : 519–25.

307. Derse PH. Evaluation of protein quality (biological method). ***J Assoc Offic Agr Chemists*** 1965 ; 48(4) : 847–50.

308. Lipstein B, Budowski P, Bornstein S. Effect of autoxidation on the nutritive value of acidulated soybean soapstock in chicks. ***Poultry Sci*** 1965 ; 44(6) : 1480–8.

309. O'dell BL, Savage JE. Arginine–lysine antagonism in the chick and its relation to dietary cations. ***J Nutr*** 1966 ; 90(4) : 364–70.

310. Izkilladziowa W, Runachowicz H, Rakawska M. Value and the digestibility of protein in powdered milk produced in 8 Polish factories. ***Przem Spozyw*** 1966 ; 20(9) : 591–7.

311. Rosenberg HR. Feed supplement containing N–substituted aminooxyacetic acid derivatives. **Patent** : U S 3, 284, 210 1966 ; 5pp.

312. Furuta K, Nakazawa M, Kitano R, Iyama I. Effect of the fish meal and the soybean cake level added to the diet of the laying hen. ***Nippon Kakin Gakkaishi*** 1967; 4(2) : 74–7.

313. De Natale F, Arrivabene G. Use of gelatin capsule trimmings to augment the protein ratio of livestock. ***Sci Aliment*** 1967 ; 13(3) : 45–7.

314. Their E, Brune H. Addition of L–lysine hydrochloride and DL–methionine to pig diets and significance of the determined nitrogen balance. Z Tierphysiol, ***Tierenaehr Futtermittelk*** 1968 ; 24(4) : 209–29.

315. Hoelmer G, Aaes–Joergensen E. Essential fatty acid–deficient rats. II. Fatty acid composition of partially hydrogenated arachis, soybean, and herring oils and of normal, refined arachis oil. ***Lipids*** 1969 ; 4(6) : 507–14.

316. Dal Borgo G, McGinnis J. Effect of soybean meal treatment and dietary carbohydrate on plasma protein levels and body composition of chicks. ***Poultry Sci*** 1969 ; 48(1) : 341–3.

317. Poppe S, Meier H, Barth U, Nowak P, Gabriel E, Schneider M. Evaluation of the amino acid requirements of broiler chicks. Wiss Z Univ Rostock, ***Math–Naturwiss Reihe*** 1969 ; 18(1/2) (Pt. 1) : 43–7.

318. Nagy MR. Effect of feeding rats on diets with different proteins for one hour daily on weight, feed intake, body composition, and free amino acid in blood. ***Meded Landbouwhogesch Wageningen*** 1970; (70–4) : 102pp.

319. Skotnicki J, Stawinska Z, Lukaszuk S. Synthetic fatty acids, tallow, and soybean oil in broiler feeding. ***Rocz Nauk Roln, Ser B*** 1970;92(2):291–311.

320. Ziombski H. Comparison of nutritive value of Lard, soybean oil, and rapessed oil. ***Zesz Probl Postepow Nauk Roln*** 1970;(91):413–23.

321. Gorrill ADL, Cameron CDT, Nicholson JWG. Growth, digestibility, and nitrogen retention by ambs fed liquid diets containing milk and soybean protein. ***Can J Anim Sci*** 1971;51(3):663–7.

322. Lennon AM, Ramey HA, Alsmeyer WL, Clawson AJ, Barrick ER. Soy flour s a protein source for early–weaned pigs. ***J Anim Sci*** 1971;33(2):514–9.

323. Saxena SK, Otterby DE, Donker JD, Good AL. Effects of feeding alkali–treated oat straw supplemented with soybean meal or nonprotein nitrogen on growth of lambs and on certain blood and rumen liquor parameters. ***Ibid*** 1971;33(2):485–90.

324. Francisco JO. Utillization of urea by lactating ewes and growing lambs. ***An Fac Vet Leon***, Univ Oviedo 1972;18(2):475–536.

325. Bolduan G, Voigt J, Piatkowski B. Protein and urea supplements as affecting the digestibility, ruminal fermentation, and ruminal degradation of cellulose in straw fed animals. ***Arch Tierernaehr*** 1972;22(6):389–94.

326. Packham RG, Royal AJE, Payne CG. Cottonseed meal in broiler diets. I.Use of cottonseed meal as as a replacement for soybean meal in broiler starter diets. ***Aust J Exp Agr Anim Husb*** 1973;13(65):649–55.

327. Tamura T, Stokstad ELR. Availability of food folate in man. ***Brit J Haematol*** 1973;25(4):513–32.

328. Petrovic D, Veljkovic S, Mireskovic D. Utilization of proteins by children fed large quantities of soybeans. ***Hrana Ishrana*** 1973 ; 14(3–4) : 103–16.

329. Mee JML, Brooks CC. Amino acid availability of coconut meal protein in swine***. Nutr Rep Int*** 1973 ; 8(4) : 261–9.

330. Eeckhout W, Casteels M, Cottyn B. Use, in some milk substitutes for fattening calves, of heat–treated soybean preparations. ***Rev Agr*** (Brussels) 1973 ; 26(3) : 601–20.

331. Marinov B, Angelova L, Mandev I. Protein sources in mixed feed for chicks. I. Sunflower oil cake. ***Zhivotnovud Nauki*** 1973 ; 10(8) : 81–8.

332. Burris WR, Bradley NW, Boling JA. Amino acid availability of isolated rumen microbes as affected by protein supplement. ***J Anim Sci*** 1974 ; 38(1) : 200–5.

333. Netke SP, Scott HM. Sulfer amino acid activity in soybean meal and corn measured by chick growth. ***Poult Sci*** 1974 ; 53(2) : 592–6.

334. Guihermet R. Use of the liquid form to allow a protein supplement to bypass the rumen in the ruminant calf. ***Sci Agron Rennes*** 1975 : 165–9.

335. Caselli R. Animal feed value of the soybean meal residue after extraction of the oil. ***Tec Molitoria*** 1975 ; 26(5) : 69–76.

336. Vara OM, Brandao FJ, Rubens SP, Da Silva DJ. Determination of the nutritive value of Opaque–2 corn in poultry feeds. ***An Cient*** 1976 ; 14(1–4) : 73–81.

337. Kracht W, Hennig A, Gruhn K. Protein utilization of mixed feed rations by lactating pigs, with special reference to the content of essential amino acids in the dietary proteins. ***Arch Teirrernaehr*** 1976 ; 26(4) : 267–74.

338. Paik IK, Han IK. Studies on the nutritive values of locally produced oil meals. III. Comparative feeding value of locally produced oil meals. ***Hanguk Ch'uksan Hakhoe Chi*** 1976 ; 18(1) : 52–8.

339. Park KR, Han IK. Effects of dietary fats and oils on the growth and serum cholesterol content of rats and chicks. ***Hanguk Yongyang Hakhoe Chi*** 1976 ; 9(2) : 169–77.

340. Morisio Guidetti L, Gattullo D. Electrophoretic serum protein patterns of chickens on supplementary oil deits. ***Minerva Dietol Gastroenterol*** 1977;23(3):193–5.

341. Lipstein b, Bornstein l, Budowski P. Utilization of choline from crude soybean lecithin by chicks. I. Growth and prevention of perosis. ***Poult Sci*** 1977;56(1):331–6.

342. Lipstein B, Bornstein S, Budowski P. Utlization of choline from crude soybean by chicks. 1. Growth and protein concentreates for growing pigs. ***Br. J Nutr*** 1978;40(1):23–8.

343. Chug CS, Chung IK, Han IK. Studies on the nutritive values of locally produced oil meals. V. Comparison of the nutritive values of locally produced oil meals for egg–type starters. ***Hanguk Ch'uksan Hakhoe Chi*** 1978;20(1):90–7.

344. Chung CS, Han IK. Studies on the nutritive values of locally produced oil meals for egg–type grower. ***Ibid*** 1978l20(1):98–103.

345. Rasmussen AI. Nutrient comparison of fresh and fied–dried, green–seeded soybeans. ***J Am Diet Assoc*** 1978;72(6):604–8.

346. Stoyanov V, Gurdev M, Petrov P, Marinchevskii I. Study on the production and use of high–protein sunflower meal. IV. Comparative effects in feeding pigs and chickens. ***Maslo–Sapunena Prom–st*** 1978;14(1):39–49.

347. Kannev S, Klisurov H, Ilieva I, Nakov S, Angelova L. Use of different protein and lysine sources in pig fattening. ***Zhivotnovud Nauki*** 1978;15(8):3–10.

348. สมชาย ประภาวัต และคณะ. **การปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการของนมถั่วเหลืองโดยการเติมส่วนที่สกัดจากงา**. ข่าวสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 2521;19 (189) :11.

349. Robel EJ. Effect of dietary protein intakes and flavoring mixture on the performance of early weaned pigs. ***Nutr Rep Int*** 1979;19(3):427–35.

350. Takahashi T, Muramatsu S, Shibahara Y. Comparison of nutritive values between soy protein isolate and other soybean proteins. ***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1981;2(1):52–7.

351. Inoue G, Kishi K, Yagi I. Nutritive value of soybean protein isolate determined by slope ratio assay in growing rats. ***Ibid*** 1981;2(1):62–6.

352. Koishi H, Okuda T, Tamura R, Hattori Y, Kajiwara N, Miyata K. The effect of supplementing soybean protein isolate with gluten and casein on nutritional values in growth rat. ***Ibid*** 1981;2(1):62–6.

353. Decuypere JA, Meeusen A, Henderick HK. Influence of the partial replacement of milk protein by soybean protein isolates with different physical properties on the performance and nitrogen digestibility of early–weaned pigs. ***J Anim Sci*** 1981;53(4):1011–8.

354. Arnould R, Van Hoek A, Callewaert D. Measure of the nutritive value of soybean protein destined for human consumption. ***Publ Lab Biochim Nutr*** (Univ Cathol Louvain, Fac Sci Agron) 1981;32:15pp'

355. Bonsembinte M, Rioni M, Bittante G, Ahgina C. Protein source alternatives to casein in milk substitutes for weaning calves. ***Zootec Nutr Anim*** 1981;7(2):89–107.

356. วลัย อินทรัมพรรย์. **การใช้เนื้อถั่วเหลืองและถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริม**. ข่าวสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 2524;22(230):4–5.

357. Frydrych Z, Heger J, Vavak J. Effect of essential amino acids, vitamin B12 and energy intake on the nutritive value of a cereal–based diet in growing rat. ***Biol Chem Zivocisne Vyroby Vet*** 1982;18(6):521–8.

358. Hulan HW, Proudfoot FG, Zarkadas CG. Potato waste meal. II. The nutritive value and quality for broiler chicken. ***Can J Anim Sci*** 1982;62(4):1171–80.

359. Kaneko K, Koike G. Utilization and requirement of soybean protein isoloate in the adult female. ***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1982;3(1):60–4.

360. El–Sherbiny GA, Rizk SS, Heikal HA. Improving the nutritional aspect to of broad bean seeds. (Vicia faba Linen). ***Egypt J Food Sci*** 1982;8(1–2):61–7.

361. Iwaya M, Yamaguchi M, Miyazahi M. Nutritive of soy protein isolate in adult rats. III. Supplementel effects of its limiting amino acids. ***Eiyogaku Zasshi*** 1982;40(3):155–62.

362. Brito OJ, Nunez N. Evaluation of sesame flour as a complementary protein source for combinations with soy and corn flours. ***J Food Sci*** 1982;47(2):457–60.

363. Ravel A, Roussel AM, Decoux G, et al. Nutritional value and hypocholesterolemic effect of walnut meal in comparison with soybean and casein in rabbits. ***Med Nutr*** 1982:103–6.

364. Hogue DE, Adam AA. Protein sources for Nutr Conf Feed Manuf with animal fat. ***Rev Aliment Anim*** 1982;359:34–8.

365. Grosjean F, Castaing J. Study of the enrichment of barley–based swine feed with animal fat. ***Rev Aliment Anim*** 1982;359:34–8.

366. Zernicki W. Effect of fractionation of rapeseed, soybean, and linseed oilmeals by screen and pneumatic methods on their nutritional quality. II. Biological studies. ***Zesz Nauk Akad Roln–Tech Olsztynie, Technol Zywn*** 1982;(17):175–86.

367. Eggum BO, Pedersen B. Feed conversion and protein utilization in rats fed a soybean meal based diet fortified with either DL–, L– or D–methionine and cystine. ***Acta Agric Scand*** 1983;33(1):29–31.

368. Newport MJ, Keal HD. Effect of protein source on performance at 21 days of age. ***Anim Prod*** 1983;37(3):395–400.

369. Williams AP, Smith RH, McAllan AB. Undergraded dietary protein estimated by *in vivo*, *in vitro* and 'in rumen' methods. ***Colloq INRA*** 1983l16:215–8.

370. Grenet E, Demarquilly C. The nitrogen value of lactosylurea for ruminants. ***Ibid*** 1983;16:329–32.

371. Zhang Y, Partridge IG, Mitchell KG. Amino acid supplementation of a starter diet for pigs weaned at three weeks of age. ***Ibid*** 1983;16:435–8.

372. Arai S. Nutritional properties of an oligopeptied mixture prepared from soy protein isolate by enzymic modification. ***Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1983;4(1):22–5.

373. Koishi H, Okuda T, Kajiwara N. The Nutritional evatluation of soy protein isolate in adult males. ***Ibid*** 1983;4(1):105–10.

374. Park YJ, Han IK. Influence of the combination of casein and isolated soybean protein with or without methionine supplementation on the growth, metabolism, and body

composition of growth rats. ***Han'guk Yongyang Siklyong Hakhoechi*** 1983;12(2):73–83.

375. Van der Aar PJ, Berger LL, Fahhey Jr GC, Loerch SC. Effects of alcohol treatments on utilization of soybean meal by lambs and chicks. ***J Anim Sci*** 1983;57(2):511–8.
376. Harrlold RL, Slanger WD, Haugse CN, Johnson RL. Phosphorus bioavailability in the chick: effects of protein source and clacium level. ***Ibid*** 1983;57(5):1173–81.
377. Paterson JA, Anderson BM, Bowman DK, Morrison RL, Williams JE. Effect of protein source and lasalocid on nitrogen digestibility and growth by rumnants. ***Ibid*** 198357(6):1537–44.
378. Lehner Y. Nutritional considerations in choosing protein and carbohydrate sources for use in pollen substitutes for honeybees. ***J Apic Res*** 1983;22(4):242–8.
379. Campos OF, Huber JT. Performance and digestion by calves in response to limestone added to milk replacers containing soy protein concentrate. ***J Dairy Sci*** 1983;66(11):2365–72.
380. Van Dijk HJ, O'Dell GD, Perry PR, Grimes LW. Extruded versus raw ground soybeans for dairy cows in early lactation. ***Ibid*** 1983;66(12):2521–5.
381. Takeuchi T, Satoh S, Watanabe T. studies on nutritive value of dietary lipids in fish. XXVII. Dietary lipids suitable for the practical feed of *Tilapia nilotica*. ***Nippon Suisan Gakkaishi*** 1983;49(9):1361–5.
382. Farnworth ER, Kramer JKG. The effect of dietary fatt acids on growth and carcass composition in the rat. ***Nutr Rep Int*** 1983;27(4):799–809.
383. Miller J. Some effects of dietary protein on growth and iron metabolism in anemic rats. ***Ibid*** 1983;27(6):1187–97.
384. Kubena KS, Landmann WA, Carpenter ZL. Suboptimal intake of magnesium in rats. ***Nutr Res*** (N Y) 1983;3(3):385–94.
385. Shan BG, Giroux A, Belonje B. Bioavailability of iron in ground beef and beef and plant protein concentrates. ***Ibid*** 1983;3(4):547–55.
386. Essien EU, Marshall MW. The rehabilitation of malnourished rats. With different sources of dietary lipids. ***Ibid*** 1983;3(6):865–79.
387. Takagi S, Murakami Y, Muraki A, Waki M. Digestibility and nutritional value of soy protein concentrate on rat nutrition. I. Effect of proteolytic pretreatment of soy protein

concentrate on amino acid pattern in small intestine and activities of enzymes related to digestion and metabolism of protein. ***Okayama Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku*** 1983;61:59–66.

388. Stojanovic S. Biological cativity of amino acids in sunflower and soybean proteins in relation to their nutritive value. ***Poljopr Znan Smotra*** 1983; 62:425–45.
389. Teller E, Godeau JM. The nitrogen/sulfur ratio in the nutrition of the nutrition of the dairy cow. ***Rev Agric*** (Brussels) 1983;36(6):1661–7.
390. Kunachowicz H, Klys W, Czarnowska–Misztal E. Effect of different protein levels on the nutritional value of mixed diets with elevated levels of so protein. Part III. Levels of experimental animals. ***Rocz Panstw Zakl Hig*** 1983;34(3):245–50.
391. Battes K, Luca C, Maries S, Ilioaia T, Budescu D. Concentrated feed for growth fish. **Patent**:Rom RO 80,513. 1983;3pp.
392. Teller E, Godeau JM, Lebrun P. A study of different nitrogen supplements for lactating cows. ***Z Tierphysiol, Tierernaehr Futtermittelked*** 1983;49(2):98–104.
393. Burgstaller G, Zywczok H, Mogalle H, Mogalle H, Lindner JP. Use of protected soybean protein and calcium N–hydroxymethyl–DL–methionine in the feeding of high yielding dairy cows. 1. Feed intake and milk yield. ***Zuechtungskunde*** 1983;55(4):275–88.
394. Czarnowska–Misztal E, Kunachowicz H, Klys W. Effect of increased proportion of soy protein in diet on the development and on nitrogen metabolism in laboratory rats. ***Zywienie Czlowieka Metab*** 1983;10(2):87–108.
395. Young VR, Wayler A, Garza C, et al. A long–term metabolic balance study in young men to assess the nutritional quality of an isolated soy protein and beef protein and beef proteins. ***Am J Clin Nutr*** 1984;39(1):8–15.
396. Young VR, Puig M, Queiroz. E, Scrimshaw NS, Rand WM. Evaluation of the protein quality of an isolated soy protein in young men: relative nitrogen requirements and effect of methionine supplementation. ***Am J Clin Nutr*** 1984;39(1):16–24.
397. Berschauer F, Ehrensvaerd U. Studies of the nutritive physiological effects of dietary fat in rations of growing pigs. 6. Effect of soybean oil and also on some blood parameters of fattening pigs. ***Arch Tiernaehr*** 1984;34(3):191–204.

398. Staudacher W, Kirchgessner M, Steinhart H. Content of essential amino acids. in early weaned piglets fed different qualities and amounts of protein. ***Ibid*** 1984;34(4):263–72.

399. Clancy M. Animal feeds. **Patent**: Brit UK Pat Appl GB 2, 141, 316,(CI.A23K 1/22)1984;8pp.

400. Bell JM,Keith MO,Blake JA,McGregor DI.Nutritional evaluation of ammoniated mustard meal for use in swine feeds.***Can J Anim Sci***

401. Nakajima T,Wakamatsu H,Higashi Y.Nutritive value analysis of feeds by an *in vitro* digestion method using a freeze-dried reagent from pork small intestinal fluid.***Chikusan no Kenkyu*** 1984;38(7):843–8.

402. Kaneko K,Koike G.Supplementary effect of limiting amino acid on the utilization of soy protein isolate in human adults.***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1984;5(1):104–8.

403. Oslage HJ,Boehme H,Petersen U.Studies on the use of different feeding fats for growing fattening pigs.***Fette,Seifen,Anstrichm*** 1984;86(10):397–404.

404. Kang IO,Kim SH. Effect of casein,soy protein and corn gluten as protein sources in diets on the cellular development of arts during prenatal and lactating periods.***Han'guk Yongyang Siklyong Hakhoechi*** 1984;13(2):156–62.

405. Thacker PA,Sauer WC,Joergensen H.Amino acid availability and urea recycling in finishing swine fed barley-based diets supplemented with soybean meal or sunflower meal.***J Anim Sci*** 1984;59(2):409–15.

406. Sahlu T,Scingoethe DJ,Clark AK.Lactational and chemical evaluation of soybean meals heat-treated by two methods.***J Dairy Sci*** 1984;67(8):1725–38.

407. Rogers JA,Clark JH,Drendel TR,Fahey Jr GC.Milk production and nitrogen utilization by dairy cows infused postruminally with sodium caseimate soybean meal cottonseed meal.***Ibid*** 1984;67(9):1928–35.

408. Picciano MF,Weingartner KE,Erdman Jr JW.Relative bioavailability of dietary iron from three processed soy products.***Ibid*** 1984;49(6):1558–61.

409. Lo G, Settle SL, Steinke FH. Bioavailability of copper in isolated soybean protein using the rat as an experimental.***J Nutr*** 1984;114(2):332–40.

410. Ketelsen SM, Stuart MA, Weaver CM, Forbes RM, Erdman Jr JW. Bioavailability of zinc to rats from defatted soybean flour,acid–precipitated soybean concentrate and neutralized soybean concentrate as determined by intrinsic and extrinsic labeling techniques.***Ibid*** 1984;114(3):536–42.

411. Weaver CM, Nelson N, Elliott JG. Bioavailability of iron to rats from processed soybean fractions determined by intrinsic and extrinsic labeling techniques. ***Ibid*** 1984;114(6):1042–8.

412. Chen Z, Qin J, Fan X, Li X. Effects of adding lipids and juvenoid into the artificial diet on the feeding and reproduction of *Cocinella septempunctata*. ***Kunchong Xuebao*** 1984;27(2):136–46.

413. Antal M,Nagy K,Bedo M,et al.Effect of soya consumption on hepatic mono oxygenase enzyme system and some lipid parameters in rats.***Nahrung*** 1984;28(3):309–18.

414. Dinham D,Knight EM,Adkins J.The effect of protein quality on fetal development and 33Smethionine incorporation into protein of rat fetuses.***Nutr Rep Int*** 1984;29(1):23–34.

415. Samman N,Farias RN.Effect of dietary lipids on evaluation of protein quring 24 hour feeding period.***Ibid*** 1984;29(2):411–8.

416. Beynen AC,Ven Gils LGM.Postprandial levels of serum glucose and performance of veal calves fed milk erplacers containing skim milk powder or soybean protein concentrate.***Ibid*** 1984;29(3):663–71.

417. Ballan GC, Nelson TS,Kirby LK.The effect of phytate and fiber source on phytate hydrolysis and mineral availability in rats.***Ibid*** 1984;30(5):1089–100.

418. Delisle J,Amiot J,Goulet G,Simard C,Brisson GJ,Jones JD.Nutritive value of protein fractions extracted from soybean,rapeseed and wheat flours in rat.***Qual Plant – Plant Foods Hum Nutr*** 1984;34(4):243–51.

419. O'Dell BL,Browning JD,Reeves PG.Interaction of zinc and major nutrients in the stability of rat erythrocytes.Trace Elem Man Anim'TEMA 5,Proc Int Symp,5th 1984:75–9.

420. Pond WG,Laurent SM,Orloff HD.Effect of dietary clinoptilolite or zeolite Na–A on body weidht gain and feed utilization of growing lambs fed urea or intact protein as a nitrogen supplement.***Zeolites*** 1984;4(2):127–32.

421. Campabadal H,Carlos M,Zumbado A,Mario E.Evealuation of protein sources in broiler chick feeding.***Agron Costarric*** 1985;9(1):41–6.

422. Lynch SR,Dassenko SA,Morck T,Beard JL,Cook JD.Soy protein products and heme iron absorption in humans.***Am J Clin Nutr*** 1985;41(1):13–20.

423. Kishi K,Maegawa M,Yamamoto S,Shizuka F,Inoue G.Nutritive value of soy protein isolate and effect of methionine supplementation in human adults. ***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1985;6(1):88–95.

424. Cosgrove SB, Corley JR, Mahan DC. Effects of combining protein sources on lysine utilization by starter pigs. ***J Anim Sci*** 1985 ; 60(2) : 470–3.

425. Stern MD, Santos KA, Satter LD. Protein degradation in rumen and amino acid absorption in small intestine of lactating dairy cattle fed heat–treated whole soybeans. ***J Dairy Sci*** 1985 ; 68(1) : 45–56.

426. Claypool DW, Hoffman CH, Oldfield JE, Adams HP. Canola meal, cottonseed, and soybean meals as protein supplements for calves. ***Ibid*** 1985 ; 68(1) : 67–76.

427. Reddy NS, Reddy PR. Effect of varying levels of proteins from soybeans and fortification of soybeans with methionine on the bioavallability of iron. ***Nutr Rep Int*** 1985 ; 31(1) : 115–20.

428. Savitri A, Desikachar HSR. A comparative study of flatus production in relation to the oligosaccharide content of some legumes. ***Ibid*** 1985 ; 31(2) : 337–44.

429. Meyer EW. Dry mixes of zinc salts with particulate proteinaceous feeds for ruminates. **Patent** : S African ZA 85 00, 134, 1985 : 21pp.

430. Nekrasova VB, Kovalev VE. Effect of β–sitosterol on the biological value of fats and oils. ***Vopr Pitan*** 1985 ; (6) : 60–3.

431. Ausman LM, Gallina DL, Hayes KC, Hegsted DM. Comparative assessment of soy milk protein quality in infant cebus monkeys. ***Am J Clin Nutr*** 1986 ; 43(1) : 112–27.

432. Russell LE, Easter RA, Gomez–Rojas V, Cromwell GL, Stahly TS. A note on the supplementation of low–protein, maize–soybean meal diets with lysine, tryptophan, threonine and methionine for growing pigs. ***Anim Prod*** 1986 ; 42(2) : 291–5.

433. Mohamed K, Larbier M, Leclercq B. A comparative study of the digestibility of soybean and cottonseed meal amino acids in domestic chicks and muscovy ducklings. ***Ann Zootech*** 1986 ; 35(1) : 79–85.

434. Murai T, Ogata H, Kosutarak P, Arai S. Effects of amino acid supplementation and methanol treatment on utilization of soy flour by fingerling carp. ***Aquaculture*** 1986 ; 56(3–4) : 197–206.

435. Fiems LO, Boucque CV, Cottyn BG, Buysse FX. Cottonseed meal and maize gluten feed versus soybean meal as protein supplements in calf starters. ***Arch Anim Nutr*** 1986 ; 36(8) : 731–40.

436. Gabel M, Poppe S. Investigations into protein and amino acid metabolism in the digestive tract of growing bulls. 5. Flow of amino acids into the duodenum. ***Arch Tierernaehr*** 1986 ; 36(4–5) : 431–56.

437. Labudova OA, Lichvar I. Use of different lysine forms in piglet feeding. ***Dokl Vses Akad S–kh Nauk im V I Lenina*** 1986 ; (4) : 36–7.

438. Mitchell GV, Grundel E. Nutritional value of proteins in powdered infant formula : *In vitro* and *in vivo* methods. ***J Agric Food Chem*** 1986 ; 34(4) : 650–3.

439. Rowan TG, Lawrence TLJ. Growth, tissue deposition and metabolism studies in growing pigs given low glucosinolate rapeseed meal diets containing different amounts of copper and polyethyleneglycol. ***J Agric Sci*** 1986 ; 107(3) : 505–13.

440. Hill GM, Utley PR, Newton GL. Influence of dietary crude protein on peanut skin digestibility and utilization by feedlot steers. ***J Anim Sci*** 1986 ; 62(4) : 887–94.

441. Walker WR, Maxwell CV, Owens FN, Buchanan DS. Milk versus soybean protein sources for pigs : II. Effects on performance and digestibility. ***Ibid*** 1986 ; 63(2) : 505–12.

442. Walker WR, Maxwell CV, Owens FN, Buchanan DS. Milk versus soybean protein sources for pigs : II. Effects on amino acid availability. ***Ibid*** 1986 ; 63(2) : 513–24.

443. Koeln LL, Paterson JA. Nitrogen balance and amino acid disappearance from the small intestine in calves fed soybean meal–, toasted soybean meal–or corn gluten meal–supple–mented diets. ***Ibid*** 1986 ; 63(4) : 1258–66.

444. Stock R, Klopfenstein TBD. Whey as a source of rumen–degradable protein. II. For growing ruminants. ***Ibid*** 1986 ; 116(5) : 1574–80.

445. Ling PR, Hamawy KJ, Moldawer LL, Istfan N, Bistrain BR, Blackburn GL. Evaluation of the protein quality of diets containing medium–and long–chain triglyceride in healthy rats. ***J Nutr*** 1986 ; 116(3) : 343–9.

446. Fomon SJ, Ziegler EE, Nelson SE, Edwards BB. Requirement for sulfer–containing amino acids in infancy. ***Ibid*** 1986 ; 116(8) : 1405–22.

447. Koski KG, Hill FW. Effect of low carbohydrate diets during pregnancy on parturition and postnatal survival of the newborn rat pup. ***Ibid*** 1986 ; 116(10) : 1938–48.

448. Jenkins MY, Mitchell GV. Effects of dietary protein on growth and on plasma and liver vitamin A and E levels in young rats. ***Nutr Res*** (N Y) 1986 ; 6(9) : 1083–94.

449. Dale NM, Fuller HL. Repeatability of true metabolizable energy versus nitrogen corrected true metabolizable energy values. ***Poult Sci*** 1986 ; 65(2) : 352–4.

450. Tsujiwaki G, Hirose M, Yahiro M. Human milk fat substitutes. **Patent** : Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 61, 209, 544 [86, 209, 544], 1986 ; 4pp.

451. Tamura T, Takahashi T, Matsuda S. Fermentation product as food for patients with liver failure. **Patent** : Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 62, 234, 026 [87, 234, 026], 1987 ; 6pp.

452. Pesti GM, Arraes RA, Miller BR. Use of the quadratic growth response to dietary protein and energy concentrations in least–cost feed formulation. ***Poult Sci*** 1986 ; 65(6) : 1040–51.

453. Nakada M. Manufacture of feeds for fish and shellfish. **Patent** : Jpn Tokkyo Koho JP 61 07, 310 [86 07, 310], 1986 : 3pp.

454. Carre B, Brillouet JM. Yield and composition od cell wall residues isolated from various feedstuffs used for non–ruminant farm animals. ***J Sci Food Agric*** 1986 ; 37(4) : 341–51.

455. Hvelplund T, Hesselholt M. Digestibility of individual amino acids in rumen microbial protein and undegraded dietary protein in the small intestine of sheep. ***Acta Agric Scand*** 1987; 37(4) : 469–77.

456. Kal'nitskii BD, Kuznesov SG, Bataeva AP, Pustovoi VV. Biological availability of trace elements for young pigs from new and conventional feed materials. ***Nauchn Tr–Vses Nauchno–Issled Inst Fiziol, Biokhim Pitan S–kh Zhivotn*** 1986 ; 33 : 133–47.

457. Partridge IG, Low Ag, Matte JJ. Double–low rapeseed meal for pigs : ileal apparent digestibility of amino acids in diets containing various proportions of rapeseed meal, fish meal and soybean meal. ***Anim Prod*** 1987;44(3):415–20.

458. Furuya S, Nagano R, Kaji Y. True ileal digestibility of crude protein and amino acids in protein sources as determined by a regression method for growing pihs. ***Nippon Chikusan Gakkaiho*** 1986;57(10):859–70.

459. Liebert F, Gebhardt G. The requirement of selected amino acids by growing female pigs and their efficiency.2. Efficiency of methionine and cystine. ***Arch Anim Nutr*** 1987;37(2):159–67.

460. Ndlovu LR, Buchanan–Smith JG. Alfalfa supplementation of corncob diets for sheep: comparison with higher volatile fatty acids, soybean protein and alfalfa fiber on intake, environment and digestion in the rumen and digesta passage. ***Can J Anim Sci*** 1987;67(4):1083–91.

461. Smith Jr NK. Investigations of essential amino acid needs of broiler chickens fed diets based on corn, grain sorghum, and soybean meal. ***Diss Abstr Int B*** 1987;48(5):1199.

462. Korte E. Amino acids analysis in food chemistry. ***GIT–Suppl*** 1987;(7):57–8.

463. Bajnogel F, Kallai M, "Bertoti I, Stankivics L, Hajas P. Preparation of feed with highbiological value and optimum protein content suitable for young domestie animals. **Patent**:Hung Teljes HU 42,302,1987:18pp.

464. Russell LE, Kerr BJ, Easter RA. Limiting amino acids in an 11% Crude protein corn–soybean meal diet for growing pihs. ***J Anim Sci*** 1987;65(5):1266–72.

465. Casper DP, Schingoethe DJ, Yang CMJ, Mueller CR. Protected methionine supple–mentation with extruded blend of soybeans and soybean meal for dairy cows. ***J Dairy Sci*** 1987; 70(2): 321–30.

466. Gregory PC, Rayner DV. The injluence of gastrointestinal injusion of fats on regulation of food intake in pigs. ***J Physiol*** (London) 1987; 385:471–81.

467. Tamura T, Takahashi T, Matsuda S. Fermentation product as food for patients with liver failure. **Patent**: Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 62,234, 026 [87, 234, 026], 1987;6pp.

468. Tamur T, Takahashi T, Matsuda S. Fermentation product as food additives for patients with hyperlipidemia. **Patent**: Kokai Tokkyo Koho JP 62,234,027 [87, 234, 027], 1987:6 pp.

469. Meisel H, Hagemeister H. Postprandial proteolysis of casein and soy protein. ***Milchwissenchaft*** 1987; 42(3): 153–8.

470. Kaji Y, Furuya S. The threoinine, methionine, tryptophan, isoleucine and valine requirements of growing pigs. ***Nippon Chikusan Gakkaiho*** 1987; 58(9): 743–9.

471. Lohrey EE. The effects of oxidized lipid on the biological measurement of quality of animal and vegetable proteins. ***N Z J Dairy Sci Technol*** 1987; 22(2): 131–42.

472. Semon BA, Leung PMB, Rogers QR, Gietzen DW. Effect of type of protein on food intake of rats fed high protein diets. ***Physiol Behav*** 1987:41(5):451–7.

473. Blair ME, Potter LM. Dificient amino acids in protein of dehulled soybean meal for young turkeys. ***Poult Sci*** 1987 ; 66(11) : 1813–7.

474. Motta S, Rostagno HS, Tafuri ML, Araujo JMA. Biological availability of vitamin E concentrates to chickens. ***Rev Soc Bras Zoctec*** 1987 ; 16(6) : 532–9.

475. Meyer EW. Protein–protected ruminant feeds. **Patent** : U S 4, 704, 287, 1987 ; 5pp.

476. Tkachev EZ, Moshkutelo II, Grigor'eva AI, Markova VD. Nutrient utilization by piglets receiving feed containing maximal amounts of legume seeds. ***Vestn S–kh Nauki*** (Moscow) 1987 ; (3) : 94–7.

477. Nikolaevskaya VR, Siviengsai C, Chernikov MP. Initial stages of protein assimilation in experimental artificial feeding. ***Vopr Pitan*** 1987 ; (6) : 54–8.

478. อรุณี สมมณี ชั้นเอก ทังสุบุตร. **การทดลองเลี้ยงปลานิลโดยใช้กากถั่วเหลืองป่นและรำละเอียดเป็นอาหารสมทบ**. วารสารวิทยาศาสตร์ 2530 ; 41(2) : 68–74.

479. Leibholz J, Mollah Y. Digestibility of threonine from protein concentrates for growing pigs. II. The digestibility of theonine to the terminal ileum in pigs given six protein concentrates. ***Aust J Agric Res*** 1988 ; 39(4) : 721–8.

480. Misir R, Blair R. Biotin bioavailability from protein supplements and cereal grains for weanling pigs. ***Can J Anim Sci*** 1988 ; 68(2) : 523–32.

481. Christensen K, Just A. Interactive effects of live weight, basal diet and fat supply on essential fatty acid status and blood concentrations of glulose, insulin and thyroxine

measured post–prandially in pigs. ***Comp Boichem Physiol, A : Comp Physiol*** 1988 ; 91A(2) : 279–91.

482. Sauer WC, Mosenthin R, Ozimek L. The digestibility of biotin in protein supplements and cereal grains for growing pigs. ***J Anim Sci*** 1988 ; 66(10) : 2583–9.
483. Windschhilt PM, Stern MD. Effects of urea supplementation of diets containing ligno–sulfonate–treated soybean meal on bacterial fermentation in continuous culture of ruminal contents. ***Ibid*** 1988 ; 66(11) : 2948–58.
484. Schingoethe DJ, Casper DP, Yang C, Illg DJ, Sommerfeldt JL, Mueller CR. Lactational response to soybean meal, heated soybean meal, and extruded soybeans with ruminally protected mithionine. ***J Dairy Sci*** 1988 ; 71(1) : 173–80.
485. Eastridge MI, Cunningham MD, Patterson JA. Effect of dietary energy source and concentration on performance of dairy cows during cearly lactation. ***Ibid*** 1988 ; 71(11) : 2959–66.
486. Windschitl PM, Stern MD. Evaluation of calcium lignosulfonate–treated soybean meal as a source of rumen protected protein for dairy cattle. ***Ibid*** 1988 ; 71(12) : 3310–22.
487. Poneros AG, Erdman Jr JW. Bioavailability of calcium fron tofu, tortillas, nonfat dry milk and mozzarella cheese in rats : effect of supplemental ascorbic acid. ***J Food Sci*** 1988 ; 53(1) : 208–10, 230.
488. Hosokawa Y, Niizeki S, Tojo H, Sato I, Yamaguchi K. Hepatic cysteine dioxygenase activity and sulfer amino acid metabolism in rats : possible indicators in the evaluation of protein quality. ***J Nutr*** 1988 ; 118(4) : 456–61.
489. Kelly DS, Nelson GJ, Serrato CM, Schmidt PC, Branch LB. Effects of type of dietary fat on indexes of immune status of rabbits. ***Ibid*** 1988 ; 118(11) : 1376–84.
490. Kimura H, Arai S. Oligopeptide mixtures produced from soy protein by enzymic modification and their nutritional qualities evaluated by feeding tests with normal and malnourished rats. ***J Nutr Sci Vitaminol*** 1988 ; 34(4) : 375–86.
491. Opstvedt J, Pettersen J, Mork SJ. Trans fatty acids. I. Growth, fertility, organ weights and nerve histology and conduction velocity in sows and offspring. ***Lipids*** 1988 ; 23(7) : 713–9.

492. Millamena OM, Bombeo RF, Jumalon NA, Simpson KL. Effects of various diets on the nutritional value of Artemia sp. As food for the prawn Penaeus monodon. ***Mar Biol*** (Berlin) 1988 ; 98(2) : 217–21.

493. Suehiro K, Sota M, Sogawa Y, et al. Nutritional effect of an elemental diet containing high branched–chain amino acids and fat emulsion in small intestine–resected rats. ***Nippon Jomyaku, Keicho Eiyo Kenkyukaishi*** 1988 ; 3 : 96–9.

494. Mizuta M, Sota M, Suehiro K, et al. Nutritional effect of high branched–chain amino acid–and fat emulsion–containing elemental diet, with special reference to the biochemical study of the liver. ***Ibid*** 1988 ; 3 : 100–2.

495. Chausow DG, Czarnecki–Maulden GL. The relative bioavailability of iron from feedstuffs of plant and animal origin to the chick. ***Nutr Res*** (N Y) 1988 ; 8(2) : 175–85.

496. Crick DC, Nwokolo EN, Sim JS. Effect of blending dietary oils on growth performance, total and individual fatty acid absorption by the growing chick. ***Ibid*** 1988 ; 8(6) : 643–51.

497. Gry J, Bille N, Kristiansen E, et al. Thermally oxidized soya bean oil interacted with mono and diglycerides of food fatty acids (esters of glycerol and thermally oxidized soybean fatty acids) : a long–term study in rats. ***Publ Levnedsmiddelstyr*** (Den) 1988 ; 172 : 154pp.

498. Le Henaff L, Rulquin H, Peyraud JL. Study on the disappearance of dietary amino acids in the rumen and intestine using the nylon bag method. ***Reprod, Nutr, Dev*** 1988 ; 28(Suppl. 1) : 133–4.

499. Meyer EW. Cattle feed containing zinc compounds for increasing protein utilization. **Patent** : U S 4, 737, 365, 1988 : 5pp.

500. Jayaprakash AZ, Zebrowska T. Nitrogen utilization by lambs depending on the source and level of protein in the ration. ***Zesz Probl Postepow Nauk Roln*** 1988 ; 352 : 177–81.

501. Puwastien P, Valaipatchara U, Vamaputha M, Kongkachuichai R, Chitchumroonchokchai C. Nutritive values of strict vegetarian diets. ***Mahidol Univ Annual Res Abst*** 1988 ; 5 : 642.

502. Shibata K, Matsuo H. Effect of dietary soy protein isolate level on the ratio of N^1–methl–2–pyridone–5–carboxamide plus n^1–methyl–4–pyridone–3–carboxamide to N^1–methylnicotinamide excretion in rats. ***Agric Biol Chem*** 1989 ; 53(4) : 1003–7.

503. Eid AE, Matty AJ. A simple *in vitro* method for measuring protein digestibility. ***Aquaculture*** 1989 ; 79(1–4) : 111–9.

504. Thomassen MS, Roesjoe C. Different fats in feed for salmon : influence on organoleptic properties, growth rate and fatty acids in muscle and heart. ***Ibid*** 1989 ; 79(1–4) : 129–35.

505. Kawata T, Doi T, Iijima T, Maekwa A. Effect of dietary protein on vitamin B12–deficiency in rats. ***Bitamin*** 1989 ; 63(9) : 401–8.

506. Kopinski JS, Leibholz J, Bryden WL. Biotin studies in pigs. 4. Biotin availability in feedstuffs for pigs and chickens. ***Br J Nutr*** 1989 ; 62(3) : 773–80.

507. Atteh JO, Lesson S, Summers JD. Effects of dietary sources and levels of fat on performance, nutrient retention and bone mineralization of broiler chicks fed two levels of calcium. ***Can J Anim Sci*** 1989 ; 69(2) : 459–67.

508. Cleale R, Morton IV. Nonenzymically browned soybean meal as a supplemental protein source for growing ruminants. ***Diss Abstr Int B*** 1989 ; 49(11) : 4616–7.

509. Kadzere C, Molnar S. Investigations of interactions between fats and calcium carbonate or dicalcium phosphate supplements following the feeding of lipid–rich rations to growing pigs. ***Fett Wiss Technol*** 1989 ; 91(4) : 135–48.

510. Blair R, Misir R. Biotin bioavailability from protein supplements and cereal grains for growing broiler chickens. ***Int J Vitam Nutr Res*** 1989 ; 59(1) : 55–8.

511. Churella HR, Vivian VM. Effect of phytic acid level in soy protein based infant formulas on mineral availavility in the rat. ***J Agric Food Chem*** 1989;37(5):1352–7.

512. Khorasani GR, Ozimek L, Sauer WC, Kennelly JJ. Substitution of milk protein with isolated soy protein in calf milk replacers. ***J Anim Sci*** 1989;67(6):1634–41.

513. Coffey KP, Paterson JA, Saul CS, Coffey LS, Turner KE, Bowman JG. The influence of pregnancy and source of supplemental protein on intake, digestive kinetics and amino acid absorption by ewes. ***Ibid*** 1989;67(7):1805–14.

514. Erickson PS, Schauff DJ, Murphy MR. Diet digestibility and growth of Holstein calves fed acidified milk replacers containing soy protein concentrate. ***J Dairy Sci*** 1989;72(6):1528–33.

515. McCarthy Jr RD, Klusmeyer "TH, Vicini JL, Clark JH, Nelson DR. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. ***Ibid*** 1989;72(8):2002–16.

516. Gordon DT, Godber JS. The enhancement of nonheme iron bioavailability by beef protein in the rat. ***J Nutr*** 1989;119(3):446–52.

517. Nagashima A, Tanabe Y, Enoki T, Tomori T, Takaesu Y. Composition and fluoride content of commercially available experimental diets for animals. ***Koku Eisei Gakkai Zasshi*** 1989;39(1):2–8.

518. Roth–Maier DA, Kirchgessner M. Raw and extruded soybeans in digestibility and fattening trials with pigs. ***Landwirtsch Forsch*** 1989;42(2/3):205–15.

519. Ohmura H, Matsuoka Y, Fukada T. Effect of mulberry leaf protein and other proteins on the feeding of larvae of the silkworm, Bombyx mori. ***Nippon Sanshigaku Zasshi*** 1989;58(2):96–100.

520. Murai T, Ogata H, Villaneda A, Watanabe T. Utilization of soy flour by fingerling rainbow trout having different body size. ***Nippon Suisan Gakkaishi*** 1989;55(6):1067–73.

521. Hancock JD, Lewis AJ, Peo Jr ER. Effects of ethanol extraction on the utilization of soybean protein by growing rats. ***Nutr Rep Int*** 1989;39(4):813–21.

522. Khan A, Weaver CM. Bioavailability of zing to rats from soybeans and casein as affected by protein source and length of adaptation. ***Nutr Res*** (N Y) 1989;9(3):327–36.

523. Buchowski MS, Mahoney AW, Kalpalathika MPV. Nongeme iron absorption, apparent iron absorption and hemoglobin regeneration efficiency in anemic and normal rats fed with dietary heme and nonheme iron at various levels. ***Ibid*** 1989;9(7):773–83.

524. Sarwar G, Peace RW, Botting HG, Brule D. Relationship between amino acid scores and protein quality indexes based on rat growth. ***Plant Foods Hum Nutr*** (Dordrecht, Neth) 1989;39(1):33–44.

525. McDonough FE, Bodwell CE, Staples RS, Wells PA. Rat bioassays for methionine availability in 16 foof sources. ***Ibid*** 1989;39(1):77–84.

526. McDonough FE, Bodwell CE, Wells PA, Kamalu JA. Bioavailab ility of tryptophan in selected foods by rat growth assay. ***Ibid*** 1989;39(1):85–91.

527. Lee DY, Johnson PE. Manganese –54 absorption and excretion in rats fed protein and casein diets. ***Proc Soc Exp Biol Med*** 1989;190(2):211–6.

528. Nikolaevskaya VR, Ekimovskii AP, Chernikov MP. Comparative study of the biological value of qualitatively different proteins and their hydrolyzability by digestive proteinases. ***Vopr Pitan*** 1989 ; (2) : 37–42.

529. Zucker H, Flurer CI. The protein requirement of adult marmosets : nitrogen balances and net protein utilization of milk proteins, soy proteins, and amino acid mixtures. ***Z Ernaehrungswiss*** 1989 ; 28(2) : 142–8.

530. Siriworawat S. Nutritive value of soybean and cow's milk based infant formulas : effects on mineral status. ***MS Thesis***, Mahidol Univ 1993.

531. Puchaiwatananon O. Effects of soybean–based formula supplementation on protein–energy and lipid status in thalassemic children. ***MS Thesis***, Mahidol Univ 1993.

532. Pianpaktr B. Nutritive value of soybean and cow's milk based infant formula : effects on growth , protein status and stool characteristics. ***MS Thesis***, Mahidol Univ 1993.

533. Araya J, Robert P, Barriga C. Reversal of brain and erythrocytes omega–3 docosahexaenoic acid deficiency in the sucking rats by maternal dietary supplement containing either soybean oil or fish oil. ***Arch Latinoam Nutr*** 1994 ; 44(2) : 105–11.

534. Kanthatasiri J. Effect of soybean–based formula intake on protein–calorie status in healthy adults and patients on tube feeding. ***MS Thesis***, Mahidol Univ 1994.

535. Sugawara N, Yamaguchi A, Sugawara C, et al. Effect of protein nutrition on hepatic cancer in LEC (Long Evans cinnamon) rat. (2) Feeding of F1 (LEC x Fischer) rats a soy protein diet with or without addition of methionine. ***Daizu Tanpakushitsu Kenkyukai Kaishi*** 1995 ; 16 : 128–32.

536. Henning U, Souffrant WB. Additivity of the prececal apparent amino acid absorption of diets based on maize with meals of sunflower–, cotton–, linseed or soybean in pigs. ***Schriftenr–Forschungsinst Biol Landwirtsch Nutztiere*** 1994 ; 3 : 107–10.

537. Park K–K. Effects of adding various substrates to broiler litter before deep–stackinog on nutrient composition, digestivility and recovery (xylose, soybean meal). ***Diss Abstr Int, B*** 1996 ; 57(3) : 1519.

538. Kornrgay ET, Denbow DM, Yi Z, Ravindran V. Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize–soybean–meal–based diets containing three levels of non–phyrtate phosphours. ***Br J Nutr*** 1996 ; 75(6) : 839–52.

539. Hammond BG, Vicni JL, Hartnell GF, et al. The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. ***J Nutr*** 1996 ; 126(3) : 717–27.

540. Yi Z, Kornegay ET, Ravindran V, Lindemann MD, Wilson JH. Effectiveness of Natuphos phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in soybean metal–based semipurified diets for young pigs. ***J Anim Sci*** 1996 ; 74(7) : 1601–11.

541. Adeola O. Bioavailability of tryptophan in soybean meal for 10–kg pigs using slope–ratio assay. ***Ibid*** 1996 ; 74(10) : 2411–9.

542. Hajos G, Gelencser E, Grant G, et al. Effect of proteolytic modification and methionine enrichment on the nutritional value of soya albumins for rats. ***J Nutr Biochem*** 1996 ; 7(9) : 481–7.

543. Hadorn R, Wenk C. Effect of different sources of dietary fiber on nutrient and energy utilization in broilers. Part 1. Characterization of the diets, growth performance, and nutrient utilization. ***Arch Gefluegelkd*** 1996 ; 60(1) : 14–21.

544. Czarnowska–Misztal E, Kunachowicz H, Klys W, Dziekan A. Effect of increased proportion of soy protein in the diet on the development and nitrogen metabolism of two generations of rats. ***Rocz Panstw Zakl Hig*** 1983;34(1):21–7.

545. Rubin M, Bird HR, Rothchild I. A growth–promoting factor for chick in the feces of hens. ***Poullry Sci*** 1946 ; 25 : 526–8.

546. Carver DS, Johnson EL. Unidentified growth factors for the chick in vegetable oils and fatty acid concentrates. ***Ibid*** 1953 ; 32 : 701–5.

547. Jensen LS, Mraz FR. Rachitogenic activity of isolated soybean protein for chicks. ***J Nutr*** 1966 ; 88(2) : 249–53.

548. Lebas F, Cousin MC, Sardi G. Growth performances of the rabbit as affected by the protein level of soybean or sesame diets. ***Ann Zootech*** 1973 ; 22(1) : 83–92.

549. Castell AG, Spurr DT. Effects of dietary composition on the relative performance and carcass characteristics of male and female pigs fed from 25 kg to 92 kg liveweight. ***Can J Anim Sci*** 1976 ; 56(3) : 439–50.

550. Viola S, Rappaport U. Acidulated soapstocks in intensive carp diets their effect on growth and body composition. Symposium on Finfish Nutrition and Feed Technology, Hamburg, Germany.

551. Yamaguchi M, Iwaya M, Miyazaki M. Comparison of nutritional effects of soy protein isolate and its original soybean meal in growing rats. ***Eiyogaku Zasshi*** 1981 ; 39(6) : 275–84.

552. Yao H, Cai F, Qin H, et al. Effects of soybean protein–fortified children's food on growth and nitrogen metabolism. ***Nanjing Yixueyuan Xuebao*** 1986 ; 6(3) : 195–7.

553. Davenport GM, Boling JA, Gay N, Bunting LD. Effect of soybean lipid on growth and ruminal nitrogen metabolism in cattle fed soybean meal or ground whole soybeans. ***J Anim Sci*** 1987 ; 65(6) : 1680–9.

554. Murata M, Imaizumi K, Sugano M. Hypocholesterolemic action of soybean phospholipif and its long–term effects on growth, immunological and physiological parameters of mice. ***Gakuger Zasshi–Kyushu Faigaku Nogakubu*** 1988;42(3/4):187–90

555. Vit P, Cioccia AM, Brito O, Hevia P. Minimal time required for ddetecting defferences between soy and gelatin using uric acid excretion and purine enzymes as indicators of protein quality in chickens. ***Arch Latinoam Nutr*** 1993;43(4):286–93.

556. Hussein HS, Berger LL. Feedlot performance and carcass characteristics of Holstein steers as affected by source of dietary protein and level of ruminally protected lysine and methionine. ***J Anim Sci*** 1995;73(12):3503–9.

557. Zijlstra RT, Mies AM, McCracken BA, et al. Short–term metabolic responses do not differ between neonatal piglets fed formulas containing hydrolyzed or intract soy proteins. ***J Nutr*** 1996;126(4):913–23.

558. Bears JL, Burton JW, Theli EC. Pueified ferritin and soybean meal can be sources of iron for treating iron deficiency in rats. ***Ibid*** 1996;126(1):154–60.

559. Kim I–H. The effects of novel processing on nutritional value of soybeans and cereal grains for nursery, growing, and finishing pigs and lactating sows. ***Diss Abstr Int, B*** 1996;57(1):8.

560. Owen KQ, Nelssen JL, Goodband RD, Weeden TL, Blum SA. Effect of L–carnitine and soybean oil on growth performance and body composition of eaely–weaned pigs. ***J Anim Sci*** 1996;74(7):1612–9.

561. Vohra P, Heil JR. Growth–promoting properties of crude soybean phospholipids. ***Poultry Sci*** 1969;48(5):1661–7.

562. Davis SL, Dodson MV, Ohlson DL. Continuous elevation of blood growth hormone concentrations by beeswax implant. ***J Dairy Sci*** 1983;66(9):1980–2

563. Imaki T, Shibasaki T, Shizume K, et al. The effect of free fatty acids on growth hormone. ***J Clin Endocrinol Metab*** 1985;60(2):290–3

564. Takeba G, Nakajema Y, Kozaki A, Tanaka O, Kasai Z. A flower–indvcing substance of high molecular weight from higher plants. ***Plant Physiol*** 1990;94(4):1677–81

565. Kubo M. Bacillus for degradation of soybean lees for preparation of plant growth promoting substances. **Patent** :Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 07,313,148 [95,313,148], 1995:10pp.

566. Evans LS, Tramontano WA. Trigonelline and promotion of cell arrest in G2 of various legumes. ***ACS Symp Ser*** 1984;257:75–82.

567. Sunkova EI, Kalinina MV. Effect of vegetable and whale oils on mycelium growth and oleandomycin production in Actinomyces [Streptomyces] antibioticus. ***Mikrobiologiya*** 1969;37(1):152–8.

568. Cotugno M, Gallone U, Izzi R, Sansone G, Biondi G, Biondi A. Effect of the nonsapomifiable components of the most common edible oils on *Escherichia coli* bacterial developmint. ***Boll–Soc Ital Biol Sper*** 1980;56(20):2151–7.

569. Miyamoto T, Hirata N, Nakae T. Isolation from soy milk of agrowth–stimulating substance for lactic acid bacteria. ***Nippon chikusan Gakkaiho*** 1987;58(9):754–63.

570. Miyazawa T, Rebhung F, Fujimoto K, Kaneda T. Effects of soybean oill supplementation in palm oil diet on weight gain and tissue lipids of rats. ***Nutr, Lipids, Health, Dis,*** [Proc UNESCO Conf] 1994:129–38.

571. Noguchi T, Takenaka A, Hidaka T. SPI as the principal nitrogen source of a designed diet for galactosamine–induced hepatitic rats. ***Daizu Tanpakushitsu Kenkyukai Kaishi*** 1995;16:115–8.

572. Maitani Y, Hazama M, Tojo H, Qi X–R, Nagai T. Effects of orally administered liposomes with soybean–derived sterols and their glucosides on rat body weight. ***Biol Pharm Bull*** 1995;18(11):1551–5.

573. Koga T, Kikuchi M. Isolation and characterization of a novel immunomodulating fraction from soybeans. ***Biosci Biotech Biochem*** 1993;57(3):367–71.

574. Lalles JP, Dreau D, Femenia F, Parode AL, Toullec R. Feeding heated soybean flour increases the density of B and T lymphocytes in the small intestine of calves. ***Vet Immunol Immunopathol*** 1996;52(1,2):105–15.

575. Krugluger W, Lucas T, Koeller M, Boltz–Nitulescu G, Foerster O. Soybean agglutinin binds a 160–kDa rat macrophage membrane glycoprotein and enhances cell defferentiation and activation. ***Immunol Lett*** 1996;52(1):53–6

576. Henderson CW, Scheerens JC, Berry JW. Antinutritional Factors in Cucurbita seed meals. ***J Agr Food Chem*** 1986;34(3):434–6.

577. Filisetti TMCC, Filho JM, Marquez UML, Lajolo FM. Anti–nutritional factors in commercial soybean products. ***Rev Farm Bioquim Univ Sao Paulo*** 1977;15(1–2):93–108.

578. Sitrin HS, Ahmid EM, George DE. *In vivo* and *in vitro* assessment or antinutritional factors in peanut and soy. ***J Food Sci*** 1985;50(2):418–23.

579. Marzo F, Santidrian S, Larralde J. Effect of tannic acid on the intestinal absorption of D–galactose in chicks. ***Rev Esp Fisiol*** 1987;43(4):529–30.

580. Petres J, Senkalszky Akos E, Czukor B. Antinutritive materials in soybeans. Part II. Antinutritive substances of soy products. ***Elelmez Ip*** 1988:42(9):321–4.

581. Comai K, Triscari JB, Sullivan AC. Differences between lean and obese Zucker rats: the effect of poorly absorbed dietary lipid on energy intake and body weight gain. ***J Nutr*** 1978;108(5):826–35.

582. Abe Masao, Ogawa T, Nagai Y, Sakabe Y. Studies on edible fats and oils. (5). Effects of high dietary fiber on digestion of thermally oxidized oil. ***Nagoya-shi Eisei Kenkyushoho*** 1988;34:61-5.

583. Miiho Y, Yamazaki T, Hosono T, Nakajima Y, Ishizaki M, Kurashige T. Pharmacological studies on small piptide fraction derived from soybean. The effects of small peptide fraction derived from soybean on fatigue, obesity and glycemia in mice. ***Yakugaku Zasshi*** 1993;113(4):334-42.

584. Gerry RW, Carrick CW, Hauge SM. Untoasted soybean-oil medl in a simplified chick ration. ***Poultry Sci*** 1948;27:621-6.

585. Lienet IE, Spector H, Fevold HL, Berryman GH. Effect of soybean growth inhibitors on the availability of methionine for growth and lipotropism. ***Arch Biochem*** 1949;27:621-6.

586. Haines PC, Lyman RL. Relation of pancreatic enzyme secretion to growth inhibition in rats fed soybean trypsin inhibitor. ***J Nutr*** 1961;74:445-52.

587. Iwal H, Kenmoku A. The effect of water soluble substances of soybean oil meal on the growth of rats. ***Eiyogaku Zasshi*** 1962;20:115-20.

588. Rackis JJ, Smith AK, Nash AM, Robbins DJ, Booth AN. Feeding studies on soybeans. ***Cereal Chem*** 1963;40(5):531-8.

589. Lang K, Kieckebusch W, Jahr K, Czok G, Griem W, Degkwitz E. Physiological actions of hydroxylated soybean oil. ***Helv Physiol Pharmacol Acta*** 1963;21(4):354-64.

590. Schingoethe DJ, Aust SD, Thomas JW. Separation of a mouse growth inhibitor in soybeans from trypsin inhibitors. ***J Nutr*** 1970;100(7):739-48.

591. Nolen FA. Feeding study of a used, partially hydrogenated soybean oil, frying fat in dogs. ***Ibid*** 1973;103(9):1248-55.

592. Cappelli V, Cuzzoni MT, Gazzani G, Griziotti A. Comparative strdy in rats fed different vegetable oils. II. Body growth, organ weights, percentage distribution of fatty acids in the liver. ***IRCS Med Sci: Libr Compend*** 1983;11(7):625-6.

593. Takigwa A, Ohyama Y. Effects of oxidized oil on developmint of encephalomalacia, growth, digestion and organs in chicks. ***Nippon Chikusan Gakkaiho*** 1983;54(8):444-50.

594. Grant G, Watt WB, Stewart JC, Pusztai A. Effects of dietary soybean (*Glycine max*) lectin and trypsin inhibitors upon the pancreas of rats. ***Med Sci Res*** 1987;15(19):1197–8.

595. Rees JC, Chan BG, Waiss Jr AC. Effects of cotton condensed tannin, maysin (corn) and pinitol (soybeans) on Heliohis zea growth and developmint. ***J Chem Ecol*** 1982;8(12):1429–36.

596. Cotugno M, Gallone U, Sansone G, Barone E, cozzolino A, Biondi A. Effect of the unsaponifiable fraction of the most common edible oils on the growth of the alga *Euglena gracilis*. ***Boll–Soc Ital Biol Sper*** 1981;57(9):970–3.

597. Inamori Y, Muro C, Yoshioka M, et al. Phytogrowth–inhibitory activities of sulfurcontaining compounds. II. The inhibitory activities of thiosalicylic acid and dihydro–2(3H)–thiophenone–related compounds on plant growth. ***Biol Pharm Bull*** 1993;16(8):813–6.

598. Mukhopadyaya P, Gupta JD, Senval U, Das S. Influence of deetary restriction and soyabean supplementation on the growth of a murine lymphoma and host immune function. ***Cancer Lett*** 1994;78(1/3):151–7.

599. Yu LP, Jiang M, Liu J, Zhao Q. Inhibitting effects of total soyasaponin on tumor cells. ***Baiqiuen Yike Daxue Xuebao*** 1992;18(4):333–5.

600. Imaki T. Metabolic effect on growth hormone–relesaing factor (GHRF) –mediated growth hormone secretion. ***Tokyo Joshi Ika Daigaku Zasshi*** 1984;20(1–2):1314–23.

601. Lourenco EJ, Zucas SM, Braganca Pereira CA. Effect of protein diet on organ development. Test with rats. ***An Farm Quim Sao Paulo*** 1980;20(1–2):254–60.

602. Zhang JX, Lundin E, Reuterving CO, et al. Effects of rye bran, oat bran and soya–bean fibre on bile composition, gallstone formation, gall–bladder morphology and serum cholesterol in Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). ***Brit J Nutr*** 1994;71(6):861–70.

603. Matsuo M, Hitomi E. Supprission of plasma cholesterol elevation by Lkara Tempe in rats. ***Biosci Biotech Biochem*** 1993;57(7):1188–90.

604. Uberoi SK, Vadhera S, Soni GL. Role of dietary fibre from pulses and cereals as hypocho-lesterolemic and hypolipidemic agent. ***J Food Sci Technol*** 1992;29(5):281-3.

605. Pant MC, Uddin I, Bhardwaj UR, Tewari RD. Blood sugar and total cholesterol lowering effect of *Glycine soja* (Sieb and Zucc.) *Mucuna Pruriens* (D.C.) and *Dolichos biflorus* (Linn.) seed diets in normal fasting albino rats. ***Indian J Med Res*** 1968;56(12):1808-12.

606. Terpstra AHM, West CE, Fennis JTCM, Schouten JA, Van Der Veen EA. Hypocholesterolemic effect of dietary soy protein versus casein in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). ***Amer J Clin Nutr*** 1984;39:1-7.

607. De Bruin TWA, Brouwer CB, Trip MLS, Jansen H, Erkelens DW. Different postprandial metabolism of olive oil and soybean oil: a possible mechanism of the high-density lipoprotein conserving effect of olive oil. ***Amer J Clin Nutr*** 1993;58(4)477:83.

608. Chindavanig A. Effect of vegetable oils on plasma cholesterol in man and dog. ***MS Thesis***, Department of Bilchemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailsnd, 1971:58pp.

609. Webb TE, Stromberg PC, Abou-Issa H, Curley Jr RW, Moeschberger M. Effect of dietary soybean and licorice on the male F344 rat:: an integrated study of some parameters relevant to cancer chemoprevention. ***Nutr Cancer*** 1992;18(3):215-30.

610. Clarkson TB, Stanton King Jr J, Warnock NH. The hypocholesterolizing effect of gallogen and its potentiation of soybean sterols. ***Circulation Research*** 1956;4:54-6.

611. Hill EG, Peifer JJ, Lundeberg WO. Influence of sex and dietary phosphatides on cholesterol levels in blood plasma of swine. ***Proc Soc Exptl Biol Med*** 1958;99:586-9.

612. Bartov I, Budowski P, Bornstein S. Anticholesterolic effects of soybean sterols. ***Eiyo to Shokuryo*** 1970;49(6):1492-500.

613. Yasui A, Kaneda T. Synergistic effect of tocopherols on plasma cholesterol-lvwering effect of vegetable sterols. ***Eiyo To Shokuryo*** 1973;26(1):27-32.

614. Girardet M, Jacotot B, Mendy F, Piganeau P, Beaumont JL. Effects of edible oils on blood and arterial lipids in rats after one year's balanced normolipidic diet. ***J Med*** (Wesbury, N Y) 1977;8(3–4):261–78.

615. Fumagalli R, Paoletti R, Howard AN. Hypocholesterolaemic effect of soya. ***Life Sci*** 1978;22(11):947–52.

616. Sim JS, Bragg DB. Effect of dietary oil, cholesterol, and soy sterols on the lipid concentration and fatty acid composition of egg yolk, liver and serum of laying hens. ***Poult Sci*** 1978;57(2):466–72.

617. Potter JD, Topping DL, Oakenfull D. Soy, saponins, and plasma cholesterol. ***Lancet*** 1979;1(8109):223.

618. Antibioticos SA. Nonsaponifiable soybean oil fraction as an hypolipemic drug. **Patent**: Span ES 481,093,1980;64pp.

619. Thacker PA, Bowland JP, Fenton M. Cholesterol metabolism in pigs fed propionic acid containing diets supplemented with soybean meal or canola meal. ***Agric For Bull*** 1981;20–2.

620. Ashida K. Effect of soy bean protein isolate on lipid metabolism. ***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1981;2(1):27–30.

621. Sugano M, Nagata Y. Hypocholesterolemic effect of soybean protein isolate in rats. ***Ibid*** 1981;2(1):45–51.

622. Kimura S, Odaka H. Camparative studies on the goitogenic activeties of defatted soybean and soybean protein isolate. ***Ibid*** 1981;2(1):86–90.

623. Nam HK, Sung HC, Chang IY. Studies on the effect in degree of saturation of fats on serum cholesterol level in the raabbit. ***Han'guk Yongyang Siklyong Hakhoechi*** 1981;10(1):27–37.

624. Carroll KK, Wlldward CJH. Hypocholesterolemic effects of soy protein in relation to amino acid composition :experimintal researches. Soy Protein Prev Atheroscler, Proc Int Symp, 4tj. 1981:21–6.

625. Descovich Gc, Mannino G, Benassi MS, et al. Treatment of hypercholesterolemic patients with soybean protein. ***Ibid*** 1981:21–6.

626. Barbara L, Mazzella G, Cornia GL, Testoni S, Pironi L, Roda E. Hepatobiliary effects of soybean protein diet. ***Ibid*** 1981;39–44.

627. Benassi Ms, Ceredi C, Copparoni G, er al. Modification of plasma fatty acid levels during soybean protein (Cholsoy L) treatment. ***Ibid*** 1981;63–71.

628. Sangilrgi Z, Benassi MS, Copparoni G, er al. Total and thin–layer chromatography fractio–nated phospholipids hypereholesterolemic patients during lecithinated textured soybean protein diet. ***Ibid*** 1981;83–7.

629. Gaddi A, Descovich GC, Benassi MS, et al. Dietary modification of serum free amino acids in hypercholesterolemic patients. ***Ibid*** 1981;89–98.

630. Sautier C, Dieng K, Flament C, Doucet C, Lemonnier D. Dietary proteins and metabolism of sterols in rats. ***Ibid*** 1981;99–106.

631. Kimura S, Kawamura M, Hirama M. Comparative studies on the goitrogenic activeties of soy bean and soy0 protein isolate. ***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1982;3(1)18–23.

632. Kanamori M, Doi H. The effects of soy protein isolate and its enzymic hydrolyzate on cholesterol metabolism. ***Ibid*** 1982;3(1):33–9.

633. Sugano M, Tanaka K, Ide T, Imaizumi K. Hypocholesterolemic effect of soy protein isolate in rats. ***Ibid*** 1982;3(1):33–9.

634. Hayashi S, Murakami Y, Hara Y. Effect of soybean protein isolate on the plasma cholesterol concentration in the rat. ***Ibid*** 1982;3(1):40–3.

635. Ashida K. Effect of soy protein isolate on lipid metabolism. ***Ibid*** 1982;3(1):77–9.

636. Ajinomoto Co, Inc. Polyunsaturated fatty acid–enriched oils. **Patent**:Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 8236,935,1982;5pp.

637. Julius AD, Wiggers KD, Richard MJ. Effect of infant foumulas on blood and tissue cholesterol,bone calcium, and bldy composition in weanling pigs. ***J Nutr*** 1982;112(12):2240–9.

638. Kim DN, Lee KT, Reiner JM, Thomas WA. Hypolipidemic action of soy protein in swine. ***Symp Giovanni Lorenzini Found*** 1982;13:265–70.

639. Sautier C, Dieng K, Flament C, Doucet C, Lemonnier D. Effects of dietary proteins and sodium phytate on the lipoproteins and the metabolism of sterols in rat. ***Ibid*** 1982;13:271–8.

640. Terpstra AHM, Van Tintelen G, West CE. Serum lipids, lipoprotein composition and liver cholesterol in genetically obese Zucker rats fed semipurified diets containing either casein or soy protein. ***Ann Nutr Metab*** 1983;27(2):132–6.

641. Terpstra AHM, Ben Schutte J, West CE. Prevention of hypercholesterolemia in cholesterol–fed chickens by high–casein and high–soybean protein diets. ***Atherosclerosis*** (Shannon, Irel) 1983;46(1):95–1014.

642. Goulding NJ, Gibney MJ, Taylor TG, Gallagher PJ. Reversible hypercholesterolemia produced by cholesterol–free fish meal protein diets. ***Ibid*** 1983;49(2):127–37.

643. Sautier C, Dieng K, Flament C, Doucet C, Suquet J, Kimonnier D. Effects of whey protein, casein, soybean and sunflower proteins on the serum tissue and fecal steroids in rats. ***Br J Nutr*** 1983;49(3):3131–9.

644. Kim DN, Lee KT, Reiner JM, Thomas WA. Effects of soy protein on cholesterol metabolism in swine. ***Curr Top Nutr Dis*** 1983;8:101–10.

645. Van Raaij JMA, Katan MB, West CE. Influence of human diets containing casein and soy protein on serum cholesterol and lipoproteins in humans, rabbits, and rats ***Ibid*** 1983;8:111–34.

646. Yamaguchi M, Iwaya M, Miyazaki M. Limiting amino acids of soybean protein isolate ad their supplementary effects (Part 4). ***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1983;4(1):65–8.

647. Sugano M, Ishiwaki N, Nadashima K. Hypocholesterolemic effect of soy rpotein isolate in rats. ***Ibid*** 1983;4(1):79–84.

648. Fujita Y, Murakami Y, Hayashi S. Mechanism for plasma cholesterol–lowering effect of soy protein isolate. ***Ibid*** 1983;4(1):85–8.

649. Sanno Y, Kimura T, Tanaka T. Effects of dietary proteins on serum levels of cholesterol and apolipoproteins in rats. ***Ibid*** 1983;4(1):89–92.

650. Islam MN, Schitzer JL. Islam NB. Effect of trans fatty acids on protein utilization and serum cholesterol. ***J Food Sci*** 1983;48(1):100–3,110.

651. Beynen AC, Scholz KE, Van Zutphen LFM, West CE. Correlation between the cholesterolemic responses produced by dietary cholesterol and casein in rabbits. ***J Nutr*** 1983;113(6):1204–11.

652. Tanaka K, Imaizumi K, Sugano M. Effects of dietary proteins on the intestinal synthesis and transport of cholesterol and apolipoprotein A–I in rats. ***Ibid*** 1983;113(7):1388–94.

653. Kiribuchi M, Miura K, Tokuda S, Kaneda T. Hypocholesterolemic effect of triterpene alcoohols with soysterol on lasma cholesterol in rats. ***J Nutr Sci Vitaminol*** 1983;29(1):35–43.

654. Tanaka C, Watanuki M, Nozaki Y. Effect of soybean protein on coprostanol production and cholesterol metabolism in cholesterol–fed rats. ***Ibid*** 1983;29(4):447–54.

655. Shibuya K, Hasegawa K. Effect of purified soybean sterol on lipid metabolism in rats. ***Joshi Eiyo Daigaku Kiyo*** 1983;14:173–9.

656. Sautier C, Dieng K, Flament C, Doucet C, Lemonnier D. The influment of four dietary proteins and sodium phytate on the metabolism of cholesterol and the lipoproteins in rats. ***Qual Plant–Plant Foods Hum Nutr*** 1983;33(2–3):193–9.

657. Carroll KK. Effects of dietary proteins and amino acids on serum cholesterol levels. ***Symp Giovanni Lorenzini Found*** 1983;17:293–9.

658. De Barker G, Rosseneu M, Pannier R. Effect of soy milk on serum lipids and apoproteins. ***Voeding*** 198344(9):304–8.

659. Scholz KE, Beynen AC, West CE. Regression of casein and cholesterol–induced hypercholesterolemia in rabbits. ***Z Ernaehrungswiss*** 1983;22(2):85–96.

660. Garg S, Atreja SK. Plasma cholesterol in rats on feeding milk fat and its blends with edible oils. ***Asian J Dairy Res*** 1984;(3):165–71.

661. Cohn JS, Kimpton WG, Nestel PJ. The effect of dietary casein and soy protein on cholesterol and very low density lipoprotein metabolism in the rat. ***Atherosclerosis*** (Shannon, Irel) 1984;52(2):219–31.

662. Mouri K, Igarashi O. Effect of dietary protein on vitamin E transfer between blood and tissues in rats. ***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1984;5(1):59–62.

663. Sugano M, Tanaka K, Ikeda I, Imaizumi K. Hypocholesterolemic effect of soy protein isolate in rats. ***Ibid*** 1984;5(1):75–8.

664. Tanaka K, Aso B, Sugano M. Biliary steroid excretion in rats fed soybean protein and casein or their amino acid mixtures. ***J Nutr*** 1984; 114(1):26–32.

665. Oakenfull DG, Topping DL, Illman RJ, Fenwick DE. Prevention of dietary hypercholesterolemia in the rat by soya bean and quillaja saponins. ***Nutr Rep Int*** 1984;29(5):1039–46.

666. Thatcher CD, Jacobson NL, Young JW, Richard MJ. Effects of sources of dietary fat and protein on tissue cholesterol. ***Nutr Res*** (N Y) 1984;4(6):1013–24.

667. Doi H, Iwami K, Ibuki F, Kanamori M. Effects of feeding soy protein isolate and its proteolytic digests on cholesterol level in rat serum and hepatic and small intestinal functions. ***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenyukai Kaishi*** 1985;6(1):58–62.

668. Sugano M, Tanaka K. Hypocholesterolemic effect of soy protein isolate in rats (VI). ***Ibid*** 1985;6(1):76–9.

669. Hayashi S, Fjita Y, Yamashita J, Murakami Y. Effects of dietary proteins on gastrointestinal transit time, fecal sterol excretion, and plasma cholesterol leveling the rat. ***Ibid***1985;6(1):80–4.

670. Iwami K, Sakakibara K, Ibuki F. Involvement of post–digestion hydrophobic peptides in plasma cholesterol–lowering effect of dietary plant proteins. ***Agric Biol Chem*** 1986;50(5):1217–22.

671. Oku H, Ide T, sugano M. Dietary protein–dependent changes in rat intestinal 3–hydroxyl–3–methylglutaryl coenzyme a reductase activity. ***Agric Biol Chem*** 1986;50(6):1545–50.

672. Sidhu GS, Oakenfull DG. A mechanism for the hypocholesterolemic activity of saponins ***Br J Nutr*** 1986;55(3):643–9.

673. Antal M, Szepvolgyi J, Nagy K, et al. Safety and nutritional–physiological examination of a new type of plant protein source in rats. ***Egeszsegtudomany*** 1986;30(4):354–66.

674. Thomas M, Leelamma S, kurup PA. Effect of dietary protein on cholesterol lowering action of blackgram fiber. ***Indian J Biochem Biophys*** 1986;23(3):179–81.

675. Clifford AJ, Smith LM, Creveling RK, Hamblin CL, Clifford CK. Effects of dietary triglycerides on serum and liver lipids and sterol excretion of rats. ***J Nutr*** 1986;116(6):944–56.

676. Forsythe III WA. Comparison of dietary casein or soy protein effects on plasma lipids and hormone concentrations in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). ***Ibid*** 1986;116(7):1165–71.

677. Sugiyama K, Okawa S, Muramatsu K. Relationship between amino acid composition of diet and plasma cholesterol level in growing rats fed a high cholesterol diet. ***J Nutr Sci Vitaminol*** 1986;32(4):413–23.

678. Takahashi T, Miyazawa T, fujimoto K, Kaneda T. Effect of soybean curd refuse on cholesterol metabolism in rats. ***Nippon Eiyo, Shokuryo Gakkaishi*** 1986;39(5):337–84.

679. Amagaya S, Matsumoto Y, Ogihar Y, et al. Aterosclerosis induced by cholesterol in rabbits. ***Domyaku Koka*** 1987;15(6):1387–92.

680. Kuroda K, Kobatake Y, Nishide E, Yamauchi M. Effects of phospholipid concentrations wiht different fatty acid patterns on serum and liver lipids of rats. ***Eiyogaku Zasshi*** 1987;45(6):263–74.

681. Baldner–Shank GL, Richar MJ, Beitz DC, Jacobson NL. Effect of animal and vegetable fats and organs of young growing pigs. ***J Nutr*** 1987;117(10):1727–33.

682. Mercer NJH, Carroll KK, Givoannetti PM, Steinke FH, Wolfe BM. Effects on human plasma lipids of substituting soybean protein isolate for milk protein in the diet. ***Nutr Rep Int*** 1987;35(2):279–87.

683. Koh ET. Comparison of hypolipemic effects of corn oil, seame oil, and soybean oil in rats. ***Nutr Rep Int*** 1987;36(4):903–17.

684. Sanchez A, Rubano DA, Shavlik GW, Hubbard R, Horning MC. Cholesterolemic effects of the lysine/arginine ratio in rabbits after initial early growth. ***Arch Lationoam Nutr*** 1988;38(2):229–38.

685. Sanchez A, Rubano DA, Sanvlik GW, Fagen strom P, Register UD, Hubbard RW. Separate effects of dietary protein and fat on serum cholesterollevels: another view of amino acid content of proteins. ***Ibid*** 1988;38(2):239–50.

686. Meinertz H, Faergeman O, Nilausen K, Chapman MJ, Goldstein S, Laplaud PM. Effects of soy protein and casein in low cholesterol diets on plasma lipoproteins in normolipidemic subjects. ***Atherosclerosis*** (Shannon, Irel) 1988;72(1):63–70.

687. Sugano M, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T, Kimoto M. The hypocholes terolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. ***Atherosclerosis*** (Shannon, Irel) 1988;72(2–3):115–22.

688. Aviram M, Williams KJ, Deckelbaum RJ. Macrophage cholesterol removal by triglyceride phospholipids emulsions. ***Biochem Biophys Res Commun*** 1988;155(2):709–13.

689. Kudchodkar BJ, Lee MJC, Lee SM, DiMacro NM, Lacko AG. Effect of dietary protein on cholesterol homeostasis in diabetic rats. ***J Lipid Res*** 1988;29(10):1272–87.

690. Ishida T, Koba K, Sugano M, Imaizumi K, Watanbe S, Minoshima R. Cholesterol levels and eicosanoid production in rats. ***Fed Phoshpatidylinositol*** 1988;34(2):237–44.

691. Murata S, Hara K. Oil–water–oil emulsion compositions containing oils or fats and phospholipids for treatment of hypercholesterolemia, hyperlipemia, and arteriosclerosis. **Patent**: Jpn Kokai Tokko Koho JP 63 44, 842[88 44,842], 1988;4pp.

692. Murata S, Hara K. Oil–water–oil emulsion compositions containing oils or fats and highly unsaturated fatty acids (esters) for treatment of hypercholesterolemia, arteriosclerosis, thrmbosis, and diabeteic retinopathy. **Patent**: Jpn Kokai Tokkyo JP 63 44,843 [88 44,843],1988;4pp.

693. Procter and Gamble Co. Blood cholesterol lowering food composition and its preparation. **Patent**: Jpn Kokai Tokko Koho JP 63,245,651[88245,651],1988;17pp.

694. O'Brien BC, Corring SM. Influence of dietary soybean and egg lecithins on lipid responses in cholesterol–fed guinea pigs. ***Lipids*** 1988;23(7):647–50.

695. Cho YS, Horigome T, Sakaguchi E, Uchida S. Effect of feeding of leaf proteins on serum cholesterol concentration in rats. ***Nipon Eiyo, Shokuryo Gakkaishi*** 1988;41(2):127–32.

696. Mizuno T, Abe H, Hirano R, Yamada K. Effect of supplementation of sulfur–containing amino acids to a low–soy protein diet containging cholesterol on plasma cholesterol levels in rats. ***Ibid*** 1988;41(6):441–8.

697. Kabatake Y, Kuroda K, Saito M, Nishide E, Yamaguchi M. Differential effedt of a dietary soybean phosphatiodylcholine and phospholipid mixture on hematologic parameters and serum lipids in rats. ***Ibid*** 1988;41(6):457–63.

698. Jacques H, Deshaies Y, Carroll KK, Hrabek Smith JM, Savoie L. Effects of dietary proteins on the cholesterol and soluble apolipoprotein composition of plasma lipoproteins in the rat. ***Nutrition*** (Burbank, Calif) 1988;4(6):439–45.

699. Sanchez A, Filler KM, Hubbard RW, Shavlik GW. Plasma amino acids after single soy, casein or protein–free meals in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. ***Nutr Rep Int*** 1988;38(1):117–28.

700. Okita T, Sugano M. Effects of the type and level of dietary proteins on plasma lipids, fatty acid profiles, and fecal steroid excretion in rats. ***Agric Biol Chem***. 1989;53(3):659–66.

701. Meinertz H, Nilausen K, Faergeman O. Soy protein and casein in cholesterol – enriched diets: effects on plasma lipoproteins in normolipidemic subjects. ***Am J Clin Nutr***. 1989;50(4):786–93.

702. Haban P, Stanova E. Effect of dietary proteins on Nile red fluorescence from the arch of aorta. ***Bratisl Lek Listy***, 1989;90(2):120–4.

703. West CE, Spaaij CJK, Clous WM, et al. Comparison of the hypocholesterolesterolemic effects of dietary soybean protein wih those of formaldehyde–treated casein in rabbits. ***J Nutr***. 1989;119(6):843–56.

704. Pakpeankitavatana R, Sammasut R, Tanphaichitr V. The effect of soybean oil intake on lipid status in healthy men. ***Mahidol Univ Annual Research Abstract***. 1989;16:137.

705. Srinivasan N, Shanmugasundaram KR. Effect of plant protein substitution in lowering plasma choltesterol, LDL and cholesterol elimination with high fat diets***. Nutr Rep Int.*** 1989;39(2):253–64.

706. Pacini N, Ferrari A, Zanchi R, Corti M, Greppi GF. The effects of protein dietary sources on serum cholesterol and bile acid microniological transtormations in rabbits. ***Ibid*** 1989;39(4):851–9.

707. Alladi S, Gilbert R, Shanmugasundaram KR. Lipids, lipoproteins and lipolytic activity in plasma with dietary protein changes. ***Ibid*** 1989;4(4):653–61.

708. Sundram K, Khor HT, Ong ASH. Effect of dietary palm oil and its fractions on rat plasma and high density lipoprotein lipids. ***Lipids*** 1990;25(4):187–93.

709. Stitchantrakul W. Effect of soy bean–based formula supplementation on lipid status in patients with type II hyperlipoproteinemia. MS Thesis, ***Mahidol Univ*** 1993.

710. de Abreu J, Millan N. Effect of addition of brewer's yeast tosoy protein and casein on plasma cholesterol levels of rabbits. ***Arch latinoam Nutr*** 1994;44(1):18–22.

711. Yonemoto C, Kohda Y, Uenakai K, Nakano Y. Effect of vinegar made from soybean soybean oligosaccharides on lipid metabolism in rat. ***Nippon Eiyo, Shokuryo Gakkaishi*** 1995;48(6):441–9.

712. Kanazawa T. Suppressive effects of soy protein on the production of peroxidized LDL and enlargement of LDL molecular size. ***Daizu Tanpakushitsu Kenkyukai Kaishi*** 1995;16:21–31.

713. Kabir Y, Ide T. Effect of dietary soybean phospholipids and fats differing in the degree of unsaturation on fatty acid synthesis and oxidation in rat liver. ***J Nutr Sci Vitaminol*** 1995;41(6):635–45.

714. Bagalkote SG, Jumbe J, Okelo O, Okelo RO. The effect of soaked soybean (*Glycine max*) yellow variety on growth and some blood serum components i.e. cholesterol, total lipids, triglycerides and muscle glycogen of common carps, ***Cyprinus carpio (L.). Discovery Innovation*** 1995 ; 7(1) : 69–75.

715. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes Jr CL, Morgan TM, Burke GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. ***J Nutr*** 1996 ; 126(1) : 43–50.

716. Ueda H, Matsumoto A, Goutani S. Effects of soybean saponin and soybean protein on serum cholesterol concentration in cholesterol–fed chicks. ***Anim Sci Technol*** 1996 ; 67(5) : 415–22.

717. Potter SM, Pertile J, Berber–Jimenez MD. Soy protein concentrate and isolated soy protein similarly lower blood serum cholesterol but differently affect thyroid hormones in hamsters. ***J Nutr*** 1996 ; 126(8) : 2007–11.

718. Jacotot B, Girardet M, Mendy F, Piganeau P, Deroo M, Beaumont JL. Effects of several edible oils on blood and arterial lipids of rats fed an equilibrated normal lipid diet for one year. ***Ann Nutr Aliment*** 1977 ; 31(3) : 291–307.

719. Lapiccirella R. Absorption of cholesterol [administered] in various oily solvents. ***Rass Med Sper*** 1957 ; 4 : 357–63.

720. Manzoni C, Lovati MR, Agostinelli P, Sirtori CR. Studies on the mechanism of the cholesterol lowering activity of soy proteins. ***Pharmacol Res*** 1990 ; 22(2) : 300.

721. Gao GO, Li ZY, Chen YG, Liu YT. Effect of soy saponin on hyperlipemia of rabbits induced by Adeps Suillus and on the endurance to anoxia in mice under normal pressure. ***Chung Yao T'ung Pao*** 1984 ; 9(4) : 184–5.

722. Bakhit RM, Klein BP, Essex–Sorlie D, Ham JO, Erdman Jr JW, Potter SM. Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. ***J Nutr*** 1994 ; 124(2) : 213–22.

723. Klevay LM. Soy protein may affect plasma cholesterol through copper. ***Amer J Clin Nutr*** 1994 ; 60(2) : 300–1.

724. Yanagisawa F, Ogasawara K, Bushimata K. Biochemical studies on plant oils. II. Hypocholesterolemic action. ***Tokyo Toritsu Eisei Kenkyusho Nempo*** 1967 ; 19 : 90–6.

725. Fukawa K, Irino O, Sawabe T, et al. Effects of soybean oil unsaponifiables on experimental arteriosclerosis. ***Oyo Yakuri*** 1979 ; 18(2) : 291–2.

726. Kazakov AL. Study of the hypolipidemic activity of natural isoflavones. ***Khim Farm Zh*** 1979 ; 13(1) : 58–60.

727. Durand G, Pascal G, Gounelle de Pontanel H. Treatment of hypercholesterolemia in the rat by the introduction of soy bean oil ration supplemented with sardine oil or not. ***Ann Nutr Aliment*** 1979 ; 33(5) : 687–706.

728. Society for the study of provisions. Anti–cholestermic compositons. ***Patent : Jpn Kokai Tokkyo Koho JP*** 58, 116, 415 [83, 116, 415], 1983 : 8pp.

729. Schweizer TF, Bekhechi A, Koellreutter B, Reimann S, Pometta D, Bron BA. Metabolic effects of dietary fiber from dehulled soybeans in humans. ***Amer J Clin Nutr*** 1983 ; 38(1) : 1–11.

730. Richard MJ, Stewart JW, Heeg TR, Wiggers KD, Jacobson NL. Blood plasma lipoprotein and tissue cholesterol of calves fed soybean oil, corn oil, vegetagle shortening or tallow. ***Atheroscleosis (Shannon, Irel)*** 1980 ; 37(4) : 513–20.

731. Nam HK, Lee YO. The effect of dietary vegetable oils on the blood cholesterol level of rabbit. Hanguk Sikp' um Kwahakhoe Chi 1980 ; 12(2) : 77–81.

732. Nam HK. Influence of edible oil, casein, calcium and magnesium on serum cholesterol level in rabbit. ***Han' guk Yongyang Siklyong Hakhoechi*** 1983 ; 12(2) : 122–36.

733. Diersen–Schade DA, Richard MJ, Jacobson NL. Effects of dietary calcium and fat on cholesterol in tissues and feces of young goats. ***J Nutr*** 1984 ; 114(12) : 2292–300.

734. Nelson GL, Kelly DS, Schmidt PC, Serrato CM, Lindgren FT. Effect of menhaden oil and various seed oils on serum lipids and lipoproteins in rabbits. ***Nutr Res (N Y)*** 1989 ; 9(5) : 531–44.

735. Rabie MMA, Said MM, Badawi MM, Morsi MKS, Salem II M. Influence of different protein diets on lipid pattern in albino rats. ***J Drug Res*** 1985 ; 16(1–2) : 45–52.

736. Tashiro T, Mashima Y, Yamamori H, Okui K. Alteration of lipoprotein profile during total parenteral nutrition with intralipid 10% JPEN, ***J Parenter Enteral Nutr*** 1986 ; 10(6) : 622–6.

737. Sanada M, Tashiro T, Mashima Y, et al. Lipid metabolism after administration of 10% and 20% intralipid. The effects after lipoprotein–X administration. ***Nippon Jomyaku, Keicho Eiyo Kenkyukaishi*** 1987 ; 2 : 160–3.

738. Leplaix–Charlat L, Bauchart D, Durand D, Laplaud PM, Chapman MJ. Plasma lipoproteins in preruminant calves fed diets containing tallow or soybean oil with and without cholesterol. ***J Dairy Sci*** 1996 ; 79(7) : 1267–7.

739. Hrabek–Smith JM, Kurowska EM, Carroll KK. Effects of cholesterol–free, semipurified diets containing different levels of casein or soy protein on distribution of cholesterol and protein among serum lipoproteins of rabbits. ***Atherosclerosis (Shannon, Irel)*** 1989 ; 76(2–3) : 125–30.

740. Jalil MA, Rahman MS. Effect of certain dietary vegetable oils and cholesterol on lipid pattern in serum and liver of rats. ***Pak J Biochem*** 1969 ; 2(1) : 41–6.

741. Aurangzeb, Ahmad M, Bakhsh R. Effect of dietary protein source on lipid metabolism in chicks. ***Pak J Sci Ind Res*** 1987 ; 30(11) : 825–7.

742. Kobatake Y, Kuroba K, Yamaguchi M. Effects of dietary soybean phospholipids levels on hemostatic and hepatic components in young rats. Nippon Eiyo, ***Shokuryo Gakkaishi*** 1988 ; 41(4) : 23–8.

743. Zhang Z, Dai Y, Cui G, Li F, Zhao G, Wang Y. Effect of soybean phospholipids composite on serum on tissue lipids, lipid peroxidation and fatty livers in ratz. ***Yingyang Xuebao*** 1995 ; 17(3) : 263–8.

744. Nagem TJ, de Oilveira TT, da Silva MC, Guedes De Miranda LC. Anticholesteremic effect of flavonoid derivatives in rats. ***Arq Biol Techol*** 1995 ; 38(3) : 859–68.

745. Weinberg RB, Singh KK. Short–term parenteral nutrition with glucose and interlipid : effects on serum lipids and lipoproteins. ***Am J Clin Nutr*** 1989 ; 49(5) : 794–8.

746. Sanchez–Muniz FJ, Terpstra AHM. Hyper–cholesterolemia induction in rabbits fed semisynthetic diets. ***Rev Esp Fisiol*** 1988 ; 44(1) : 45–50.

747. Sirtori CR, Galli G, Lovati MR, Carrara P, Bosisio E, Kienle MG. Effects of dietary proteins on the regulation of liver lipoprotein receptors in rats. ***J Nutr*** 1984 ; 114(8) : 1493–500.

748. Noseda G, Frangiacomo C, Cairoli R, Sirtori CR. Hormonal effects of soybean protein diet. ***Soy Protein Prev Atheroscler, Proc Int Symp, 4th***, 1981 : 27–38.

749. Grundy SM, Abrams JJ. Comparison of actions of soybean protein and casein on metabolism of plasma lipoproteins and cholesterol in humans. ***Am J Clin Nutr*** 1983 ; 38(2) : 245–52.

750. Iritani N, Nagashima K, Fukuda H, Katsurada A, Tanaka T. Effects of dietary proteins on lipogenic enzyme induction in rat liver. ***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1985 ; 6(1) : 54–7.

751. Mizukami T, Ito A, Utsunomiya K, Nishino A, Horikawa R. Effects of soy protein isolate, casein, and their mixtures on the lipid levels in rat plasma and liver. ***Kaseigaku Kenkyu*** 1988 ; 34(2) : 98–106.

752. Sharmanov TS, Maksimenko VB, Servetnik Chalaya GK, Abdraimova SM. Influence of different food proteins on lipid transport in blood serum. ***Vopr Pitan*** 1988 ; (4) : 45–8.

753. Prasapairin A. Effect of soybean–based formula intake on lipid status in healthy adults and patients on tube feeding. ***MS Thesis, Mahidol Univ*** 1994.

754. Iritani N, Fukuda H, Tada K. Effects of soybean protein on lipid metabolism in genetically obese rat. ***Daizu Tanpakushitsu Kenkyukai Kaishi*** 1995 ; 16 : 14–7.

755. Carroll KF, Nestel PJ. Effect of long–chain triglyceride on human insulin secretion. ***Diabetes*** 1972 ; 21(9) : 923–9.

756. Cross KE, Dodds PF, Noble RC, McCartney R, Connor K. Effects of age and diet on the lipid content and composition of gallbladder bile, liver and serum in laying strains of hen. ***Br Poult Sci*** 1987 ; 28(4) : 577–84.

757. Yagasaki K, Kametaka M. Effect of dietary fats and fatty acid on liver lipid accumulation in rats fed low protein diets. ***J Nutr Sci Vitaminol*** 1978 ; 24(2) : 149–58.

758. Horii M, Muramatsu Y, Yoshikawa S. The control effect of soybean components on liver fat deposition resulting from feed combination in rats. ***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1983 ; 4(1) : 69–74.

759. Mandal B, Majumdar SG, Maity CR. Hepatic function of albino rats on diets supplemented with seed protein and casein. ***Proc Indian Natl Sci Acad, Part B*** 1984 ; 50(1) : 43–7.

760. Ohminami H, Kimura Y, Okuda H, Arichi S, Yoshikawa M, Kitagawa I. Effects of soyasaponins on liver injury induced by highly peroxidized fat in rats. ***Planta Med*** 1984 ; 50(5) : 440–1.

761. Hayashi K, Tanaka H, Sasagawa T, Uemura I, Aizawa A. Feeding of poultry with iodinated proteins. ***Patent : Jpn Kokai Tokkyo JP 63, 169, 941 [88, 169, 941]***, 1988 : 8pp.

762. Horst A, Kaganowicz I, Zagorska I, Rozynkowa D. Effect of vegetable oil hardening on fat and cholesterol metabolism in white rats. I. ***Rapeseed oil. Patol Polska*** 1962 ; 13 : 139–46.

763. Kluszczynska Z, Ponomarenko W. Consumption of fats and the chemical composition of rats. ***Przegl Lek*** 1978 ; 35(4–5) : 543–5.

764. Fukawa K, Bando K, Iwadate K, Watanabe A, Fukuda Y. Effects of soybean oil unsaponifiables on experimental arteriosclerosis and lipid deposition in viscera. ***Oyo Yakuri*** 1979 ; 18(2) : 273–90.

765. Yoshida A, Yokogoshi H. Effect of sulfur amino acid supplement to the soybean protein isolate on lipid metabolism in rats. ***Daizu Tanpakushitsu Eiyo Kenkyukai Kaishi*** 1983 ; 4(1) : 75–8.

766. Degani G. Dietary effects of lipid source, lipid level and temperature on growth of glass eel (*Anguilla anguilla*). ***Aquaculture*** 1986 ; 56(3–4) : 207–14.

767. Garcia P, Illera M, De la Hoz L. Effect of the dietary fat composition on fatty acids in rat carcass. ***An R Acad Farm*** 1988 ; 54(3) : 546–52.

768. Garcia P, Illera M, De la Hoz L. Effect of the dietary fat composition on fatty acids in rat liver. ***Ibid*** 1988 ; 54(4) : 681–7.

769. Iritani N, Suga A, Fukuda H, Katsurada A, Tanaka T. Effects of dietary casein and soybean protein on triglyceride turnover in rat liver. ***J Nutr Sci Vitaminol*** 1988 ; 34(3) : 309–15.

770. Hara E, Shimizu Y, Shimizu T. Effects of soy protein isolate on sucrose–induced fat accumulation in lactational maternal rats and sucking baby rats. ***Daizu Tanpakushitsu Kenkyukai Kaishi*** 1995 ; 16 : 9–13.

771. Murata M, Imaizumi K, Sugano M. Hepatic secretion of lipids and apolipoproteins in rats fed soybean phospholipids and soybean oil. ***J Nutr*** 1983 ; 113(9) : 1708–16.

772. Andersen DB, Holub BJ. The influence of dietary inositol on glyceride composition and synthesis in livers of rats fed different fats. ***Ibid*** 1976 ; 106(4) : 529–36.

773. Curri SB, Montanari M, Gonzato P, Vecchia P. Between phospholipids and cholesterol. I. Chromatographic determination of the composition of various phospholipids mixtures in relation to their effect on blood cholesterol level. ***Giorn Gerontol*** 1965 ; 13(3) : 247–85.

774. Jacobson NL, Richard M, Berger PJ, Kluge JP. Comparative effects of tallow, lard, and soybean oil, with and without supplemental cholesterol, on growth, tissue cholesterol, and other responses of calves. ***J Nutr*** 1974 ; 104(5) : 573–9.

775. Triscari J, Hamilton JG, Sullivan AC. Comparative effects of saturated and unsaturated lipids on hepatic lipogenesis and cholesterol–genesis *in vivo* in the meal–fed rat. ***Ibid*** 1978 ; 108(5) : 815–25.

776. Pavone F, Natoli M, Sacco A. Variations in lipid profiles in subjects fed mother's or artificial milks. ***Aggiorn Pediatr*** 1982 ; 33(11–2) : 843–50.

777. Beynen AC, Soffers AEMF, West CE. Relations between the concentrations of iron and cholesterol in the serum of rabbits fed semipurified diets containing either casein or soy protein. ***Nutr Rep Int*** 1983 ; 27(3) : 647–53.

778. Vahouny GV, Chalcarz W, Satchithanandam S, Adamson I, Klurfeld DM, Kritchevsky D. Effect of soy protein and casein intake on intestinal absorption and lymphatic transport of cholesterol and oleic acid. ***Am J Clin Nutr*** 1984 ; 40(6) : 1156–64.

779. Kritchevsky D, Tepper SA, Czarnecki SK, Mueller MA, Klurfeld DM, Story JA. Effects of dietary protein on lipid metabolism in rats. ***J Wash Acad Sci*** 1984 ; 74(1) : 1–8.

780. Schade DAD. Metabolism of cholesterol and triglycerides in young pigs fed beef–based, soy–based, or conventional diets. ***Diss Abstr Int B*** 1985 ; 45(7) : 1981.

781. Pfeuffer M, Barth CA. Modulation of very low density lipoprotein secretion by dietary protein is age–dependent in rats. ***Ann Nutr Metab*** 1986 ; 30(5) : 281–8.

782. Aljawad NS. Effects of casein, soy and whey proteins and amino acid supplementation on cholesterol metabolism. ***Diss Abstr Int B*** 1986 ; 46(6) : 1873.

783. Diersen–Schade DA, Richard MJ, Beitz DC, Jacobson NL. Plasma, tissue and fecal cholesterol of young pigs fed restricted or liberal amounts of beef, soy or conventional diets. ***J Nutr*** 1986 ; 116(11) : 2086–95.

784. Doi H, Iwami K, Ibuki F, Kanamori M. Effect of feeding peptic digest of soy protein isolate on rat serum cholesterol. ***J Nutr Sci Vitaminol*** 1986 ; 32(4) : 373–9.

785. Gilbert R, Alladi S, Shanmugasundaram KR. Intestinal brush border membrane lipid changes in rabbits with dietary protein. ***Biochem Arch*** 1988 ; 4(3) : 263–8.

786. Hargreaves KM, Clandinin MT. Dietary control of diacylphosphatidylethanolamine species in brain. ***Biochim Biophys Acta*** 1988 ; 962(1) : 98–104.

787. Lin C, Sakuma N, Matsumoto Y, et al. Changes of HDL subfraction concentration and particle size by intralipid *in vivo*. ***Domyaku Koka*** 1988 ; 15(8) : 1639–45.

788. Georgieva N, Puncheva M. Influence of various amounts of soybean protein in food on the bile composition in rats. ***Eksp Med Morfol*** 1988 ; 27(1) : 23–7.
789. Green MH, Green JB. Effects of native and fractionated vegetable oil on lipid absorption in the rat. ***Nutr Res (N Y)*** 1988 ; 8(11) : 1265–75.
790. Bergeron N, Jacques H. Influence of fish protein as compared to casein and soy protein on serum and liver lipids, and serum lipoprotein cholesterol levels in the rabbit. ***Atherosclerosis (Shannon, Irel)*** 1989 ; 78(2–3) : 113–21.
791. Kurowska EM, Hrabek–Smith JM, Carroll KK. Compositional changes in serum lipoproteins during developing hypercholesterolemia induced in rabbits by cholesterol–free, semipurified diets. ***Ibid*** 1989 ; 78(2–3) : 159–65.
792. Khosla P, Samman S, Carroll KK, Huff MW. Turnover of 125I–VLDL and 133I–LDL, apolipoprotein B in rabbits fed diets containing casein or soy protein. ***Biochim Biophys Acta*** 1989 ; 1002(2) : 157–63.
793. Choi YS, Goto S, Ikeda I, Sugano M. Interaction of dietary protein, cholesterol and age on lipid metabolism of the rat. ***Br J Nutr*** 1989 ; 61(3) : 531–43.
794. Kuyvenhoven MW, Roszkowski WF, West CE, et al. Digestibility of casein, formaldehyde et al. Digestibility of casein, formaldehyde treated casein and soya–bean protein in relation to their effects on serum cholesterol in rabbits. ***Ibid*** 1989 ; 62(2) : 331–42.
795. Khaililov EM, Torkhovskaya TI, Fortinskaya ES, et al. Possible approaches to the formation of phospholipids preparations–acceptors of membranous cholesterol. ***Byull Eksp Biol Med*** 1989 ; 107(4) : 451–3.
796. Turunen S, Chippendale GM. Relationship between dietary lipids, midgut lipids, and lipid absorption in eight species of Lepidoptera reared on artificial and natural diets. ***J Insect Physiol*** 1989 ; 35(8) : 627–33.
797. Johnson JA, Beitz DC, Jacobson NL. Effects of dietary beef and soy protein on tissue composition and low density lipoprotein uptake in young pigs. ***J Nutr*** 1989 ; 119(5) : 696–705.
798. www.shopnatural.com
799. www.crigifts.com
800. www.dld.go.th

ภาคผนวกที่ 2
การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากตัวอย่างสมุนไพรที่คัดเลือกมา

การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากตัวอย่างสมุนไพรที่คัดเลือกมา

บทนำ

โปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งทางอุตสาหกรรมอาหาร เช่น สารอิมัลซิไฟเออร์ สารเพิ่มการอุ้มน้ำ และเครื่องสำอาง เช่น แชมพู คอนดิชันเนอร์ ยา และอาหารเสริม เช่น อาหารเสริมโปรตีน และอุตสาหกรรมการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรส นิยมนำพืชที่มีโปรตีนสูงมาใช้ในกระบวนการผลิต เช่น เมล็ดถั่ว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว เมล็ดทานตะวัน และเห็ด เป็นต้น

องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสทคล้ายคลึงกับสารประกอบที่เกิดขึ้นระหว่างการหุงต้มเนื้อ กระบวนการผลิตนิยมใช้กรดที่มีความเข้มข้นและอุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการผลิต (by product) คือ 3–monochloropropanediols (3–MCPD) ซึ่งจัดเป็นสารพิษในกลุ่มของ chlorohydrins ที่ก่อให้เกิดมะเร็งในร่างกายได้ และยังสูญเสียคุณค่าทางอาหารด้วย ปัจจุบันการย่อยสลายโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากแหล่งต่างๆ เป็นวิธีที่มีนิยมใช้ เนื่องจากให้โปรตีนที่มีเปปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระในปริมาณสูงสุด ทั้งนี้เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและ pH ที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจึงสามารถเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์และภาวะการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม เอนไซม์ทางการค้าที่นิยมใช้ ได้แก่ Falvourzyme®, Alcalase® และ Neutase® เป็นต้น อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง อุตสาหกรรมอาหารเป็นอุตสาหกรรมหลักของประเทศไทยจึงมีการนำเข้าโปรตีนไฮโดรไลเสทในปริมาณสูง ดังนั้นหากสามารถพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทให้มีต้นทุนต่ำและไม่ก่อให้เกิดสารพิษได้ จะช่วยพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศอีกทางหนึ่งด้วย

ในปัจจุบันได้มีการเริ่มนำคลื่นความถี่สูง (high–intensity ultrasound) มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำอิมัลชัน การสกัด การกำจัดแก๊สออก การกรอง และการทำแห้ง คลื่นเสียงความถี่สูงจะส่งผ่านพลังงานไปยังตัวกลางที่เป็นของเหลว ทำให้เกิดฟองเล็กๆ จำนวนมากและทำให้บริเวณรอบๆนั้นเกิดอุณหภูมิและความดันสูงขึ้น ส่งผลให้เซลล์เมมเบรนแตกและผนังเซลล์ฉีกขาดเมื่อฟองเหล่านั้นแตกสลาย นอกจากนี้ยังมีการนำคลื่นเสียงความถี่สูงมาช่วยเพิ่มการละลายน้ำ (solubilize) สำหรับการนำคลื่นเสียงความถี่สูงมาใช้ยังไม่แพร่หลายนัก

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวัตถุดิบอาหารเสริมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชสมุนไพรไทยที่มีโปรตีนสูง ซึ่งได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วลันเตา ถั่วพู และถั่วแปะยี โดยเปรียบเทียบการสกัดด้วยวิธีการใช้กรดไฮโดรคลอลิกและคลื่นความถี่สูง

วัตถุดิบที่นำมาสกัด จำนวน 6 ตัวอย่าง

1. ถั่วเหลือง (Soy bean)
2. ถั่วลิสง (Peanut)

3. ถั่วเขียว (Mung bean)

4. ถั่วลันเตา (Garden pea)

5. ถั่วพู (Winged bean)

6. ถั่วแปะยี (Hyacinth bean)

2. วัสดุ และอุปกรณ์

1. Beaker	(Pyrex, Asbash, Germany)
2. Stirring rod	–
3. hot plate stirrer	(Harmony LMS HTS–1003, Japan)
4. Sonicator bath	(Chest ultrasonics corp., NJ, USA)
5. Balance (4 digits)	(Sartorious, England)
6. Aluminium foil	(Diamond, Thailand)
7. Rotary evaporator	(Buchi, Switzerland)
8. Blender	(Philips, Indonesia)
9. Centrifuge	(Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)
10. Spin freezer	(Christ, Germany)
11. Lyophilizer	(Christ, Germany)
12. Hot air oven	(Memmert, Germany)
13. Centrifuge tube	(Pyrex, Asbash, Germany)
14. Buchner funnel	(Duran, Dassel, Germany)
15. Suction flask	(Duran, Dassel, Germany)
16. Filter paper	(Whatman® No.1, Dassel, Germany)
17. Probe sonicator	(Vibra cell™, Sonics & Materials, Inc., Newtown, USA)

3. สารเคมี

1. 37% hydrochloric acid	(Labscan, Thailand)
2. Sodium hydroxide	(Labscan, Thailand)
3. น้ำกรอง	(NPRDC, Chiang Mai University, Thailand)

4. วิธีการทดลอง

4.1 วิธีการเตรียมวัตถุดิบถั่ว

นำถั่วที่อบแห้งแล้วไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น

4.2 การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท ด้วยกรดไฮโดรคลอริก

ชั่งผงถั่วปั่นละเอียด 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์

↓

เติมกรดไฮโดรคลอลิกความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 60 มล. ลงในบีกเกอร์ คนด้วยแท่งแก้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

↓

แยกตะกอนออกโดยกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

↓

นำสารละลายที่ได้ไปปรับ pH เท่ากับ 6.5 – 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

↓

ทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer และคำนวณหา %yield

↓

เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ใช้ในการทดสอบ

4.3 การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท ด้วยคลื่นความถี่สูง (probe sonicator)

ชั่งผงถั่วปั่นละเอียด 10 กรัม ลงในบีกเกอร์ แล้วเติมน้ำกรองปริมาตร 80 มล.

↓

นำไป sonicate ด้วยเครื่องคลื่นความถี่สูง (sonicator probe) 39% amplitude เป็นเวลา 60 นาที

↓

แยกตะกอนออกโดยกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

↓

ทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer และคำนวณหา %yield

↓

เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ใช้ในการทดสอบ

5. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการเตรียมสารสกัดจากถั่วทั้ง 6 ชนิด พบว่าสารสกัดที่ให้ % yield สูงสุดสามลำดับแรก ได้แก่ สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก (60.10%), สารสกัดจากถั่วเหลืองที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก (53.80%), และสารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (53.10%) ตามลำดับ การสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกให้ปริมาณสารสกัดสูงกว่าการสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงอย่างมีนัยสำคัญ (*p value < 0.05*, T-test) ดังแสดงใน**ตารางที่ 2.1**

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดจากถั่วต่างๆ โดยการสกัดด้วยกรดและคลื่นความถี่สูง

ที่	สารสกัด	รหัสสารสกัด	ลักษณะที่ได้	% yield (w/w)
1	สารสกัดจากถั่วเหลืองที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	SB_HCl	ผงสีน้ำตาลอ่อน	53.80
2	สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	PN_HCL	ผงสีขาว	60.10
3	สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	MB_HCl	ผงสีขาว	50.10
4	สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	GP_HCl	ผงสีขาว	30.70
5	สารสกัดจากถั่วพูที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	WB_HCl	ผงสีขาว	34.90
6	สารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	HB_HCL	ผงสีขาว	45.90
7	สารสกัดจากถั่วเหลืองที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	SB_So	ผงสีขาว	47.10
8	สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	PN_So	ผงสีขาว	53.10
9	สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	MB_So	ผงสีเหลืองอ่อน	25.20
10	สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	GP_So	ผงสีน้ำตาลอ่อน	17.90
11	สารสกัดจากถั่วพูที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	WB_So	ผงสีน้ำตาลอ่อน	34.60
12	สารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	HB_So	ผงสีเขียว	23.20

หมายเหตุ: SB (soy bean) หมายถึง ถั่วเหลือง PN (peanut) หมายถึง ถั่วลิสง
MB (mung bean) หมายถึง ถั่วเขียว GP (garden peas) หมายถึง ถั่วลันเตา
WB (winged bean) หมายถึง ถั่วพู HB (hyacinth bean) หมายถึง ถั่วแปะยี
_HCl คือ สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก _So คือ สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

6. สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกให้ปริมาณสารสกัดสูงสุด ซึ่งจะได้นำสารสกัดจากถั่วทั้ง 12 ตัวอย่างไปทดสอบต่อไป

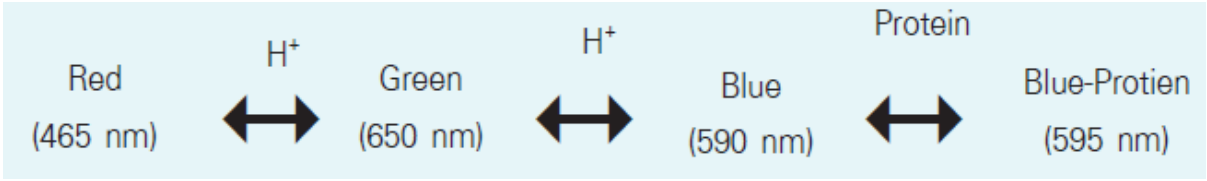
ภาคผนวกที่ 3
การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ของสารสกัดจากสมุนไพร

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ของสารสกัดจากสมุนไพร

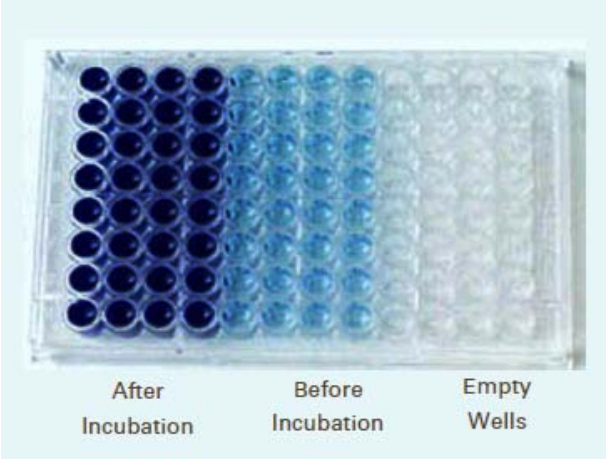
บทนำ

การหาปริมาณโปรตีนจากสารตัวอย่าง มีหลายวิธี ผู้วิเคราะห์จะต้องเลือกให้เหมาะสม พิจารณาจากสถานะของสารตัวอย่าง ความไว (sensitivity) ของวิธีการ ปัจจัยแทรกซ้อนที่ลดความแม่นยำของวิธีการที่จะเลือกใช้ และข้อจำกัดต่างๆ เช่น อุปกรณ์เครื่องมือ สารเคมีที่ต้องใช้ งบประมาณ เวลาที่ต้องใช้วิเคราะห์ และจำนวนสารตัวอย่าง เป็นต้น การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่นิยม เช่น Biuret Method แต่วิธีการนี้มีปัจจัยแทรกซ้อนที่อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น หากมี lipid หรือ detergents อยู่ในสารละลายด้วยจะเกิดความขุ่นทำให้ได้ค่าสูงกว่าความเป็นจริง นอกจากนี้ยังมีสารบางชนิดที่ไม่ใช่โปรตีนสามารถเกิดสีได้ในสารละลาย Biuret เช่น peptides, sucrose, tris และ bile pigment เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีวิธี Lowry–Folin Method ที่ได้พัฒนาปรับปรุงจากวิธี Biuret แต่มี interfering substances หลายชนิด ซึ่งได้แก่ phenolic compounds รวมทั้ง Phe, Tyr, Trp อิสระ น้ำตาลต่างๆ เช่น sucrose, glucose รวมทั้ง glycerol, thiol cpds และ reducing agents เป็นต้น

ส่วนวิธี dye–binding method (Bradford) ได้ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดของวิธี Biuret และ Lowry โดยใช้สารละลาย Coomassie Brilliant Blue G–250 dye ในกรด โดยอาศัยหลักการความสมดุลระหว่าง Coomassie Brilliant Blue G–250 และการรวมตัวกันกับโปรตีนแบบเฉพาะเจาะจง Coomassie Brilliant Blue G–250 หรือที่เรียกว่า Bradford's reagent ภายใต้สภาวะกรดเข้มข้น Coomassie Brilliant Blue G–250 จะให้สีแดงอมน้ำตาล เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ยิ่งมีปริมาณกรดอะมิโนมาก สีที่เปลี่ยนไปจะยิ่งเข้มขึ้น ซึ่งสามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งปกติจะมีความยาวคลื่นอยู่ที่ 465 นาโนเมตร แต่เมื่อจับกับโปรตีนจะเปลี่ยนความยาวคลื่นอยู่ที่ 595 นาโนเมตร สีจะเกิดขึ้นหลังการผสมเพียง 2 นาทีเท่านั้น วิธีการนี้มีเพียง detergent เป็นตัวแทรกซ้อนเพียงเล็กน้อย เช่น Triton X และ sodium dodesyl sulphate เป็นต้น ดังแสดงใน**รูปที่ 1–2**



รูปที่ 3.1 การเปลี่ยนรูปแบบของ Coomassie Brilliant Blue G–250 ในกรดเข้มข้นและเปลี่ยนสภาวะเมื่อจับกับโปรตีน



รูปที่ 3.2 การทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bio-Rad microassay โดยจะใช้เมื่อปริมาณโปรตีนของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัม

1. วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกและคลื่นความถี่สูงโดยวิธี Bradford เปรียบเทียบกับ bovine serum albumin (BSA)

2. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1. 96-well plate	(NUNC, Sterilin, Newport, UK)
2. Autopipetted	(Biohit, England)
3. Tips	(Hyclone, Thailand)
4. Beaker	(Pyrex, Asbash, Germany)
5. Stirring rod	-
6. Microcentrifuge tube	(Hyclone, Thailand)
7. Balance (4 digits)	(Sartorious, England)
8. Microplate reader	(BIO-RAD, Philadelphia, USA)

2.2 สารเคมี

1. Coomassie Brilliant Blue G-250	(BIO-RAD, Philadelphia, USA)
2. Bovine Serum Albumin (BSA)	(Amresco, Solon, OH, USA)
3. Acetic acid	(Labscan, Thailand)
4. 85% phosphoric acid	(Labscan, Thailand)
5. Distilled water	(NPRDC, Chiang Mai University, Thailand)
6. Methanol	(Labscan, Thailand)

3. วิธีการทดลอง

3.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่ละลายในน้ำกลั่น
- เตรียมสารละลายจากสารสกัดถั่วที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml ที่ละลายในน้ำกลั่น

3.2 วิธีการเตรียม Bradford's dye reagent (Stock solution)

ชั่งสี Coomassie blue G–250 ปริมาตร 0.1 กรัม ละลายใน MeOH 50 มล.

↓

เติมกรด phosphoric 85% ปริมาตร 100 มล.

↓

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มล.

↓

ใช้เป็น stock solution เก็บไว้ในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิ 4ºC

ก่อนนำไปใช้ได้ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4

3.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากถั่ว ด้วยวิธี Bradford

เติม BSA ปริมาตร 10 µl ใส่ลงใน 96–well plate

↓

เติมสารละลายสารสกัดจากถั่วปริมาตร 10 µl

↓

เติม Bradford's dye reagent ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 300 µl ลงในหลุม

↓

บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

↓

สร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) และคำนวณหาความเข้มข้น (mg/ml) ของโปรตีนในสารสกัดจากถั่วจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

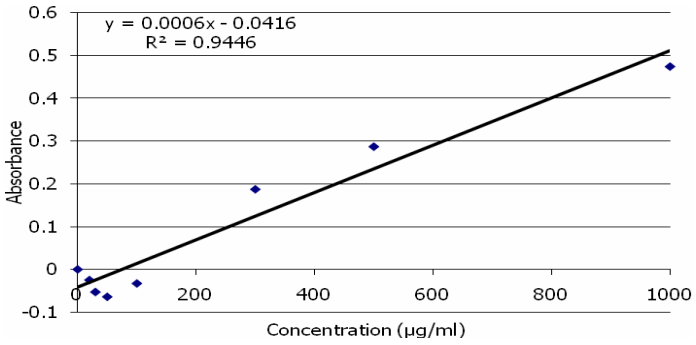
4. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ของสารสกัดจากถั่วทั้ง 6 ชนิด ที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกและคลื่นความถี่สูง พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (PN_So) สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (GP_So) และสารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (MB_So) มีความเข้มข้นของโปรตีน เท่ากับ 527.67, 489.33 และ 473.78 µg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกให้ปริมาณโปรตีนต่ำกว่าสารสกัด

จากถั่วที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงอย่างมีนัยสำคัญ (*p value < 0.05*, T-test) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้คลื่นความถี่สูงในการสกัดทำให้ผนังเซลล์ของถั่วแตกได้มากกว่าการใช้กรดไฮโดรคลอลิกทำให้สามารถสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วได้ในปริมาณสูงกว่า นอกจากนี้โปรตีนยังอาจถูกกรดทำลายไป ดังแสดงใน **ตารางที่ 1**

5. สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงให้ปริมาณโปรตีนสูง ซึ่งจะได้นำถั่วทั้ง 3 ชนิดนี้ไปพัฒนาต่อไป



รูปที่ 3.3 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (mg/ml) ของ Bovine Serum Albumin (BSA) และค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 3.1 การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากถั่วทั้ง 6 ชนิดที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกและคลื่นความถี่สูง

ที่	สารสกัด	รหัสสารสกัด	ความเข้มข้นของโปรตีน (µg/ml)
1	สารสกัดจากถั่วเหลืองที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	SB_HCl	-
2	สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	PN_HCL	146.56
3	สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	MB_HCl	99.33
4	สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	GP_HCl	191.00
5	สารสกัดจากถั่วพูที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	WB_HCl	321.56
6	สารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก	HB_HCL	291.00
7	สารสกัดจากถั่วเหลืองที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	SB_So	352.67
8	สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	PN_So	527.67
9	สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	MB_So	473.78
10	สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	GP_So	489.33
11	สารสกัดจากถั่วพูที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	WB_So	403.22
12	สารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	HB_So	316.00

หมายเหตุ: SB (soy bean) หมายถึง ถั่วเหลือง PN (peanut) หมายถึง ถั่วลิสง

MB (mung bean) หมายถึง ถั่วเขียว GP (garden peas) หมายถึง ถั่วลันเตา

WB (winged bean) หมายถึง ถั่วพู HB (hyacinth bean) หมายถึง ถั่วแปะยี

_HCl คือ สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก _So คือ สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

– หมายถึง มีปริมาณโปรตีนน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณหาค่าได้

ภาคผนวกที่ 4
การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ ด้วยวิธี SDS – PAGE

การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่ว ด้วยวิธี SDS – PAGE

บทนำ

คุณลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเสทอาจจะพิจารณาได้จากองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ โดยโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีคุณลักษณะดีควรมีปริมาณโปรตีนสูงที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนในปริมาณสูงและมีปริมาณไขมันต่ำ องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเสทขึ้นกับปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ และกระบวนการผลิต นอกจากนี้น้ำหนักโมเลกุลยังมีความสำคัญในการบ่งบอกคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสท ถ้าระดับการย่อยสลายสูงจะมีกรดอะมิโนอิสระและเพปไทด์ขนาดเล็กจำนวนมาก (น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 kDa) ซึ่งทำให้ละลายได้ดีแต่ขาดคุณสมบัติบางอย่างไป และถ้าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้ประกอบด้วยเพปไทด์ขนาดใหญ่ (น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 26 kDa) อาจไม่ละลายได้เพียงพอที่จะแสดงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ได้

Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS–PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว โดยอาศัยหลักการที่ว่า สารตัวอย่างอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH เป็นด่างและ sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น anionic detergent ที่มีประจุลบที่สามารถแยกพอลิเปปไทด์ที่อยู่รวมกันออกเป็นสายเดี่ยวให้มีโครงสร้างเป็นแท่งและทุกสายมีประจุลบจึงเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก (SDS จับพอลิเปปไทด์คงที่ด้วยอัตราส่วน 1.4 กรัมSDS/กรัมโปรตีน โดยมี β–mercaptoethanol เป็น reducing agent เพื่อใช้ทำลายพันธะ disulfide ในโปรตีน) อัตราการเคลื่อนที่ของพอลิเปปไทด์จะเร็วหรือช้าขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุล ผลของการแยกโปรตีนสามารถมองเห็นแถบของพอลิเปปไทด์เมื่อย้อมสีด้วย Coomassie blue และหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเปปไทด์แต่ละสายของสารตัวอย่างได้โดยนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (molecular weight marker)

1. วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากถั่วเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มในท้องตลาด 2 ยี่ห้อ ซึ่งได้แก่ เครื่องดื่มเปปไทด์จากถั่วเหลือง (PEPTiNE®) และซุปไก่สกัด (BRAND®) ซึ่งสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างได้โดยการเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐาน

สารสกัดจากถั่วที่นำมาทดสอบจำนวน 12 ตัวอย่างมีดังนี้

1. สารสกัดจากถั่วเหลืองที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก
2. สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก

3. สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก
4. สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก
5. สารสกัดจากถั่วพูที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก
6. สารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก
7. สารสกัดจากถั่วเหลืองที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง
8. สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง
9. สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง
10. สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง
11. สารสกัดจากถั่วพูที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง
12. สารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

2. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1. Beaker (Pyrex, Asbash, Germany)
2. Autopipette (Biohit, England)
3. Balance (4 digits) (Sartorious, England)
4. Gel electrophoresis system (BIO–RAD, Philadelphia, PA19102–1737, USA)
5. Gel documentation (BIO–RAD, Philadelphia, USA)

2.2 สารเคมี

1. Acrylamide (Fluka, Buchs, Switzerland)
2. Distilled water (NPRDC, Chiang Mai University, Thailand)
3. Bis – acrylamide (Sigma, St. Louis, MO, USA)
4. Tris–HCl (Fluka, Buchs, Switzerland)
5. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
6. Ammonium persulfate (APS) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
7. Comassie blue G–250 (Sigma, St. Louis, MO, USA)
8. TEMED (Sigma, St. Louis, MO, USA)
9. Methanol (Labscan, Thailand)
10. Acetic acid (Labscan, Thailand)

3. วิธีทดลอง

3.1 การเตรียม SDS–PAGE

3.1.1 Separating gel (สำหรับเจล 2 แผ่น) ประกอบด้วย

- 40% acrylamide/bis stock solution 2.25 ml
- H_2O 2.16 ml
- 1.5 M Tris–HCl, pH 8.8 1.50 ml
- 10% SDS 0.06 ml
- 10% APS 0.03 ml
- TEMED 0.003 ml

3.1.2 Stacking gel (สำหรับเจล 2 แผ่น) ประกอบด้วย

- acrylamide/bis stock solution 0.24 ml
- H_2O 1.98 ml
- 0.5 M Tris–HCl, pH 6.8 0.75 ml
- 10% SDS 0.03 ml
- 10% APS 0.015 ml
- TEMED 0.0015 ml

3.1.3 Soft destainer (low methanol) ปริมาตร 1,000 มล. ประกอบด้วย

- Methanol 75 ml
- Acetic acid 75 ml
- Distilled water 850 ml

3.2 การเตรียมตัวอย่าง

3.2.1 เตรียมสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทความเข้มข้น 1 มก./มล. ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มล.

3.2.2 นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสทมาผสมกับ loading dye (7 : 3)

3.3 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วย gel electrophoresis

ทำการ load สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผสม loading dye แล้วในปริมาตร 10 µl ลงในหลุมเจลที่เตรียมไว้

↓

ตั้งค่าเครื่อง gel electrophoresis

Condition: ค่าความต่างศักย์กระแสไฟฟ้า (voltage) 80 V เป็นเวลา 120 นาที

↓

นำแผ่นเจลที่ได้มาย้อมสีด้วย coomassie blue G – 250 เป็นเวลา 30 นาที

↓

ล้างสีย้อมออกด้วย soft destainer เขย่าทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

↓

ล้างด้วยน้ำกรองอีก 1 ครั้ง จะปรากฏแถบสีน้ำเงินบนแผ่นเจลใส

↓

เปรียบเทียบแถบสีของสารสกัดกับโปรตีนมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล

↓

วิเคราะห์หาพื้นที่และความหนาแน่นของแถบสีโปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วต่างๆ
ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa ด้วยโปรแกรม Quantity One

↓

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วต่างๆ
ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa ดัง**สมการที่ 4.1**

$$\% \text{ โปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa} = \left[\frac{P_{area} \times P_{density}}{Total_{area} \times Total_{density}}\right] \times 100$$

สมการที่ 4.1

โดย P_{area} หมายถึง พื้นที่ของแถบสีโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa

$P_{density}$ หมายถึง ความหนาแน่นของแถบสีโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa

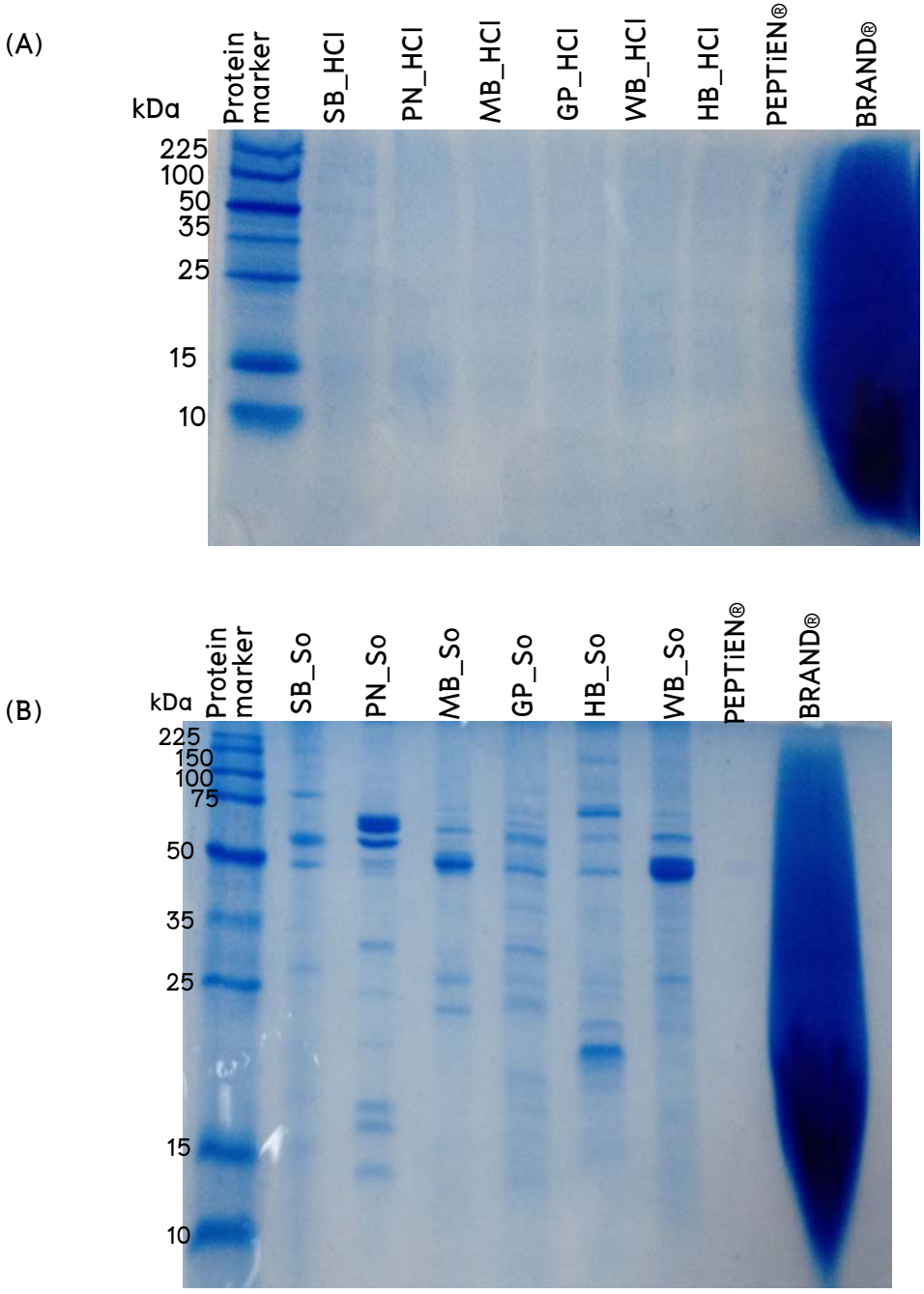
$Total_{area}$ หมายถึง พื้นที่ของแถบสีโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งหมด

$Total_{density}$ หมายถึง ความหนาแน่นของแถบสีโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งหมด

4. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทในสารสกัดจากถั่วทั้ง 6 ชนิด เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดด้วยวิธี SDS–PAGE ดังแสดงใน**รูปที่ 4.1** และ**ตารางที่ 4.1** พบว่าสารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTEiN® มีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทน้อยมากจนไม่สามารถมองเห็นแถบสีของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS–PAGE ได้ ส่วนผลิตภัณฑ์ภัณฑ์เครื่องดื่ม BRAND® ปรากฏแถบสีน้ำเงินเข้มขนาดใหญ่ อาจเนื่องจากมีความเข้มข้นสูงเกินไปและมีปริมาณโปรตีนที่ได้จากสัตว์หลายชนิดที่อาจมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่สามารถแยกแถบได้ชัดเจน

นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทในสารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง พบว่าสารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงทั้ง 6 ตัวอย่างปรากฏแถบสี



รูปที่ 4.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทในสารสกัดจากถั่วต่างๆ ที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก (A) และสารสกัดจากถั่วที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (B) เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มในท้องตลาด และโปรตีนมาตรฐาน marker

หมายเหตุ: SB (soy bean) หมายถึง ถั่วเหลือง
PN (peanut) หมายถึง ถั่วลิสง
MB (mung bean) หมายถึง ถั่วเขียว
GP (garden peas) หมายถึง ถั่วลันเตา
WB (winged bean) หมายถึง ถั่วพู
HB (hyacinth bean) หมายถึง ถั่วแปะยี
_HCl คือ การสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก
_So คือ การสกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa ของสารสกัดจากถั่วต่างๆ ที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

สารสกัด	รหัสสารสกัด	เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa
1. ถั่วเหลืองที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	SB_So	75.10
2. ถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	PN_So	65.40
3. ถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	MB_So	83.20
4. ถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	GP_So	62.39
5. ถั่วพูที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	WB_So	83.70
6. ถั่วแปะยีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	HB_So	43.83

หมายเหตุ: % ของโปรตีนไฮโดรเลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa

$$= \left(\frac{\text{พื้นที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa} \times \text{ความหนาแน่นของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50}}{\text{พื้นที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งหมด} \times \text{ความหนาแน่นของโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งหมด}} \right) \times 100$$

อักษรย่อ

SB (soy bean) หมายถึง ถั่วเหลือง
PN (peanut) หมายถึง ถั่วลิสง
MB (mung bean) หมายถึง ถั่วเขียว
GP (garden peas) หมายถึง ถั่วลันเตา
WB (winged bean) หมายถึง ถั่วพู
HB (hyacinth bean) หมายถึง ถั่วแปะยี
_HCl คือ การสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก
_So คือ การสกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

เข้มที่สุดที่น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 50 – 75 kDa และสารสกัดจากถั่วแปะยีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (HB_So) ยังปรากฏแถบสีเข้มที่น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 20 – 25 kDa สารสกัดที่พบแถบสีอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุด ได้แก่ สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (PN_So) ซึ่งปรากฏแถบสีฟ้าที่น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 13 – 15 kDa อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTEiN® ไม่ปรากฏแถบสี ในขณะที่ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม BRAND® ปรากฏแถบสีน้ำเงินเข้มขนาดใหญ่ นอกจากนี้การสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงสามารถสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ ได้ในปริมาณค่อนข้างสูง โดยโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa ที่ตรวจสอบด้วย gel electrophoresis/gel documentation มีปริมาณอยู่ในช่วง 43.83 – 83.70% ของโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งหมด สารสกัดจากถั่วพูและถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa สูงสุด (83.70 และ 83.20% ตามลำดับ) และถั่วแปะยีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa ต่ำสุด (43.83%) อย่างไรก็ตามต้องยืนยันผลอีกครั้งด้วย HPLC

5. สรุปผลการทดลอง

โปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วต่างๆ ที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิกมีปริมาณน้อยจึงไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี SDS–PAGE การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ ด้วยคลื่นความถี่สูงให้ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทค่อนข้างสูง จากการวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis/gel documentation สารสกัดจากถั่วพูที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 – 50 kDa สูงสุด ซึ่งจะได้ยืนยันผลด้วย HPLC เพื่อคัดเลือกชนิดของถั่ว เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

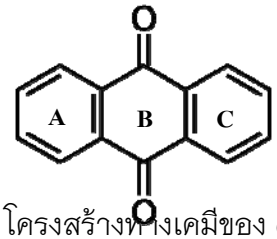
ภาคผนวกที่ 5
การศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท จากถั่วต่างๆ

การศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วต่างๆ

บทนำ

สารพฤกษเคมี (phytochemicals) หมายถึง สารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบเฉพาะในพืช สารกลุ่มนี้อาจเป็นสารที่ทำให้พืชผักนั้นๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว สารพฤกษเคมีเหล่านี้มักมีฤทธิ์ต่อต้านหรือป้องกันโรคบางชนิด ในพืชประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological action) ซึ่งมักเรียกว่าเป็นสารสำคัญ (active constituents) ที่สามารถนำมาใช้เตรียมเป็นยา นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารและเครื่องสำอาง สารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายชนิด ซึ่งอาจแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 7 กลุ่มดังนี้

1. Anthraquinones



รูปที่ 5.1 โครงสร้างทางเคมีของ anthraquinone

Anthraquinone เป็น quinone ที่มีในธรรมชาติมากที่สุด แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามหมู่แทนที่และกระบวนการทางชีวสังเคราะห์

- **Anthraquinones of emodin type** กลุ่มนี้มีหมู่แทนที่ที่ ring A และ C โดยมีกระบวนการชีวสังเคราะห์ไม่ว่าจะในพืชชั้นสูงหรือสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ จะมาจาก acetate–malonate pathway เช่น emodin
- **Anthraquinones of alizarin type** กลุ่มนี้มีหมู่แทนที่ที่ ring C เท่านั้นและพบในพืชบางวงศ์ ซึ่งได้แก่ rubiaceae, bignoniaceae และ verbenaceae โดยมีกระบวนการชีวสังเคราะห์ที่มาจาก shikimic acid ในรูปของ mevalonate และ o–succinoyl benzoic acid

ฤทธิ์ที่สำคัญของ anthraquinone คือ ใช้เป็นยาระบาย เช่น sennoside ในมะขามแขก , aloin และ aloe–emodin ในว่านหางจระเข้ เมื่อ anthraquinone ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย จะถูก bacteria ในลำไส้ใหญ่ reduce ให้เป็น anthranol ซึ่งระคายเคืองต่อลำไส้ จึงทำให้มีฤทธิ์เป็นยาระบาย นอกจากนี้ยังใช้เป็นสีย้อมและยารักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนัง การทดสอบหา anthraquinone เบื้องต้นสามารถทำการทดสอบด้วยวิธี modified Borntragers test ซึ่งสารสกัดที่มี anthraquinone จะให้สีชมพูในชั้นของ ammonium

2. Glycosides

Glycosides เป็นสารประกอบที่พบมากในพืชสมุนไพร มีโครงสร้างแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาล และส่วนที่ไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เรียกชื่อว่า aglycone (หรือ genin) การมีน้ำตาลทำให้สารนี้

ละลายน้ำได้ ส่วน aglycone เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีสูตรโครงสร้างและเภสัชวิทยาแตกต่างกันไป และส่วนนี้เองที่ทำให้สมบัติทางเภสัชวิทยาของ glycoside แตกต่างกันและใช้แบ่ง glycoside เป็นประเภทต่างๆ เช่น

- **Cardiac glycoside** มีฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อหัวใจและระบบไหลเวียนโลหิต เช่น สารในใบยี่โถ
- **Anthraquinone glycoside** ใช้เป็นระบาย (laxative) ฆ่าเชื้อ (antibiotic) และสีย้อม พบสารนี้มีในใบชุมเห็ดเทศ เมล็ดชุมเห็ดไทย ใบขี้เหล็ก และใบมะขามแขก เป็นต้น
- **Saponin glycoside** เมื่อละลายน้ำจะได้ฟองคล้ายสบู่ มักใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตตัวยาประเภทสเตียรอยด์ เช่น ลูกประคำดีควาย
- **Flavonoid glycoside** เป็นสีที่พบในดอกและผลของพืชต่างๆ โดยสามารถใช้เป็นสีย้อมหรือสีแต่งอาหาร บางชนิดใช้เป็นยา เช่น สารสกัดสีจากดอกอัญชัน

การทดสอบหา glycosides เบื้องต้นสามารถทดสอบหาน้ำตาลได้โดยใช้เทคนิค TLC (thin layer chromatography) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน glucose, fructose และ sucrose

3. Tannins

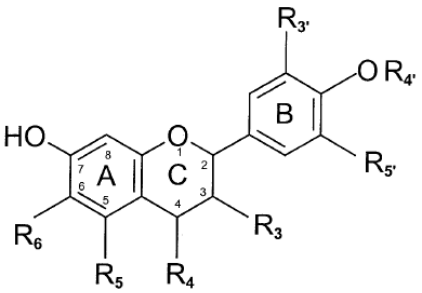
Tannins เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน เป็นกรดอ่อนรสฝาด เป็นสารให้ความฝาดในพืช พบได้ในพืชหลายชนิด แทนนิน มี 2 ชนิด คือ คอนเดนส์แทนนิน (condensed tannins) หรือเรียกว่าโปรแอนโทรไซยานิน (proanthrocyanin) พบได้ในส่วนเปลือกต้น และแก่นไม้เป็นส่วนใหญ่ และไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolysable tannins) คือ tanninที่สามารถถูกย่อยออกเป็นโมเลกุลเล็กๆ ได้ พบมากในส่วนใบ ฝัก และส่วนที่ปูดออกมาเมื่อต้นไม้ได้รับอันตราย (gall) tannin มีคุณสมบัติตกตะกอนโปรตีน ทำให้หนังสัตว์ไม่เน่าเปื่อย จึงมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง tannin มีฤทธิ์ฝาดสมานจึงใช้เป็นยารักษาโรคท้องเสีย และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ตัวอย่าง tannin ได้แก่ theogallin, gallic acid, ellagic acid การทดสอบหา tannin เบื้องต้นสามารถทำได้โดยนำสารสกัดมาละลายใน ethanol แล้วนำส่วนใสมาทดสอบกับสารละลายอิ่มตัวของ calcium hydroxide สารสกัดที่มี tannin จะเกิดตะกอนสีเหลืองเทาน้ำเงิน

4. Carotenoids

Carotenoids เป็นเม็ดสีที่สามารถละลายได้ในไขมัน พบในผลไม้และผักที่มีสีเหลืองไปจนถึงแดง beta–carotene เป็นสารยับยั้งการเกิดปฏิกริยา oxidation ตามธรรมชาติ ในการป้องกันการเกิดปฏิกริยา oxidation ของไขมันและ lipid membrane พบว่า carotenoid จากพืชผักสีเขียวและเหลืองมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง สามารถใช้ carotenoid ในการรักษาโรคทางพันธุกรรมบางชนิดได้โดยเฉพาะโรค porphyria ซึ่งเป็นอาการของการไวต่อแสงผิดปกติ เมื่อได้รับแสงอาทิตย์ในผิวหนัง จะเกิด singlet oxygen ซึ่งมีความไวต่อปฏิกิริยาต่างๆที่จัดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ชนิดแรงและเป็นสาเหตุของปฏิกริยา lipid peroxidation การทดสอบหา carotenoid เบื้องต้นสามารถทำได้โดยนำสารสกัดมาละลายใน

chloroform แล้วนำส่วนใสมาทดสอบกับ sulfuric acid สารสกัดที่มี carotenoid จะได้สารละลายที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหรือสีเขียวอมน้ำเงิน

5. Flavonoids



รูปที่ 5.2 โครงสร้างทางเคมีของ flavone

Flavonoids เป็นสารประกอบกลุ่ม polyphenol ซึ่งประกอบด้วยวง aromatic ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป โดยมีการจับกับคาร์บอนใน aromatic hydroxyl สารประกอบ flavonoids สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามระดับการเกิดออกซิเดชั่นและหมู่ฟังก์ชันของ C ring คือ flavonol, flavonones, flavones, isoflavones และ anthocyanidins

สารประกอบ flavonoid อาจเป็น nutraceuticals ซึ่งหมายถึงอาหารหรือองค์ประกอบของอาหารที่สามารถนำไปใช้เป็นยาหรืออาหารเสริมสุขภาพทั้งในด้านการป้องกันและรักษาโรค โดยมีประโยชน์ คือ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory และ antidiabetic และมีผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต พบว่าการได้รับสาร flavonoid จะช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง ภาวะการมีไขมันในเลือดสูง หลอดเลือดแดงแข็งตัว และการแข็งตัวของเลือด

การทดสอบหา flavonoid เบื้องต้นสามารถทำได้โดยวิธี magnesium–hydrochloric acid test โดยนำสารสกัดละลายใน methanol ใส่ขวดแล้วใส่ลวด magnesium ลงไป แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับกรด hydrochloric สารสกัดที่มี flavanone จะให้สีแดงเข้มไปจนถึงสีแดงอมม่วง สารสกัดที่มี flavanonol จะให้สีแดงและ สารสกัดที่มี flavone จะให้สีเหลือง

6. Alkaloids

Alkaloids เป็นสารที่พบมากในพืชสมุนไพร แต่ปริมาณสารจะต่างกัน เป็นสารอินทรีย์ ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ โครงสร้างส่วนใหญ่เป็น heterocyclic ring มักพบในพืชชั้นสูง มีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกัน ปัจจุบันพบ alkaloid มากกว่า 5,000 ชนิด คุณสมบัติของ alkaloid คือส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์และมีฤทธิ์เป็นด่าง

Alkaloid มีประโยชน์ในการรักษาโรค เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน และยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น

การทดสอบหา alkaloid เบื้องต้น ทำโดยนำสารสกัดมาทดสอบกับ Dragendorff's reagent สารสกัดที่มี alkaloid จะให้ตะกอนสีส้ม

7. Steroids / Triterpenoids

Triterpnoids เป็นสารประเภท terpenes จัดเป็น steroids ชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างประกอบด้วย isoprene จำนวน 6 unit จัดเป็นสารอินทรีย์ประเภทกรดไขมัน มีรสขมและฝาด เป็นสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง บำรุงตับ รักษาตับ ควบคุมระดับความดันโลหิตให้ปกติ ควบคุมภูมิแพ้ ลดคอเลสเตอรอล ปรับไขมันในร่างกายให้เป็นปกติ เสริมสร้างระบบย่อยอาหารให้ดีขึ้น และกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว triterpene พบมากในสปอร์ของเห็ดหลินจือซึ่งมีจุดประสงค์ในการใช้รักษาโรคมะเร็ง เช่น สถาบันโรคมะเร็งสโลนเก็ตเตอร์ริงในประเทศสหรัฐอเมริกา(Memorial Sloan–Kettering Cancer Center) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ triterpene เพื่อใช้รักษามะเร็งและสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ในโปแลนด์มีการใช้สาร triterpene ในคนไข้มะเร็งซึ่งพบว่าส่วนใหญ่มีอาการดีขึ้น ก้อนเนื้องอกอ่อนนิ่มลง อาการเจ็บปวดดีขึ้น ผู้ป่วยนอนหลับดีและกินอาหารได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดผลข้างเคียงของการรักษามะเร็งที่ใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) และ การฉายแสง (radio therapy) การทดสอบหา triterpene เบื้องต้นสามารถทำได้โดยใช้วิธี TLC plate และใช้ 0.1% vanillin เป็น spraying reagent สารสกัดที่มี steroids จะมี spot สีม่วง ส่วนสารสกัดที่มี triterpenoids จะมี spot สีน้ำเงินหรือฟ้า

1. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมี (phytochemitry) ของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

2. วิธีการทดลอง

2.1 การทดสอบหา anthraquinones

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Hydrogenperoxide (H_2O_2) (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Potassium hydroxide (KOH) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Methanol (MeOH) (Lab Scan, Bangkok, Thailand)
- Benzene(C_6H_6) (Lab Scan, Bangkok, Thailand)
- Acetic acid (CH_3COOH) (Lab Scan, Bangkok, Thailand)
- Amonium hydroxide(NH_4OH) (Merck, Darmstadt, Germany)
- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- สารสกัดจากฝักราชพฤกษ์ (ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

นำไปต้มกับ 2 ml ของ 0.5 N KOH

↓

เติม 0.5 ml ของ H_2O_2 (dilute)

↓

ต้มประมาณ 30 นาที

↓

เติม 100 µl ของ acetic acid

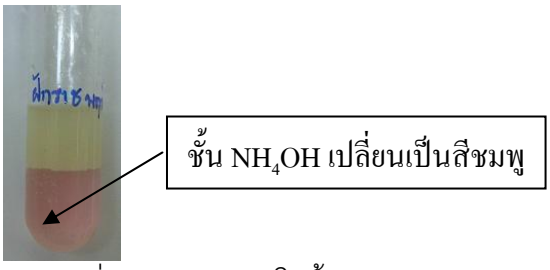
↓

นำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วย 1 ml ของ benzene

↓

นำชั้นของ benzene มาเติม 1 ml ของ 25%NH_4OH

ผลบวกของปฏิกิริยามีสีชมพูถึงแดงดัง**รูปที่ 3**



รูปที่ 5.3 ตัวอย่างผลการทดสอบหา anthraquinone ซึ่งผลบวกจะทำให้ชั้น 25% NH_4OH เปลี่ยนเป็นสีชมพู

2.2 การทดสอบหา glycosides

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- TLC plate silica gel60 (Merck, Darmstadt, Germany)
- Butanol (BuOH) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Acetic acid (CH_3COOH) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Diethylether (Lab scan, Bangkok, Thailand)

- Sulfuric acid(H_2SO_4) (Merck, Darmstadt, Germany)
- TLC tank (Kimble Chase–Kontes Glass, NJ, USA)

สารมาตรฐาน

- Sucrose (Merck, Darmstadt, Germany)
- Glucose (Merck, Darmstadt, Germany)
- Fructose (Merck, Darmstadt, Germany)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วยน้ำกลั่นและอุ่นบน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

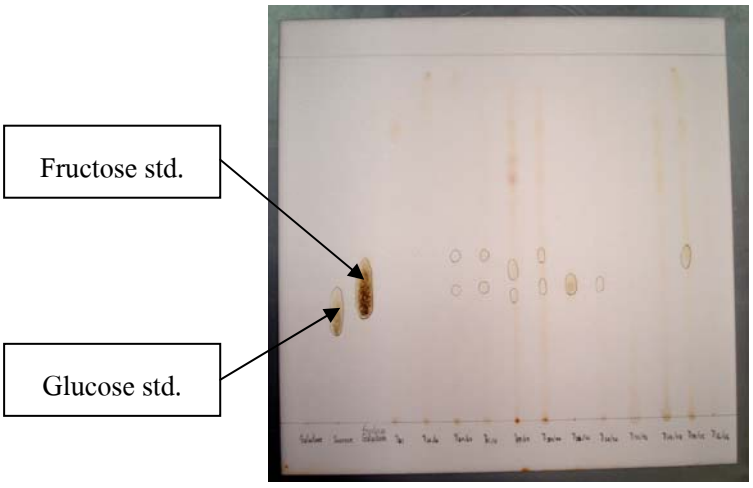
นำตัวอย่างทั้งหมดมา spot ในแผ่น TLC ปริมาตร 10 µl แล้วสังเกตผลการทดลอง**ดังรูปที่ 5.4**

Condition ของ TLC:

Stationary phase: Silica gel 60

Mobile phase : butanol/acetic acid/diethyl ether/water (9:6:1:3)

Detection : spraying with 10% H_2SO_4 และ heat



รูปที่ 5.4 ตัวอย่างผลการทดสอบหา glycoside ในสารสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน fructose และ glucose

2.3 การทดสอบหา tannins

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ethanol (EtOH) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- Tannin (เวชวิทย์ เชียงใหม่ ประเทศไทย)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml ของ ethanol และอุ่นบน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

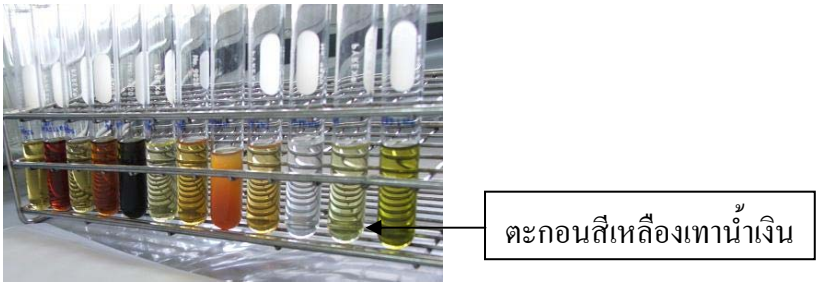
↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ทำการทดสอบด้วย 100 µl $Ca(OH)_2$ (sat.)

ผลบวกคือเกิดตะกอนสีเหลืองเทาน้ำเงินดังแสดงใน**รูปที่ 5.5**



รูปที่ 5.5 ตัวอย่างผลการทดสอบหา tannins ในสารสกัด

2.4 การทดสอบหา carotenoids

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Sulfuric acid (H_2SO_4) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Methanol (MeOH) (Lab scan, Bangkok, Thailand)

- Chloroform($CHCl_3$) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- สารสกัดจากแครอท (ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml ของ chloroform

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

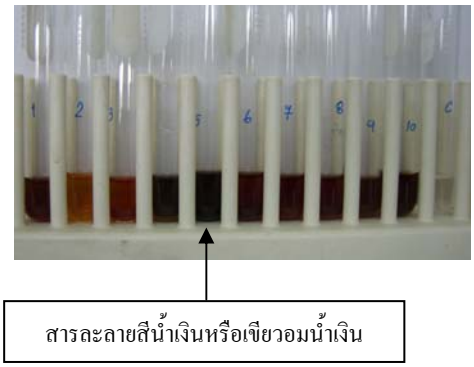
↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ทดสอบด้วย 100 µl ของ sulfuric acid เข้มข้นโดยทำการเปรียบเทียบกับ control

ผลบวกจะได้สารละลายสีน้ำเงินหรือเขียวอมน้ำเงินดังแสดงใน**รูปที่ 5.6**



รูปที่ 5.6 ตัวอย่างผลการทดสอบหา carotenoids ในสารสกัด

2.5 การทดสอบหา flavones

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Hydrochloric acid (HCl) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Methanol (MeOH) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Magnesium ribbon (LABCHEM, NSW, Australia)

- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- Flavone (Sigma, Louis, USA)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml ของ methanol และอุ่นบน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ใส่ลวด magnesium ลงไปในสารละลายของสารสกัด

แล้วเติม 100 µl ของ HCl (conc.)

↓

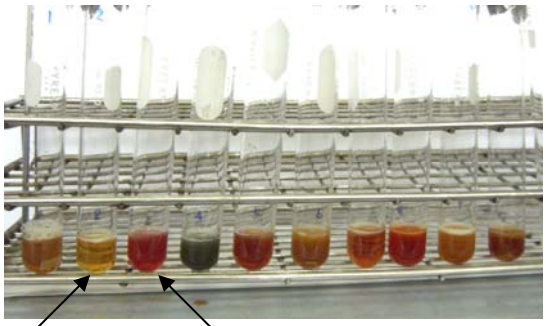
ปฏิกิริยาที่เป็น positive จะเป็นดังนี้คือ

flavanone จะปรากฏเป็นสีแดงเข้มไปจนถึงสีแดงอมม่วง

flavanonol จะปรากฏเป็นสีแดง

flavonol จะปรากฏเป็นสีแดงไปจนถึงสีแดงเข้ม

flavone จะปรากฏเป็นสีเหลือง ดังแสดงใน**รูปที่ 5.7**



Flavone จะปรากฏเป็นเหลือง

Flavonol จะปรากฏเป็นสีแดงไปจนถึงสีแดงเข้ม

รูปที่ 5.7 ตัวอย่างผลการทดสอบหา flavone ในสารสกัด

2.6 การทดสอบหา alkaloids

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Dragendorff's reagent
    - Bismuth nitrate (UNIVAR, NSW, Australia)
    - Nitric acid (Sigma–Aldrich, MO, USA)
    - Potassium iodide (UNIVAR, NSW, Australia)
- Hydrochloric acid (HCl) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Methanol (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- Quinine sulfate (Sigma, Louis, USA)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml ของ HCl (2 N) และอุ่นบน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

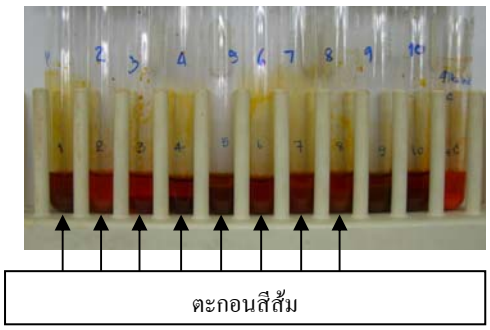
นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ทดสอบด้วย 100 µl ของ Dragendorff's reagent ผลบวกจะเกิดตะกอนสีส้ม ดังแสดงใน**รูปที่ 5.8**

วิธีการเตรียม Dragendorff's reagent

1. ละลาย bismuth nitrate 8 g ใน nitric acid, 30% W/V 12 ml
2. ละลาย potassium iodide 27.2 g ในน้ำกลั่น 50 ml แล้วเทสารละลาย potassium iodide ลงในสารละลาย bismuth nitrate แล้วเติมน้ำจนครบปริมาตร 100 ml



รูปที่ 5.8 ตัวอย่างผลการทดสอบหา alkaloid ในสารสกัด

2.7 การทดสอบหา Triterpenoids / Steroids

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Sulfuric acid (H_2SO_4) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Chloroform (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Acetic anhydride (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- Stigmasterol (Sigma, Louis, MO, USA)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 2 มล. และนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

↓

แยกสารละลายส่วนใสออก นำมา spot ลงบนแผ่น TLC

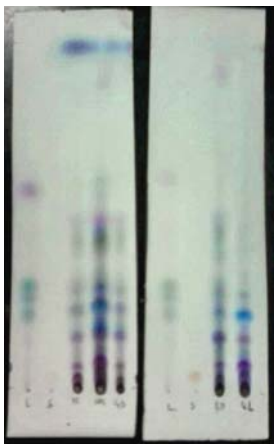
Mobile phase : hexane/ethyl acetate (7:3)

Detection : spraying with 0.1% vanillin in H_2SO_4

↓

สารสกัดที่มี triterpenoids จะได้ spot สีน้ำเงิน

และสารสกัดที่มี steroids จะได้ spot สีม่วง ดังแสดงใน**รูปที่ 5.9**



รูปที่ 5.9 ตัวอย่างผลการทดสอบหา triterpenes/steroids ในสารสกัด

3. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดสอบหาพฤกษเคมีของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตา พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีสเตียรอยด์สูง มีอัลคาลอยด์และกลูโคสเล็กน้อย สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีอัลคาลอยด์และซาโปนินสูง มีกลูโคสและฟลาโวนอยด์เล็กน้อย สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีสเตียรอยด์และกลูโคสเล็กน้อย มีอัลคาลอยด์และซาโปนินสูง ดังแสดงใน**ตารางที่ 5.1**

4. สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงพบสารพฤกษเคมีบางชนิดเป็นองค์ประกอบ ซึ่งได้แก่ สเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ กลูโคส ฟลาโวนอยด์ และซาโปนิน ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีที่จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพได้

ตารางที่ 1 การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

สารสกัด	ผลการทดสอบพฤกษเคมี									
	Steroids/Triterpenoids	Alkaloids	Anthraquinones	Glycosides			Flavonoids	Carotenoids	Tannins	Saponins
				F	G	S				
ถั่วลิสง	+++/–	+	–	–	++	–	–	–	–	–
ถั่วเขียว	–/–	+++	–	–	+	–	+	–	–	+++
ถั่วลันเตา	+/–	+++	–	–	++	–	–	–	–	+++

หมายเหตุ: “+” หมายถึง พบสารพฤกษเคมีดังกล่าวในสารสกัด, “–” หมายถึง ไม่พบสารพฤกษเคมีดังกล่าวในสารสกัด, F หมายถึง ฟรุกโตส, G หมายถึง กลูโคส และ S หมายถึง ซูโครส

5. เอกสารอ้างอิง

1. Peter Schreier, Natural product analysis: chromatography–spectroscopy–biological testing. Braunschweig/Wiesbaden : Vieweg, 1998.
2. E.A. Hussein, A.M. Taj–Eldeen, A.S. Al–Zubairi, A.S. Elhakimi and A.R. al–dubaie, Phytochemical screening, Total phenolics and antioxidant and antibacterial activities of Callus from *Brassica nigra* L. hypocotyls expants. International Journal of Pharmacology 6(4): 464–417, 2010
3. J. Ntbede, R.A. Yakabu and D.A.Nyam, Phytochemical screening for active compounds in *Canarium schweinfurthii* (Atile) leaves from Jos North, Plateau state, Nigeria. Research Journal of Biological Sciences3(9): 1076–1078, 2008
4. H. A. Ibrahim and H. Ibrahim, Phytochemical screening and toxicity evaluation on the leaves of A*rgemone Mexicana* Linn (Papaveraceae). Int. Jor. P. App. Scs.3(2):39–43, 2009
5. Mawardi Bin Rahimani, Ruth Kiew, Nordin Hj. Lajis Rahin Othman and Robert f. Toia, A Contribution to the phytochemical survey of peninsular Malaysia. Pertanika 8(3): 347 – 357, 1985.
6. M. Phadungkit, R. Rattarom and S. Rattana, Phtochenical screening, antioxidant, antibacterial and cytotoxic activities of *Knema angustifolia* extracts. Journal of Medicinal plants Research 4(13):1269–1272, 2010
7. Jimaima Lako, V"craige Trenerry, Mark Wahlqvist, Naiyana Wattanapenpaiboon, Subramanium Sotheeswaran and Robert Premier, Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant propertiesof a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readilyavailable foods. Food Chemistry 101 : 1727–1741, 2007

ภาคผนวกที่ 6

Specification ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก ถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

Specification ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก ถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

บทนำ

การควบคุมคุณภาพเป็นหัวใจสำคัญของกระบวนการการผลิต เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมามีมาตรฐาน ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญของฝ่ายควบคุมคุณภาพที่จะต้องเอาใจใส่และคอยควบคุมการผลิตในแต่ละขั้นตอน เริ่มตั้งแต่กระบวนการในการตรวจสอบคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ขั้นตอนและกระบวนการผลิต จนกระทั่งผลิตออกมาเป็นสินค้าสำเร็จรูป หลังจากนั้นจะมีการตรวจสอบด้านกายภาพและด้านเคมี ซึ่งจะมีการออกข้อกำหนด (Specification) ของสารสกัดแต่ละตัวที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับผลการทดสอบด้านกายภาพและด้านเคมีต่างๆ

1. วัตถุประสงค์

เพื่อจัดทำ specification ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

2. วัสดุ อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
2. หลอดหยด (Union Science, Thailand)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorious, England)
- 4. เครื่องเขย่า (Vortex mixer) (Vortex, Fisher scientific, UK)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การทดสอบความคงตัวในสารเคมีต่างๆ ของสารสกัดจากถั่วต่างๆ

3.1.1 สารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. 10% hydrochloric acid
2. 10% sodium hydroxide
3. 10% acetic acid
4. 10% ammonium hydroxide
5. 10% hydrogen peroxide
6. 10% ferric chloride
7. 10% sodium acetate

3.1.2 สารละลายสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

เตรียมสารละลายสารสกัดจากถั่ว 0.1% ในน้ำ

↓

วัดค่า pH ของสารละลายสารสกัดจากถั่ว

↓

หยดสารเคมีที่จะทดสอบทีละหยดจนครบ 50 หยด

สังเกตและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในแต่ละหยด

(สี, ความขุ่น และตะกอน)

3.2 การทดสอบความสามารถในการละลายของสารสกัดจากถั่วต่างๆ

3.2.1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. น้ำร้อน (อุณหภูมิ 60°C)
2. น้ำเย็น (อุณหภูมิ 25°C)
3. ethanol
4. methanol
5. propylene glycol
6. glycerin
7. mineral oil

3.2.2 วิธีการทดสอบ

สารสกัดจากถั่วปริมาตร 0.01 กรัม

↓

เติมตัวทำละลายตามปริมาตรของตัวทำละลาย ดังแสดงใน**ตารางที่ 6.1**

↓

บันทึกปริมาตรของตัวทำละลายเมื่อละลายหมด

↓

เปรียบเทียบค่าการละลายและคำจำกัดความของค่าการละลายจาก**ตารางที่ 6.2**

ตารางที่ 6.1 ปริมาตรตัวทำละลายที่เติมลงในสารสกัดจากถั่วต่างๆ

ครั้งที่	ปริมาตรตัวทำละลาย	ครั้งที่	ปริมาตรตัวทำละลาย	ครั้งที่	ปริมาตรตัวทำละลาย
1	10 µl	6	1 ml	11	1 ml
2	90 µl	7	1 ml	12	1 ml
3	200 µl	8	1 ml	13	1 ml
4	700 µl	9	1 ml	14	1 ml
5	1 ml	10	1 ml	15	1 ml

ตารางที่ 6.2 คำจำกัดความของการละลาย

คำจำกัดความของการละลาย	ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัด (µl)
Very soluble	< 1
Freely soluble	1 – 10
Soluble	10 – 30
Sparingly soluble	30 – 100
Slightly soluble	100 – 1,000
Very Slightly soluble	1,000 – 10,000
Practically insoluble / insoluble	> 10,000

4. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดสอบความคงตัวในสารเคมีต่างๆ ของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสงมีความคงตัวในสารเคมีต่างๆ สูงสุด เนื่องจากไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบด้วยสารเคมีต่างๆ แต่สารสกัดจากถั่วลันเตาและถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงไม่คงตัวในสารเคมีบางชนิด ดังแสดงใน**ตารางที่ 6.3**

สารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ชนิด มีค่า pH เท่ากับ 6 เมื่อละลายในน้ำ สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีลักษณะสีขาวขุ่น สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีลักษณะสีเขียวอ่อนและขุ่น และสารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีลักษณะสีเหลืองอ่อนและขุ่น สารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ตัวอย่างละลายในสารละลายต่างๆ ไม่ดีจนถึงไม่สามารถละลายดังแสดงใน**ตารางที่ 6.4 – 6.5**

5. สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมี specification ด้านกายภาพดังแสดงใน**ตารางที่ 6.6**

ตารางที่ 3 ความคงตัวของโปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงในสารเคมีต่างๆ

ที่	สารเคมีที่ใช้ทดสอบ	ประเภทของสารเคมี	ลักษณะของสารสกัด		
			ถั่วลิสง	ถั่วลันเตา	ถั่วเขียว
1	10% HCl	กรดแก่	–	–	–
2	10% NaOH	ด่างแก่	–	1 หยด ใสขึ้น	1 หยด ใสขึ้น
3	10% CH3COOH	กรดอ่อน	–	1 หยด ขุ่นขึ้น	–
4	10% NH4OH	ด่างอ่อน	–	–	1 หยด ใสขึ้น
5	10% H2O2	oxidizing agent	–	–	–
6	10% FeCl3	reducing agent	–	–	–
7	10% CH3COONa	เกลือของกรดอ่อน	–	5 หยด เกิดตะกอน	–

หมายเหตุ: – หมายถึง ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 6.4 ลักษณะของตัวอย่างเมื่อละลายน้ำกลั่น (0.1% ในน้ำ)

ตัวอย่าง	pH	ลักษณะของสารละลายตัวอย่าง
สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง	6	ขาวขุ่น
สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตา	6	เขียวอ่อนขุ่น
สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเขียว	6	เหลืองอ่อนขุ่น

ตารางที่ 6.5 ความสามารถในการละลายของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงในตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	**ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารสกัดจนหมด**	**คำจำกัดความของความสามารถในการละลายของสารสกัด**		
		ถั่วลิสง	**ถั่วลันเตา**	**ถั่วเขียว**
น้ำร้อน	100 µl	slightly soluble	slightly soluble	slightly soluble
น้ำเย็น	200 µl	slightly soluble	slightly soluble	slightly soluble
Ethanol	>10,000 µl	insoluble	insoluble	insoluble
Methanol	>10,000 µl	insoluble	insoluble	insoluble
Propylene glycol	1,000 – 10,000 µl	very slightly soluble	very slightly soluble	very slightly soluble
Glycerin	1,000 – 10,000 µl	very slightly soluble	very slightly soluble	very slightly soluble
Mineral oil	>10,000 µl	insoluble	slightly soluble	insoluble

ตารางที่ 6.6 Specification ของโปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วลันเตาและถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

โปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	
ลักษณะทางกายภาพ	สารละลายขาวขุ่น
การละลาย	ละลายได้ดีในน้ำร้อน (60°C) และน้ำเย็น (25°C) ละลายได้ไม่ดีใน propylene glycol, glycerin, mineral oil, เอธานอล และเมธานอล
pH	6 (0.1%ในน้ำ)
ความคงตัว	คงตัวใน ด่างแก่ ด่างอ่อน กรดแก่ กรดอ่อน, oxidizing agent, reducing agent และเกลือของกรดอ่อน
โปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	
ลักษณะทางกายภาพ	สีเขียวอ่อนขุ่น
การละลาย	ละลายได้ดีในน้ำร้อน (60°C) และน้ำเย็น(25°C)

	ละลายได้ไม่ดีใน propylene glycol, glycerin, mineral oil, เอธานอล และเมธานอล
pH	6 (0.1%ในน้ำ)
ความคงตัว	คงตัวใน กรดแก่ ด่างอ่อน oxidizing agent และ reducing agent ไม่คงตัวใน ด่างแก่ กรดอ่อน และเกลือของกรดอ่อน
โปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง	
ลักษณะทางกายภาพ	สีเหลืองอ่อนขุ่น
การละลาย	ละลายได้ดีในน้ำร้อน (60˚C) และน้ำเย็น(25˚C) ละลายได้ไม่ดีใน เอธานอล,เมธานอล, propylene glycol, glycerin และmineral oil
pH	6 (0.1%ในน้ำ)
ความคงตัว	คงตัวใน oxidizing agent และ reducing agent ไม่คงตัวใน ด่างแก่ ด่างอ่อน กรดแก่ กรดอ่อน และเกลือของกรดอ่อน

ภาคผนวกที่ 7

การจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

การจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

บทนำ

การควบคุมคุณภาพสารสำคัญในตัวอย่างต่างๆ จะใช้วิธีการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณสำคัญสารด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟฟี เช่นการแยกสาร phenolic ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีและการวิเคราะห์สารด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สำหรับสารสกัดจากธรรมชาติเช่นสมุนไพรที่มีสารสำคัญมากกว่า 1 ตัว ในการควบคุมมาตรฐานหรือ standardization จะใช้วิธีการจัดทำ fingerprint ซึ่งการทำ fingerprint อาจใช้วิธี HPLC โดยอาจมี marker หรือไม่มีก็ได้ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดว่ามีปริมาณสารสำคัญ หรือ marker ที่สม่ำเสมอทุกครั้ง ซึ่งเป็นคุณลักษณะของสารสกัดที่เหมาะสมในการนำไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เสริมอาหาร และยาต่อไป

1. วัตถุประสงค์

เพื่อจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มในท้องตลาด 2 ตัวอย่าง ซึ่งได้แก่ PEPTiEN® และ BRAND®

2. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1. เมมเบรนไนลอน 0.45 ไมครอน, 47 มม. (Filtrex, Virginia Beach, USA)
2. Nylon syringe filter 0.45 ไมครอน, 25 มม. (MS®, membrane-solution LLC., Japan)
3. Erlenmeyer flask (Pyrex, Asbash, Germany)
4. Beaker (Pyrex, Asbash, Germany)
5. Balance 4 digits (Sartorious, England)
6. UV-detector (SpectraSYSTEM UV1000, Ontario, Canada)
7. HPLC (Thermo finnan, Ontario, Canada)
8. Bath sonicator (Chest ultrasonics corp., NJ, USA)

2.2 สารเคมี

1. Trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma-Aldrich Ltd. Co., Louis, MO, USA)

2. Acetonitrile (Labscan, Thailand)

3. Distilled water (NPRDC, Chiang Mai University, Thailand)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียม mobile phase

1. เตรียม mobile phase ดังนี้

– Mobile phase A: 0.1% TFA ใน acetonitrile

– Mobile phase B: 0.1% TFA ในน้ำกลั่น

2. กรองผ่านกระดาษกรองไนลอน 0.45 ไมครอน แล้ว degas เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้

3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. เตรียมสารละลายสารสกัดจากถั่วที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. ละลายใน mobile phase A

2. ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTEiN® และ BRAND®

3. กรองสารละลายตัวอย่างผ่านกระดาษกรองไนลอน 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปใช้

3.3 condition ที่ใช้ในการจัดทำ HPLC fingerprint

1. Column: Phenomenex®, Gemini–NX, 5 µm, C18, 110A, 250×4.60 mm

2. Injection volume: 20 µl

3. Detected at: 220 nm

4. Gradient system: %mobile phase A และ **B** ดังแสดงใน**ตารางที่** 7.1

ตารางที่ 7.1 %mobile phase A และ mobile phase B ที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบของสารสกัดจากถั่วต่างๆและผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด

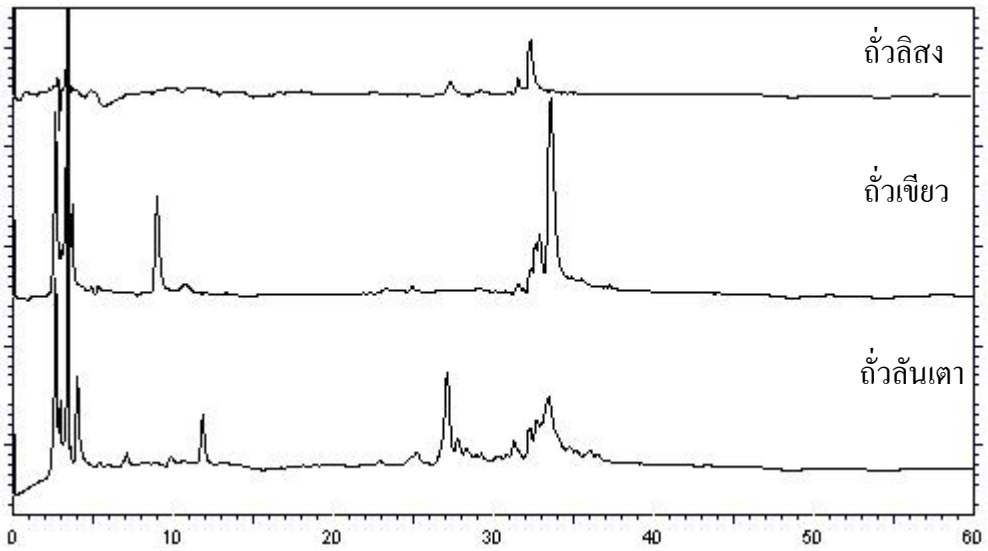
Time (minute)	Mobile phase A	Mobile phase B
0 – 10	10%	90%
10 – 20	20%	80%
20 – 30	40%	60%
30 – 40	60%	40%
40 – 60	60%	40%

4. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

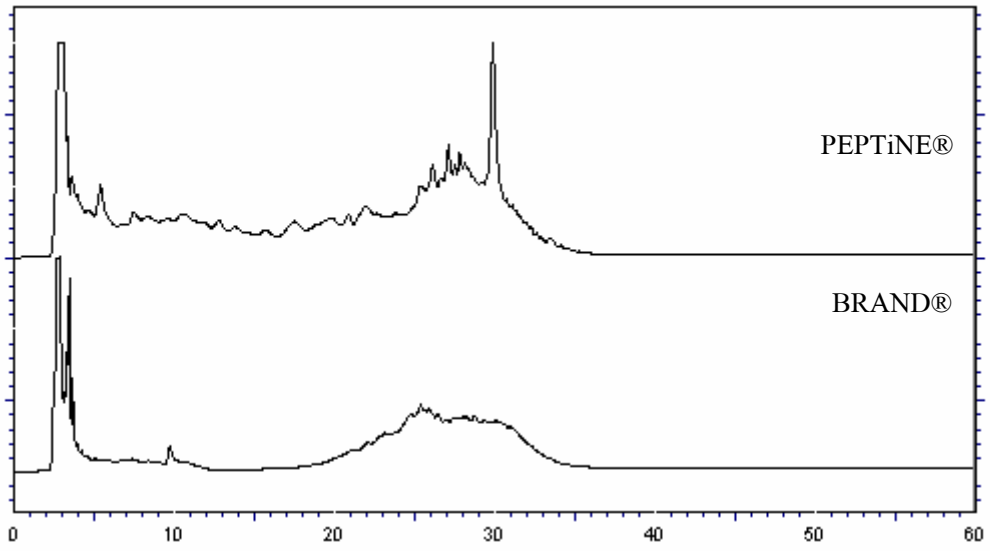
จากผลการวิเคราะห์โปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN® และ BRAND® พบว่าโครมาโทแก

รมของสารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ตัวอย่างปรากฏ peak ที่เวลา 31–33 นาที ถั่วเขียวและถั่วลันเตาปรากฏ sharp peak ที่เวลา 8 – 12 นาที ถั่วลิสงและถั่วลันเตาปรากฏ peak ที่เวลา 25 – 27 นาที ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN® ที่ระบุว่ามีปริมาณของ soy peptide เท่ากับ 5.3% ต่อขวด ปรากฏ sharp peak ที่เวลา 30 นาที ซึ่งอาจเป็น peak ของ soy peptide ส่วนผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม BRAND® ที่ระบุว่ามีปริมาณของไก่สกัด 99.7% ต่อขวด ไม่ปรากฏ peak เหมือนเช่นโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN® ดังแสดงใน**รูปที่ 7.1 – 7.2**

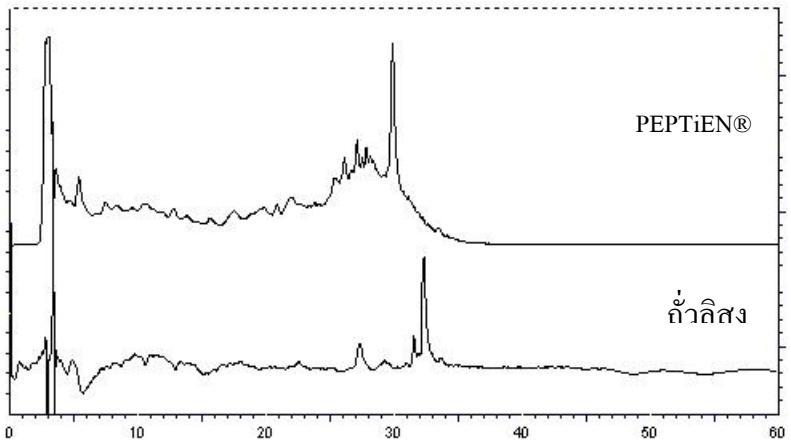
เมื่อเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN® พบว่าปรากฏ peak ที่เวลาใกล้เคียงกัน และมีลักษณะเฉพาะเจาะจงที่ใกล้เคียงกัน อาจเป็นเพราะมีสารสกัดจากถั่วที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสทหรือเปปไทด์เป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกันกับเครื่องดื่ม PEPTiEN® ดังแสดงใน**รูปที่ 7.3 – 7.5** อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วและผลิตภัณฑ์ BRAND® พบว่ามีลักษณะแตกต่างกัน อาจเนื่องจากผลิตภัณฑ์ BRAND® เป็นสารสกัดจากไก่ที่มีโปรตีนที่ได้จากสัตว์ แต่สารสกัดจากถั่วมีโปรตีนที่ได้จากพืช โปรตีนที่สกัดได้จึงมีลักษณะแตกต่างกัน รวมทั้ง BRAND® อาจไม่มีส่วนประกอบของโปรตีนใน chain สั้นเหมือนจากถั่วที่ได้จากการใช้คลื่นความถี่สูงดังแสดงใน**รูปที่ 7.6 – 7.8**



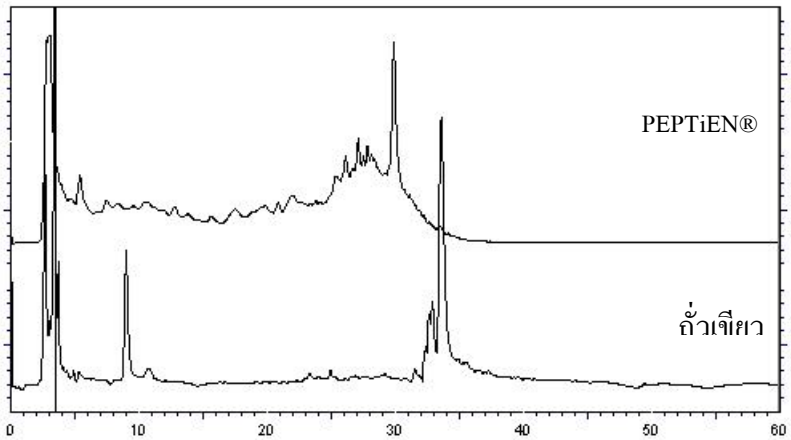
รูปที่ 7.1 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง



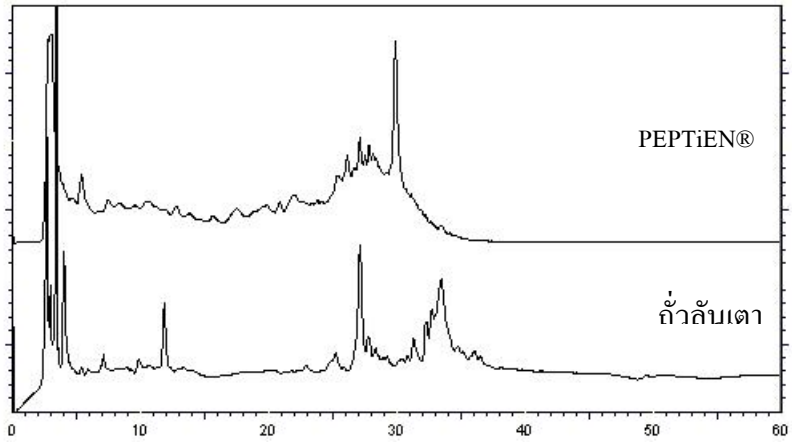
รูปที่ 7.2 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN® และ BRAND®



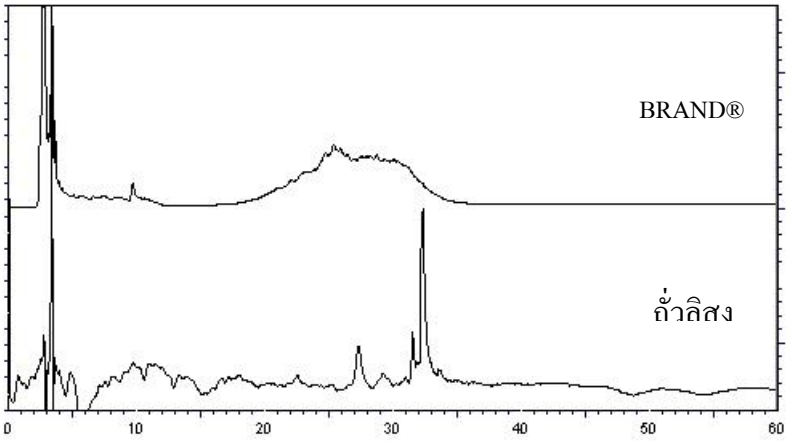
รูปที่ 7.3 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN®



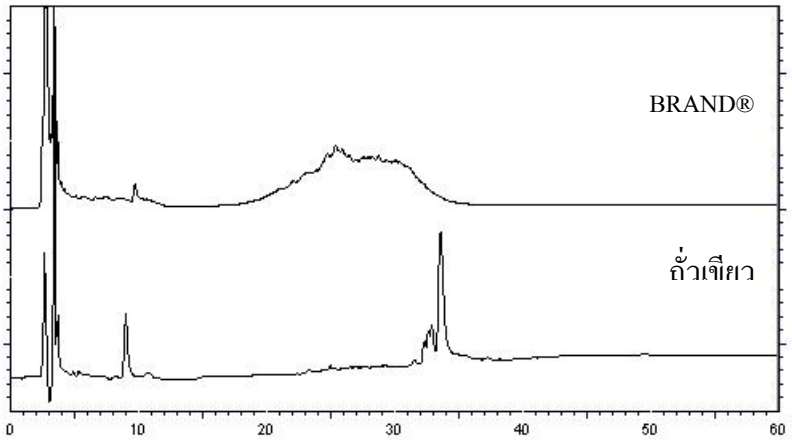
รูปที่ 7.4 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN®



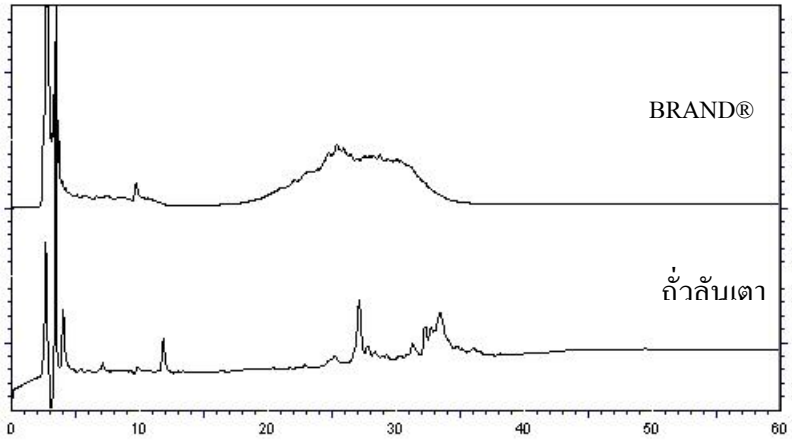
รูปที่ 7.5 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN®



รูปที่ 7.6 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม BRAND®



รูปที่ 7.7 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม BRAND®



รูปที่ 7.8 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม BRAND®

5. สรุปผลการทดลอง

จากผลการจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมีลักษณะโครมาโทแกรมใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN® ซึ่งระบุว่ามี soy peptide เป็นส่วนประกอบ ดังนั้นสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงจึงน่าจะมีโปรตีนไฮโดรไลเสทหรือเปปไทด์ชนิดใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTiEN® คือ มีน้ำหนักโมเลกุล และมีลักษณะโครมาโทแกรมคล้ายกันซึ่งจะได้ยืนยันผลต่อไป

ภาคผนวกที่ 8
การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียวด้วยคลื่นความถี่สูงที่ใช้ระยะเวลาต่างๆ

การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียด้วยคลื่นความถี่สูงที่ใช้ระยะเวลาต่างๆ

1. วัตถุประสงค์

เพื่อให้ทราบช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสกัดว่าช่วงเวลาใดสามารถสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทได้มากที่สุดและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับมาร์กเกอร์โปรตีน

2. วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

1. บีกเกอร์ (Pyrex, Asbash, Germany)
2. แท่งแก้ว (Pyrex, Asbash, Germany)
3. ขวดก้นกลม (Pyrex, Asbash, Germany)
4. เครื่องปั่นไฟฟ้า (Philips, Indonesia)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า2ตำแหน่ง (Sartorious, England)
6. Ice bath
7. เครื่องกำเนิดคลื่นความถี่สูง(ultrasonic probe) (Vibra cell^{TM}, Sonics & Materials, Inc., Newtown, USA)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)
9. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (Buchi, Switzerland)
10. เครื่อง spin freezed (Christ, Germany)
11. เครื่อง lyophilizer (Christ, Germany)
12. สมุนไพร ได้แก่ ถั่วลันเตา (ซื้อจากตลาดวโรรส) ถั่วลิสง (ซื้อจากตลาดต้นพยอม) และถั่วเขียว (ซื้อจากตลาดต้นพยอม)

3. วิธีการสกัด

1. นำพืชสมุนไพรมาลดขนาดด้วยการปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า ใส่ในบีกเกอร์เติมน้ำกรองให้ท่วม 2–3 นิ้ว
2. คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้ว
3. นำบีกเกอร์ที่มีสมุนไพรคนเข้ากันแล้วใส่ใน ice bath
4. นำไป sonicate ด้วย probe ที่ 39 amplitude นาน 30, 45, 60, 90 และ120 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 50°C
5. หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้กรองด้วยผ้าขาวบาง นำไปปั่นแหวี่ยงนาน5นาทีเพื่อเอาตะกอนละเอียดออก
6. นำไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศด้วยกระดาษกรองเบอร์1
7. นำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาน้ำออกจนเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ

8. นำไป lyophilizeด้วยเครื่อง lyophilizer จนแห้งแล้วชั่งน้ำหนักหาเปอร์เซ็นต์ yield วิเคราะห์ HPLC รันเจลอีเล็คโตรโฟรีสีสและหาปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยวิธี Bradford

4. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการสกัดถั่วลิสง ถั่วลันเตา และถั่วเขียว พบว่าเมื่อระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารสกัดที่ได้ เมื่อใช้เวลานานขึ้นจะได้ผลผลิตของสารสกัดสูงขึ้น โดยถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาให้ปริมาณสารสกัดจากสูงไปต่ำตามลำดับ สารสกัดที่ได้มีค่า pH เป็นกรดอ่อนอยู่ในช่วง pH 5.98 – 6.48 ดังแสดงใน**ตารางที่ 8.1**

5. สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 120 นาที ให้ผลผลิต (%yield) สารสกัดสูงสุด สารสกัดจากถั่วด้วยคลื่นความถี่สูงที่ใช้ระยะเวลาในการสกัดแตกต่างกันอาจให้ปริมาณโปรตีนไฮโดรเสทต่างกัน ซึ่งจะได้ทำการควรตรวจสอบปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดเหล่านี้ต่อไป

ตารางที่ 8.1 ลักษณะทางกายภาพและเปอร์เซ็นต์ yield ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วลันเตาและถั่วเขียวที่สกัดคลื่นความถี่สูงที่ใช้ระยะเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	เวลาที่ใช้ในการสกัด	ลักษณะของสารสกัด	pH	เปอร์เซ็นต์ yield
ถั่วลิสง	30นาที	ผงสีขาวนวล	6.05	42.68
	45นาที	ผงสีขาวนวล	6.09	48.65
	60นาที	ผงสีขาวนวล	5.98	47.92
	90นาที	ผงสีขาวนวล	6.30	46.57
	120นาที	ผงสีขาวนวล	6.53	52.68
ถั่วลันเตา	30นาที	ผงสีเขียวอ่อน	6.05	12.49
	45นาที	ผงสีเขียวอ่อน	6.36	17.28
	60นาที	ผงสีเขียวอ่อน	6.33	18.08
	90นาที	ผงสีเขียวอ่อน	6.45	18.76
	120นาที	ผงสีเขียวอ่อน	6.48	18.92
ถั่วเขียว	30นาที	ผงสีเหลืองอ่อน	6.25	15.70
	45นาที	ผงสีเหลืองอ่อน	6.32	20.61
	60นาที	ผงสีเหลืองอ่อน	6.43	22.75
	90นาที	ผงสีเหลืองอ่อน	6.37	22.29
	120นาที	ผงสีเหลืองอ่อน	6.38	24.27

หมายเหตุ : %ผลผลิต (%yield) $= \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัด (g)}}{\text{น้ำหนักของถั่ว (g)}} \times 100$

ภาคผนวกที่ 9

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford และการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี SDS – PAGE ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท จากถั่วต่างๆที่สกัด ด้วยวิธี sonication ที่เวลาต่างๆ

ตอนที่ 9.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท จากถั่วที่สกัดด้วยวิธี sonication ที่เวลาต่างๆ

บทนำ

โปรตีนในถั่วต่างๆมีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งยากต่อการดูดซึม มีจากการศึกษาพบว่า lectin ในถั่วลิสงมีน้ำหนักโมลกุล 110 kDa โปรตีนถั่วเขียวมีน้ำหนักโมเลกุล 220–295 kDa และ legumin ในถั่วลันเตามีน้ำหนักโมเลกุล 320–380 kDa จึงยากต่อการดูดซึม ในปัจจุบันจึงเตรียมให้อยู่ในรูปโปรตีนไฮโดรไลเสทซึ่งเป็นของผสมของเพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีน การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสทในการเป็นเครื่องดื่มเสริมสุขภาพ พบว่าร่างกายสามารถดูดซึมโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายแล้ว และนำไปใช้ได้เร็วกว่าโปรตีนทั่วไป และยังมีการใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพให้กับผู้ป่วย ผู้บาดเจ็บ ผู้ผ่านการผ่าตัด และผู้ที่มีปัญหาในการย่อยอาหารอีกด้วย

1. วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (sonication) นาน 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที โดยวิธี Bradford เปรียบเทียบกับ bovine serum albumin (BSA)

สารสกัดจากถั่วที่นำมาทดสอบจำนวน 15 ตัวอย่างมีดังนี้

13. สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที จำนวน 5 ตัวอย่าง
14. สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที จำนวน 5 ตัวอย่าง
15. สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที จำนวน 5 ตัวอย่าง

2. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

เหมือนภาคผนวกที่ 3

3. วิธีการทดลอง

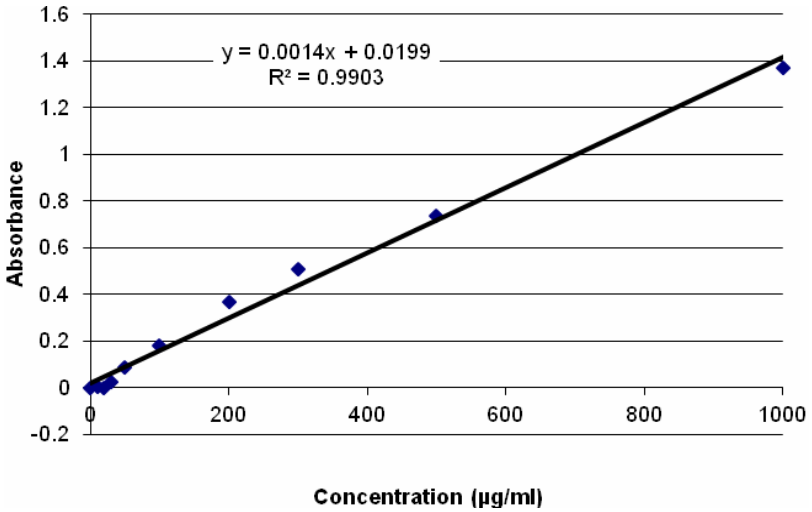
เหมือนภาคผนวกที่ 3

4. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ของสารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ชนิดเมื่อสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับ bovine serum albumin **(รูปที่ 9.1)** พบว่าสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยเวลาต่างๆ มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 115.58–194.83, 121.74–310.31 และ 191.02–347.69 µg/ml ตามลำดับ โดยสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดเป็นเวลานาน 60, 90 และ 60 นาทีตามลำดับ ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดตามลำดับ ดังแสดงใน

ตารางที่ 9.1 ในขณะที่เครื่องดื่มเปปไทด์จากถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีนน้อยเพียง 183.44 µg/ml ส่วนซุปไก่สกัดมีปริมาณโปรตีนมีปริมาณโปรตีน 178.64 µg/ml ทั้งนี้เนื่องจากเครื่องดื่มเปปไทด์จากถั่วเหลืองประกอบด้วยกรดอะมิโนเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้น Bradford จึงไม่สามารถวิเคราะห์กรดอะมิโนได้ ซึ่งทำให้มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าสารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ชนิด

พืชแต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันเนื่องจากมีความสามารถถูกย่อยได้ต่างกัน โดยเวลาที่ใช้สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนานขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณโปรตีนมากขึ้น แต่หากให้เวลานานเกินไปโปรตีนจะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโน ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford



รูปที่ 9.1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Bovine Serum Albumin (BSA) และค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 9.1 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ชนิดที่เมื่อสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ

สารสกัด	รหัสสารสกัด	ความเข้มข้นของโปรตีน (µg/ml)
1. ถั่วลิสง		
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30 นาที	PN30	126.26
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 45 นาที	PN45	171.74
- **สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที**	**PN60**	**194.83**
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 90 นาที	PN90	142.45
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 120 นาที	PN120	115.58

ตารางที่ 9.1 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ชนิดที่เมื่อสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ (ต่อ)

สารสกัด	รหัสสารสกัด	ความเข้มข้นของโปรตีน (µg/ml)
2. ถั่วเขียว		
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30 นาที	MB30	121.74
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 45 นาที	MB45	143.64
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที	MB60	252.93
- **สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 90 นาที**	**MB90**	**310.31**
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 120 นาที	MB120	230.31
3. ถั่วลันเตา		
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30 นาที	GP30	314.83
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 45 นาที	GP45	323.64
- **สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที**	**GP60**	**347.69**
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 90 นาที	GP90	207.92
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 120 นาที	GP120	191.02
เครื่องดื่มเปปไทด์จากถั่วเหลือง*	PEPTiNE®	183.44
ซุปไก่สกัด	BRAND®	178.64

หมายเหตุ: PN (peanut) หมายถึง ถั่วลิสง, MB (mung bean) หมายถึง ถั่วเขียว และ GP (garden peas) หมายถึง ถั่วลันเตา 30, 45, 60, 90 และ 120 คือเวลาที่ใช้ในการสกัด

* ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม PEPTEiN® เข้มข้น 0.022 mg/ml

5. สรุปผลการทดลอง

โปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลานาน 60, 90 และ 60 นาทีตามลำดับ ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี Bradford จึงน่าจะเหมาะสมสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

ตอนที่ 9.2 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วที่สกัดที่เวลาต่างๆ ด้วยวิธี SDS – PAGE

บทนำ

น้ำหนักโมเลกุลยังมีความสำคัญในการบ่งบอกคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสท ถ้าระดับการย่อยสลายสูงจะมีกรดอะมิโนอิสระและเพปไทด์ขนาดเล็กจำนวนมาก (น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 kDa) ซึ่งทำให้ละลายได้ดีแต่ขาดคุณสมบัติบางอย่างไป และถ้าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้ประกอบด้วยเพปไทด์ขนาดใหญ่ (น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 25 kDa) อาจไม่ละลายได้เพียงพอที่จะแสดงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ได้

6. วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30, 45, 60, 90 และ 120 นาทีที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 ^{o}C เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มในท้องตลาด 2 ยี่ห้อ ซึ่งได้แก่ เครื่องดื่มเปปไทด์จากถั่วเหลือง (PEPTiNE®) และซุปไก่สกัด (BRAND®) ซึ่งสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างได้โดยการเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐาน

สารสกัดจากถั่วที่นำมาทดสอบจำนวน 15 ตัวอย่างมีดังนี้

1. สารสกัดจากถั่วลิสงที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที จำนวน 5 ตัวอย่าง
2. สารสกัดจากถั่วเขียวที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที จำนวน 5 ตัวอย่าง
3. สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที จำนวน 5 ตัวอย่าง

7. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

เหมือนภาคผนวกที่ 4

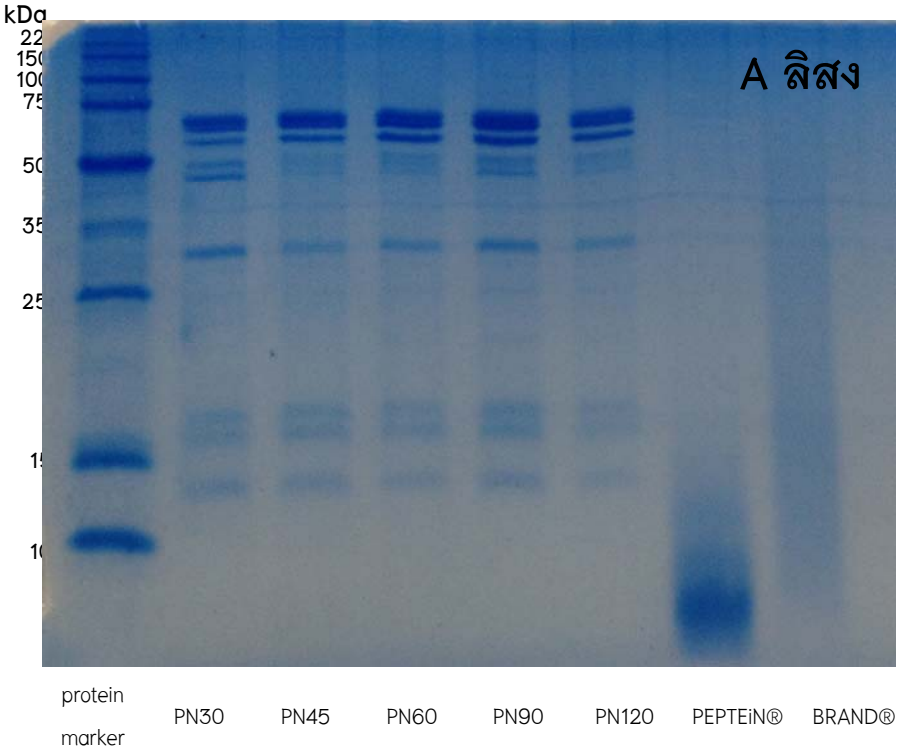
8. วิธีทดลอง

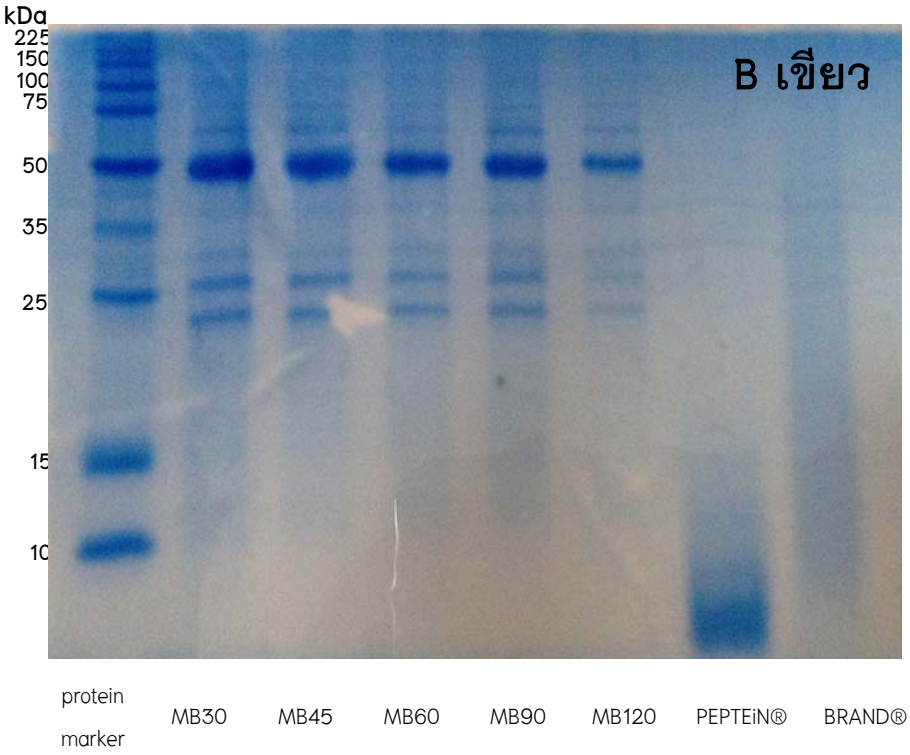
เหมือนภาคผนวกที่ 4

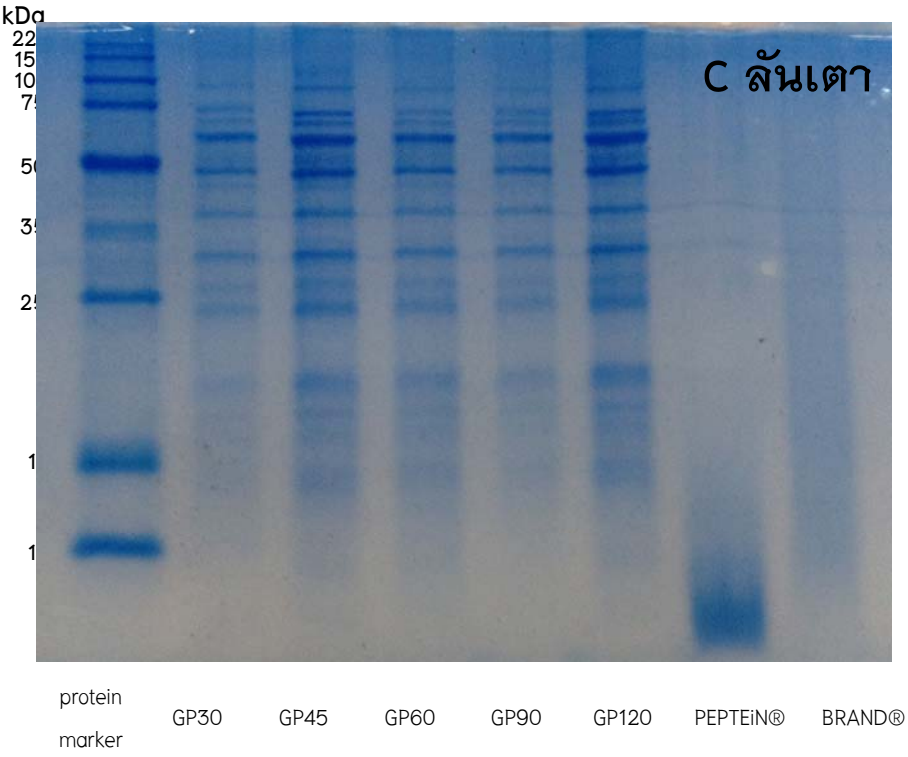
9. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทในสารสกัดจากถั่วทั้ง 3 ชนิด เมื่อสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดด้วยวิธี SDS–PAGE ได้แสดงในรูปที่ 10.1–10.3 พบว่า แถบโปรตีนที่เข้มที่สุดของถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่ความเข้มข้น 0.001 mg/ml เมื่อสกัดเป็นเวลานาน 90, 30 และ 120 นาทีตามลำดับ ส่วนผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม

PEPTEiN® ที่ความเข้มข้น 0.022 mg/ml พบแถบโปรตีนขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 kDa และผลิตภัณฑ์ภัณฑ์เครื่องดื่ม BRAND® ปรากฏแถบยาวสีน้ำเงิน อาจเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนที่ได้จากสัตว์หลายชนิดที่อาจมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่สามารถแยกแถบได้ชัดเจน







รูปที่9.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทในสารสกัดจากถั่วต่างๆ (A) ถั่วลิสง (B) ถั่วเขียว และ (C) ถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มในท้องตลาด และโปรตีนมาตรฐาน marker

หมายเหตุ: PN (peanut) หมายถึง ถั่วลิสง, MB (mung bean) หมายถึง ถั่วเขียว และ GP (garden peas) หมายถึง ถั่วลันเตา 30, 45, 60, 90 และ 120 คือเวลาที่ใช้ในการสกัด

นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทในสารสกัดจากถั่วจากความเข้มและพื้นที่ของแถบที่ปรากฏบนเจลที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงต่างๆ **(ตารางที่ 9.2)** พบว่า

- สารสกัดจากถั่วลิสงส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 kDa และมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa อยู่ในช่วง 19.87–28.57% ของโปรตีนทั้งหมด โดยสารสกัดที่สกัดนาน 90 นาทีมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa มากที่สุด นอกจากนี้มีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 10–24 kDa อยู่ในช่วง 55.45–66.23% ของโปรตีนทั้งหมด โดยสารสกัดที่สกัดนาน 60 นาทีมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 10–24 kDa มากที่สุด แต่ไม่พบโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 kDa
- สารสกัดจากถั่วเขียวส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 kDa และมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa อยู่ในช่วง 46.02–96.50% ของโปรตีนทั้งหมด โดยสารสกัดที่สกัดนาน 120 นาทีมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa มากที่สุด นอกจากนี้มี

ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 10–24 kDa อยู่ในช่วง 7.69–38.89% ของโปรตีนทั้งหมด โดยสารสกัดที่สกัดนาน 90 นาทีมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 10–24 kDa มากที่สุด แต่ไม่พบโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 kDa

- สารสกัดจากถั่วลันเตาส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 kDa และมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa อยู่ในช่วง 40.56–55.57% ของโปรตีนทั้งหมด โดยสารสกัดที่สกัดนาน 120 นาทีมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa มากที่สุด นอกจากนี้มีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 10–24 kDa อยู่ในช่วง 20.42–31.63% ของโปรตีนทั้งหมด โดยสารสกัดที่สกัดนาน 60 นาทีมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 10–24 kDa มากที่สุด แต่ไม่พบโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 kDa

ตารางที่ 9.2 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงต่างๆของสารสกัดจากถั่วต่างๆ ที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ

สารสกัด	รหัสสารสกัด	เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไฮโดรไลเสท		
		น้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 50 kDa	น้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa	น้ำหนักโมเลกุล 10–24 kDa
1. ถั่วลิสง				
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30 นาที	PN30	22.66	19.87	57.46
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 45 นาที	PN45	12.72	26.90	60.38
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที	PN60	11.52	22.24	**66.23**
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 90 นาที	PN90	15.97	**28.57**	55.45
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 120 นาที	PN120	14.15	26.38	59.47
2. ถั่วเขียว				
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30 นาที	MB30	0	71.00	28.99
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 45 นาที	MB45	14.46	63.77	21.76
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที	MB60	4.49	70.69	24.82
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 90 นาที	MB90	1.00	51.09	**38.89**
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 120 นาที	MB120	27.28	**96.50**	7.69
3. ถั่วลันเตา				
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 30 นาที	GP30	27.74	48.06	24.20
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 45 นาที	GP45	39.02	40.56	20.42
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที	GP60	26.83	41.54	**31.63**
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 90 นาที	GP90	31.61	45.34	23.04
- สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 120 นาที	GP120	14.33	**55.57**	30.10

หมายเหตุ: PN (peanut) หมายถึง ถั่วลิสง, MB (mung bean) หมายถึง ถั่วเขียว และ GP (garden peas) หมายถึง ถั่วลันเตา 30, 45, 60, 90 และ 120 คือเวลาที่ใช้ในการสกัด

10. สรุปผลการทดลอง

โปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียวและถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลานาน 90, 120 และ 120 นาทีตามลำดับ ให้ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25–50 kDa สูงสุด และสกัดเป็นเวลานาน 60, 90 และ 60 นาทีตามลำดับให้ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10–24 kDa สูงสุด อย่างไรก็ตามไม่พบปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 kDa มีรายงานว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่สามารถจับกับ IgE antibodies ได้อยู่ในช่วง 1300–5000 Da [1] นอกจากนี้พบว่า whey protein hydrolysate จาก PROLIANT Co., USA, มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 600–1400 Da [2]

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารสกัดทั้ง 2 วิธี พบว่าถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลานาน 60 นาที มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (374.69 µg/ml) เมื่อทดสอบด้วยวิธี Bradford นอกจากนี้ยังมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสูง โดยมีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทที่น้ำหนักโมเลกุล 25–50 และ 10–24 kDa เท่ากับ 41.54 และ 31.63 %ของโปรตีนทั้งหมด เนื่องจากในการนำไปใช้ร่างกายสามารถดูดซึมโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ดังนั้นจึงควรเลือกสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลานาน 60 นาทีไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. http://www.ubic-consulting.com/food/ingredient/chemical-industries/protein-hydrolysate-ingredient-market.html
2. Li-juna, L., Chuan-heb, Z. and Zhenga, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food and Bioproducts Processing*, 2008; 86(1): 1–6.

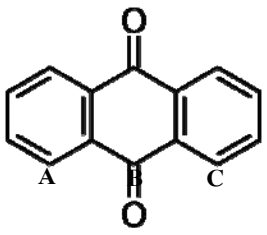
ภาคผนวกที่ 10
การศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท จากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที

การศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตา ที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงนาน 60 นาที

บทนำ

สารพฤกษเคมี (phytochemicals) หมายถึง สารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบเฉพาะในพืช สารกลุ่มนี้อาจเป็นสารที่ทำให้พืชผักนั้นๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว สารพฤกษเคมีเหล่านี้มักมีฤทธิ์ต่อต้านหรือป้องกันโรคบางชนิด ในพืชประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological action) ซึ่งมักเรียกว่าเป็นสารสำคัญ (active constituents) ที่สามารถนำมาใช้เตรียมเป็นยา นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารและเครื่องสำอาง สารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายชนิด ซึ่งอาจแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 7 กลุ่มดังนี้

8. Anthraquinones



รูปที่ 10.1 โครงสร้างทางเคมีของ anthraquinone

Anthraquinone เป็น quinone ที่มีในธรรมชาติมากที่สุด แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามหมู่แทนที่และกระบวนการทางชีวสังเคราะห์

- **Anthraquinones of emodin type** กลุ่มนี้มีหมู่แทนที่ที่ ring A และ C โดยมีกระบวนการชีวสังเคราะห์ไม่ว่าจะในพืชชั้นสูงหรือสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ จะมาจาก acetate–malonate pathway เช่น emodin
- **Anthraquinones of alizarin type** กลุ่มนี้มีหมู่แทนที่ที่ ring C เท่านั้นและพบในพืชบางวงศ์ ซึ่งได้แก่ rubiaceae, bignoniaceae และ verbenaceae โดยมีกระบวนการชีวสังเคราะห์ที่มาจาก shikimic acid ในรูปของ mevalonate และ o–succinoyl benzoic acid

ฤทธิ์ที่สำคัญของ anthraquinone คือ ใช้เป็นยาระบาย เช่น sennoside ในมะขามแขก , aloin และ aloe–emodin ในว่านหางจระเข้ เมื่อ anthraquinone ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย จะถูก bacteria ในลำไส้ใหญ่ reduce ให้เป็น anthranol ซึ่งระคายเคืองต่อลำไส้ จึงทำให้มีฤทธิ์เป็นยาระบาย นอกจากนี้ยังใช้เป็นสีย้อมและยารักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนัง การทดสอบหา anthraquinone เบื้องต้นสามารถทำการทดสอบด้วยวิธี modified Borntragers test ซึ่งสารสกัดที่มี anthraquinone จะให้สีชมพูในชั้นของ ammonium

9. Glycosides

Glycosides เป็นสารประกอบที่พบมากในพืชสมุนไพร มีโครงสร้างแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาล และส่วนที่ไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เรียกชื่อว่า aglycone (หรือ genin) การมีน้ำตาลทำให้สารนี้ละลายน้ำได้ ส่วน aglycone เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีสูตรโครงสร้างและเภสัชวิทยาแตกต่างกันไป และส่วนนี้เองที่ทำให้สมบัติทางเภสัชวิทยาของ glycoside แตกต่างกันและใช้แบ่ง glycoside เป็นประเภทต่างๆ เช่น

- **Cardiac glycoside** มีฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อหัวใจและระบบไหลเวียนโลหิต เช่น สารในใบยี่โถ
- **Anthraquinone glycoside** ใช้เป็นระบาย (laxative) ฆ่าเชื้อ (antibiotic) และสีย้อม พบสารนี้มีในใบชุมเห็ดเทศ เมล็ดชุมเห็ดไทย ใบขี้เหล็ก และใบมะขามแขก เป็นต้น
- **Saponin glycoside** เมื่อละลายน้ำจะได้ฟองคล้ายสบู่ มักใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตตัวยาประเภทสเตียรอยด์ เช่น ลูกประคำดีควาย
- **Flavonoid glycoside** เป็นสีที่พบในดอกและผลของพืชต่างๆ โดยสามารถใช้เป็นสีย้อมหรือสีแต่งอาหาร บางชนิดใช้เป็นยา เช่น สารสกัดสีจากดอกอัญชัน

การทดสอบหา glycosides เบื้องต้นสามารถทดสอบหาน้ำตาลได้โดยใช้เทคนิค TLC (thin layer chromatography) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน glucose, fructose และ sucrose

10. Tannins

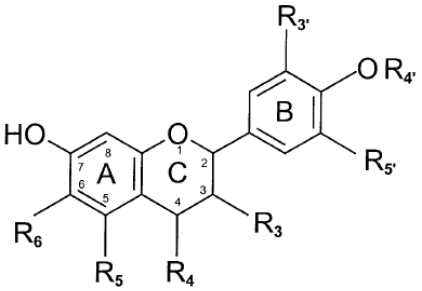
Tannins เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน เป็นกรดอ่อนรสฝาด เป็นสารให้ความฝาดในพืช พบได้ในพืชหลายชนิด แทนนิน มี 2 ชนิด คือ คอนเดนส์แทนนิน (condensed tannins) หรือเรียกว่าโปรแอนโทรไซยานิน (proanthrocyanin) พบได้ในส่วนเปลือกต้น และแก่นไม้เป็นส่วนใหญ่ และไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolysable tannins) คือ tanninที่สามารถถูกย่อยออกเป็นโมเลกุลเล็กๆ ได้ พบมากในส่วนใบ ฝัก และส่วนที่ปูดออกมาเมื่อต้นไม้ได้รับอันตราย (gall) tannin มีคุณสมบัติตกตะกอนโปรตีน ทำให้หนังสัตว์ไม่เน่าเปื่อย จึงมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง tannin มีฤทธิ์ฝาดสมานจึงใช้เป็นยารักษาโรคท้องเสีย และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ตัวอย่าง tannin ได้แก่ theogallin, gallic acid, ellagic acid การทดสอบหา tannin เบื้องต้นสามารถทำได้โดยนำสารสกัดมาละลายใน ethanol แล้วนำส่วนใสมาทดสอบกับสารละลายอิ่มตัวของ calcium hydroxide สารสกัดที่มี tannin จะเกิดตะกอนสีเหลืองเทาน้ำเงิน

11. Carotenoids

Carotenoids เป็นเม็ดสีที่สามารถละลายได้ในไขมัน พบในผลไม้และผักที่มีสีเหลืองไปจนถึงแดง beta-carotene เป็นสารยับยั้งการเกิดปฏิกริยา oxidation ตามธรรมชาติ ในการป้องกันการเกิดปฏิกริยา oxidation ของไขมันและ lipid membrane พบว่า carotenoid จากพืชผักสีเขียวและเหลืองมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง สามารถใช้ carotenoid ในการรักษาโรคทางพันธุกรรมบางชนิดได้โดยเฉพาะโรค porphyria ซึ่งเป็นอาการของการไวต่อแสงผิดปกติ เมื่อได้รับแสงอาทิตย์ในผิวหนัง จะเกิด singlet

oxygen ซึ่งมีความไวต่อปฏิกิริยาต่างๆที่จัดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ชนิดแรงและเป็นสาเหตุของปฏิกริยา lipid peroxidation การทดสอบหา carotenoid เบื้องต้นสามารถทำได้โดยนำสารสกัดมาละลายใน chloroform แล้วนำส่วนใสมาทดสอบกับ sulfuric acid สารสกัดที่มี carotenoid จะได้สารละลายที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหรือสีเขียวอมน้ำเงิน

12. Flavonoids



รูปที่ 10.2 โครงสร้างทางเคมีของ flavone

Flavonoids เป็นสารประกอบกลุ่ม polyphenol ซึ่งประกอบด้วยวง aromatic ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป โดยมีการจับกับคาร์บอนใน aromatic hydroxyl สารประกอบ flavonoids สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามระดับการเกิดออกซิเดชั่นและหมู่ฟังก์ชันของ C ring คือ flavonol, flavonones, flavones, isoflavones และ anthocyanidins

สารประกอบ flavonoid อาจเป็น nutraceuticals ซึ่งหมายถึงอาหารหรือองค์ประกอบของอาหารที่สามารถนำไปใช้เป็นยาหรืออาหารเสริมสุขภาพทั้งในด้านการป้องกันและรักษาโรค โดยมีประโยชน์ คือ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory และ antidiabetic และมีผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต พบว่าการได้รับสาร flavonoid จะช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง ภาวะการมีไขมันในเลือดสูง หลอดเลือดแดงแข็งตัว และการแข็งตัวของเลือด

การทดสอบหา flavonoid เบื้องต้นสามารถทำได้โดยวิธี magnesium–hydrochloric acid test โดยนำสารสกัดละลายใน methanol ใส่ขวดแล้วใส่ลวด magnesium ลงไป แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับกรด hydrochloric สารสกัดที่มี flavanone จะให้สีแดงเข้มไปจนถึงสีแดงอมม่วง สารสกัดที่มี flavanonol จะให้สีแดงและ สารสกัดที่มี flavone จะให้สีเหลือง

13. Alkaloids

Alkaloids เป็นสารที่พบมากในพืชสมุนไพร แต่ปริมาณสารจะต่างกัน เป็นสารอินทรีย์ ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ โครงสร้างส่วนใหญ่เป็น heterocyclic ring มักพบในพืชชั้นสูง มีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกัน ปัจจุบันพบ alkaloid มากกว่า 5,000 ชนิด คุณสมบัติของ alkaloid คือส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์และมีฤทธิ์เป็นด่าง

Alkaloid มีประโยชน์ในการรักษาโรค เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน และยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น

การทดสอบหา alkaloid เบื้องต้น ทำโดยนำสารสกัดมาทดสอบกับ Dragendorff's reagent สารสกัดที่มี alkaloid จะให้ตะกอนสีส้ม

14. Steroids / Triterpenoids

Triterpnoids เป็นสารประเภท terpenes จัดเป็น steroids ชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างประกอบด้วย isoprene จำนวน 6 unit จัดเป็นสารอินทรีย์ประเภทกรดไขมัน มีรสขมและฝาด เป็นสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง บำรุงตับ รักษาตับ ควบคุมระดับความดันโลหิตให้ปกติ ควบคุมภูมิแพ้ ลดคอเลสเตอรอล ปรับไขมันในร่างกายให้เป็นปกติ เสริมสร้างระบบย่อยอาหารให้ดีขึ้น และกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว triterpene พบมากในสปอร์ของเห็ดหลินจือซึ่งมีจุดประสงค์ในการใช้รักษาโรคมะเร็ง เช่น สถาบันโรคมะเร็งสโลนเก็ตเตอร์ริงในประเทศสหรัฐอเมริกา(Memorial Sloan–Kettering Cancer Center) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ triterpene เพื่อใช้รักษามะเร็งและสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ในโปแลนด์มีการใช้สาร triterpene ในคนไข้มะเร็งซึ่งพบว่าส่วนใหญ่มีอาการดีขึ้น ก้อนเนื้องอกอ่อนนิ่มลง อาการเจ็บปวดดีขึ้น ผู้ป่วยนอนหลับดีและกินอาหารได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดผลข้างเคียงของการรักษามะเร็งที่ใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) และ การฉายแสง (radio therapy) การทดสอบหา triterpene เบื้องต้นสามารถทำได้โดยใช้วิธี TLC plate และใช้ 0.1% vanillin เป็น spraying reagent สารสกัดที่มี steroids จะมี spot สีม่วง ส่วนสารสกัดที่มี triterpenoids จะมี spot สีน้ำเงินหรือฟ้า

1. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมี (phytochemitry) ของสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง

2. วิธีการทดลอง

2.1 การทดสอบหา anthraquinones

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Hydrochloric (Lab Scan, Bangkok, Thailand)
- Chloroform (Lab Scan, Bangkok, Thailand)
- Amonium hydroxide(NH_4OH) (Merck, Darmstadt, Germany)
- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- สารสกัดจากฝักราชพฤกษ์ (ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

เติม 10%HCl ปริมาตร 2 ml

↓

ต้มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที

↓

ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง

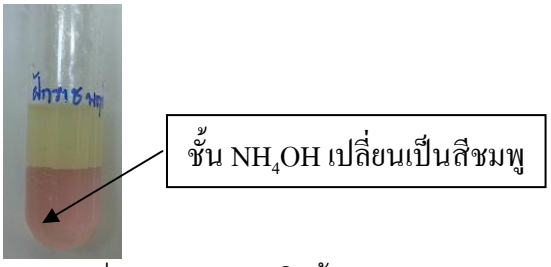
↓

นำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2 ml

↓

เติมสารละลาย 25%NH_4OH ปริมาตร 2 ml

ผลบวกของปฏิกิริยามีสีชมพูถึงแดงดัง**รูปที่ 3**



รูปที่ 10.3 ตัวอย่างผลการทดสอบหา anthraquinone ซึ่งผลบวกจะทำให้ชั้น 25% NH_4OH เปลี่ยนเป็นสีชมพู

2.2 การทดสอบหา glycosides

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- TLC plate silica gel60 (Merck, Darmstadt, Germany)
- Butanol (BuOH) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Acetic acid (CH_3COOH) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Diethylether (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Sulfuric acid(H_2SO_4) (Merck, Darmstadt, Germany)
- TLC tank (Kimble Chase-Kontes Glass, NJ, USA)

สารมาตรฐาน

- Sucrose (Merck, Darmstadt, Germany)
- Glucose (Merck, Darmstadt, Germany)

- Fructose (Merck, Darmstadt, Germany)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วยน้ำกลั่นและอุ่นบน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

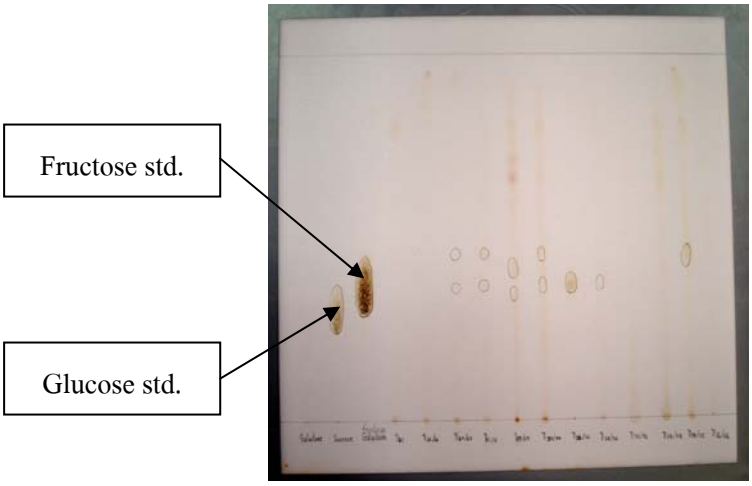
นำตัวอย่างทั้งหมดมา spot ในแผ่น TLC ปริมาตร 10 µl แล้วสังเกตผลการทดลอง**ดังรูปที่ 10.4**

Condition ของ TLC:

Stationary phase: Silica gel 60

Mobile phase : butanol/acetic acid/diethyl ether/water (9:6:1:3)

Detection : spraying with 10% H_2SO_4 และ heat



รูปที่ 10.4 ตัวอย่างผลการทดสอบหา glycoside ในสารสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน fructose และ glucose

2.3 การทดสอบหา tannins

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ethanol (EtOH) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)

- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- Tannin (เวชวิทย์ เชียงใหม่ ประเทศไทย)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml ของ ethanol และอุ่นบน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

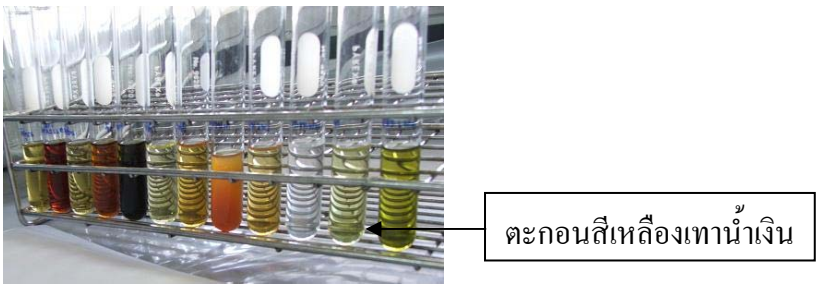
↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ทำการทดสอบด้วย 100 µl $Ca(OH)_2$ (sat.)

ผลบวกคือเกิดตะกอนสีเหลืองเทาน้ำเงินดังแสดงใน**รูปที่ 5.5**



รูปที่ 10.5 ตัวอย่างผลการทดสอบหา tannins ในสารสกัด

2.4 การทดสอบหา carotenoids

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Sulfuric acid (H_2SO_4) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Methanol (MeOH) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Chloroform($CHCl_3$) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- สารสกัดจากแครอท (ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml ของ chloroform

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

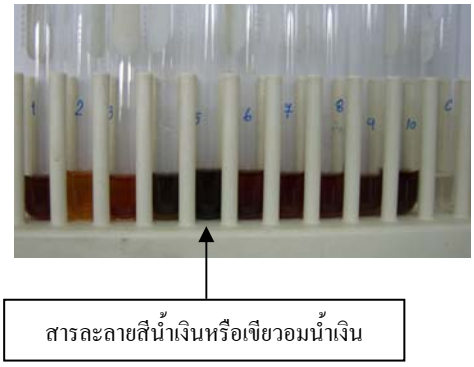
↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ทดสอบด้วย 100 µl ของ sulfuric acid เข้มข้นโดยทำการเปรียบเทียบกับ control

ผลบวกจะได้สารละลายสีน้ำเงินหรือเขียวอมน้ำเงินดังแสดงใน**รูปที่ 5.6**



รูปที่ 10.6 ตัวอย่างผลการทดสอบหา carotenoids ในสารสกัด

2.5 การทดสอบหา flavones

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Hydrochloric acid (HCl) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Methanol (MeOH) (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Magnesium ribbon (LABCHEM, NSW, Australia)
- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- Flavone (Sigma, Louis, USA)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml ของ methanol และอุ่นบน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ใส่ลวด magnesium ลงไปในสารละลายของสารสกัด

แล้วเติม 100 µl ของ HCl (conc.)

↓

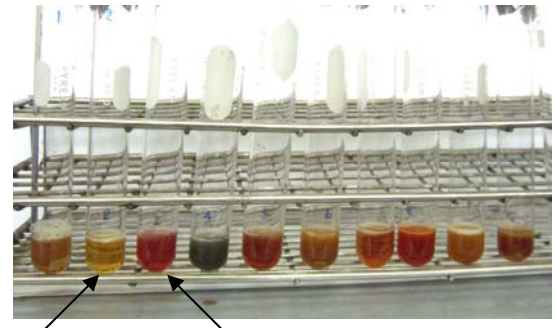
ปฏิกิริยาที่เป็น positive จะเป็นดังนี้คือ

flavanone จะปรากฏเป็นสีแดงเข้มไปจนถึงสีแดงอมม่วง

flavanonol จะปรากฏเป็นสีแดง

flavonol จะปรากฏเป็นสีแดงไปจนถึงสีแดงเข้ม

flavone จะปรากฏเป็นสีเหลือง ดังแสดงใน**รูปที่ 5.7**



Flavone จะปรากฏเป็นเหลือง

Flavonol จะปรากฏเป็นสีแดงไปจนถึงสีแดงเข้ม

รูปที่ 10.7 ตัวอย่างผลการทดสอบหา flavone ในสารสกัด

2.6 การทดสอบหา alkaloids

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Dragendorff's reagent
    - Bismuth nitrate (UNIVAR, NSW, Australia)

- Nitric acid (Sigma–Aldrich, MO, USA)
- Potassium iodide (UNIVAR, NSW, Australia)

- Hydrochloric acid (HCl) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Methanol (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- Quinine sulfate (Sigma, Louis, USA)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml ของ HCl (2 N) และอุ่นบน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

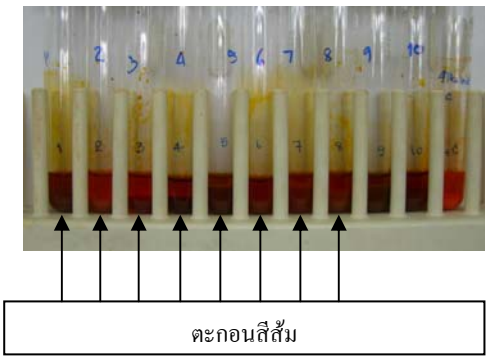
นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ทดสอบด้วย 100 µl ของ Dragendorff's reagent ผลบวกจะเกิดตะกอนสีส้ม ดังแสดงใน**รูปที่ 5.8**

วิธีการเตรียม Dragendorff's reagent

3. ละลาย bismuth nitrate 8 g ใน nitric acid, 30% W/V 12 ml
4. ละลาย potassium iodide 27.2 g ในน้ำกลั่น 50 ml แล้วเทสารละลาย potassium iodide ลงในสารละลาย bismuth nitrate แล้วเติมน้ำจนครบปริมาตร 100 ml



รูปที่ 10.8 ตัวอย่างผลการทดสอบหา alkaloid ในสารสกัด

2.7 การทดสอบหา Triterpenoids / Steroids

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- Sulfuric acid (H_2SO_4) (Merck, Darmstadt, Germany)

- Chloroform (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Acetic anhydride (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
- เครื่อง centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)

สารมาตรฐาน

- Stigmasterol (Sigma, Louis, MO, USA)

วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 2 มล. และนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

↓

แยกสารละลายส่วนใสออก นำมา spot ลงบนแผ่น TLC

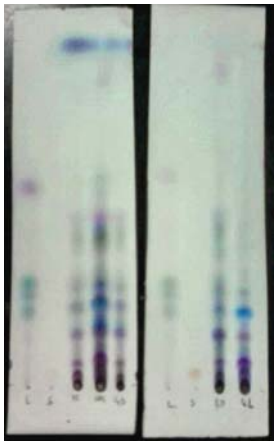
Mobile phase : hexane/ethyl acetate (7:3)

Detection : spraying with 0.1% vanillin in H_2SO_4

↓

สารสกัดที่มี triterpenoids จะได้ spot สีน้ำเงิน

และสารสกัดที่มี steroids จะได้ spot สีม่วง ดังแสดงใน**รูปที่ 10.9**



รูปที่ 10.9 ตัวอย่างผลการทดสอบหา triterpenes/steroids ในสารสกัด

3. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดสอบหาพฤกษเคมีของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงนาน 60 นาที พบสารพฤกษเคมีบางชนิด ซึ่งได้แก่ ซูโครสและซาโปนิน ซึ่งซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้ง่ายและช่วยเพิ่มพลังงาน ทำให้รู้สึกสดชื่น นอกจากนี้มีงานวิจัยรายงานว่าซาโปนินบางชนิดมีประโยชน์ในเชิงป้องกันและบำรุงร่างกาย เช่น เสริมภูมิคุ้มกัน ยับยั้งเนื้องอก และช่วยเพิ่มกระบวนการเผาผลาญ เป็นต้น[8] จึงเหมาะสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาหรือเสริมอาหาร ดังแสดงใน**ตารางที่** 10.1

4. สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที พบสารพฤกษเคมี ซึ่งได้แก่ ซูโครส และซาโปนิน ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีที่จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพได้

ตารางที่ 10.1 การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที

สารสกัด	ผลการทดสอบพฤกษเคมี								
	Steroids/Triterpenoids	Alkaloids	Anthraquinones	Glycosides			Flavonoids	Carotenoids	Tannins	Saponins
				F	G	S				
สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงนาน 60 นาที	–/–	–	–	–	–	++	–	–	–	+

หมายเหตุ: "+" หมายถึง พบสารพฤกษเคมีดังกล่าวในสารสกัด, "-" หมายถึง ไม่พบสารพฤกษเคมีดังกล่าวในสารสกัด, F หมายถึง ฟรุกโตส, G หมายถึง กลูโคส และ S หมายถึง ซูโครส

5. เอกสารอ้างอิง

8. Peter Schreier, Natural product analysis: chromatography–spectroscopy–biological testing. Braunschweig/Wiesbaden : Vieweg, 1998.
9. E.A. Hussein, A.M. Taj–Eldeen, A.S. Al–Zubairi, A.S. Elhakimi and A.R. al–dubaie, Phytochemical screening, Total phenolics and antioxidant and antibacterial activities of Callus from *Brassica nigra* L. hypocotyls expants. International Journal of Pharmacology 6(4): 464–417, 2010
10. J. Ntbede, R.A. Yakabu and D.A.Nyam, Phytochemical screening for active compounds in *Canarium schweinfurthii* (Atile) leaves from Jos North, Plateau state, Nigeria. Research Journal of Biological Sciences3(9): 1076–1078, 2008
11. H. A. Ibrahim and H. Ibrahim, Phytochemical screening and toxicity evaluation on the leaves of A*rgemone Mexicana* Linn (Papaveraceae). Int. Jor. P. App. Scs.3(2):39–43, 2009
12. Mawardi Bin Rahimani, Ruth Kiew, Nordin Hj. Lajis Rahin Othman and Robert f. Toia, A Contribution to the phytochemical survey of peninsular Malaysia. Pertanika 8(3): 347 – 357, 1985.
13. M. Phadungkit, R. Rattarom and S. Rattana, Phtochenical screening, antioxidant, antibacterial and cytotoxic activities of *Knema angustifolia* extracts. Journal of Medicinal plants Research 4(13):1269–1272, 2010.
14. Jimaima Lako, V"craige Trenerry, Mark Wahlqvist, Naiyana Wattanapenpaiboon, Subramanium Sotheeswaran and Robert Premier, Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant propertiesof a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readilyavailable foods. Food Chemistry 101 : 1727–1741, 2007.
15. K. Hostettmann and A. Marston. Saponins, Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Cambridge University Press, 2005.
16. P.A. Egwaikhide and C.E. Gimba. Analysis of the phytochemical content and anti–microbial activity of *Plectranthus glandulosis* whole Plant. Middle–East Journal of Scientific Research 2 (3–4): 135–138, 2007.

ภาคผนวกที่ 11

Specification ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที

Specification ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก ถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที

บทนำ

การควบคุมคุณภาพเป็นหัวใจสำคัญของกระบวนการการผลิต เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมามีมาตรฐาน ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญของฝ่ายควบคุมคุณภาพที่จะต้องเอาใจใส่และคอยควบคุมการผลิตในแต่ละขั้นตอน เริ่มตั้งแต่กระบวนการในการตรวจสอบคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ขั้นตอนและกระบวนการผลิต จนกระทั่งผลิตออกมาเป็นสินค้าสำเร็จรูป หลังจากนั้นจะมีการตรวจสอบด้านกายภาพและด้านเคมี ซึ่งจะมีการออกข้อกำหนด (Specification) ของสารสกัดแต่ละตัวที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับผลการทดสอบด้านกายภาพและเคมีต่างๆ

1. วัตถุประสงค์

เพื่อจัดทำ specification ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง เป็นเวลา 60 นาที

2. วัสดุ อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง (Pyrex, Asbash, Germany)
2. หลอดหยด (Union Science, Thailand)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorious, England)
- 4. เครื่องเขย่า (Vortex mixer) (Vortex, Fisher scientific, UK)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การทดสอบความคงตัวในสารเคมีต่างๆ ของสารสกัดจากถั่วต่างๆ

3.1.1 สารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

8. 10% hydrochloric acid
9. 10% sodium hydroxide
10. 10% acetic acid
11. 10% ammonium hydroxide
12. 10% hydrogen peroxide
13. 10% ferric chloride
14. 10% sodium acetate

3.1.2 สารละลายสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

เตรียมสารละลายสารสกัดจากถั่ว 0.1% ในน้ำ

↓

วัดค่า pH ของสารละลายสารสกัดจากถั่ว

↓

หยดสารเคมีที่จะทดสอบทีละหยดจนครบ 50 หยด

สังเกตและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในแต่ละหยด

(สี, ความขุ่น และตะกอน)

3.2 การทดสอบความสามารถในการละลายของสารสกัดจากถั่วต่างๆ

3.2.1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดสอบ

8. น้ำร้อน (อุณหภูมิ 60°C)
9. น้ำเย็น (อุณหภูมิ 25°C)
10. ethanol
11. methanol
12. propylene glycol
13. glycerin
14. mineral oil

3.2.2 วิธีการทดสอบ

สารสกัดจากถั่วปริมาตร 0.01 กรัม

↓

เติมตัวทำละลายตามปริมาตรของตัวทำละลาย ดังแสดงใน**ตารางที่ 11.1**

↓

บันทึกปริมาตรของตัวทำละลายเมื่อละลายหมด

↓

เปรียบเทียบค่าการละลายและคำจำกัดความของค่าการละลายจาก**ตารางที่ 11.2**

ตารางที่ 11.1 ปริมาตรตัวทำละลายที่เติมลงในสารสกัด

ครั้งที่	ปริมาตรตัวทำละลาย	ครั้งที่	ปริมาตรตัวทำละลาย	ครั้งที่	ปริมาตรตัวทำละลาย
1	10 µl	6	1 ml	11	1 ml
2	90 µl	7	1 ml	12	1 ml
3	200 µl	8	1 ml	13	1 ml
4	700 µl	9	1 ml	14	1 ml
5	1 ml	10	1 ml	15	1 ml

ตารางที่ 11.2 คำจำกัดความของการละลาย

คำจำกัดความของการละลาย	**ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัด (µl)**
Very soluble	< 1
Freely soluble	1 – 10
Soluble	10 – 30
Sparingly soluble	30 – 100
Slightly soluble	100 – 1,000
Very Slightly soluble	1,000 – 10,000
Practically insoluble / insoluble	> 10,000

4. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดสอบความคงตัวในสารเคมีต่างๆ ของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที พบว่าสารสกัดจากถั่วลันเตาไม่คงตัวในด่างแก่ กรดอ่อน และเกลือของกรดอ่อน เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงใน**ตารางที่ 11.3**

สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที มีค่า pH เป็นกรดอ่อน โดยมี pHเท่ากับ 6 โดยสารสกัดที่ได้มีลักษณะสีเขียวอ่อนและขุ่นเมื่อละลายในน้ำกลั่น นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดละลายในตัวทำละลายต่างๆ ได้ไม่ดีจนถึงไม่ละลาย ดังแสดงใน**ตารางที่ 11.4 – 11.5**

5. สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ pH เท่ากับ 6 สารสกัดที่ได้มีลักษณะสีเขียวอ่อนและขุ่นเมื่อกระจายตัวในน้ำกลั่น สามารถละลายได้ดีในน้ำร้อนและน้ำเย็น แต่ละลายได้ไม่ดีใน propylene glycol, glycerin, mineral oil, เอทานอลและเมธานอล สารสกัดจากถั่วลันเตาดังกล่าวไม่มีความคงตัวในด่างแก่ กรดอ่อน และเกลือของกรดอ่อน แต่คงตัวในกรดแก่ ด่างอ่อน oxidizing agent และ reducing agent specification ของถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที ได้แสดงใน**ตารางที่ 11.6**

ตารางที่ 11.3 ความคงตัวของโปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที เมื่อทดสอบด้วยสารเคมีต่างๆ

ที่	สารเคมีที่ใช้ทดสอบ	ประเภทของสารเคมี	ลักษณะของสารสกัด
1	10% HCl	กรดแก่	–
2	10% NaOH	ด่างแก่	1 หยด ใสขึ้น
3	10% CH3COOH	กรดอ่อน	1 หยด ขุ่นขึ้น
4	10% NH4OH	ด่างอ่อน	–
5	10% H2O2	oxidizing agent	–
6	10% FeCl3	reducing agent	–
7	10% CH3COONa	เกลือของกรดอ่อน	5 หยด เกิดตะกอน

หมายเหตุ: – หมายถึง ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 11.4 ลักษณะของตัวอย่างเมื่อกระจายตัวในน้ำกลั่น (0.1% ในน้ำ)

ตัวอย่าง	pH	ลักษณะของสารละลายตัวอย่าง
สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที	6	เขียวอ่อนขุ่น

ตารางที่ 11.5 ความสามารถในการละลายของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที ในตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารสกัดจนหมด	คำจำกัดความของความสามารถในการละลายของสารสกัด
น้ำร้อน	100 µl	slightly soluble
น้ำเย็น	200 µl	slightly soluble
Ethanol	>10,000 µl	insoluble
Methanol	>10,000 µl	insoluble
Propylene glycol	1,000 – 10,000 µl	very slightly soluble

Glycerin	1,000 – 10,000 µl	very slightly soluble
Mineral oil	>10,000 µl	slightly soluble

ตารางที่ 11.6 Specification ของโปรตีนไฮโดรไลเสทของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที

ลักษณะทางกายภาพ	สีเขียวอ่อนขุ่น
การละลาย	ละลายได้ดีในน้ำร้อน (60°C) และน้ำเย็น(25°C) ละลายได้ไม่ดีใน propylene glycol, glycerin, mineral oil, เอธานอล และเมธานอล
pH	6 (0.1%ในน้ำ)
ความคงตัว	คงตัวใน กรดแก่ ด่างอ่อน oxidizing agent และ reducing agent แต่ไม่คงตัวใน ด่างแก่ กรดอ่อน และเกลือของกรดอ่อน

6. เอกสารอ้างอิง

Council of Europe. European Pharmacopoeia. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2005. Character section in monograph; p. 565.

ภาคผนวกที่ 12

การจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที

การจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตา ที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที

บทนำ

การควบคุมคุณภาพของสารสำคัญในตัวอย่าง จะใช้วิธีการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟฟี เช่นการแยกสาร phenolic ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีและการวิเคราะห์สารด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) หรือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สำหรับสารสกัดจากธรรมชาติเช่นสมุนไพรที่มีสารสำคัญมากกว่า 1 ตัว ในการควบคุมมาตรฐานหรือ standardization จะใช้วิธีการจัดทำ fingerprint ซึ่งการทำ fingerprint อาจใช้วิธี HPLC โดยอาจมี marker หรือไม่มีก็ได้ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดว่ามีปริมาณสารสำคัญ หรือ marker ที่สม่ำเสมอทุกครั้ง เพื่อเป็นการประกันว่าสารสกัดมีคุณลักษณะของสารสกัดที่เหมาะสมในการนำไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เสริมอาหาร และยาต่อไป

1. วัตถุประสงค์

เพื่อจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาทีที่คัดเลือกมา

2. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1. เมมเบรนไนลอน 0.45 ไมครอน, 47 มม. (Filtrex, Virginia Beach, USA)
2. Nylon syringe filter 0.45 ไมครอน, 25 มม. (MS®, membrane-solution LLC., Japan)
3. Erlenmeyer flask (Pyrex, Asbash, Germany)
4. Beaker (Pyrex, Asbash, Germany)
5. Balance 4 digits (Sartorious, England)
6. UV-detector (SpectraSYSTEM UV1000, Ontario, Canada)
7. HPLC (Thermo finnan, Ontario, Canada)
8. Bath sonicator (Chest ultrasonics corp., NJ, USA)

2.2 สารเคมี

1. Trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma-Aldrich Ltd. Co., Louis, MO, USA)
2. Acetonitrile (Labscan, Thailand)
3. Distilled water (NPRDC, Chiang Mai University, Thailand)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียม mobile phase

1. เตรียม mobile phase ดังนี้

– Mobile phase A: 0.1% TFA ใน acetonitrile

– Mobile phase B: 0.1% TFA ในน้ำกลั่น

2. กรองผ่านกระดาษกรองไนลอน 0.45 ไมครอน แล้ว degas เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้

3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

3.2.1 ตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้ :

– สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา **60** นาที

– เจลาติน A (จาก Porcine Skin (Approx 175 bloom))

– สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Perfect Protein Markers™ 10–225 kDa มีส่วนประกอบ

ดังนี้; glycerol (10%), 2–mercaptoethanol (200 mM) **และ** bromophenol blu (0.007%)

3.2.2 เตรียมสารละลายตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

– เตรียมสารละลายสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที และ

เจลาติน A ที่ความเข้มข้น 10 มก./มล. ละลายใน mobile phase A

– เจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐานใน mobile phase A ด้วยอัตราส่วน 1:9

– กรองสารละลายตัวอย่างผ่านกระดาษกรองไนลอน 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปใช้

3.3 Condition ที่ใช้ในการจัดทำ HPLC fingerprint

1. Column: Phenomenex®, Gemini–NX, 5 µm, C18, 110A, 250×4.60 mm

2. Injection volume: 20 µl

3. Detected at: 220 nm

4. Gradient system: %mobile phase A และ **B** ดังแสดงใน**ตารางที่** 12.1

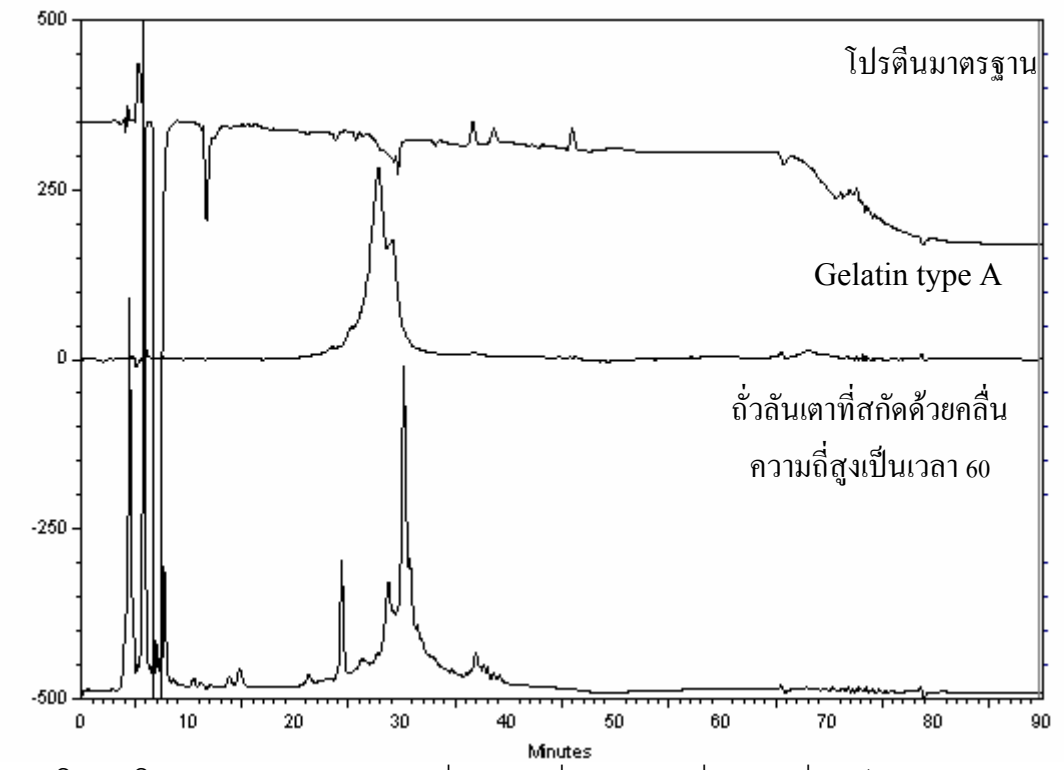
ตารางที่ 12.1 %mobile phase A และ mobile phase B ที่ใช้ในการตรวจสอบวิเคราะห์ด้วย **HPLC**

เวลา (นาที)	**Mobile phase A**	**Mobile phase B**

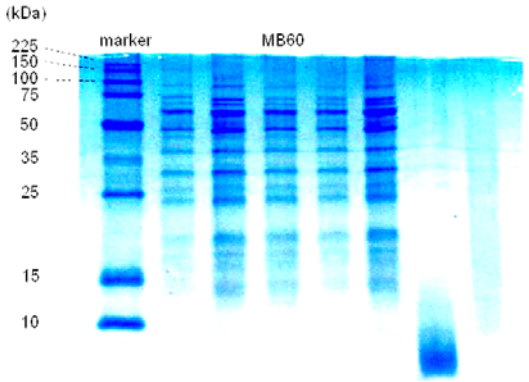
0 – 10	10%	90%
10 – 20	20%	80%
20 – 30	40%	60%
30 – 40	60%	40%
40 – 60	60%	40%

4. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาทีเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของเจลาติน A (น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 40 kDa) และ Perfect Protein Markers™ (Novagen®, EMD Chemicals, Inc., CA, USA) (น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 – 225 kDa) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน ดังแสดงใน**รูปที่ 12.1** พบว่าโครมาโทแกรมของ Perfect Protein Markers™ ปรากฏ peak ของส่วนประกอบอื่นมาบดบัง ซึ่งได้แก่ สีย้อมและบัฟเฟอร์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามโครมาโทแกรมของโปรตีนมาตรฐานปรากฏ peak ที่แยกชัดเจน ที่เวลา 36, 38 และ 47 นาที ซึ่ง Perfect Protein Markers™ ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน แต่โปรตีนมาตรฐานยี่ห้อดังกล่าว (Novagen®) ระบุว่าจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ชนิดอื่นจะปรากฏ peak ที่เวลา 37, 38 และ 45 นาทีซึ่งเป็น peak ของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50, 75 and 100 kDa ตามลำดับ ดังนั้น peak นาที ที่ปรากฏในโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่เวลา 37–38 ที่เหมือนกับโครมาโทแกรมของ Perfect Protein Markers™ อาจมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 50–75 kDa นอกจากนี้โครมาโทรแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตายังปรากฏ peak ที่เวลา 27–29 นาทีเช่นเดียวกันกับโครมาโทรแกรมของเจลาติน A ดังนั้นสารสกัดจากถั่วลันเตาจึงอาจมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 40 kDa เช่นเดียวกับเจลาติน A ซึ่งผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วย HPLC มีความสอดคล้องกับการทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วย gel electrophoresis ดังแสดงใน**รูปที่ 12.2** ปริมาณของโปรตีนที่ได้จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นพื้นที่ (% Area) ของ peak ในช่วงเวลาต่างๆ ดังแสดงใน**ตารางที่ 12.1** โดย peak ที่เวลา 29–32 นาที เป็นกลุ่ม peak หลัก มีปริมาณ 64% จากพื้นที่ของ peak ทั้งหมดที่ปรากฏในโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตา ในขณะที่ peak ที่เวลา 37–39 นาที เป็นกลุ่ม peak รอง และมีปริมาณ 6% จากพื้นที่ของ peak ทั้งหมดที่ปรากฏในโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตา จากผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า peak ที่ปราฏในโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตามีน้ำหนักโมเลกุล 40, 50 และ 75 kDa ซึ่งสอดคล้องกับแถบโปรตีนที่ปรากฏใน gel electrophoresis



รูปที่ 12.1 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบกับเจลาติน A และโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 12.2 gel electrophoresis ของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบกับ Perfect Protein Markers™

ตารางที่ 12.1 เปอร์เซ็นต์พื้นที่ของ peak ของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ในโครมาโทแกรมของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที

เวลา (retention time)	เปอร์เซ็นต์พื้นที่ของ peak	น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight)
6 – 8 นาที	18.3	–
24 นาที	7.3	–
29 – 32 นาที	64.1	40 kDa
37 – 39 นาที	6.0	50–75 kDa
อื่นๆ	4.3	–
รวม	100	–

5. สรุปผลการทดลอง

ผลการจัดทำ HPLC fingerprint ของสารสกัดจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 นาที ประกอบด้วย peak ที่เวลา 29 – 32 นาที พบว่าเหมือนกันกับโครมาโทแกรมของเจลาติน A ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 40 kDa โดยมีปริมาณ 64% และปรากฏ peak ที่เวลา 37 – 39 นาที เหมือนกันกับโครมาโทแกรมของ Perfect Protein Markers™ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 50 – 75 kDa โดยมีปริมาณ 6%

6. **เอกสารอ้างอิง:**

6.1 Demirezer L O, Karahan N, Ucakturk E, Kuruuzum-Uz A, Guvenalp Z and Kazaz C (2011). "HPLC fingerprinting of sennosides in laxative drugs with isolation of standard substances from some senna leaves." Rec. Nat. Prod. **5**(4): 261-270.

6.2 Sirikatitham A, Chuchom T and Itharat A (2007). "Development of the chromatographic fingerprint analysis of dioscorealides and dioscoreanone from *Dioscorea membranacea* Pierre." Songklanakarin J. Sci. Technol. **9**(1): 101-107.

ภาคผนวก 13
การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง นาน 60 นาที

การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท จากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง นาน 60 นาที

สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่สกัดด้วยคลื่นความถี่สูง นาน 60 นาที ปริมาณ 1 กิโลกรัม มีรายละเอียดต้นทุนการผลิตดังแสดงใน**ตารางที่ 13.1–13.2** ส่วน**ตารางที่ 13.3** เปรียบเทียบโปรตีนไฮโดรไลเสทของโครงการวิจัยและที่มีขายในท้องตลาด จะเห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วลันเตาที่โครงการวิจัยพัฒนาได้มีราคาถูกกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทในท้องตลาด โดยราคาต่อกิโลกรัมต่ำกว่าเครื่องดื่มซุปไก่สกัด (Brand's®) และเครื่องดื่มเปปทีน (Peptien®) 8 และ 2 เท่าตามลำดับ อย่างไรก็ตามผงแห้งของเครื่องดื่มซุปไก่สกัดและเปปทีนอาจมีส่วนประกอบอื่นด้วย ดังนั้นน้ำหนักผงแห้งที่ได้จึงอาจสูงกว่าน้ำหนักผงแห้งของโปรตีนไฮโดรไลเสทจริงในผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 13.1 การคำนวณต้นทุนค่าวัตถุดิบที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท (1 กิโลกรัม)

วัตถุดิบ	ราคาต่อหน่วย (บาท)	ปริมาณที่ใช้	คิดเป็นเงิน (บาท)
– ถั่วลันเตา	60.0	5.6 กก.	336.0
– น้ำกรอง	1.0	28.0 ล.	28.0
หมายเหตุ: – ถั่วลันเตาอบแห้ง 100 g ได้สารสกัด 18.1 g – ใช้เวลาในการสกัด 10 วัน – กก. ย่อมาจาก กิโลกรัม, ล. ย่อมาจาก ลิตร		รวมค่าวัตถุดิบ	364.0

ตารางที่ 13.2 การคำนวณต้นทุนค่าพลังงานไฟฟ้าที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท (1 กิโลกรัม)

เครื่องใช้ไฟฟ้า	ขนาดปริมาณกำลังไฟฟ้า (กิโลวัตต์)	เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)	จำนวนเงินต่อหน่วยไฟฟ้า (บาท/กิโลวัตต์)	คิดเป็นเงิน (บาท)
– Probe sonicator	0.5	55.31	3.94	109.0
– Rotary evaporator	1.3	55.31	3.94	283.0
– Freeze drier	0.5	276.55	3.94	545.0
		รวมเงินค่าพลังงาน		937.0

รวมต้นทุนที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมสารสกัด 1 กิโลกรัม

(364 บาท + 937 บาท) เท่ากับ 1,301 บาท

ตารางที่ 13.3 การเปรียบเทียบราคาของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่โครงการวิจัยพัฒนาได้และที่มีขายในท้องตลาด

ตัวอย่าง/บริษัทผู้ผลิต	**คุณลักษณะ**	**น้ำหนักโมเลกุล** (kDa)	**ราคาต่อกิโลกรัม (บาท/กก.)**	**หมายเหตุ**
โปรตีนไฮโดรไลเสทที่โครงการวิจัยพัฒนาได้	เตรียมจากสารสกัดจากถั่วลันเตาโดยใช้คลื่นความถี่สูงนาน 60 นาที	40 – 75	1,301	–
เครื่องดื่มซุปไก่สกัด ยี่ห้อ Brand's® บริษัท เซเรบอส (ประเทศไทย) จำกัด	ซุปไก่สกัด 1 ขวด ปริมาตร 42 มล. ได้น้ำหนักผงแห้ง 3.7 กรัม (เตรียมโดยวิธี freez dry)	ไม่ระบุ	10,000*	ราคาขวดละ 37 บาท (42 มล.)
เครื่องดื่มเปปทีน Original soy peptide 4000 ยี่ห้อ Peptien® บริษัท โอสถสภา จำกัด	เปปทีน 1 ขวด ปริมาตร 100 มล.ได้น้ำหนักผงแห้ง 14.0 กรัม (เตรียมโดยวิธี freez dry)	ไม่ระบุ	2,357**	ราคาขวดละ 33 บาท (100 มล.)

หมายเหตุ: *ราคาต่อกิโลกรัมของซุปไก่สกัดคำนวณได้จาก

ปริมาตรซุปไก่สกัด 3.7 กรัม ราคาเท่ากับ 37 บาท

ดังนั้นถ้าปริมาตรซุปไก่สกัด 1,000 กรัม จะมีราคาเท่ากับ 10,000 บาท

*ราคาต่อกิโลกรัมของเครื่องดื่มเปปทีนคำนวณได้จาก

ปริมาณเปปทีน 14 กรัม ราคาเท่ากับ 33 บาท

ดังนั้นถ้าปริมาณเปปทีน 1,000 กรัม จะมีราคาเท่ากับ 2,357 บาท