รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการให้ถั่วอัลฟาฟ่าต่อปริมาณ Phytoestrogen ในน้ำนมของโคนม

Effects of feeding alfalfa on milk phytoestrogen concentration in dairy cattle

นางสาวสุปรีณา ศรีใสคำ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 60334

สัญญาเลขที่ 25/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการให้ถั่วอัลฟาฟ่าต่อปริมาณ Phytoestrogen ในน้ำนมของโคนม

Effects of feeding alfalfa on milk phytoestrogen concentration in dairy cattle

นางสาวสุปรีณา ศรีใสคำ

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 25/2562

สุปรีณา ศรีใสคำ

สิงหาคม 2562

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์มุ่งเน้นการหาองค์ประกอบทางเคมี คุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด, สารประกอบฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด, สารประกอบฟลาโวนอยด์, ไอโซ-ฟลาโวน) และการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DHHP, ABTS และ FRAP assay ซึ่งใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ด เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการประเมินศักยภาพถั่วอัลฟัลฟ่าก่อนนำไปประยุกต์ใช้เป็นอาหารเลี้ยงโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียนในระยะรีดนม เนื่องจากไอโซฟลาโวนเป็นสารประกอบธรรมชาติที่พบได้ในพืชวงศ์ถั่ว ซึ่งช่วยกระตุ้นการเพิ่มฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกาย เหมาะสำหรับผู้สูงอายุที่เข้าสู่วัยทองและมีปัญหาอาการเกี่ยวเนื่องจากภาวะหลังหมดประจำเดือน ถั่วนอกจากจะเป็นแหล่งวัตถุดิบโปรตีนคุณภาพดีที่ได้รับความสนใจในแง่ของสารพฤษเคมีแล้ว ยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านการป้องกันโรคและเป็นสารโภชนเภสัชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย ดังนั้นหากสามารถพัฒนาอาหารเสริมสุขภาพจากการเสริมถั่วอัลฟัลฟ่าในอาหารโคนมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ทางเลือก (นมโคไอโซฟลาโวนสูง) ที่สามารถมีคุณสมบัติเป็นอาหารเชิงหน้าที่ป้องกันหรือลดการเกิดโรคเรื้อรังที่ไม่ติดต่อ จะเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพอย่างมาก จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นด้านองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด, ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด, เดดซีนและเจนิสทีน ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ด เท่ากับ 18.17 เปอร์เซ็นต์โปรตีน, 2.42 mg GAE/g sample, 2.25 mg RE/g sample, 55.12 และ 25.92 µg/g sample ตามลำดับ และมีสารประกอบฟีนอลิกชนิด Gallic acid สูงที่สุด (215.30 µg/g sample) ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ Apigenin สูงสุดที่ 2,278.27 µg/g sample ขณะที่การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ DPPH, ABTS และ FRAP assay เท่ากับ 46.69, 66.09 เปอร์เซ็นต์ และ 3.25 mgFe^{2+}/g sample โดยไม่พบปริมาณความเข้มข้นของไอโซฟลาโวนในรูปอนุพันธ์ของเดดซีนและเจนิสทีนในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ผลิตได้จากแม่โคที่ไม่ได้รับถั่วอัลฟัลฟ่าเป็นอาหารในครั้งนี้

คำสำคัญ: ถั่วอัลฟัลฟ่า, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, ไอโซฟลาโวน, สารต้านอนุมูลอิสระ, น้ำนมดิบโค

ABSTRACT

The aim of this study was to measured chemical composition, bioactive compound (Total phenolic, phenolic compounds, total flavonoids, flavonoids, isoflavone) and antioxidant activity of alfalfa dehydrated pellet (ADP) by DHHP, ABTS and FRAP assay including standard (Trolox). The potentially ingredient of ADP was studied to evaluate the nutritive values before apply to use in the Crossbred Holstein-Friesian lactating dairy cows diet. Isoflavone is a natural substance occurring in legume that stimulates and increases estrogen in the body especially in women entering menopause and have problems related to post-menopausal symptoms. Legume, in addition to being a source of good quality protein source that have interested in terms of phytochemicals, it also contains bioactive compounds in case of disease prevention and antioxidant activity. Therefore, if able to develop foods beneficial on health from supplementing ADP in dairy cattle feed to achieve alternative products (High-flavonoids level in dairy cow milk) as functional food properties to prevent or reduce the incidence of Non-Communicable diseases (NCDs), that will be useful for health.

The chemical composition, total phenolic, total flavonoids, daidzein and genistein in ADP was at 18.17% crude protein, 2.42 mg GAE/g sample, 2.25 mg RE/g sample, 55.12 and 25.92 µg/g sample respectively, and the highest of gallic acid (215.30 µg/g sample), apigenin at 2,278.27 µg/g sample while antioxidant activity with DPPH, ABTS and FRAP assay is 46.69, 66.09% and 3.25 mgFe^{2+}/g sample respectively, with non-detect in the form of Isoflavone derivatives of daidzein and genistein in of raw cow's milk samples that all cows were fed concentrate with *ad libitum* fresh grass (non ADP).

Keywords: Alfalfa, Bioactive compound, Isoflavone, Antioxidant activity, Raw cow's milk

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ก
บทคัดย่อภาษาไทย ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค
สารบัญเรื่อง ง
สารบัญตาราง ฉ
สารบัญภาพ ช

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1
วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย 2
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework) 2
วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย 4

บทที่ 2 การตรวจเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบ 10
3.2 การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำนมดิบ 10
3.2.1 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic) และสารประกอบ Flavonoid 10
3.2.2 การวิเคราะห์สารประกอบ flavonoid ในกลุ่ม Isoflavone ในตัวอย่างน้ำนมดิบ 11
3.2.3 การเตรียมการสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโน 12
3.3 การเตรียมถั่วอัลฟัลฟ่าเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางโภชนะ 13
3.3.1 การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในถั่วอัลฟัลฟ่า 13
3.3.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในถั่วอัลฟัลฟ่า 16
3.4 สถานที่ทำการวิจัย 17
3.5 ระยะเวลาการทดลอง 17

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ 18
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 36
บทที่ 6 ผลผลิต 37
รายงานสรุปการเงิน 38
เอกสารอ้างอิง 39
ภาคผนวก 45
ประวัตินักวิจัย 50

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ผลผลิตปริมาณน้ำนมและการกินได้ ของพืชอาหารสัตว์แต่ละชนิดในโคนม	7
2.2	ความเข้มข้นระดับปริมาณ Phytoestrogense ในน้ำนม (µg/kg of milk)	8
4.1	องค์ประกอบทางเคมีและจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบ	18
4.2	สารประกอบฟีนอลิคในน้ำนมดิบ	22
4.3	สารประกอบฟลาโวนอยด์ในน้ำนมดิบ	23
4.4	องค์ประกอบทางเคมีของอัลฟัลฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ด (Mean ± SD)	26
4.5	ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในน้ำนมดิบ	27
4.6	ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ปริมาณสารฟลาโวนอยทั้งหมด (Total flavonoid compounds) ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด	28
4.7	ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด	29
4.8	ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด	30
4.9	ชนิดและปริมาณของสารประกอบไอโซฟลาโวนในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด	32
4.10	ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด	34
4.11	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH radical scavenging activities (% Inhibition และ Trolox) และ FRAP, ABTS ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด	34

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	กราฟมาตรฐานไอโซฟลาโวนในรูปอนุพันธ์ของ Genistein และ Daidzein	23
4.2	ผลการวิเคราะห์ไอโซฟลาโวนไอโซฟลาโวนในรูปอนุพันธ์ของ Genistein และ Daidzein ในตัวอย่างน้ำนมดิบ	24
4.3	โครมาโตรแกรมของสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด	31
4.4	โครมาโตรแกรมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่มไอโซฟลาโวนในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด	33

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

อาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยสี่ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ หากมนุษย์หรือผู้บริโภคมีภาวะโภชนาการอาหารที่ดีจะช่วยเสริมสร้างร่างกายให้แข็งแรง แต่โดยความเป็นจริง ปัจจุบันนี้การใช้ชีวิตที่เร่งรีบมากขึ้น ทำให้การตระหนักถึงพฤติกรรมการกินอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพนั้นน้อยลง ทำให้เกิดผลต่อการทำลายสุขภาพและการเกิดโรคภัยต่างๆ ตามมา อย่างไรก็ตาม กระแสห่วงใยสุขภาพนับเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจจากทุกเพศทุกวัย โดยพบว่ามีความต้องการอาหารทางเลือกที่หลากหลายเพื่อตอบสนองต่อรูปแบบการใช้ชีวิตในยุคปัจจุบันมากขึ้น และเริ่มที่จะเลือกบริโภคอาหารหรือผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์จากธรรมชาติต่อสุขภาพของตนเองมากขึ้น ไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogens) เป็นสารจากพืชที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogenic activity) ในพืชสามารถพบสารนี้ได้หลายกลุ่ม เช่น ไอโซฟลาโวน (isoflavones) โครมีน (chromene) คูเมสเตน (coumestan) ลิกแนน (lignans) สารกลุ่มไฟโตเอสโตรเจน สามารถพบได้ในพืช 3 กลุ่ม เช่น พืชวงศ์ถั่ว (legume) พืชชนิดที่เป็นเมล็ด (cereal) และกลุ่มสุดท้ายคือ พืชจำพวกหญ้า (grasses) ซึ่งพืชทั้ง 3 ชนิด ล้วนเป็นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงโคนม ดังนั้นหากเกษตรกรมีการจัดการการให้อาหารโคด้วยพืชวงศ์ถั่ว (ในกรณีนี้คือ ถั่วอัลฟัลฟ่า) น่าจะสามารถทำให้น้ำนมมี Phytoestrogens สูงขึ้นได้ ซึ่ง Phytoestrogens มีคุณประโยชน์ที่มีผลต่อต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันอาการแก่ก่อนวัย ลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคกระดูกพรุน รวมถึงปัญหาที่เกี่ยวเนื่องกับภาวะการหมดประจำเดือนได้อีกด้วย (Adlercreutz et al.,1991; Cornwell et al., 2004; Ososki and Kennelly, 2003.) จากรายงานของ Andersen et al. (2008) พบว่าการให้พืชวงศ์ถั่วมีผลทำให้ปริมาณของ Phytoestrogens ในน้ำนมเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับ (Höjer et al., 2012; Steinshamn et al., 2008) ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการเสริมพืชอาหารสัตว์จากถั่วอัลฟัลฟ่าเพื่อเพิ่มปริมาณของ Phytoestrogens ในน้ำนม ซึ่งเป็นแนวทางที่จะทำให้น้ำนมมีปริมาณ Phytoestrogens สูงขึ้น เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ รวมทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่น้ำนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมได้อีกด้วย

ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาวิจัยปีที่ 1 (ปีงบประมาณ 2562) แบบการศึกษานำร่อง (Pilot study) เกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี, จำนวนเซลล์โซมาติก, สารประกอบ Phenolic และ flavonoid, Isoflavone, กรดอะมิโนที่พบในน้ำนมโคที่ผลิตในภาวะปกติและ Total phenolic, สารประกอบ Phenolic, Total flavonoid, สารประกอบ Flavonoid, Isoflavone, กรดอะมิโน (amino acid) และฤทธิ์ทางชีวภาพ (กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ) ในถั่วอัลฟัลฟ่า รวมถึงคุณค่าทางโภชนะของถั่วอัลฟัลฟ่า เพื่อเป็นฐานข้อมูลเบื้องต้นในการต่อยอดงานวิจัยสู่ระยะที่ 2 ในปีงบประมาณ 2563 คือ การนำถั่วอัลฟัลฟ่าไปใช้ประโยชน์ได้จริงในอาหารโคนมเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Isoflavone ซึ่งถูกจัดไว้ในกลุ่มของ Phytoestrogen ในน้ำนมโคเพื่อเป็นทางเลือกสำหรับผู้บริโภคและพัฒนาห่วงโซ่ทางคุณค่าเพื่อยกระดับมูลค่าเพิ่มผลิตภัณฑ์ (The value chain development platform) ให้แก่น้ำนมโคต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1.2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี จำนวนเซลล์โซมาติก และตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบ Phenolic, สารประกอบ Flavonoids, Isoflavone, กรดอะมิโนในน้ำนมดิบที่ผลิตในภาวะปกติจากถังรวบรวมน้ำนมดิบภายในฟาร์มโคนม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.2.2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ Total phenolic, สารประกอบ Phenolic, Total flavonoid, สารประกอบ Flavonoid, Isoflavone, กรดอะมิโน (amino acid) และฤทธิ์ทางชีวภาพ (กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ) ในถั่วอัลฟัลฟ่าเพื่อประเมินศักยภาพถั่วอัลฟัลฟ่าก่อนนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียน

1.3 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย (Conceptual framework)

จากทัศนคติและพฤติกรรมผู้บริโภคโดยเฉพาะสังคมผู้สูงอายุในยุคปัจจุบันต่ออาหารเชิงหน้าที่ (functional food) เพื่อการกินดีอยู่ดี มีสุขภาพแข็งแรง และลดภาวะความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ นั้นมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และจากข้อมูลข่าวสารที่รายงานถึงปัญหาสุขภาพของผู้หญิงสูงอายุที่เข้าสู่วัยทองอาจได้รับผลกระทบจากการรับเอสโตรเจนสังเคราะห์ในระยะยาวต่อร่างกายได้ จึงกระตุ้นให้เกิดความสนใจสารธรรมชาติบำบัด (Natural healing substance) หรือพฤกษเคมีจากพืชหลากหลายชนิดทั้งในและต่างประเทศเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้ป่วยหรือแม้แต่ผู้รักสุขภาพทุกเพศทุกวัย สารธรรมชาติอย่าง Isoflavone ที่ถูกจัดไว้ในกลุ่มไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogen) พบได้มากในพืชวงศ์ถั่ว (Leguminous) เช่น ถั่วเหลือง นั้นจะสามารถช่วยกระตุ้นการเพิ่มฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ในเพศหญิงได้ เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน รวมถึงมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ทำให้ช่วยป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากความมีอายุได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม มีผู้บริโภคจำนวนไม่น้อยที่อาจไม่นิยมอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบและยิ่งไปกว่านั้นคือมีอาการแพ้นมถั่วเหลือง ทำให้เงื่อนไขของโจทย์วิจัยครั้งนี้จำเป็นต้องปรับเปลี่ยน (transformation) ประยุกต์ให้เชื่อมโยงกับผลิตภัณฑ์อาหารทางเลือกอื่นในรูปแบบอื่น

อนึ่ง ข้อจำกัดของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมและมูลค่าของผลผลิตน้ำนมดิบในประเทศในเพียงพอจะทำให้เกษตรมีความมั่นคงในอาชีพหรือก้าวข้ามกับดักรายได้ปานกลางเพื่อการมีคุณภาพชีวิตหรือรายได้ที่ดีขึ้นได้ เนื่องจากขาดองค์ความรู้และความเข้าใจในการพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรที่สามารถผันเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง (value added) ด้วยเทคโนโลยีจากการต่อยอดทางความคิดได้ จึงนำมาสู่กรอบแนวคิดในการสร้างขีดความสามารถเพื่อเพิ่มศักยภาพของเกษตรให้รับรู้และเข้าถึงองค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องจากพืชวงศ์ถั่วโภชนะสูงเพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตของตนเอง โดยในอนาคตจะสามารถสร้างอัตลักษณ์เฉพาะตัวแก่สินค้าของตน และทำหน้าที่ส่งมอบผลิตภัณฑ์น้ำนมโคที่คุณค่าสารอาหารพิเศษสูงสู่อุตสาหกรรมตลาดเฉพาะ (niche) ให้กับลูกค้ากลุ่มเป้าหมาย (target customers) ได้

การวิจัยนี้จึงมีแนวคิดเพื่อยกระดับของผลผลิตของน้ำนมโคให้สูงขึ้น ด้วยการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและตรวจหาและเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compound) ในน้ำนมดิบและถั่ว

อัลฟัลฟ่า เพื่อประเมินศักยภาพในการประยุกต์ใช้ถั่วอัลฟัลฟ่าเป็นอาหารเลี้ยงโคนมเพื่อทางเลือกในการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์น้ำนมพร้อมดื่มเสริมสุขภาพต่อไป

1.4 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

1.4.1 สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบภายในถังรวมนมของฟาร์มโคนม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เก็บติดต่อกัน 2 วัน (เช้าและเย็น) ทุกๆ เดือน เป็นระยะเวลา 1 ปี

1.4.1.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีนนม (protein), ไขมันนม (fat), แลคโตส (lactose), เนื้อนมไม่รวมมันเนย (solid not fat; SNF) และของแข็งรวม (total solid) ด้วยเครื่อง MilkoScanTM FT2 (Foss Hillerøed, Denmark)

1.4.1.2 ตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติก (somatic cell count) ด้วยเครื่อง Fossomatic 5000 basic

1.4.1.3 ศึกษาคุณสมบัติสารประกอบออกฤทธิ์

1.4.1.3.1 ศึกษาหาปริมาณสารประกอบ Phenolic ตามวิธีการของ Kubola et al. (2011), สารประกอบ Flavonoid ตามวิธีของ Kubola and Siriamornpun (2011) ด้วยเครื่อง High liquid Chromatograph (HPLC), ปริมาณของ Isoflavone ดัดแปลงวิธีการสกัดของ Li et al. (2009) และ Vázquez et al. (2015) ในน้ำนมด้วยเครื่อง HPLC- Diode array detector (DAD)

1.4.1.4 ศึกษาหาปริมาณกรดอะมิโน สกัดตามวิธีของ Thiele et al. (2012) ด้วยเครื่อง LCMS/MC (Nimbalkar et al., 2012)

1.4.2 เตรียมตัวอย่างถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ด (Alfalfa dehydrated pellet) โดยบดให้ละเอียดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี

1.4.2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ วัตถุแห้ง (Dry matter, DM), โปรตีนหยาบ (Crude protein, CP), ไขมัน (Ether extract), เถ้า (ash), เยื่อใยหยาบ (Crude fiber, CF) ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบประมาณ (Proximate analysis) ตามวิธีมาตรฐาน AOAC (1990) และวิเคราะห์เยื่อใยโดยวิธี Detergent analysis เพื่อหา Neutral detergent fiber (NDF), Acid detergent fiber (ADF), Acid detergent lignin (ADL) และส่วนของเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid Insoluble ash, AIA) ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970)

1.4.2.2 ศึกษาคุณสมบัติสารประกอบออกฤทธิ์

ศึกษาหาปริมาณสาร Total phenolic โดยวิธี Folin-Ciocalteu method (Kubola and Siriamornpun, 2011), ปริมาณสารประกอบ Phenolic ตามวิธีการของ Kubola et al. (2011), ปริมาณ Total flavonoid compounds และสารประกอบ Flavonoid ตามวิธีของ Kubola and Siriamornpun (2011) ด้วยเครื่อง High liquid Chromatograph (HPLC), ปริมาณของ Isoflavone โดยการสกัดตามวิธีของ Akitha Devi et al. (2009) ด้วยเครื่อง HPLC- DAD และทดสอบเปอร์เซ็นต์แทนนินด้วยวิธี Burns (1971)

1.4.2.3 ศึกษาหาปริมาณกรดอะมิโน สกัดตามวิธีของ Thiele et al. (2012) ด้วยเครื่อง LCMS/MC (Nimbalkar et al., 2012)

1.4.2.4 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสารต้านอนุมูลอิสระเสถียร DPPH โดยวิธี DPPH radical scavenging assay (Wanyo et al., 2016), ferric reducing/antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงจากวิธีของ Wanyo et al., 2016, ABTS ดัดแปลงจากวิธีของ Daiponmak et al. (2014).

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1. ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบ Phenolic, Flavonoids, Isoflavone และกรดอะมิโนที่มีในน้ำนมดิบที่ผลิตในภาวะปกติของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเชี่ยนสายเลือดมากกว่า 87.5 (Crossbred Holstein-Friesian (>87.5% Holstein)) ที่อยู่ในระยะให้นมที่ได้รับอาหารข้น 21 เปอร์เซ็นต์โปรตีนร่วมกับหญ้าสด

1.5.2 ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณความเข้มข้นของ Total phenolic, สารประกอบ Phenolic, Total flavonoid, สารประกอบ Flavonoid, Isoflavone, กรดอะมิโนและฤทธิ์ทางชีวภาพในถั่วอัลฟัลฟ่า

1.5.3 ได้ข้อมูลพื้นฐานต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยต่อยอดกับนักวิชาการ มหาวิทยาลัย และนักวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ นำไปสู่การขยายผลจนเกิดผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพได้ในอนาคต

1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

1.6.1 นำเสนอผลงานทางวิชาการในการประชุมวิชาการระดับชาติ

1.6.2 ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับชาติและ/หรือนานาชาติ

1.6.3 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่สถาบันการศึกษา และส่วนงานราชการต่างๆ เช่น กรมปศุสัตว์ และ/หรือสหกรณ์โคนมต่างๆ เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม

1.6.4 สร้างการรับรู้สู่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมที่สนใจ และ/หรือผู้บริโภคที่รักสุขภาพ นักวิชาการ และนักวิจัยเชิงลึก ผ่านการอบรมโดยสร้างเครือข่ายการทำงานแบบบูรณาการเพื่อพัฒนาความรู้ทางวิชาการร่วมกัน (engagement) แบบร่วมคิด ร่วมทำ ร่วมได้ประโยชน์

บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันการพัฒนาด้านอาหารและกลยุทธการให้อาหารสัตว์มีความก้าวหน้าไปอย่างมาก โดยวิธีการในการเลือกใช้วัตถุดิบอย่างเหมาะสม จะนำมาซึ่งการทำให้สัตว์เจริญเติบโตดีให้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี วัตถุดิบจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากในการเลือกใช้ โดยทั่วไปสัตว์เคี้ยวเอื้องจะใช้หญ้าเป็นแหล่งอาหารหยาบหลัก แต่หากพิจารณาเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนะของหญ้าและพืชวงศ์ถั่ว จะพบว่าปริมาณโปรตีนในพืชวงศ์ถั่วมีค่ามากกว่าพืชวงศ์หญ้าซึ่งเป็นที่ต้องการสำหรับการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง นอกจากนี้ถั่วอาหารสัตว์ที่จัดว่าเป็นพืชโปรตีนและพืชบำรุงดิน สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ไรโซเบียมในปมรากถั่ว ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากพืชวงศ์ถั่วเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ทำให้เกษตรกรได้ประโยชน์ทั้งจากลำต้นและใบ อย่างไรก็ตาม การใช้ประโยชน์จากพืชวงศ์ถั่วบางชนิดยังคงมีข้อจำกัดอยู่มากในเรื่องของผลผลิตต่อไร่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถั่วอัลฟัลฟ่า (*Medicago sativa* L.) ถึงแม้ว่าคุณค่าทางโภชนะและพฤกษเคมีในถั่วอัลฟัลฟ่าจะมีคุณค่าสูงและความต้องการที่เพิ่มขึ้น แต่ยังคงได้รับความนิยมไม่มากนักเนื่องจากมีราคาสูง จากคุณสมบัติที่ปรากฏ พบว่าโปรตีนจากใบของถั่วอัลฟัลฟ่าให้คุณภาพทางโภชนาการสูงต่อมนุษย์และสัตว์ (Platt and Bassham, 1978) และมีรายงานพบว่าในระยะออกดอกมีระดับโปรตีนอยู่ระหว่าง 16-25% ซึ่งมีค่าโภชนะการย่อยได้สูงถึง 60-70% (สำนักงานพัฒนาอาหารสัตว์, 2562) และยังให้ผลผลิตในรูปของโปรตีนต่อพื้นที่มากกว่าการปลูกข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และข้าว สามารถนำมาใช้เป็นหญ้าแห้ง, หญ้าหมัก, ทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ (Hassan and Keyhani, 2010) รวมถึงพบสารประกอบจำพวก saponin, flavonoid, tannin, coumestrol, carotenoid, และ tocol (Stochmal and Riccardis, 2001) ซึ่ง tannin จะสามารถเพิ่มคุณภาพโปรตีนผ่านการดูดซึมในลำไส้ได้สูงขึ้นในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Waghorn et al., 1987) และมีรายงานการยับยั้งการเจริญเติบโตของพยาธิตัวกลมในทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้อีกด้วย (Max et al., 2002) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกระถิน (*Leucaena leucocephala*) พืชโปรตีนท้องถิ่นของไทยที่นิยมใช้เลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง ขณะที่สารสำคัญของกลุ่ม flavonoid, isoflavone, flavonones และ chalcones นี้จะพบมากในพืชวงศ์ถั่วกลุ่ม Leguminous ซึ่งถูกจัดกลุ่มเป็น 1 ใน 3 ชนิดของ phytoestrogen (Herman et al., 1995) โดยเฉพาะ isoflavone ซึ่งเป็น subclass ของ flavonoid มีรายงานพบว่าเป็นสารสำคัญที่พบได้มากในถั่วเหลือง ซึ่งเป็นสารกลุ่ม phenolic ที่พบได้ในอาหารและพืช (ภคนิจ, 2556) โดย flavonoid ที่ได้มาจาธรรมชาตินี้มีคุณสมบัติคล้ายกับ estrogen เพราะโครงสร้างที่มี phenolic ring จึงทำให้สามารถจับกับโปรตีนตัวรับของ estrogen ได้ จึงจัดได้ว่าเป็น phytoestrogen ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว การทดแทนการขาดหรือน้อยลงของฮอร์โมน estrogen ในร่างกายของหญิงที่เข้าสู่วัยหมดประจำเดือน (menopause) จึงสามารถทดแทนได้ด้วยสารธรรมชาติจาก Isoflavone และยังลดความเสี่ยงจากผลข้างเคียงอื่นๆ จากการได้รับฮอร์โมนสังเคราะห์หรือทดแทนเป็นระยะเวลายาวนาน เช่น การเกิดมะเร็ง (Messina, 1999) นอกจากนี้ คุณประโยชน์ของ phytoestrogen ยังพบว่า สามารถช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจหรือภาวะกระดูกพรุน อัตราการเกิดโรคมะเร็งได้หลายชนิด รวมทั้งมีการศึกษาวิจัยพบว่า phytoestrogen มี

ความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์อีกหลายทาง ไม่ว่าจะเป็นการบำบัดโรคหรือลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรค ภาวะเสื่อมของร่างกาย (Ososki and Kennelly, 2003; Borker et al., 2002; Piller et al., 2006; Kurzer et al., 1997 และ Lee et al., 1991) อาการร้อนวูบวาบและภาวะโรคกระดูกพรุน หรืออัตราการเกิดมะเร็งเต้านมของสตรีชาวญี่ปุ่นและจีนที่บริโภคอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบเป็นประจำนั้นต่ำกว่าสตรีชาวตะวันตก (Wu et al., 1996)

ไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogen) เป็นสารประกอบที่แยกได้จากพืช ซึ่งเอสโตรเจนที่สกัดได้จากพืชมีสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่พบในมนุษย์ ไฟโตรเอสโตรเจนนั้นมีฤทธิ์ที่เทียบกับเอสโตรเจนได้เพียงอ่อนๆ เพียง 1:500 ถึง 1:1000 (Wohlmuth et al., 2004) เราสามารถพบ Phytoestrogen ในพืชหลากหลายชนิดเช่น พืชวงศ์ถั่วในกลุ่ม Leguminous เช่น ถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถั่วเหลือง ถั่วเขียว โดยมีรายงานในปี 2006 Jing และ Zhang ระบุว่า ถั่วเหลืองมี Isoflavone ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกาย (อ้างโดย รัชฎาพร, 2556) จึงสามารถจับกับ estrogen receptor ได้ โดย genistein, daidzein และ coumestrol เป็นสารที่พบมากในกลุ่มนี้ (Patricia et al., 2010 อ้างโดยรัชฎาพร, 2556) ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งในร่างกายหญิงสูงวัยที่เข้าสู่วัยหมดประจำเดือนหรือวัยทอง อย่างไรก็ตาม ปริมาณของ Phytoestrogen ในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของพืช เช่น ราก เมล็ด เป็นต้น (Herman et al., 1995) แบ่งชนิดของ Phytoestrogen ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1.กลุ่ม Flavonoid, Isoflavone, Flavonones และ Chalcones สารในกลุ่มนี้จะพบมากในพืชวงศ์ถั่วในกลุ่ม Leguminous พืชที่มีสีแดง เช่น แครอท พืชที่มีสีเหลือง เช่น ฟักทอง พืชตระกูลมะนาว (Citrus fruit) และเมล็ดของแอปเปิ้ล สารที่สำคัญที่แยกได้จากพืชกลุ่มนี้ คือ genistein, daidzein และ equol

2. กลุ่ม Coumestans สารในกลุ่มนี้จะพบมากในเมล็ดทานตะวัน ถั่วเหลือง บรอคโคลีและพืชวงศ์ถั่วบางชนิด ฯลฯ ซึ่งสารสำคัญที่พบ คือ coumestrol พืชในกลุ่มนี้จะไม่สามารถผลิต Phytoestrogen ได้โดยตรง แต่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดหรือที่อยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์

3. กลุ่ม Lignans พบมากในเมล็ดธัญพืชสาหร่ายแห้ง ผัก ผลไม้ และพืชวงศ์ถั่ว โดยเฉพาะในเมล็ดพืชที่มีน้ำมันผสมอยู่ (oil-seed) และสารที่สำคัญในกลุ่มนี้คือ enterolactone และ enterodiol พืชในกลุ่มนี้จะไม่สามารถผลิต Phytoestrogen ได้โดยตรงเช่นเดียวกับพืชในกลุ่ม coumestrol ซึ่งจะได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดหรือที่อยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ ประโยชน์ของ phytoestrogen มีงานวิจัยเกี่ยวกับ phytoestrogen พบว่าสามารถช่วยลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งได้หลายชนิด และยังช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจหรือภาวะกระดูกพรุน โดยการได้รับ Phytoestrogen ในมนุษย์ พบว่า ผู้หญิงในวัยหมดประจำเดือนได้รับประทานแป้งจากถั่วเหลืองจำนวน 45 กรัมต่อวันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า Phytoestrogen ในถั่วเหลือง ช่วยบรรเทาอาการต่างๆ ของภาวะหมดประจำเดือน (Murkies et al. 1995; Albertazzi et al. 1998) นอกจากนี้พบว่า การได้รับ isoflavone วันละ 90 มิลลิกรัม จากโปรตีนถั่วเหลือง ทำให้ความหนาแน่นของกระดูกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และการได้รับ isoflavone วันละ

62 มิลลิกรัม จากโปรตีนถั่วเหลือง จะช่วยลด LDL ลง 10% และการบริโภคถั่วเหลืองที่มี phytoestrogen ค่อนข้างสูงเป็นประจำ จะลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ และมะเร็งเต้านม เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีข้อเสนอแนะการให้พืชวงศ์ถั่วเป็นอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยการศึกษาวิจัยการใช้พืชวงศ์ถั่วต่อการกินได้และการให้ผลผลิตน้ำนมในโคนม (ตารางที่ 1) ของ Steinshamn et al. (2008) พบว่าการใช้ White clover-glass silage และ Red clover-glass silage รวมกับอาหารข้นมีผลต่อการกินได้ที่สูงกว่า สอดคล้องกับ Höjer et al. (2012) ที่ศึกษาการให้ birdsfoot trefoilgrass silage และ red clover-grass silage พบว่า birdsfoot trefoilgrass silage มีผลต่อการกินได้สูงกว่า ทั้งนี้อาจมาจาก NDF ที่มีอยู่ในพืชอาหารสัตว์ของแต่ละชนิดแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม Andersen et al. (2008) ได้ศึกษาการใช้ Lucerne silage และ grass/clover silage ในสัดส่วนที่ต่างกันก็ไม่มีผลต่อการกินได้ของโคนม

ตารางที่ 1 ผลผลิตปริมาณน้ำนมและการกินได้ ของพืชอาหารสัตว์แต่ละชนิดในโคนม

References	Treatment	Feed Intake (kg/d)	Milk yield (Kg/d)	Protein (g/Kg of milk)	Fat (g/Kg of milk)
Steinshamn et al, (2008)	WCS0	13.90[a]	21.10[a]	-	-
	WCS1	20.80[b]	27.40[b]	-	-
	RCS0	14.90[a]	22.00[a]	-	-
	RCS1	20.2[b]	26.10[b]	-	-
Andersen et al, (2008)	LS	22.70	33.10	-	-
	2/3LS	21.20	33.20	-	-
	1/3LS	22.10	33.40	-	-
	GCS	21.30	34.50	-	-
Höjer et al., (2012)	B2	21.7[a]	26.00	35.20	45.00
	R2	19.7[b]	25.50	34.80	44.50
	R3	18.9[b]	26.10	35.00	44.80

หมายเหตุ [a,b] และ [c] ค่าแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

WCS0 = white clover-grass silage without concentrate supplementation, WCS1 = white clover-grass silage with concentrate supplementation, RCS0 = red clover- grass silage without concentrate supplementation, RCS1 = red clover- grass silage with concentrate supplementation, LS = Lucerne silage, 2/3LS = 2/3 Lucerne silage and 1/3 maize silage, 1/3LS = 1/3 Lucerne silage and 2/3 maize silage, GCS = grass/clover silage B2 = 2-cut birdsfoot trefoil grass silage, R2 = 2-cut red clover-grass silage, R3 = 3-cut red clover grass silage

การใช้พืชอาหารสัตว์ที่เป็นวงศ์ถั่วต่อความเข้มข้นของปริมาณไฟโตเอสโตรเจนในน้ำนม (ตารางที่ 2) จากการทดลองของ Steinshamn et al., (2008) พบว่า การใช้พืชอาหาร white clover-grass silage กับ Red clover-grass silage เพียงอย่างเดียวมีผลต่อการปริมาณของ Eqoul ในน้ำนม ซึ่งมีปริมาณมากกว่าอาหารที่เสริมด้วยอาหารข้น เนื่องจากการให้อาหารหยาบเพียงชนิดเดียวจะทำโคนมได้รับไฟโตเอสโตรเจนมาก แต่ถ้ามีอาหารข้นเข้าไปด้วย การใช้ประโยชน์ได้ของอาหารหยาบจึงลดน้อยลง ซึ่งจากผลที่แสดงในตารางพบว่า การเลี้ยงโคนมด้วยอาหารหยาบเพียงอย่างเดียวทำให้ไฟโตเอสโตรเจนเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นจะขึ้นอยู่กับรูปแบบการเลี้ยงโคภายในฟาร์ม ยกตัวอย่างเช่น ฟาร์มที่เลี้ยงโคนมแบบปกติและเลี้ยงแบบฟาร์มอินทรีย์ พบว่า มีปริมาณไฟโตเอสโตรเจนเท่ากับ 41-62 µg/l และ 230-411 µg/l ตามลำดับ (Purup et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Andersen et al. (2008) ที่ใช้พืชอาหารชนิด Lucerne silage (ทำการหมัก) และ GCS (grass/clover silage) มีผลทำให้ปริมาณของไฟโตเอสโตรเจนชนิด Eqoul ต่างกัน พบว่าการใช้พืชวงศ์ถั่ว Lucerne silage ในสัดส่วนที่ต่างกัน ไม่มีผลต่อปริมาณของไฟโตเอสโตรเจน

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นระดับปริมาณ Phytoestrogense ในน้ำนม (µg/kg of milk)

References	Treatment	Equol	Secoisolariciresinol	Enterolactone
Steinshamn et al., (2008)	WCS0	97.10[b]	5.19	27.00[b]
	WCS1	52.00[a]	5.34	38.80[a]
	RCS0	364.00[b]	5.33	21.60[a]
	RCS1	272.70[a]	4.80	27.00[b]
Andersen et al., (2008)	LS	2.99[a]	26.52	63.8[a]
	2/3LS	1.79[a]	25.51	66.12[a]
	1/3LS	0.64[a]	26.00	95.88[b]
	GCS	186.17[b]	26.23	57.51[a]
Höjer et al., (2012)	B2	145[b]	10.20	225.6[a]
	R2	1,494[a]	10.10	107.8[b]
	R3	1,297[a]	10.30	79.4[b]

หมายเหตุ [a,b] และ [c] ค่าแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

WCS0 = white clover-grass silage without concentrate supplementation, WCS1 = white clover-grass silage with concentrate supplementation, RCS0 = red clover- grass silage without concentrate supplementation, RCS1 = red clover- grass silage with concentrate supplementation, LS = lucerne silage, 2/3LS = 2/3 lucerne silage and 1/3 maize silage, 1/3LS = 1/3 lucerne silage and 2/3 maize silage, GCS = grass/clover silage B2 = 2-cut birdsfoot trefoil grass silage, R2 = 2-cut red clover-grass silage, R3 = 3-cut red clover grass silage

นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้พืช GCS มีไฟโตเอสโตรเจน Eqoul ที่สูง เพราะว่าอาหารสูตรนี้เป็นพืชวงศ์ถั่วที่ผสมกับหญ้าและการเลี้ยงโคนมแบบอินทรีย์ก็สามารถทำให้ไฟโตเอสโตรเจนสูงได้ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Höjer et al., (2012) พบว่าการใช้พืชอาหารชนิด birdsfoot trefoil grass silage และ red clover-grass silage มีผลที่ให้ความแตกต่างกัน เมื่อให้พืชชนิด red clover-grass silage ในอาหารโคนมทำให้มีไฟโตเอสโตรเจน Eqoul สูงขึ้น เนื่องจากเป็นพืช red clover-grass silage เป็นพืชวงศ์ถั่วที่มีสารตั้งต้นของไฟโตเอสโตรเจนที่สูงอยู่แล้วในพืชอาหารสัตว์

การทดลองของ Steinshamn et al., (2008) สอดคล้องกับการทดลองของ Andersen et al., (2008) และการศึกษาของ Höjer et al., (2012) ซึ่งทั้ง 3 การทดลองนี้ที่ใช้ทรีตเมนต์พืชอาหารสัตว์ต่างชนิดกัน พบว่าไม่มีผลต่อ Secoisolariciresinol ไฟโตเอสโตรเจนในน้ำนม ส่วนผลของระดับปริมาณ ไฟโตเอสโตรเจนใน Enterolactone พบว่าในงานทดลองของ Steinshamn et al., (2008) ที่ใช้พืชอาหาร white clover-grass silage กับ Red clover-grass silage ร่วมกับอาหารข้น มีผลทำให้ Enterolactone มีปริมาณที่มากขึ้นกว่าพืชอาหารอาหารหยาบเพียงอย่างเดียว เพราะว่าได้รับอาหารข้นเพิ่มขึ้นในทรีตเมนต์นี้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Andersen et al., (2008) ที่ทำการศึกษาพืช GCS และ LS ในสัดส่วนของอาหารที่ต่างกัน พบว่าสัดส่วนของ 1/3LS มีความแตกต่างจากทรีตเมนต์อื่นๆ และสอดคล้องกับการศึกษา Höjer et al. (2012) ที่ใช้พืชอาหารสัตว์ B_2,R_2 และ R_3 ซึ่งพบว่าการใช้พืชชนิด B_2 ในอาหารโคนมมีความแตกต่างกัน เนื่องมาจากการกินได้ของ Secoisolariciresino ที่อยู่ในอาหารสูง ซึ่งสารชนิดนี้เป็นสารตั้งต้นที่ให้ของ Enterolactone ในไฟโตเอสโตรเจนในน้ำนม

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบ

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมโคจากถังรวบรวมน้ำนมดิบฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อใช้เป็นต้นแบบน้ำนมดิบ (Raw milk data model) ในภาวะปกติภายในฟาร์มโคนมลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเชี่ยน สายเลือดมากกว่า 87.5 เปอร์เซ็นต์ (Crossbred Holstein-Friesian (>87.5% Holstein)) ที่อยู่ในระยะให้นม จำนวน 97 ตัว โดยการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจะทำการสุ่มเก็บจากถังรวบรวมน้ำนมดิบทั้งเช้าและเย็น เวลา 04.30 น. และ 15.30 น. ตลอดระยะเวลา 12 เดือนๆ ละ 1 ครั้งๆ ละ 200 - 300 มิลลิลิตร บรรจุลงขวดสีชา มีฝาเกลียดปิดสนิท โดยมีการระบุรายละเอียด สถานที่เก็บตัวอย่าง วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง ผู้เก็บตัวอย่าง บรรจุตัวอย่างลงในถังพลาสติกหรือกล่องโฟมที่มีการควบคุมอุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส (°C) ด้วยน้ำแข็ง โดยไม่ทำการแช่แข็งตัวอย่างน้ำนม และนำตัวอย่างเข้าตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการภายใน 36 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีนนม (protein), ไขมันนม (fat), แลคโตส (lactose), เนื้อนมไม่รวมมันเนย (solid not fat; SNF) และของแข็งรวม (total solid) ด้วยเครื่อง MilkoScanTM FT2 (Foss Hillerød, Denmark), ตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติก (somatic cell count) หรือจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยเครื่อง Fossomatic 5000 basic

3.2 การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำนมดิบ

3.2.1 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic) และสารประกอบ Flavonoid ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ Kubola et al. (2011)

3.2.1.1 การสกัดสารฟีนอลิก

นำตัวอย่างน้ำนมดิบ 100 ml ทำแห้งตัวอย่างด้วยวิธี Freeze dry และนำตัวอย่างน้ำนมแห้งน้ำหนักแล้ว 5 กรัม ผสมกับเมทานอล: กรดไฮโดรคลอลิค (100:1 V/V) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 แล้วทำการเพิ่มความเข้มข้นโดยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรน้อยกว่า 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทา-นอล: น้ำ (80:20 V/V) ให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปฉีดด้วย ด้วยเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

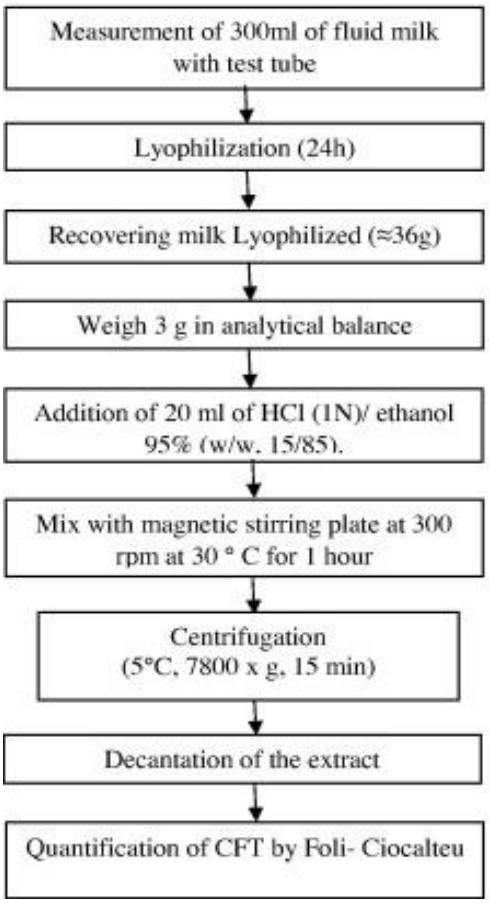
3.2.1.2 วิเคราะห์สารประกอบ Phenolic และสารประกอบ Flavonoid ด้วยเครื่อง HPLC

การแยกสารประกอบด้วยเครื่อง HPLC โดยการใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 4.6 x 250 mm, 5 µm เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นระบบ gradient เฟสเคลื่อนที่ A คือ น้ำประกอบด้วยกรดอะ

ซิตริก 1 เปอร์เซ็นต์ เฟสเคลื่อนที่ B อะซีโตไนไตร โดยระบบ gradient ดังนี้ นาทีที่ 0-40 เฟสเคลื่อนที่ A 30% เฟสเคลื่อนที่ B 70% นาทีที่ 40-45 เฟสเคลื่อนที่ A 20% เฟสเคลื่อนที่ B 80% นาทีที่ 45-55 เฟสเคลื่อนที่ A 15% เฟสเคลื่อนที่ B 85% นาทีที่ 55-57 เฟสเคลื่อนที่ A 10% เฟสเคลื่อนที่ B 90% อุณหภูมิคอลัมน์ 20 องศาเซลเซียส ปริมาตรในการฉีด 20 ไมโคลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยดีเทคเตอร์ชนิด photo diode array detector ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและ 320 นาโนเมตรสำหรับสารประกอบฟีนอลิก ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตรสำหรับสารประกอบฟลาโวนอยด์ จำแนกชนิดขององค์ประกอบของสารเทียบกับสารมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์

3.2.2 การวิเคราะห์สารประกอบ flavonoid ในกลุ่ม Isoflavone ในตัวอย่างน้ำนมดิบ

3.2.2.1 ดัดแปลงการสกัดตามวิธีของ Li et al. (2009) และ Vázquez et al. (2015) โดยนำตัวอย่างน้ำนมดิบ 100 ml ทำแห้งตัวอย่างด้วยวิธี Freeze dry และนำตัวอย่างแห้งน้ำหนัก 3 กรัม เติมสารสกัด HCl (1 N)/ethanol 95% (V/V, 15/85) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันและกวนในmagnetic stirring plate ระยะเวลาในการสกัด 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไป centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 7,800 x g ที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสไปกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 µm ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนด้วยเครื่อง HPLC (ภาพที่ 3.2.2)



ภาพที่ 3.2.2 วิธีการสกัดสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่มไอโซฟลาโวน

3.2.2.2 วิธีการวิเคราะห์สารประกอบ Flavonoid ในกลุ่ม Isoflavone โดยเครื่อง HPLC-DAD

การวิเคราะห์สารประกอบ flavonoid โดยใช้เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu LC-20AC pumps (SPD-M20A กับ diode array detector และใช้คอลัมน์ LUNA C-18 (4.6 x 250 nm i.d., 5 µm)). ก่อนการวิเคราะห์นำตัวอย่างสารสกัดที่ได้กรองผ่านหัวกรองขนาด 0.45 µm แล้วนำลงใส่ขวด vial เพื่อวิเคราะห์สารตัวทำละลายที่ใช้ในการเป็นตัวนำพา (mobile phase) ซึ่งประกอบด้วย 3 เฟส คือ เฟส A ใช้น้ำ DI (อัตราส่วน 50%) เฟส B ใช้อะซีโตนไนไตร (อัตราส่วน 10%) และเฟส D ใช้ 1% กรดอะซีติกในน้ำ DI (V/V) (อัตราส่วน 40%) โดยส่วนของการตั้งค่าในการวิเคราะห์จะใช้แบบไอโซเครติก โดยฉีดสารวิเคราะห์ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ที่ระยะเวลาในการวิเคราะห์ 30 นาที และทำการตรวจวัดค่าที่ความยาวคลื่นที่ 277 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับระยะเวลาของสารมาตรฐานที่ใช้ (genestein) (Akitha Devi et al., 2009)

3.2.3 การเตรียมการสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโน (Thiele et al., 2012)

ก่อนทำการสกัด จากตัวอย่างจะถูกนำมาบดให้ละเอียดเป็นผงแล้ว (ในกรณีของน้ำนม จะทำให้ตัวอย่างนั้นแห้งด้วยวิธี Freeze dry ก่อน) จากนั้นนำตัวอย่างที่แห้งชั่งน้ำหนักประมาณ 100 กรัม พร้อมจดบันทึก โดยทำการเตรียมตัวทำละลาย ดังนี้ สารละลายระหว่างกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และเอทานอล (Ethanol) อัตราส่วน 1:1 (V/V) จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.5 โมลาร์จากนั้นเติมตัวทำละลายดังกล่าวลงในตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสารสกัดชั้นบนจะถูกแยกออกมาเพื่อนำไปวิเคราะห์หากรดอะมิโนต่อไป

3.2.3.1 การวิเคราะห์ LCMS/MS (Nimbalkar et al., 2012)

ระบบการวิเคราะห์ LC–MS-MS ประกอบไปด้วยเครื่องรุ่น Shimadzu LCMS-8030 ชนิด triple-quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) ระบบปฏิบัติการในโหมด ESI (electrospray ionization) และระบบ HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) ซึ่งประกอบด้วยดีแก๊สเซอร์ ปั๊มสองตัวคอลัมน์โอเวนและออโต้แซมเปิล

3.2.3.2 สภาวะในการวิเคราะห์

Gradient eluent ถูกปฏิบัติงานโดยคอลัมน์คัพเปิล InertSustain® C-18 (2.1× 150 mm, 3 µm) with การ์ดคอลัมน์ InertSustain® C-18 (2.1 × 10 mm, 3 µm) โมบายเฟสมี 2 ชนิด คือ โมบายเฟส A ประกอบไปด้วยน้ำกลั่นผสมกับกรดฟอร์มิก 0.1% ชนิด B ประกอบไปด้วย สารละลายระหว่างเมทานอลและน้ำผสมกันในอัตราส่วน 50:50 โดยผสมกับกรดฟอร์มิก 0.1% เช่นกัน ซึ่งอัตราการไหลของโมบายเฟสนั้นตั้งค่าไว้ที่ 0.2 มล./นาที การไล่ระดับโมบายเฟส B เริ่มต้น 0-1.0 นาที/2% (V/V) ตามมาด้วย 1-10 นาที/2–80% (V/V) นาทีที่ 10-12 / 80% (V/V) นาทีที่12–13/80–2% (V/V) และ 12–15 นาที/2% (V/V) เงื่อนไขเริ่มต้น (20% eluent B) เตาอบคอลัมน์ถูกตั้งไว้ที่ 38 ° C เครื่องออโตแซมเปิลทำงานที่

อุณหภูมิ 4 °C และเข็มออโต้แซมเปิลถูกล้างก่อนและหลังการฉีดตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเป็นสารล้างก๊าซ nebulizing และก๊าซแห้งเป็นไนโตรเจนที่อัตราการไหล 3.0 และ 15.0 ลิตร/นาที; ion source voltage 4.5 kV; อุณหภูมิ DL คือ 250°C; และอุณหภูมิบล็อกความร้อนเท่ากับ 400°C; multiple reaction monitoring (MRM) ดังแสดงในตาราง Table of MRM conditions for amino acid on LCMS/MS (ภาคผนวก) : โดยอาร์กอนเป็นแก๊สที่เกิดจากการชน (CID) ที่แรงดัน 230 kPa แรงดันไฟฟ้าของเครื่องตรวจจับตั้งไว้ที่ 1.72 kV

3.3 การเตรียมถั่วอัลฟัลฟ่าเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางโภชนะ

นำถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ดมาทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางโภชนะ โดยทำให้แห้งด้วยการอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชม. แล้วบดละเอียดให้มีขนาด 2 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ด้วยวิธีการแบบประมาณ (Proximate analysis) ได้แก่ วัตถุแห้ง (Dry matter, DM), โปรตีนหยาบ (Crude protein, CP), ไขมัน (Ether extract), เถ้า (ash), เยื่อใยหยาบ (Crude fiber, CF), AIA ตามวิธีการ AOAC (1990) และวิเคราะห์เยื่อใยโดยวิธี Detergent analysis (Goering and Van Soest, 1970) ได้แก่ Neutral detergent fiber, (NDF), Acid detergent fiber (ADF) และ Acid detergent lignin (ADL) ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970), พลังงานรวม (แคลอรี่/กรัม) โดยวิธี Analytical Method/Bomb Calorimeter จากนั้นเก็บตัวอย่างถั่วอัลฟัลฟ่าที่แห้งและบดละเอียดไว้แล้วอีกส่วนเพื่อทำการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ต่อไป

3.3.1 การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในถั่วอัลฟัลฟ่า

ทำการสกัดตัวอย่างถั่วอัลฟัลฟ่าที่แห้งและผ่านบดละเอียดขนาด 2 มิลลิเมตรแล้ว ปริมาณ 5 กรัม ผสมกับเมทานอล:น้ำ; 80:20 (v/v) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่เครื่อง shaking incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสที่เป็นสารสกัดเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปวิเคราะห์สารออกฤทธิ์และฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.3.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content) โดยวิธี Folin-Ciocalteu method ตามวิธีของ Kubola and Siriamornpun (2011)

สารสกัดที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu method เทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid โดย สารสกัด 300 ไมโครลิตร จะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu reagent และ 7.5% Na_2CO_3 2 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร เพื่อนำมาคำนวณปริมาณของสารฟีนอลิกรวม โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ที่ความเข้มข้น 1 -1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณฟีนอลิกรวมรายงานในหน่วย mg GAE/g sample

3.3.1.2 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic) และสารประกอบ Flavonoid ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ Kubola et al. (2011)

3.3.1.2.1 การสกัดสารฟีนอลิก

นำตัวอย่างถั่งอัลฟัลฟ่าแห้งบดละเอียดแล้ว 5 กรัม ผสมกับเมทานอล: กรดไฮโดรคลอลิค (100:1 V/V) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 แล้วทำการเพิ่มความเข้มข้นโดยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรน้อยกว่า 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทา-นอล: น้ำ (80:20 V/V) ให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปฉีดด้วย ด้วยเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.3.1.2.2 การวิเคราะห์สารประกอบ Phenolic และสารประกอบ Flavonoid ด้วยเครื่อง HPLC

การแยกสารประกอบด้วยเครื่อง HPLC โดยการใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 4.6 x 250 mm, 5 µm เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นระบบ gradient เฟสเคลื่อนที่ A คือ น้ำประกอบด้วยกรดอะซิตริก 1 เปอร์เซ็นต์ เฟสเคลื่อนที่ B อะซีโตไนไตร โดยระบบ gradient ดังนี้ นาทีที่ 0-40 เฟสเคลื่อนที่ A 30% เฟสเคลื่อนที่ B 70% นาทีที่ 40-45 เฟสเคลื่อนที่ A 20% เฟสเคลื่อนที่ B 80% นาทีที่ 45-55 เฟสเคลื่อนที่ A 15% เฟสเคลื่อนที่ B 85% นาทีที่ 55-57 เฟสเคลื่อนที่ A 10% เฟสเคลื่อนที่ B 90% อุณหภูมิคอลัมน์ 20 องศาเซลเซียส ปริมาตรในการฉีด 20 ไมโคลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยดีเทคเตอร์ชนิด photo diode array detector ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและ 320 นาโนเมตรสำหรับสารประกอบฟีนอลิก ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตรสำหรับสารประกอบฟลาโวนอยด์ จำแนกชนิดขององค์ประกอบของสารเทียบกับสารมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์

3.3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด Total flavonoid compounds (Kubola and Siriamornpun, 2011)

นำสารสกัดปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 2.25 มิลลิลิตร และเติมสารโซเดียมไนเตรท (NaNO2) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 6 นาที แล้วเติมสารอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3 \cdot 6H_20$) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ ผสมให้เข้ากันทำปฏิกิริยา 5 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 M ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง uv-vis spectophotmeter นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน rutin ความเข้มข้น 1 -1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อหาความเข้มข้นของ total flovonoid content ในตัวอย่างโดยรายงานในหน่วย mgRE/g

3.3.1.4 วิธีการสกัดสารประกอบ Flavonoid ในกลุ่ม Isoflavone ในถั่วอัลฟัลฟ่า

ชั่งตัวอย่างถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งที่บดละเอียดแล้ว 5 กรัม เติมสารสกัด 80 เปอร์เซ็นต์ของเมทานอล จำนวน 50 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการสกัด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้เขย่าสำหรับการ

สกัดสาร 150 รอบต่อนาที จากนั้นเมื่อครบเวลาในการสกัดนำมากรองผ่านกระดาษกรอง No. 1 เก็บสารสกัดที่ได้ในขวดปิดฝาสนิท ที่อุณหภูมิ -20 °C รอนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.3.1.4.1 วิธีการวิเคราะห์สารประกอบ Flavonoid ในกลุ่ม Isoflavone โดยเครื่อง HPLC-DAD

การวิเคราะห์สารประกอบ flavonoid โดยใช้เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu LC-20AC pumps (SPD-M20A กับ diode array detector และใช้คอลัม LUNA C-18 (4.6 x 250 nm i.d., 5 µm)). ก่อนการวิเคราะห์นำตัวอย่างสารสกัดที่ได้กรองผ่านหัวกรองขนาด 0.45 µm แล้วนำลงใส่ขวด vial รอวิเคราะห์สารตัวทำละลายที่ใช้ในการเป็นตัวนำพา (mobile phase) ประกอบด้วย 3 เฟส คือ เฟส A ใช้น้ำ DI (อัตราส่วน 50%) เฟส B ใช้อะซีโตนไนไตร (อัตราส่วน 10%) และ เฟส D ใช้ 1% กรดอะซีติกในน้ำ DI (V/V) (อัตราส่วน 40%) โดยการตั้งค่าในการวิเคราะห์จะใช้แบบไอโซเครติก โดยฉีดสารวิเคราะห์จำนวน 20 ไมโครลิตร ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ที่ระยะเวลาในการวิเคราะห์ 30 นาที และทำการตรวจวัดค่าที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับระยะเวลาของสารมาตรฐานที่ใช้ (genestein) (Akitha Devi et al., 2009)

3.3.1.4 การเตรียมการสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโน (Thiele et al., 2012)

สุ่มตัวอย่างถั่วอัลฟัลฟ่าหลังบดผ่านตะแกรงให้ละเอียดเป็นผงมาแล้ว 100 กรัม พร้อมจดบันทึก และทำการเตรียมตัวทำละลายด้วยสารละลายระหว่างกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และเอทานอล (Ethanol) อัตราส่วน 1:1 (V/V) จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.5 โมลาร์จากนั้นเติมตัวทำละลายดังกล่าวลงในตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสารสกัดชั้นบนจะถูกแยกออกมาเพื่อนำไปวิเคราะห์หากรดอะมิโนต่อไป

3.3.1.4.1 การวิเคราะห์ LCMS/MS (Nimbalkar et al., 2012)

ระบบการวิเคราะห์ LC–MS-MS ประกอบไปด้วยเครื่องรุ่น Shimadzu LCMS-8030 ชนิด triple-quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) ระบบปฏิบัติการในโหมด ESI (electrospray ionization) และระบบ HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) ซึ่งประกอบด้วยดีแก๊สเซอร์ ปั๊มสองตัวคอลัมน์โอเวนและออโต้แซมเปิล

3.3.1.4.2 สภาวะในการวิเคราะห์

Gradient eluent ถูกปฏิบัติงานโดยคอลัมน์คัพเปิล InertSustain® C-18 (2.1× 150 mm, 3 µm) with การ์ดคอลัมน์ InertSustain® C-18 (2.1 × 10 mm, 3 µm) โมบายเฟสมี 2 ชนิด คือ โมบายเฟส A ประกอบไปด้วยน้ำกลั่นผสมกับกรดฟอร์มิก 0.1% ชนิด B ประกอบไปด้วย สารละลายระหว่างเมทานอลและน้ำผสมกันในอัตราส่วน 50:50 โดยผสมกับกรดฟอร์มิก 0.1% เช่นกัน ซึ่งอัตราการไหลของโมบายเฟสนั้นตั้งค่าไว้ที่ 0.2 มล./นาที การไล่ระดับโมบายเฟส B เริ่มต้น 0-1.0 นาที/2% (V/V) ตามมาด้วย 1-10 นาที/2–80% (V/V) นาทีที่ 10-12 / 80% (V/V) นาทีที่12–13/80–2% (V/V) และ 12–15 นาที/2% (V/V) เงื่อนไขเริ่มต้น (20% eluent B) เตาอบคอลัมน์ถูกตั้งไว้ที่ 38 ° C เครื่องออโตแซมเปิลทำงานที่

อุณหภูมิ 4 °C และเข็มออโต้แซมเปิลถูกล้างก่อนและหลังการฉีดตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเป็นสารล้างก๊าซ nebulizing และก๊าซแห้งเป็นไนโตรเจนที่อัตราการไหล 3.0 และ 15.0 ลิตร/นาที; ion source voltage 4.5 kV; อุณหภูมิ DL คือ 250°C; และอุณหภูมิบล็อกความร้อนเท่ากับ 400°C; multiple reaction monitoring (MRM) ดังแสดงในตาราง Table of MRM conditions for amino acid on LCMS/MS (ภาคผนวก) : โดยอาร์กอนเป็นแก๊สที่เกิดจากการชน (CID) ที่แรงดัน 230 kPa แรงดันไฟฟ้าของเครื่องตรวจจับตั้งไว้ที่ 1.72 kV

3.3.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในถั่วอัลฟัลฟ่า

3.3.2.1 การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยสารต้านอนุมูลอิสระเสถียร DPPH โดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay (Wanyo et al., 2016)

1 เตรียม 2,2 diphemyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมล โดย 0.004% DPPH ละลายในเมทานอล เก็บไว้ในขวดสีชา

2 ทดสอบตัวอย่างสารสกัดโดยดูดสารสกัดอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ในหลอด จากนั้นปิเปตสารละลาย DPPH ที่เตรียมไว้ใส่หลอดที่ใส่สารสกัดตัวอย่างไปแล้วหลอดละ 3 มิลลิลิตร เพื่อให้ทำปฏิกิริยากัน แล้วทำการเขย่า ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็น blank จำนวน 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้น แต่ละตัวอย่างแล้วนำมาแทนค่าในสูตรหาประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในพืชตัวอย่าง ที่นำมาทดสอบ

$$\%\,\text{radical scavenging} = \frac{(A_{DPPH} - A_{SAMPLE}) \times 100}{A_{DPPH}}$$

เมื่อ A_{DPPH} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่าง

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

3.3.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing/antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงจากวิธีของ Wanyo et al., 2016

เตรียมสารละลาย FRAP reagent ซึ่งเตรียมได้จากการนำ acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมล (pH 3.6) จำนวน 100 มิลลิลิตร สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลละลายใน HCl ความเข้มข้น 40 มิลลิโมล จำนวน 10 มิลลิลิตร สารละลาย $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล ในอัตราส่วน 10:1:1 และ เติมน้ำกลั่น 12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์เริ่มจากการนำสารละลาย FRAP reagent จำนวน 1.8 มิลลิลิตร น้ำกลั่น จำนวน 180 ไมโครลิตร และสารสกัดจำนวน 60 ไมโครลิตร หรือสารละลายมาตรฐาน ใส่ในหลอดทดลองนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

593 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง เป็น blank แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ เพื่อหาความสามารถในการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การทำกราฟมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ นำสารละลาย FRAP reagent จำนวน 1.8 มิลลิลิตร น้ำกลั่น จำนวน 180 ไมโครลิตร ปิเปตสารละลาย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ในแต่ละความเข้มข้น (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิโมล) อย่างละ 60 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

3.3.2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจากวิธีของ Daiponmak et al. (2014).

อนุมูล $ABTS^{\square+}$ เตรียมโดยการทำปฏิกิริยาของ 7 mM ABTS ในสารละลาย 2.45 mM potassium persulfate ตั้งในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง นำสารละลายอนุมูล $ABTS^{\square+}$ ที่เตรียมได้มาเตรียมให้อยู่ในรูป working solution ที่มีความเข้มข้นพอเหมาะโดยการเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm เท่ากับ 0.7 ± 0.02 จากนั้นสารละลาย Working solution 1 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับสารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 734 โนเมตร คำนวณ % inhibition

$$\% \text{ inhibition} = (A_{ABTS} - A_{sample} / A_{ABTS}) \times 100$$

โดย A_{ABTS} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่ไม่มีตัวอย่าง

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, อาคารเครื่องมือ 1, 9 และ 10 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

ห้องปฏิบัติการด้านเคมีวิเคราะห์ ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ฯ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่วันที่ 1 พฤศจิกายน 2561 ถึง 30 กันยายน 2562

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีและจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบ

Month (2018-2019)	Fat %	Protein %	Lactose %	SNF %	TS %	SCC $\times 10^3$ cell/cm3
August	4.05	2.84	4.45	7.98	11.92	464.75
September	4.52	3.02	4.65	8.36	12.80	513.00
October	4.11	3.14	4.49	8.56	12.69	342.40
November	4.32	2.82	4.21	8.10	12.40	301.10
December	4.45	3.03	4.76	8.48	12.84	352.41
January	4.33	3.06	4.53	8.56	12.85	280.16
February	4.63	3.00	4.79	8.49	13.04	268.58
March	4.30	3.03	4.88	8.61	12.82	205.99
April	4.43	3.05	4.67	8.42	12.76	143.24
May	4.37	2.99	4.75	8.44	12.71	153.10
June	4.12	2.95	4.38	8.02	12.03	466.11
July	4.25	3.14	4.49	8.58	12.83	345.60
August	4.03	2.93	4.55	8.07	11.98	394.15

SNF = solid not fat, TS = total solid และ SCC = somatic cell count (หน่วย cell/cm^3 = เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเชี่ยนสายเลือดมากกว่า 87.5 เปอร์เซ็นต์ ในระยะให้นม จำนวน 97 ตัว จากถังรวบรวมน้ำนมดิบฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในภาวะปกติที่โคได้รับอาหารข้น 21 เปอร์เซ็นต์โปรตีน ร่วมกับหญ้าสดคุณภาพดี (ไม่มีการให้พืชวงศ์ถั่วเป็นอาหาร) พบว่า เปอร์เซ็นต์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมดิบ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ไขมันนม เปอร์เซ็นต์โปรตีนนม เปอร์เซ็นต์แล็คโตส เปอร์เซ็นต์ของเนื้อนมไม่รวมมันเนยและเปอร์เซ็นต์ของแข็งรวมในนมในรอบ 1 ปี มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.30, 3.00, 4.58, 8.36 และ 12.59 ตามลำดับ ขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 325.43 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมโคดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานการรับซื้อน้ำนมโค พ.ศ. 2558 ที่เริ่มมีผลบังคับใช้ ณ วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558 ตามประกาศคณะกรรมการโคนมและผลิตภัณฑ์นม เรื่อง 2558 มาตรฐานการรับซื้อน้ำนมโค พ.ศ. 2558 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งใกล้เคียงกับ

Srisaikham et al. (2017) รายงานว่า องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมจากถังรวบรวมน้ำนมดิบฟาร์มโคนมมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้รับอาหารข้น 21 เปอร์เซ็นต์โปรตีน ร่วมกับหญ้าสดในช่วงเดือนสิงหาคมจนถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 รวมระยะเวลา 4 เดือน มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ไขมันนม เปอร์เซ็นต์โปรตีนนม เปอร์เซ็นต์แล็คโตส เปอร์เซ็นต์ของเนื้อนมไม่รวมมันเนยและเปอร์เซ็นต์ของแข็งรวมเท่ากับ 4.12, 3.03, 4.52, 8.40 และ 12.52 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เปอร์เซ็นต์ของเนื้อนมไม่รวมมันเนยในเดือนสิงหาคม พฤศจิกายน พ.ศ. 2561 และเดือนมิถุนายน สิงหาคม ในปีพ.ศ. 2562 น้อยกว่า 8.25 ซึ่งเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของน้ำนมโคที่ใช้เป็นเกณฑ์พิจารณาด้านราคา กำหนดไว้ว่า น้ำนมโคที่มีเปอร์เซ็นต์ของเนื้อนมไม่รวมมันเนยน้อยกว่า 8.25 จะถูกหักราคารับซื้อน้ำนมลง 0.40 บาทต่อกิโลกรัม และมีเพียงเดือนกันยายน พ.ศ. 2561 ตรวจพบจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่าปกติ ซึ่งราคาน้ำนมจะถูกหักลดลง 0.20 บาทต่อกิโลกรัม ตามเกณฑ์มาตรฐานการรับซื้อน้ำนมโค พ.ศ. 2558

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมนั้นจะสัมพันธ์กับการได้รับโภชนะต่างๆ ในอาหาร ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ Conjugated linoleic acid (CLA) ในน้ำนม โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมโคจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกเดือนๆ ละ 1 ครั้งๆ ละ 24 ตัว ในรอบ 1 ปี ของวิศิษฐิพรและพิพัฒน์ (2549) พบว่า การได้รับ linoleic acid และ linolenic acid มีความสัมพันธ์ต่อการผลิต CLA ในน้ำนมโคสูง ($R = 0.59, 0.52$ และ $R^2 = 0.34, 0.27$ ตามลำดับ) ขณะที่ปัจจัยด้านสัตว์ทดลอง ปัจจัยด้านการให้ผลผลิต สิ่งแวดล้อมและอาหารสัตว์ (อาหารและอาหารหยาบที่ไม่ใช่ linoleic acid และ linolenic acid) ที่นำมาศึกษาพบว่ามีความสัมพันธ์ค่อนข้างต่ำต่อปริมาณ CLA ในน้ำนม โดยปกติแล้วไขมันในน้ำนมจะถูกสังเคราะห์จากไขมันที่โคได้รับจากอาหารเป็นส่วนใหญ่ กับไขมันที่โคดึงเอามาใช้จาก Body reserve ในส่วนของ adipose tissue อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่โคนมได้รับไขมันจากอาหารเพียงพอต่อความต้องการแล้ว การนำไขมันจาก adipose tissue มาใช้จะมีปริมาณน้อยมาก และถ้าไขมันที่มีอยู่ในอาหารเป็นไขมันชนิดใด ไขมันในน้ำนมก็จะเป็นเช่นเดียวกับที่มีอยู่ในอาหาร เช่น ถ้าโคนมได้รับ unsaturated fatty acid จากอาหารมาก ในน้ำนมก็จะมี unsaturated fatty acid มากด้วย และชนิดของ fatty acid ในน้ำนมจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับชนิดของ fatty acid ในอาหารที่โคได้รับ (Holmes and Wilson, 1984) สอดคล้องกับ Thanh and Suksombat (2015)

ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมนั้นจะสัมพันธ์กับการได้รับโภชนะต่างๆ ในอาหารเป็นสำคัญ แต่ยังมีปัจจัยด้านพันธุ์ สายพันธุ์ อายุ จำนวนครั้งของการรีดนม ระยะตั้งท้อง และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อม (สภาพภูมิอากาศ การเลี้ยงดูและการจัดการรีดนม) ยังเป็นสาเหตุโน้มนำให้ผลผลิตและองค์ประกอบของน้ำนม (Factors effecting yield and composition of milk) เปลี่ยนแปลงไปตลอดระยะเวลาในการให้น้ำนมได้เช่นกัน โดยเปอร์เซ็นต์ไขมันและโปรตีนจะเป็นปฏิภาคกลับกับผลผลิตน้ำนม ส่วนเปอร์เซ็นต์ไขมันและโปรตีนจะลดลงต่ำสุด เมื่อปริมาณน้ำนมถึงจุดสูงสุด และจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะการให้นมผ่านไปเรื่อยๆ ซึ่งหมายถึงปริมาณน้ำนมนั้นจะลดลงด้วยเช่นกัน ขณะที่ lactose ค่อนข้างจะคงที่โดยจะลดลง

ทันทีละเล็กน้อยตลอดระยะการให้น้ำนม แต่ปริมาณของแข็งที่พบจะเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย (วิศิษฐิพรและพิพัฒน์, 2549)

ลักษณะทางพันธุกรรมเป็นหนึ่งในสมการที่ใช้กำหนดลักษณะที่ปรากฏหรือลักษณะที่แสดงออกมา (คือ ฟีโนไทป์ (phenotype)) โคพันธุ์ที่แตกต่างกันจะให้องค์ประกอบของน้ำนมและผลผลิตที่แตกต่างกันออกไป จะเห็นได้ว่าโคนมพันธุ์ Holstein ให้ผลผลิตน้ำนมในปริมาณมากกว่าโคนมพันธุ์ Jersey ประมาณ 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ แต่จะให้ปริมาณไขมันและโปรตีนต่ำกว่า นอกจากนี้สีของไขมันในน้ำนมของโคนมพันธุ์ Holstein และโคนมพันธุ์ Jersey ยังมีความแตกต่างกัน โดยไขมันนมของโคนมพันธุ์ Jersey จะมีสีเหลือง (Ensminger, 1992) และมีไขมันนมที่สูงถึง 4.8 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับข้อมูลปริมาณไขมันในน้ำนมดิบที่ได้จากโคนมลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเชี่ยนสายเลือดมากกว่า 87.5 เปอร์เซ็นต์ ในครั้งนี้ ในระหว่างการเลี้ยงโค หากโคเข้าสู่วงรอบของการเป็นสัดหรือตั้งท้อง จะส่งผลให้ผลผลิตของน้ำนมโคโดยรวมลดลง เนื่องจากอิทธิพลของฮอร์โมนและปริมาณการกินอาหารของสัตว์ลดลง หลังจากนั้นผลผลิตของน้ำนมจะคืนสู่ภาวะปกติ อย่างไรก็ตาม Larson (1985) รายงานว่า ผลผลิตน้ำนมของโคที่มีประวัติให้ลูกทุกปี หรือมีระยะการตกลูกสม่ำเสมอสามารถให้ผลผลิตตลอดอายุได้มากกว่า อ้างโดยวิศิษฐิพรและพิพัฒน์ (2549)

นอกจากนี้ ยังคงมีปัจจัยหนุนนำจากสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องทั้งทางตรงและทางอ้อมทำให้ผลผลิตและองค์ประกอบของน้ำนมแตกต่างกันออกไป อาทิเช่น อาหาร สภาพภูมิอากาศ ฤดูกาล การจัดการเลี้ยงดู โรคและการดูแลรักษา เป็นต้น ชนิดของอาหาร ระดับและวิธีการให้อาหารมีผลต่อปริมาณน้ำนมที่ผลิตได้ หากโคได้รับโภชนะต่ำกว่าปกติจะมีผลให้ปริมาณน้ำนมและน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมลดลงอย่างเห็นได้ชัด และหากโคได้รับโภชนะสูงกว่าปกติน้ำนมจะสูงขึ้นแต่ไม่มากนัก ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนไปของไขมันในน้ำนมที่มีผลมาจากสูตรอาหารโคนั้นมักไม่ปรากฏ เนื่องจากโดยทั่วแล้วไขมันที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารโคนมจะไม่เกินกว่า 3-4 เปอร์เซ็นต์ แต่การที่อาหารโคมีส่วนผสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่ได้จากน้ำมันตับปลาในปริมาณมาก ส่งผลต่อการลดลงของไขมันน้ำนม โดยไม่ส่งผลต่อปริมาณน้ำนมที่ผลิตได้ (Holmes and Wilson, 1984) อย่างไรก็ตาม ไขมันในน้ำนมจะเป็นชนิดเดียวกันกับไขมันที่มีอยู่ในอาหาร หากโคได้รับอาหารที่มีไขมันที่เพียงพอทั้งปริมาณและคุณภาพต่อความต้องการของร่างกายแล้ว การนำไขมันจาก adipose tissue มาใช้จะมีปริมาณน้อยมาก ฉะนั้น การให้อาหารหยาบในปริมาณต่ำจะมีผลทำให้ไขมันในน้ำนมลดลงตามไปด้วย สำหรับอาหารหยาบนั้นจัดเป็นอาหารหลักและมีความสำคัญมากสำหรับโคนม ซึ่งจะมีปริมาณเยื่อใย (fiber) ที่ประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เพกติน (pectin) และลิกนิน (lignin) เป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง และมีการย่อยได้ต่ำ เนื่องจากส่วนใหญ่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืช (cell wall) อาหารหยาบประเภทเยื่อใยส่วนใหญ่ ได้แก่ พืชวงศ์หญ้า พืชวงศ์ถั่ว และผลพลอยได้ทางการเกษตร (crop residue) ต่างๆ เช่น ฟางข้าว ต้นและเปลือกข้าวโพด เป็นต้น อาหารหยาบเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์ภายในกระเพาะหมัก (rumen) เพื่อหมักย่อยจนได้ผลผลิตสุดท้าย คือกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) ซึ่งจัดเป็นแหล่งพลังงานหลักสำหรับโคนม นอกจากนี้ยังช่วยในการรักษาสภาพสมดุลและนิเวศวิทยาที่เหมาะสมภายในกระเพาะหมัก กระตุ้นและส่งเสริม

การบดเคี้ยวอาหาร การหลั่งน้ำลาย การเคี้ยวเอื้อง การพัฒนากระบวนการหมักในกระเพาะหมัก และเมื่อโคนมได้รับอาหารเยื่อใยอย่างเพียงพอ จะส่งผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต การให้ผลผลิตและมีสุขภาพที่ดี นอกจากนั้น ปริมาณไขมันในน้ำนมจะลดลงตามขนาดของอาหาร (particle) หยาบ (เล็กว่า 1/8 นิ้ว) (Dhiman et al. 1995) และอาหารที่ผ่านการ Treat ด้วยความร้อน อ้างโดยวิศิษฐิพรและพิพัฒน์ (2549)

ฟาร์มโคนมมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีมีระยะพักการให้น้ำนม (Dry Period) ไม่เกิน 60 วันตรงตามหลักการทั่วไป ทำให้ผลผลิตและองค์ประกอบน้ำนมที่ได้ยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ ส่วนหนึ่งเกิดจากโคจะนำเอาอาหารที่สะสมไว้ในร่างกายมาสร้างเป็นองค์ประกอบของน้ำนม ฉะนั้นในโคที่คลอดลูกและมีระยะเวลาพักการให้นมที่เหมาะสม จะทำให้สภาพร่างกายของโคฟื้นตัวและสมบูรณ์ซึ่งจะทำให้โคสามารถผลิตน้ำนมได้สูงสุด ซึ่งประมาณได้ว่าไขมันที่สะสมไว้จำนวน 100 กิโลกรัม ในร่างกาย สามารถให้พลังงานในการผลิตน้ำนม 880 กิโลกรัม (Nickerson, 1995) และยังมีผลทำให้เกิดการสร้างเซลล์กลั่นสร้างน้ำนมขึ้นมาทดแทนเซลล์กลั่นสร้างน้ำนมเดิม อย่างไรก็ดีฟาร์มโคนมแต่ละแห่งอาจจะสามารถทำได้หรือไม่ขึ้นอยู่กับการจัดการ เพราะการพักการให้น้ำนมนานเกินไป จะมีผลทำให้ผลผลิตของน้ำนมทั้งหมดลดลง (Smith and Dodd, 1966) สำหรับการปฏิบัติต่อโคในขณะรีดนม จำนวนครั้งของการรีดนมในแต่ละวัน และความยาวนานของการรีดนม ล้วนมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงไปของปริมาณและองค์ประกอบในน้ำนมเช่นกัน ฟาร์มโคนมมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้รับการรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตร การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มเลี้ยงโคนม (มกษ 6402-2552) จากกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ซึ่งมีจำนวนครั้งของการรีดนมแต่ละวันปกติจะมีการรีดนม 2 ครั้งต่อวัน (เช้า-เย็น) ถึงแม้ว่าจำนวนความถี่ในการรีดนม 3-4 ครั้งต่อวันจะส่งผลดีต่อโคที่ให้ผลผลิตสูง แต่ในความเป็นจริงเป็นเรื่องที่จัดการได้ยากในฟาร์มของเกษตรกรรายย่อยและรายกลาง เนื่องจากเป็นการเพิ่มภาระและแรงงาน (Intensive labor) จึงไม่นิยมในทางปฏิบัติ นอกจากนี้ผลผลิตและปริมาณไขมันในน้ำนมลดลงอาจเกิดขึ้นได้จากการรีดนมไม่หมดเต้า (Incomplete milking) หรือโคเกิดอาการตกใจขณะทำการรีดนมด้วย สาเหตุมาจากน้ำนมที่ตกค้างอยู่ในเต้าเป็นน้ำนมที่มีปริมาณไขมันสูง (8 – 15 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับน้ำนมรีดออกมาครั้งแรกๆ และน้ำนมที่ค้างเต้าเป็นเวลาหลายวันจะทำให้ผลผลิตน้ำนมลดลงและปริมาณไขมันเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.2 สารประกอบฟีนอลิคในน้ำนมดิบ

สารประกอบฟีนอลิค	**(µg/g DW)**	**(µg/ml)**
Gallic acid	78.61±0.84	53.09±0.96
Chlorogenic acid	5.88±0.06	3.97±0.01
p-Coumaric acid	6.04±0.02	4.08±0.04

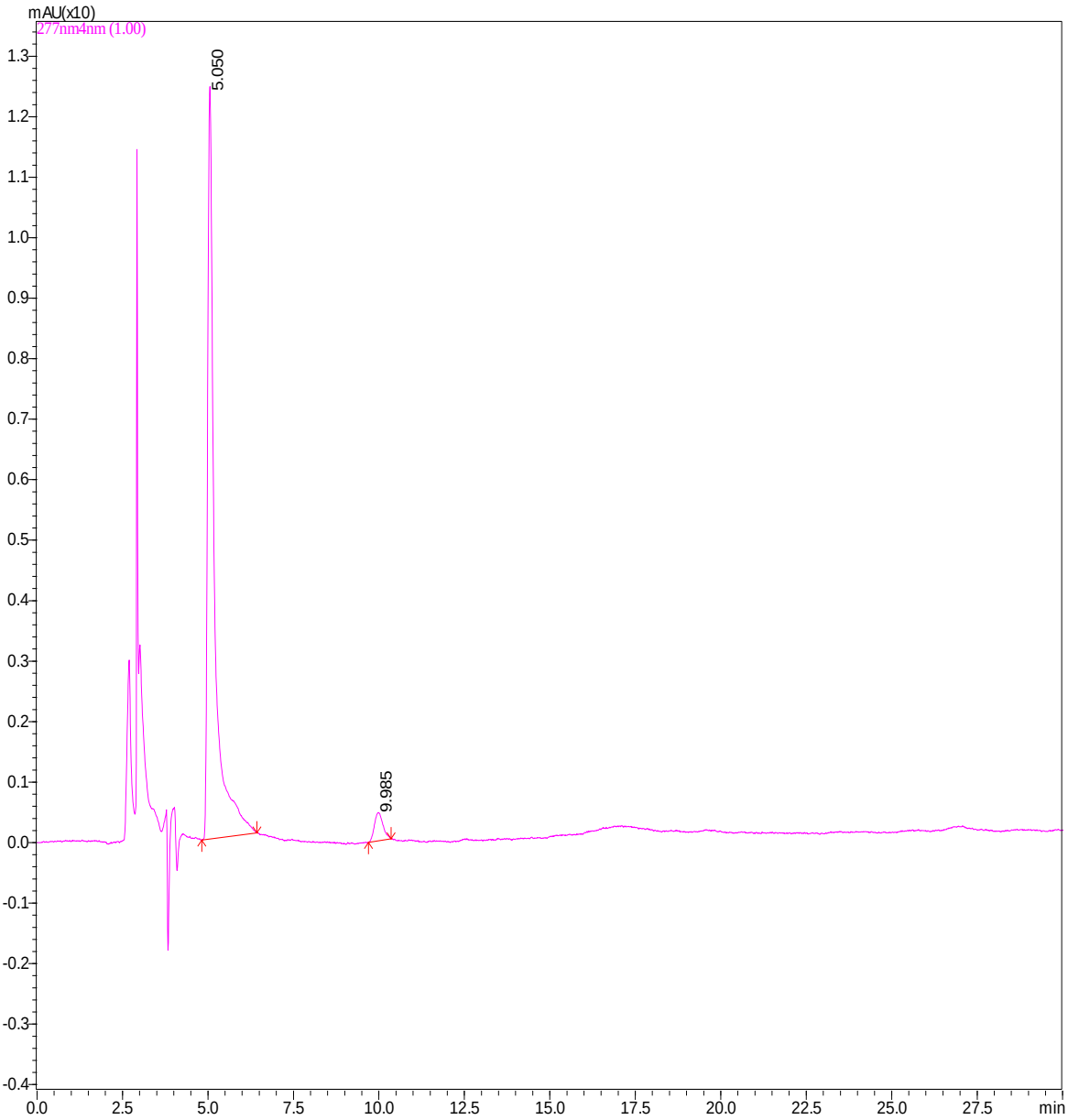
ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\overline{X}$ ±SD) (n = 3)

ตารางที่ 4.3 สารประกอบฟลาโวนอยด์ในน้ำนมดิบ

สารประกอบฟลาโวนอยด์	(µg/g DW)	(µg/ml)
Myricetin	29.69±4.71	19.92±3.20
Luteolin	109.75±4.05	74.11±2.18

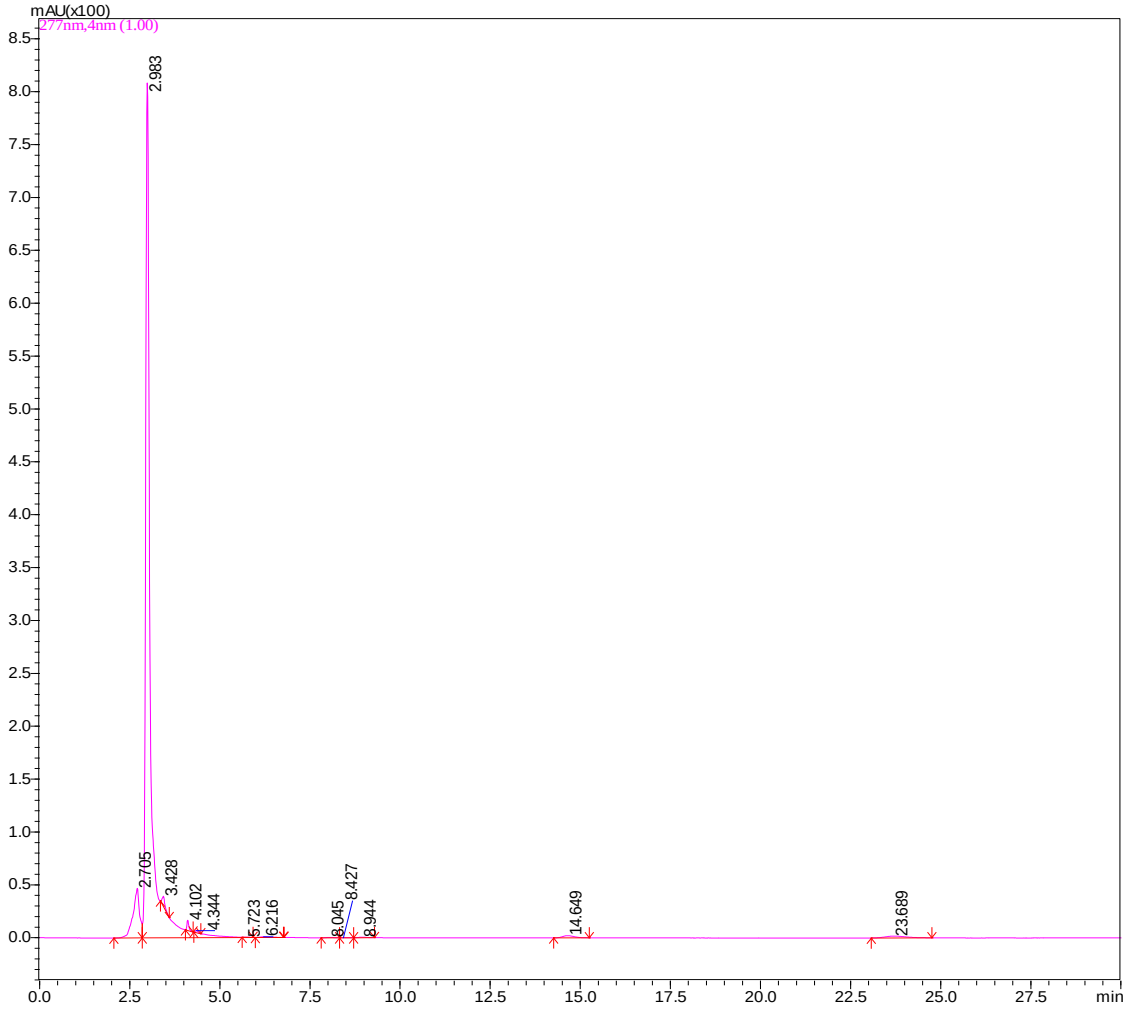
ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\overline{X}$ ±SD) (n = 3)

ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานไอโซฟลาโวนในรูปอนุพันธ์ของ Genistein และ Daidzein



หมายเหตุ: Retention time (rt) ของ Genistein = 5.050 นาที, Daidzein = 9.985 นาที

ภาพที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ไอโซฟลาโวนไอโซฟลาโวนในรูปอนุพันธ์ของ Genistein และ Daidzein ในตัวอย่างน้ำนมดิบ



จากการศึกษาพบว่า ปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบ Phenolic, Flavonoids, Isoflavone ที่มีในน้ำนมดิบที่ผลิตในภาวะปกติของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเชี่ยนสายเลือดมากกว่า 87.5 (Crossbred Holstein-Friesian (>87.5% Holstein)) ในระยะให้นมที่ได้รับอาหารข้น 21 เปอร์เซ็นต์โปรตีนร่วมกับหญ้าสด มีค่าของ Phenolic กลุ่ม Gallic acid เท่ากับ 78.61±0.84 µg/g DW (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) หรือเท่ากับ 53.09±0.96 µg/ml (ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร), Chlorogenic acid เท่ากับ 5.88±0.06 µg/g DW หรือ 3.97±0.01 µg/ml และ p-Coumaric acid เท่ากับ 6.04±0.02 µg/g DW หรือ 4.08±0.04 µg/ml ค่าของสารประกอบ Flavonoids ในน้ำนมดิบพบ 2 ชนิดคือ Myricetin เท่ากับ 29.69±4.71 µg/g DW หรือ 19.92±3.20 µg/ml และ Luteolin เท่ากับ 109.75±4.05 µg/g DW หรือ 74.11±2.18 µg/ml และไม่พบปริมาณความเข้มข้นของ Isoflavone ในรูปอนุพันธ์ของ Genistein และ Daidzein ในตัวอย่างน้ำนมดิบครั้งนี้ แตกต่างจากผลการวิเคราะห์ปริมาณ Isoflavone รวมในน้ำนมที่ผลิตได้จากแม่โคนมลูกผสม Holstein-Friesian ระยะรีดนมในภาวะปกติที่ได้รับสูตรอาหารอาหารข้นโคนม 21 เปอร์เซ็นต์โปรตีน และอาหารหยาบ

ตามโปรแกรมอาหารของงานโคนมฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จำนวน 24 ตัว ระยะเวลาในการเลี้ยง 28 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 38.720 µg/L (ภคนิจ และศจีรา, 2556) ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจพบปริมาณความเข้มข้นของ Isoflavone ของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ (อาหารข้นโคนม 21 เปอร์เซ็นต์โปรตีน) ซึ่งประกอบไปด้วย Daidzin, Genistin, Daidzein, Genistein และ Equol เท่ากับ 187.279 ppm, 200.613 ppm, 196.524 ppm, 192.635 ppm และ 145.625 ppm ตามลำดับ และเมื่อคิดเป็นปริมาณความเข้มข้นของ Isoflavone รวมจะมีค่าเท่ากับ 922.676 ppm

โดยทั่วไปแล้ว ธรรมชาติของวัตถุดิบอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้นจะมีส่วนประกอบของถั่วเหลืองหรือผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองเสมอ เนื่องจากมีระดับโปรตีนสูงและเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี สามารถทดแทนเนื้อสัตว์ได้ เนื่องจากมีทั้งชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) ที่สมดุลมากกว่าถั่วชนิดอื่น (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2562) จึงมีผลต่อปริมาณความเข้มข้นของ Isoflavone ที่จะตรวจพบ สาร Isoflavone ที่พบในถั่วเหลืองคือ daidzein และ genistein ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่มีคุณสมบัติดีต่อสุขภาพและเป็น phytoestrogen (รัชฎาพร, 2556) ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง (Estrogen, 17b-estradiol E2 Isoflavones) โดยอาหารอาหารข้นโคนม 21 เปอร์เซ็นต์โปรตีนครั้งนี้ประกอบไปด้วยวัตถุดิบอาหารที่เป็นแหล่งพลังงานและโปรตีนดังนี้ มันเส้น, กากมันสำปะหลังแห้ง, กากถั่วเหลือง, รำอ่อน, กากน้ำตาล, กากปาล์ม, ยูเรีย, แร่ธาตุ P16 พรีมิกซ์ และสารแต่งกลิ่น ภคนิจ และศจีรา (2556) รายงานว่า กากถั่วเหลือง (soybean meal: SBM) มีปริมาณความเข้มข้นของ Isoflavone ในรูปอนุพันธ์ของ Daidzin, Genistin, Daidzein, Genistein, Equol และ Isoflavone รวมเท่ากับ 58.296 ppm, 61.072 ppm, 55.877 ppm, 52.906 ppm, 28.302 และ 256.452 ppm ตามลำดับ

การวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของ Isoflavone ในวัตถุดิบอาหารอาหารสัตว์และในน้ำนมของ ภคนิจ และศจีรา (2556) รายงานการสกัดไว้ตามวิธีของ Zafra-Gomez et al. (2010) แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในรูปอนุพันธ์ของ Glycoside (Daidzin, Genistin) และ Aglycone (Daidzein และ Genistein), Equol แตกต่างจากวิธีการสกัดและวิธีการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของ Isoflavone ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งดัดแปลงการสกัดน้ำนมดิบตามวิธีของ Li et al. (2009) และ Vázquez et al. (2015) แล้ววิเคราะห์สารประกอบ Flavonoid ในกลุ่ม Isoflavone ด้วยเครื่อง HPLC-DAD ดังแสดงไว้ที่ข้อ 3.2.2 ในบทที่ 3 นอกเหนือจากจำนวนโคนมที่เก็บตัวอย่างน้ำนม ช่วงเวลา ระยะเวลาองค์ประกอบที่ผันแปรไปตามการจัดสูตรอาหารของฟาร์ม ในแต่ละรอบ (lot) ที่ต่างกันมากแล้ว ยังมีความเป็นไปได้ส่วนหนึ่งว่าค่าความเข้มข้นของ Isoflavone ที่ไม่สอดคล้องกันจาก 2 การศึกษาในสภาพแวดล้อมเดียวกันนั้น อาจมาจากวิธีการสกัดและวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับรัชฎาพร (2556) พบว่า สารประกอบ total phenolic, flavonoid, daidzein และ genistein ของสารสกัดจากถั่วเหลือง ถั่วขาว ถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักและถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน จะให้ค่าความเข้มข้นของสารประกอบดังกล่าวที่ต่างกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่นำมาใช้สกัดด้วยเอทานอล (ethanol) จะสามารถช่วยส่งเสริมการให้ค่าของพบว่า สารประกอบ total phenolic, flavonoid, daidzein และ genistein สูงขึ้นกว่าการใช้ตัวทำละลายที่นำมาใช้สกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบทางเคมีของอัลฟัลฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ด (Mean ± SD)

Item	ADP[1]	ADP[2]	ADP[3]	ADP ($\bar{x}$)
DM (%)	96.92±0.08	97.16±0.05	95.52±0.08	96.53
CP (%)	18.22±0.07	18.72±0.07	17.57±0.12	18.17
EE (%)	1.62±0.03	1.65±0.03	1.81±0.05	1.69
Ash	17.08±0.22	16.04±0.21	14.54±0.12	15.89
AIA	5.41±0.03	5.37±0.08	5.44±0.08	5.41
CF (%)	24.16±0.08	24.81±0.10	26.13±0.04	25.03
NDF (%)	39.51±0.12	39.43±0.09	38.91±0.11	27.30
ADF (%)	31.12±0.06	30.97±0.03	31.25±0.08	31.11
ADL (%)	6.81±0.03	5.87±0.02	5.53±0.03	6.07
พลังงานรวม (Calorie/g)	3,350±9.87	3,340±11.43	3,450±10.09	3,380
CT (mg CE/ml)	3.15±0.12	3.36±0.12	3.27±0.12-	3.26

หมายเหตุ: ADP = Alfalfa dehydrated pellet: ADP[1] = Alfalfa dehydrated pellet in January 2019 ,ADP[2] = Alfalfa dehydrated pellet in March 2019, ADP[3] = Alfalfa dehydrated pellet in June 2019, DM= Dry matter, CP= Crude protein, EE= Ether extract, AIA= Acid insoluble ash, NDF=Neutral-detergent fiber, ADF = Acid-detergent fiber, ADL=Acid-detergent lignin และ CT = Condensed tannins (mg catechin equivalent (CE)/ml sample)

องค์ประกอบทางเคมีของอัลฟัลฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดจากการสุ่มตัวอย่างในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2562, ADP[2] ช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ.2562 และ ADP[3] ช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ.2562 ในตารางที่ 4.4 มีค่าเฉลี่ย DM, CP, EE, ash, AIA, CF, NDF, ADF, ADL, ค่าพลังงานรวม และ condensed tannin (CT) เท่ากับ 96.53, 18.17, 1.69, 15.89, 5.41, 25.03, 27.30, 31.11, 6.07 เปอร์เซ็นต์, 3,380 แคลอรี่/กรัม และ 3.26 mg CE/ml ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าอัลฟัลฟ่าชนิดแห้ง ขณะที่ Collins (1998) รายงานว่า อัลฟัลฟ่ามีเปอร์เซ็นต์โปรตีนเท่ากับ 16, NDF เท่ากับ 49 เปอร์เซ็นต์, ADF เท่ากับ 34 เปอร์เซ็นต์ และ lignin เท่ากับ 7 เปอร์เซ็นต์, คุณภาพของ RFV มีค่าอยู่ที่ระดับ 124 ซึ่งอยู่ในช่วงค่ามาตรฐาน RFV ทั่วไปของถั่วอัลฟาฟ่า ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะจะนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง ทั้งนี้การศึกษาคุณค่าทางโภชนะของถั่วอัลฟัลฟ่าในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัดมาก เนื่องจากปลูกได้ยาก ให้ผลผลิตน้อย

ตารางที่ 4.5 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในน้ำนมดิบ

ชนิดกรดอะมิโน	น้ำนมดิบ	
	(µg/g DW)	(µg/ml)
Lysine	7.30±0.13	4.91±0.09
Histidine	6.99±0.15	4.70±0.10
Leucine	3.36±0.14	2.26±0.10
Phenylaline	1.96±0.03	1.32±0.02
Valine	28.74±2.23	19.31±1.50
Tryptophan	1.01±0.02	0.68±0.01
Arginine	2.57±0.10	1.73±0.06
Isoleucine	3.34±0.16	2.24±0.11
Methionine	1.42±0.12	0.96±0.08
Threonine	0.38±0.02	0.25±0.01

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\overline{X}$ ±SD) (n = 3)

ชนิดของกรดอะมิโนที่มีปริมาณของกรดอะมิโน (amino acid) ในน้ำนมดิบที่ผลิตในภาวะปกติ มี Valine สูงสุด ตามด้วย Lysine และตรวจพบ Threonine ต่ำที่สุด กรดอะมิโนที่จำเป็นในนมนั้นคือ เคซีน (casein) และเป็นฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) ที่พบ 80 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำนม ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย อันประกอบไปด้วย Lysine, Tryptophan, Histidine, Phenylalanine, Leucine, Isoleucine, Threonine, Methionine-cystine และ Valine จากการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ข้อมูลระยะเวลา 1 ปี พบว่า ปริมาณของกรดอะมิโนในน้ำนมดิบครั้งนี้มีปริมาณกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงกับ พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา (2562) โดยรายงานว่ากรดอะมิโนชนิด Lysine, Tryptophan, Histidine, Phenylalanine, Leucine, Isoleucine, Threonine, Methionine-cystine และ Valine ในน้ำนมมีค่าเท่ากับ 8.1, 1.6, 2.6, 5.3, 10.2, 7.2, 4.4, 4.3 และ 7.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ปริมาณสารฟลาโวนอยทั้งหมด (Total flavonoid compounds) ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด

Sample	TPC (mg GAE/g sample)	TFC (mg RE/g sample)
Alfalfa dehydrated pellet	2.41	2.26
	2.41	2.27

	2.44	2.21
ค่าเฉลี่ย	2.42	2.25

TPC = Total phenolic content, (TPC was determined in comparison with standard galic acid and the results expressed in terms of mg GAE/g), TFC = Total flavonoid compounds (TFC was determined in comparison with standard rutin and the results expressed in terms of mg RE/g), Alfalfa dehydrated pellet = ถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด,

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ปริมาณสารฟลาโวนอยทั้งหมด (Total flavonoid compounds) ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ดในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.42 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลิคต่อน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g) และ 2.25 มิลลิกรัมสมมูลของรูตินต่อน้ำหนักแห้ง (mg RE/g) การศึกษาข้อมูลที่ผ่านมา พบว่าถั่วอัลฟัลฟ่ามีปริมาณ phenolic content ต่ำ (Kagan et al., 2015) ซึ่งเป็นเพียงข้อมูลของพันธุ์ถั่วอัลฟัลฟ่า (*Medicago sativa*) จำนวนไม่มากนักสำหรับใช้เปรียบเทียบ phenolic content โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณ total phenolic contents ในถั่วอัลฟัลฟ่า 27 พันธุ์จากการศึกษาของ Kagan et al. (2015) โดยการใช้ Folin-Ciocalteu colorimetric assay พบว่า มีปริมาณเท่ากับ 15.8 ± 1.4 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg/g DW) ซึ่งค่ามาตรฐานของฟีนอลิกที่แตกต่างกันจะมีปัจจัยตอบสนองที่แตกต่างกันต่อการวิเคราะห์ colorimetric assay งานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณของ Total phenolic content ในถั่วนั้นแตกต่างกันไปตามชนิดของถั่ว หรือระยะการเจริญเติบโตของถั่ว เช่น ระยะถั่วก่อนงอก (ungerminated legumes) ระยะถั่วที่งอกแล้ว (germinated legumes) หรือถั่วที่ผ่านกระบวนการหมัก หรือแปรรูปโดยผ่านความร้อน (อบแห้ง) สอดคล้องกับเกตุการและหทัยทิพย์ (2560) สกุลกานต์และคณะ (2560 รายงานว่า ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics) มากที่สุด (130.31 mg GAE/ 100 g of DW) และปริมาณสารพฤกษเคมีของเมล็ดพืชที่ผ่านกระบวนการงอกหรือเมล็ดพืชงอก (germinated seed) ก่อนนำมาบริโภคนั้นเป็นแนวทางในการเพิ่มสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ สอดคล้องกับรายงานของอิงฟ้า และคณะ (2552) พบว่า ข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วแดง เมื่อผ่านกระบวนการงอกจะตรวจพบ total phenolics มากขึ้น เช่นเดียวกับ วรัมพร และคณะ (2554) พบว่า ธัญพืชงอกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบลักษณะเช่นนี้ในรายงานของ Suryanti et al. (2016) และ Khang et al. (2016) ที่พบว่าปริมาณ total phenolics จะเพิ่มขึ้นหลังเมล็ดพืชวงศ์ถั่วผ่านกระบวนการงอก (germinated legumes) แล้ว โดยรายงานว่า total phenolic content ของถั่วดำ, ถั่วเขียว, ถั่วลิสง, ถั่ว Adzuki และถั่วขาว ในระยะ ungerminated legumes มีปริมาณเท่ากับ 11.74±0.07, 5.80±0.05, 18.21±0.15, 12.21±0.06, 12.12±0.09, 7.79±0.02 mg GAE/ g^{-1} dry weight ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าถั่วในระยะ germinated legumes

ตารางที่ 4.7 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด

สารประกอบฟีนอลิก	**(µg/g sample)**
Gallic acid (GA)	215.30±3.35
Protocatechuic acid (PCCA)	78.55±1.47
p-Hydroxy benzoic acid (p-OH)	131.03±3.71
Chorogenic acid (ChA)	56.29±3.57
Vanilic acid (VA)	78.79±3.07
Caffeic acid (CFA)	143.58±4.98
Syrigic acid (SyA)	17.22±0.88
p-Coumaric acid (p-CA)	53.91±3.74
Ferulic acid (FA)	142.22±5.69
Sinapic acid (SNA)	18.72±1.98

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\overline{X}$ ±SD) (n = 3)

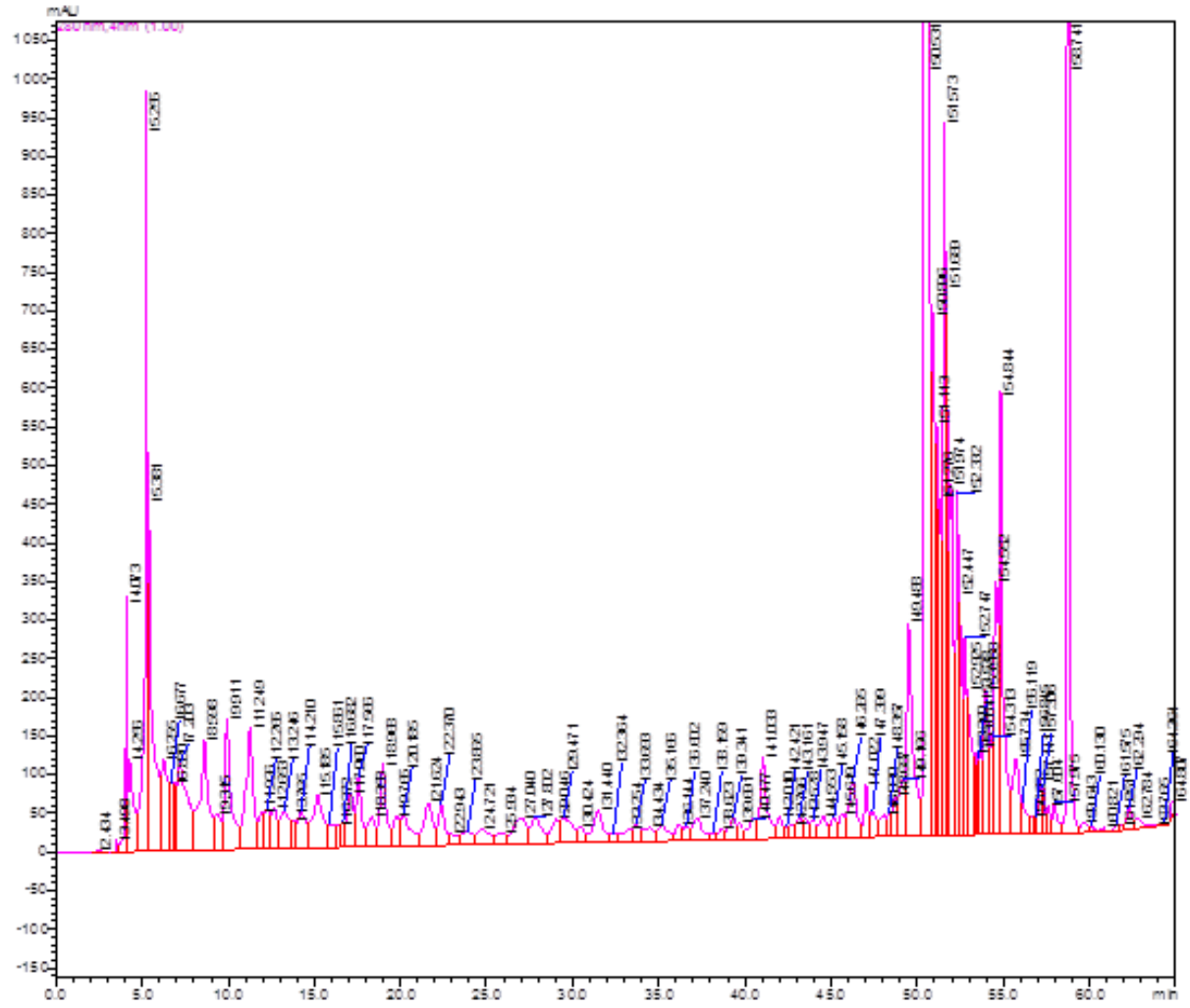
ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ดได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.7 พบว่า ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ดพบ Gallic acid สูงที่สุด และ Syrigic acid น้อยที่สุด ในขณะที่การรายงานของ Wang et al. (2017) ซึ่งศึกษาปริมาณกรดฟีนอลิกและศักยภาพของ allelopathic ในอัลฟัลฟา 10 สายพันธุ์และฤทธิ์ทางชีวภาพ พบปริมาณสูงสุดของ p-Hydroxybenzoic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, cinnamic acid และ total phenolic acids อยู่ในสารสกัดน้ำจากรากถั่วอัลฟัลฟ่า 10 พันธุ์ได้แก่ Hunterriver, Longdong, Aohan, Surprise, Pioneer, Victoria, Post mark, WL-525HQ, WL903 and WL-343HQ จาก Beijing Rytway Eco-technology Co., Ltd. (ดังนี้ WL-525HQ (p-Hydroxybenzoic acid = 13.05 µg/g), WL-525HQ (caffeic acid = 7.23 µg/g), WL-343HQ (chlorogenic acid = 22.97 µg/g), WL-343HQ (p-coumaric acid = 8.35 µg/g), Surprise (ferulic acid = 3.92 µg/g), Longdong (cinnamic acid = 3.10 µg/g) และ Longdong (total phenolic acids = 50.46 µg/g) ตามลำดับ ส่วนถั่วอัลฟัลฟ่าบริเวณ aerial (aerial part of alfalfa) หรือลักษณะของลำต้นที่ไหลหรือเลื้อย (ผ่านอากาศ) พบว่า ปริมาณของกรดฟีนอลิกที่ถูกปล่อยออกมาจากส่วนทางอากาศของอัลฟัลฟ่าอยู่ในช่วง: p-hydroxybenzoic acid (13.62 ถึง 39.18 µg/g), caffeic acid (11.78 ถึง 31.55 µg/g), chlorogenic acid (48.81 ถึง 74.80 µg/g) -coumaric acid (1.56 ถึง 5.96 µg/g), ferulic acid (3.90 ถึง 14.30 µg/g), cinnamic acid (1.32 ถึง 21.86 µg/g), และกรดฟีนอลิกรวม (115.44 ถึง 153.96 µg/g) โดย p-Hydroxybenzoic acid จากถั่วพันธุ์ Surprise, Victoria และ WL-903 มีค่า 39.18, 36.85 และ 35.97 µg/g ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอัลฟัลฟ่าสายพันธุ์อื่น ซึ่งจากการศึกษาทั้งบริเวณรากและลำต้นเลื้อยของถั่วอัลฟัลฟ่าของ Wang et al. (2017) ตรวจไม่พบปริมาณ Gallic acid, Protocatechuic acid, Vanilic

acid, Syrigic acid และ Sinapic acid อาจเนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ถั่วอัลฟัลฟ่า (*Medicago sativa* L.) ถูกเก็บเกี่ยวทั้งต้น (Whole plant) ก่อนนำมาทำให้แห้งแล้วอัดเม็ด จึงทำให้ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ดมีความหลากหลายมากกว่าและและมีปริมาณแตกต่างกันออกไป และจากข้อมูลของ Wang et al. (2017) ยังสนับสนุนอย่างชัดเจนว่า กรดฟีนอลิกของสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ (aqueous extract) ของรากถั่วผันแปรตามชนิดของสายพันธุ์ถั่วด้วยเช่นกัน และการศึกษาวิจัยจำนวนมากได้รายงานความแตกต่างของกรดฟีนอลิกอัลลีโลเคมิคอล (allelochemicals phenolic acids) ในการสกัดจากเนื้อเยื่อต่างๆ ของอัลฟัลฟ่า (Chon and Kim (2002), Sun et al. (2013), Wu et al. (2000) และ Xuan et al. (2003) อ้างโดย Wang et al. (2017)) พบว่า ปริมาณของสารอัลลีโอเคมีที่ถูกปล่อยออกมานั้นแปรผันตามสารประกอบเฉพาะ (specific coumpound) ซึ่งอยู่ในช่วง: p-hydroxybenzoic (2.3 ถึง 18.6 µg/L), vanillic (0.6 ถึง 17.5 µg/L), cis-p-coumaric (0.1 ถึง 4.9 µg/L), syringic (0.0 ถึง 52.7 µg/L), cis-ferulic (0.33 ถึง 12.7 µg/L), trans-p-coumaric (1.5 ถึง 20.5 µg/L) และกรด trans-ferulic (1.6 ถึง 23.4 µg/L) of water/agar

ตารางที่ 4.8 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด

สารประกอบฟลาโวนอยด์	**(µg/g sample)**
Catechin	430.59±6.69
Rutin	42.28±3.58
Myricetin	1378.73±88.84
Luteolin	19.04±0.51
Quercetin	181.28±10.40
Apigenin	2278.27±90.43

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\overline{X}$ ±SD) (n = 3)



ภาพที่ 4.3 โครมาโตรแกรมของสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด

ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ดแสดงไว้ในตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.3 ซึ่งพบว่า Apigenin มีค่าสูงที่สุด คือ 2278.27±90.43 µg/g sample รองลงมาคือ Myricetin 1378.73±88.84 µg/g sample ขณะที่ Catechin, Quercetin, Rutin และ Luteolin มีค่าเท่ากับ 430.59±6.69, 181.28±10.40, 42.28±3.58 และ 19.04±0.51 µg/g sample ตามลำดับ มีรายงานว่า บางส่วนของโครงสร้าง apigenin และ luteolin ตรวจพบในถั่วอัลฟัลฟ่า (Hegsted and Linkswiler, 1980) และมีการรายงานการพบ glucuronic acid ในบริเวณลำต้นเลื้อยของถั่วอัลฟัลฟ่า (*Medicago sativa* aerial parts) เป็นครั้งแรก ในฟาร์มทดลองของสถาบัน Institute of Soil Science and Plant Cultivation ใน Pulawy (Stochmal et al., 2001) นอกจากนี้ สารทุติยภูมิในอัลฟัลฟ่ายังมีความน่าสนใจต่อการใช้ประโยชน์เป็นสารอาหารสำหรับมนุษย์อยู่อีกจำนวนมาก ประกอบด้วยซาโปนิน (saponin) (Oleszek, 1996 และ Oleszek, 2000), ฟลาโวนอยด์ (Hernández et al., 1991 และ Bisby et al., 1994), แทนนิน (Marrtensson, 1979), coumestrol (Knuckles, 1976), carotenoids และ tocols (Livington et al., 1980 และ Hegsted et al.

1980) อ้างโดย Stochmal et al. (2001) บางส่วนของถั่วอัลฟัลฟ่าสามารถระบุจำนวนฟลาโวนอยด์ได้ และหลายครั้งที่ยังไม่สามารถระบุให้ชัดเจนได้ Bisby et al., 1994 อย่างไรก็ตาม ในหลายกรณีจะพบว่ามี aglycons หลังกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และมีไม่กี่กรณีเท่านั้นที่จะพบโครงสร้างของ full glycosidic จากการวิเคราะห์เบื้องต้นโดยใช้เครื่อง HPLC-DAD ในถั่วอัลฟัลฟ่า จำนวน 47 พันธุ์ที่คัดเลือกเมล็ดพันธุ์มาจาก USDA stocks และปลูกลงแปลงวิจัยใน Southern California แสดงให้เห็นว่าถั่วอัลฟัลฟ่าทุกสายพันธุ์มีชุดข้อมูลของฟลาโวนอยด์ที่คล้ายกัน และมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.24 ถึง 0.78 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง (Stochmal et al. 1999) โครมาโตแกรมของฟลาโวนอยด์จะถูกจัดป็น glycosides ของ apigenin, luteolin เนื่องจากถูกพบว่ามีโครงสร้าง Sturcture-dependent physiological activity (สารต้านอนุมูลอิสระ, ป้องกันมะเร็ง, และยาต้านจุลชีพ) (Packer et al., 1999)

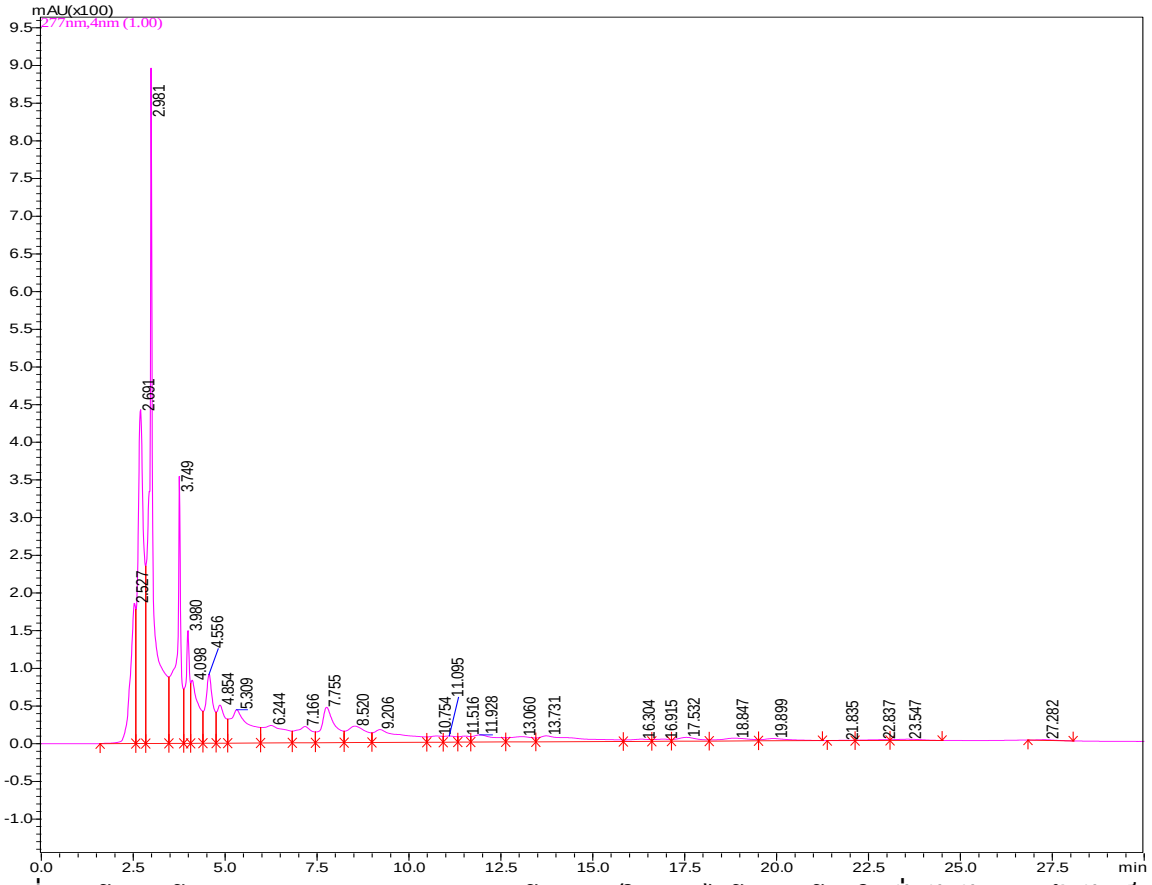
ตารางที่ 4.9 ชนิดและปริมาณของสารประกอบไอโซฟลาโวนในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด

สารประกอบไอโซฟลาโวน	**(µg/g sample)**
Genistein	25.95±0.01
Daidzein	55.12±0.01

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\overline{X}$ ±SD) (n = 3)

ปริมาณของ Genistein และ Daidzein ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ดแสดงดังตารางที่ 4.9 พบว่าระดับของ Isoflavone ในกลุ่มอะกลัยโคน (aglycone) (Genistein และ Daidzein) มีปริมาณของ Daidzein สูงกว่า Genistein งานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่า วัวนมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชวงศ์ถั่วในรูปแบบหมัก (legume silages) อาทิ White clover ((*Trifolium repens* L.), lucerne (*Medicago sativa* L.), และ red clover (*Trifolium pratense* L.) สามารถตรวจพบปริมาณความเข้มข้นของ Equol ในน้ำนมได้ (Steinshamn et al., 2008; Anderson et al., 2009 และ Mustonen et al., 2009) โดยในระหว่างการย่อยและดูดซึม Daidzein ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของ Isoflavone จะถูกเปลี่ยนไปเป็น Equol โดยแบคทีเรียในลำไส้ ซึ่งมีฤทธิ์รุนแรงสูงกว่าสารตั้งต้นที่เป็น Daidzein ถึง 2 เท่า (ภคนิจและศจีรา, 2556) ขณะที่ Daidzein ที่พบในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองจะถูก metabolized ด้วยแบคทีเรียในลำไส้เป็น Equol ในร่างกายมนุษย์เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม คาดว่ามีเพียงร้อยละ 30-50 เท่านั้นที่สามารถผลิต Equol จาก daidzein (Lampe et al., 1998) เมื่อ Isoflavone ถูกจัดไว้ในกลุ่ม Phytoestrogen และมีผลในการป้องกันหลายโรคที่เกิดจากความมีอายุมากขึ้น (โดยเฉพาะผู้หญิงที่เข้าสู่วัยหมดประจำเดือน) เช่น หัวใจ กระดูกพรุน มะเร็ง อาการร้อนวูบวาบ รวมถึงงานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่า Isoflavon ในถั่วเหลืองมีคุณสมบัติยับยั้งการสลายของกระดูกของหนูที่ถูกตัดรังไข่ (Vanlente et al., 1994, Ajimandiet et al., 1995) ป้องกันโรคอ้วน (Garcia et al., 1997) โรคมะเร็ง (Hawrylewicz et al., 1995) โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (Anderson et al., 1999) และโรคไต (Banner et al., 1982) ดังนั้นถ้า Equol ถูกชี้ว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพ น้ำนมวัวที่ผลิตจากอาหารที่มีถั่ว (ในกรณีนี้คือ Red clover) ที่ความเข้มข้น Equol ระดับสูง อาจเป็นแหล่งอาหารที่มีความ

น่าสนใจ (Steinshamn et al., 2010) จากการสังเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น ถ้า Daidzein ที่ตรวจพบในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ดจากศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 55.12±0.01 µg/g sample มีความเป็นไปได้ว่า ความเข้มข้น Equol ที่อาจตรวจพบในน้ำนมดิบอาจเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2 เท่า หรือประมาณ 110.24 µg/g sample หากนำไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารเลี้ยงโคนม



ภาพที่ 4.4 โครมาโตรแกรมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่มไอโซฟลาโวนในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด

ปริมาณกรดอะมิโนที่ตรวจพบในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด พบว่ามีชนิด Valine สูงที่สุด รองลงมาคือ Leucine, Isoleucine, Phenylaline, Tryptophan, Threonine, Arginine, Lysine, Histidine และ Methionine ดังแสดงในตารางที่ 4.9 พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา (2562) ระบุว่า ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในถั่วเหลืองชนิด Lysine มีค่าเท่ากับ 59 มิลลิกรัม/กรัม โปรตีน, Leucine 37 มิลลิกรัม/กรัม โปรตีน, Phenylalanine + tyrosine 64 มิลลิกรัม/กรัม โปรตีน, Valine 50 มิลลิกรัม/กรัม โปรตีน, Tryptophan 15 มิลลิกรัม/กรัม โปรตีน, Isoleucine 74 มิลลิกรัม/กรัม โปรตีน และ Threonine 42 มิลลิกรัม/กรัม โปรตีน อย่างไรก็ตาม Methionine จะเป็นกรดอะมิโนที่มีในปริมาณจำกัด (limiting amino acid) มากกว่ากรดอะมิโนทุกตัวที่ตรวจพบในถั่วเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโนในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด (µg/g DW)
Lysine	135.54±1.94
Histidine	33.14±3.89
Leucine	3908.11±30.73
Phenylaline	2544.94±13.75
Valine	5451.31±46.19
Tryptophan	865.83±7.72
Arginine	142.24±14.46
Isoleucine	3177.30±22.27
Methionine	11.74±1.01
Threonine	419.34±14.26

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\overline{X}$ ±SD) (n = 3)

ตารางที่ 4.11 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH radical scavenging activities (% Inhibition และ Trolox) และ FRAP, ABTS ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด

Sample	DPPH (% inhibition)	ABTS (% Inhibition)	FRAP (mgFe^{2+}/g sample)	Trolox (mg Trolox eq./g sample)
ADP	47.70	68.12	3.21	1.61
	48.54	66.67	3.34	1.64
	43.84	63.48	3.21	1.48
ค่าเฉลี่ย	46.69	66.09	3.25	1.58

DHHP radical scavenging, ABTS = 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, FRAP = Ferric reducing antioxidant activity และ ADP = alfalfa dehydrated pellet

ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ดที่ DPPH และ ABTS เท่ากับ 46.69 เปอร์เซ็นต์ และ 66.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay เท่ากับ 3.25 mgFe^{2+}/g sample ดังแสดงในตารางที่ 4.11 หากเปรียบเทียบกับสาร

มาตรฐาน Trolox พบว่า ถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารมาตรฐาน และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างจะสอดคล้องกับปริมาณของ Total phenolic ที่มีในตัวอย่าง ซึ่งปริมาณสาร Total phenolic ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ดในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 2.42 mg GAE/g sample หากพบว่าตัวอย่างใดมีปริมาณของ Total phenolic สูง จะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงมากเช่นกัน สอดคล้องกับ Jacobo-Valazquez et al. (2009) ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ Phenolic ร่วมกับความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (อ้างโดยรัชฎาพร, 2556)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ถั่วอัลฟาฟ่ามีศักยภาพเพียงพอในการนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียนสายเลือดมากกว่า 87.5 เปอร์เซ็นต์ ในระยะให้นมที่ถูกเลี้ยงในภาวะปกติที่ได้รับอาหารข้นโคนม 21 เปอร์เซ็นต์โปรตีน ร่วมกับหญ้าสดคุณภาพดี (ไม่มีการให้พืชวงศ์ถั่วเป็นอาหาร) ตามโปรแกรมอาหารของงานโคนมฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยพบว่ามีองค์ประกอบทางโภชนะที่เหมาะสม คุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของ Isoflavone ในรูปอนุพันธ์ของ Genistein และ Daidzein ที่สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น Equol ที่มีฤทธิ์รุนแรงกว่า Daidzein โดยแบคทีเรียในลำไส้ต่อไปได้ ซึ่งเป็นพฤษเคมี (Phytochemicals) จากพืชที่จัดเป็นไว้ในกลุ่มของ Phytoestrogen ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเพศหญิง (Estrogen, 17b-estradiol E2 Isoflavones) จึงมีความเป็นไปได้ว่า การเสริมหรือทดแทนโปรตีนจากกากถั่วเหลืองที่เป็นวัตถุดิบสำคัญของอาหารโคนมด้วยถั่วอัลฟัลฟ่า จะส่งเสริมให้ระดับความเข้มข้นของ Isoflavone ในน้ำนมเพิ่มสูงขึ้น

ข้อเสนอแนะ

การจำแนกองค์ประกอบพฤษเคมีในน้ำนมดิบของโคในภาวะปกติและถั่วอัลฟัลฟ่าเหล่านี้จะสามารถช่วยปรับปรุงความเข้าใจและทิศทางงานวิจัยโภชนาการในสัตว์เศรษฐกิจของประเทศได้ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับนักวิจัยใช้ในการวิเคราะห์และสังเคราะห์เชิงลึก เพื่อให้สามารถต่อยอดผลงานวิจัยนี้เข้าสู่ Phase II ในการใช้ถั่วอัลฟัลฟ่าเป็นส่วนประกอบในอาหารโคนม ก่อนส่งมอบผลิตภัณฑ์น้ำนมโคพร้อมดื่มที่มี Isoflavone สูงสู่ผู้บริโภค (ผู้หญิงวัยทองหรือผู้หญิงที่มีปัญหาเกี่ยวกับระดับฮอร์โมนเพศในร่างกายต่ำกว่าปกติ หรือผู้มีอาการแพ้น้ำนมถั่วเหลือง รวมถึงเป็นอาหารทางเลือกให้กับผู้ที่รักสุขภาพได้ในอนาคต อย่างไรก็ตาม การเสริมถั่วอัลฟัลฟ่าที่มากเกินไปในระยะยาวในอาหารโคนม อาจมีผลต่อสมดุลของระบบนิเวศวิทยาซึ่งมีประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก (rumen) ทำหน้าที่ในการผลิตกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acids) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายที่สำคัญให้กับสัตว์เคี้ยวเอื้อง ส่งผลกระทบต่อสุขภาพโคได้ นอกจากนี้ยังควรคำนึงต้นทุนค่าอาหารสัตว์ต่อความคุ้มทุนในการเพิ่มมูลค่าของสินค้าด้วย ประกอบกับมีการศึกษาวิจัยทางคลินิกให้กับผู้ที่ได้รับนมโค Isoflavone สูงควบคู่ไปกับการประเมินสุขภาพเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

6. ผลผลิต

การนำเสนอผลงานและผลงานตีพิมพ์

ผลงานวิจัยที่เกิดจากการดำเนินโครงการวิจัยเรื่อง “ผลของการให้ถั่วอัลฟาฟ่าต่อปริมาณ Phytoestrogen ในน้ำนมของโคนม” ภายใต้ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒ ได้มีการตีพิมพ์และเผยแพร่เพื่อสิ้นสุดการดำเนินโครงการวิจัยเรื่อง “ผลของการให้ถั่วอัลฟาฟ่าต่อปริมาณ Phytoestrogen ในน้ำนมของโคนม” เรียบร้อยแล้วในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติที่มีผู้ทรงคุณวุฒิร่วมกลั่นกรอง จำนวนทั้งสิ้น ๒ เรื่องดังนี้ ๒ บทความวิจัย โดยได้ประกาศกิตติคุณแก่มหาวิทยาลัยไว้แล้ว นางสาวสุปรีณา ศรีใสคำ จึงใคร่ขอส่งผลงานวิจัย ดังนี้

1. เรื่อง “Changes in microorganism growth of raw cow's milk by activation of the lactoperoxidase system.” The 2nd International Conference on Tropical Animal Science and Production Proceeding (TASP 2019), 34-37p.

2. เรื่อง “Nutritive value and digestibility in the rumen of Typha (*Typha spp*.) harvested, Leucaena (*Acacia auriculaeformis*) foliage and dehydrated alfalfa for fodder crops in North-East of Thailand” The 3rd International Symposium on Agricultural Technology 2019 (ISAT 2019) Proceeding. (Harmonization of smart and sustainable agriculture). 2-5 July 2019, 137-142p.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 5 หลัก) 60334 สัญญาเลขที่ 25/2562
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ผลของการให้ถั่วอัลฟาฟ่าต่อปริมาณ Phytoestrogen ในน้ำนมของโคนม (Effects of feeding alfalfa on milk phytoestrogen concentration in dairy cattle)
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อาจารย์ ดร.สุปรีณา ศรีใสคำ
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2561 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2562
ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2561 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2562)
<u>รายรับ</u>
จำนวนเงินที่ได้รับ
งวดที่ 1 (50%) จำนวน 188,600 บาท เมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน พ.ศ. 2561
งวดที่ 2 (40%) จำนวน 150,880 บาท เมื่อวันที่ 13 มีนาคม พ.ศ. 2562
งวดที่ 3 (10%) จำนวน 37,720 บาท เมื่อวันที่– (หลังส่งเล่มรายงานฉบับสมบูรณ์)
รวม 377,200 บาท (สามแสนเจ็ดหมื่นเจ็ดพันสองร้อยบาทถ้วน)

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	**งบประมาณที่ตั้งไว้**	**งบประมาณที่ใช้จริง**	**จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน**
1. ค่าตอบแทน	37,720 บาท	37,720 บาท	-
2. ค่าจ้าง	155,400 บาท	155,400 บาท	-
3. ค่าวัสดุ	22,360 บาท	22,360 บาท	-
4. ค่าใช้สอย	124,000 บาท	124,000 บาท	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ	37,720 บาท	37,720 บาท	-
รวม	377,200 บาท	377,200 บาท	-

(นางสาวสุปรีณา ศรีใสคำ)
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

จรัญญา งามขำ และพรทิพา พิชา. 2551. ไฟโตเอสโตรเจน: ไฟโตรเอสโตรเจนที่ได้จากพืช. ว กรมวิทย พ. 50(2): 141-150.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์.2562 Phytoestrogen/ไฟโตอีสโตรเจน. http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2948/phytoestrogen

ภคนิจ คุปพิทยานันท์และศจีรา . 2556. ระดับไอโซฟลาโวนในน้ำนมโค. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 16 หน้า.

ยุพา คู่คงวิริพันธุ์. 2562. ไฟโตเอสโตรเจนสำหรับวัยทอง. ภาควิชาสรีรวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น. http://physio1.md.kku.ac.th/ไฟโตเอสโตรเจนสำหรับวัยทอง

รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์. 2556. ฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณค่าทางโภชนาการและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วเหลืองและถั่วขาวที่ผ่านการหมัก. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 46 หน้า.

วรัมพร วงศ์สุดิน, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และอรพิน เกิดชูชื่น. 2554. การเปลี่ยนแปลงสารพฤกษเคมีและประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของธัญพืชงอก. ว.วิทย. เกษตร. 42(ฉบับพิเศษ 2): 1259-1264.

วิศิษฐิพร สุขสมบัติและพิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์. 2549. การเพิ่มปริมาณ CLA (Conjugated Linoleic Acid) ในน้ำนมโคโดยการเสริมน้ำมันพืชและ *Lactobacillus* sp. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 66 หน้า.

สกุลกานต์ สิมลา, สุรศักดิ์ บุญแต่ง และสรพงค์ เบญจศรี. 2560. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเมล็ดพืช เมล็ดพืชงอก และเมล็ดพืชงอกอบแห้ง. ว.วิทย. เกษตร. 45(ฉบับพิเศษ 1): 113-116.

สายพิณ พงษธา. Phytoestrogen. 2010. http://www.med.cmu.ac.th/dept/obgyn/2011

สำนักสำรวจดินและวางแผนการใช้ที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน. 2548. ลักษณะและสมบัติของชุดดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. เข้าถึงได้จาก http://oss101.ldd.go.th/web_standard/_doc_std/series_desc/D_NEseries_thai.pdf

สำนักสำรวจและวิจัยทรัพยากรดิน กรมพัฒนาที่ดิน. 2554. แผนที่ชุดดิน อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว. เข้าถึงได้จาก http://oss101.ldd.go.th/web_th_soilseries/02_east/27_Sakaew/27_map/27_AMP/2705.pdf

อิงฟ้า คำแพง อรพิน เกิดชูชื่น และณัฏฐา เลาหกุลจิตต์. 2552. การเปลี่ยนแปลงสารอาหารของข้าวและธัญพืชในระหว่างการงอก. ว.วิทย.เกษตร. 40(ฉบับพิเศษ 3): 341-344.

Adlercreutz, H., Honjo, H., Higashi, A., Fotsis, T., Hamalainen, E., Hasegawa, T., & Okada, H. (1991). Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 1093–1100.

Akitha Devi, M.K., Gondi, M., Sakthivelu, G., Giridhar, P., Rajasekaran, T., & Ravishankar, G.A. (2009). Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chemistry.* 114, 771-776.

Albertazzi, P., Pansini, F., Bonaccorsi, G., Zanotti, L., Forini, E., & De Aloysio, D. (1998). The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstetrics & Gynecology*, 91(1), 6-11.

Andersen, C., Weisbjerg, M. R., Hansen M., & Sejrsen, K. (2009). Effect of forage on the content of phyto-oestrogens in bovine milk. *Animal*, 3, 617-622.

Bisby, F. A., Buckingham, T., & Harborne, T. B. (1994). Eds. Phytochemical Dictionary of the Leguminosae, Vols. 1 and 2; Chapman and Hall: London.

Chon, S. U., & Kim, J. D. (2002). Biological activity and quantification of suspected allelochemicals from alfalfa plant parts. *Journal of Agronomy and Crop Science.* 188, 281-285.

Cornwell, T., Cohick, W., & Raskin, I. (2004). Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65:995 -1016.

Daiponmak, W., Senakun, C., & Siriamornpun, S. (2014). Antiglycation capacity and antioxidant activities of different pigmented Thai rice. *International Journal of food science & technology*, 49(8), 1805-1810.

Dhiman, T. R., Klrinmans, J., Tessmann, N. J., Radloff, H. D., & Satter, L. D. (1995). Digestion and energy balance in lactating dairy cows fed varying ratios of alfalfa silage and grain. *Journal of Dairy Science*, 78, 330.

Ensminger, M. E. (1992). Dairy Cattle Science. Interstate Publishers, Inc. Danvill, Illinois. 550 p.

Hegsted, M., & Linkswiler, H. M. (1980). Protein quality of high and low saponin alfalfa protein concentrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31, 777-781.

Herman, C., Adlercreutz, T., & Goldin, B. R. (1995). Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *Journal of Nutrition*, 125, 757S-70S.

Hernández, T.; Herna´ndez, A., & Martinez, C. (1991). Polyphenols in alfalfa leaf concentrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1120-1122.

Höjer A., Adler, S., Martinsson, K., Jensen, S. K., Steinshamn, H., Thuen, E., & Gustavsson, A.-M. (2012). Effects of feeding dairy cows different legume-grass silages on milk phytoestrogen concentration. *Journal of Dairy Science*, 95: 4526–4540.

Holmes, C. W., & Wilson, G. F. (1984). Milk production from pasture. Buttorworths. Welliyeton. New Zealand.

Jing L. G., & Zhang,Y. Z. (2006). Determination of soybean Isoflavone extracted from soybean by HPLC. *Journal of US-China Medicine Science*, 26(3), 629-632.

Kagan, I. A., Goff, B. M. & Flythe, M. D. (2015). Soluble Phenolic Compounds in Different Cultivars of Red Clover and Alfalfa, and their Implication for Protection against Proteolysis and Ammonia Production in Ruminants. *Natural Product Communications*, 10(7), 1263-7.

Khang, D. T., Dung, T. N. Elzaawely, A. A., & Xuan, T. D. (2016). Phenolic profiles and antioxidant activity of germinated legumes. *Foods*. 5(27), 1-10.

Knuckles, B. E.; deFremery, D., & Kohler, G. O. (1976). Coumestrol content of fractions obtained during wet processing of alfalfa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 1177-1180.

Kubola, J., Siriamornpun, S., & Meeso, N. (2011). Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. *Food Chemistry*, 126(3), 972-981.

Kurzer, M. S., & Xu, X. (1997). Dietary phytoestrogens. Annu Rev Nutr. 17, 353-81.

Lampe, J. W., Karr, S.C., Hutchins, A. M., & Slavin, J. L. (1998). Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine 217, 335-339.

Larson, B. L. (1985). Lactation. The Iowa State University Press, Ames, IA, USA.

Lee, H. P, Gourley, L., Duffy, S. W., Estéve, J., Lee, J., & Day, N. E. (1991). Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. Lancet. 337(8751), 1197-200.

Li, W., Hosseinian, F. S., Tsopmo, A., Friel, J. K., & Beta, T. (2009). Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. Nutrition. 25(1), 105-114.Larson, B. L. 1985. Lactation. The Iowa State University Press, Ames, IA, USA.

Livingston, A. L.; Kohler, G. D., & Kuzmicky, D. D. (1980). Comparison of carotenoid storage stability in alfalfa leaf protein (Pro-Xan) and dehydrated meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 652-656.

Martensson, P. (1979). Studies on tannins, saponins and trypsin inhibitors in lucerne. Biul. Inst. Hod. Rosl., 135, 294-301.

Messina, M. L. (1999). Legumes and soybean: overview of their nutritional profiles and health effects. *American journal of clinical nutrition*, 70, 439-450.

Murkies, A. L., Lombard, C., Strauss, B. J., Wilcox, G., Burger, H. G., & Morton, M. S. (1995). Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes: effect of soy and wheat. *Maturitas*, 21(3), 189-95.

Mustonen, E. A., Tuori, M., Saastamoinen, I., Taponen, J., WÄhÄlÄ, K., Saloniemi, H., & Vanhatalo, A. (2009). Equol in milk of dairy cows is derived from forage legumes such as red clover. *British Journal of Nutrition,* 102, 1552-1556.

Nickerson, S. C. (1995). Milk production: Factors affecting milk composition. In "Milk Quality". pp 3 - 23. editor Harding. F. Blackie. A&P. New York. 166 p.

Nimbalkar, M. S., Pai, S. R., Pawar, N. V., Oulkar, D., & Dixit, G. B. (2012). Free amino acid profiling in grain Amaranth using LC–MS/MS. *Food Chemistry*, 134(4), 2565-2569.

Oleszek, W. (1996). Alfalfa saponins: Structure, biological activity and chemotaxonomy. In *Saponins Used in Food and Agriculture*; Waller, G. R., Yamasaki, K., Eds.; Plenum Publishing: New York. pp 155-170.

Oleszek, W. (2000). Alfalfa saponins: Chemistry and application. In *Phytochemicals as Bioactive Agents*; Bidlack, W. R., Omaye, S. T., Meskin, M. S. Topham, D. K., Eds.;Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA and Basel, Switzerland. pp 167-188.

Ososki, A. L., & E. J. Kennelly. (2003). Phytoestrogens: A review of the present state of research. *Phytotherapy Research*, 17, 845–869.

Packer, L.; Hiramatsu, M., &Yoshikawa, T. (1999). Antioxidant Food Supplements in Human Health. Academic Press:San Diego, CA.

Patricia, D. C., Pascle, T., Guy, L., & Yves, J. (2010). Controversies concerning the use of phytoestrogens in menopause management: Bioavailability and metabolism. *Journal of Maturitas*, 65, 334-339.

Piller, R., Verla-Tebit, E., Wang-Gohrke, S., Linseisen, J., & Chang-Claude J. C. Y. P. (2006). genotype modifies the association between lignan supply and premenopausal breast cancer risk in humans. *Journal of Nutrition*, 136(6), 1596-603.

Purup, S., Hansen-Møller, J., Sejrsen, K., Chritsensen, L. P., Lykkesfeldt, A. E., Leffers, H., & Skakkebæk, N. E. (2005). Increased phytoestrogen content in organic milk and the biological importance. Newsletter from Danish Research Centre for Organic Farming, 2.

Sun, L., Ren, X. Z., Ge, G. T., Feng, X. C., Liu, Y., Hou, M. L., & Jia, Y. S. (2013). Allelopathic effect of aqueous extracts from alfalfa stem and leaf on two gramineous forages. *Journal of Northwest A&F University* (Nat. Sci. Ed.) 41, 49-53.

Smith, G. H., & Dodd F. H. (1966). Effect of milking throughout pregnant on milk yield in the succeeding lactation. *Journal of Dairy Science*, 46:204.

Steinshamn H., Purup S., Thuen E., & Hansen –Moller, J. (2008). Effects of clover-grass silages and concentrate supplementation on the content of phytoestrogens in dairy cow milk. *Journal of Dairy Science,* 91, 2715-2725.

Stochmal, A., Oleszek, W., Leitz, R. E., & Di Paola, P. (1999). Saponin and flavonoid profiles of 47 alfalfa varieties of different origin. Book of Abstracts of the Phytochemical Society of Europe Meeting, IUNG Pulawy, Poland. p 30.

Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., Riccardis, F. D., Leitz, R., & Oleszek. W. (2001). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids. 1. Apigenin and Luteolin Glycosides from Aerial Parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 753-758.

Suryanti, V., Marliyana, S. D., & Putri, H. E. (2016). Effect of germination on antioxidant activity, total phenolics, β-carotene, ascorbic acid and α-tocopherol contents of lead tree sprouts (*Leucaena leucocephala* (lmk.) de Wit). *International Food Research Journa*l, 23(1), 167-172.

Thanh, L., & Suksombat, W. (2015). Milk Yield, Composition, and Fatty Acid Profile in Dairy Cows Fed a High-concentrate Diet Blended with Oil Mixtures Rich in Polyunsaturated Fatty Acids. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(6), 796-806.

Thiele, B., Stein, N., Oldiges, M., & Hofmann, D. (2012). Direct analysis of underivatized amino acids in plant extracts by LC-MS-MS. In *Amino Acid Analysis* (pp. 317-328). Humana Press, Totowa, NJ.

Vázquez, C. V., Rojas, M. G. V., Ramírez, C. A., Chávez-Servín, J. L., García-Gasca, T., Martínez, R. A. F., & Montemayor, H. M. A. (2015). Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. *Food chemistry*, 176, 480-486.

Wang, R. L., Liu, S. W., Xin, X. W., Chen, S., Peng, G. X., Su, Y. J., & Song, Z. K. (2017). Phenolic acids contents and allelopathic potential of 10-cultivars of alfalfa and their bioactivity. *Allelopathy Journal,* 40 (1), 63-70.

Wanyo, P., Kaewseejan, N., Meeso, N., & Siriamornpun, S. (2016). Bioactive compounds and antioxidant properties of different solvent extracts derived from Thai rice by-products. *Applied Biological Chemistry*, 59(3), 373-384.

Wu, A. H., Ziegler, R G., Horn-Ross, P. L., Nomura, A. M., Weat, P. W., Koloneal, L. N., Rosenthal, J. F., Hoover, R. N., & Pike, M. C. (1996). Tofu and risk of breast cancer in Asia-Americans. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 5(11), 901-906.

Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D., & An, M. (2000). Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 2141-2154.

Xuan, T. D., Tsuzuki, E., Terao, H., Matsuo, M., & Khanh, T. D. (2003). Correlation between growth inhibitory exhibition and suspected allelochemicals (phenolic compounds) in the extract of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Production Science,* 6, 165-171.

Zafra-Gomez, A., Garballo A., García-Ayuso, L. E., & Morales, J. C. (2010) Improved sample treatment and chromatographic method for the determination of isoflavones in supplemented foods. *Food Chemistry*, 123, 872-877.

ภาคผนวก

ภาพ A กราฟมาตรฐานไอโซฟลาโวน (สำหรับน้ำนมดิบโค)

rt ของ Genistein = 5.050 นาที, Daizein = 9.985 นาที

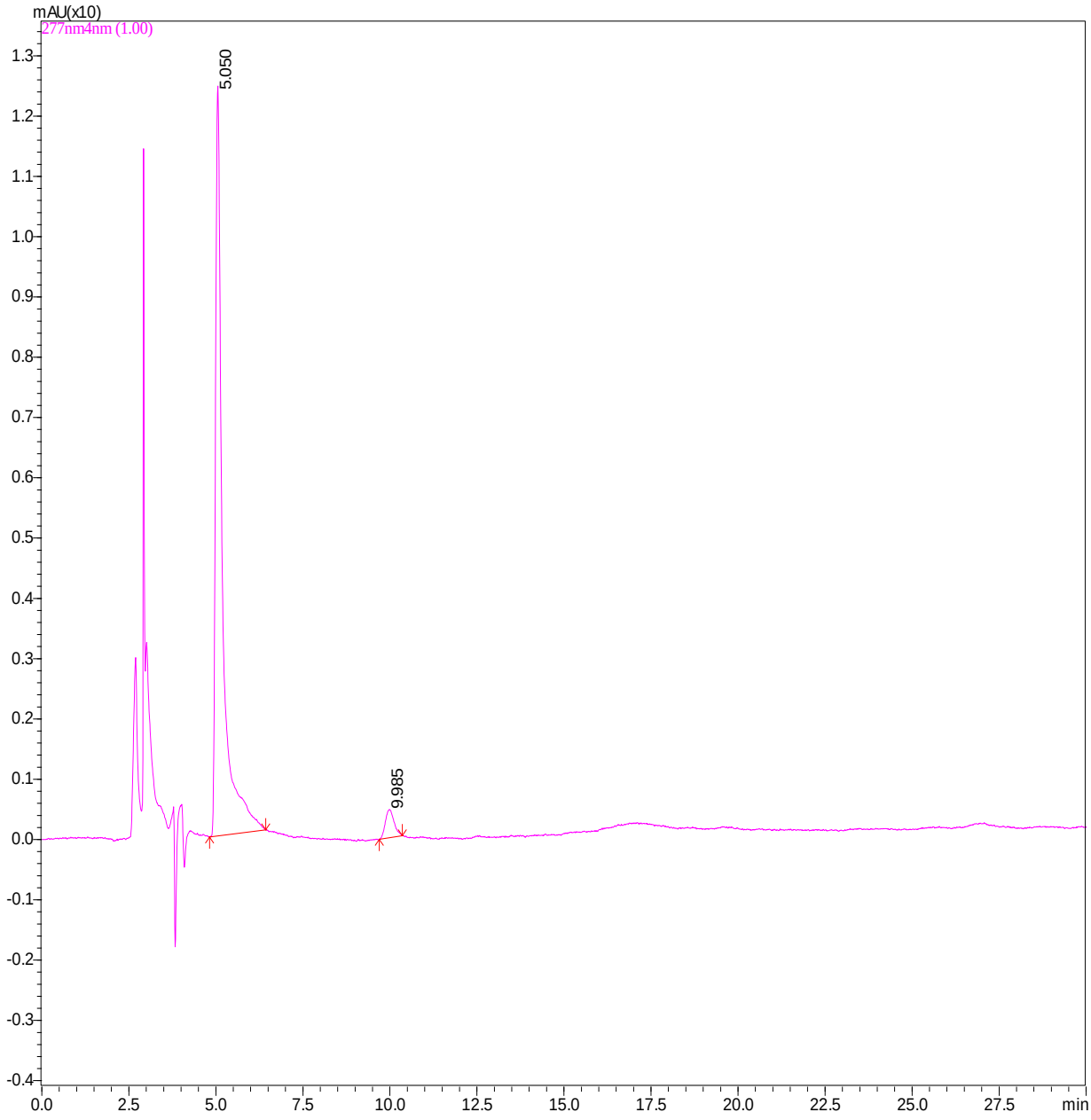


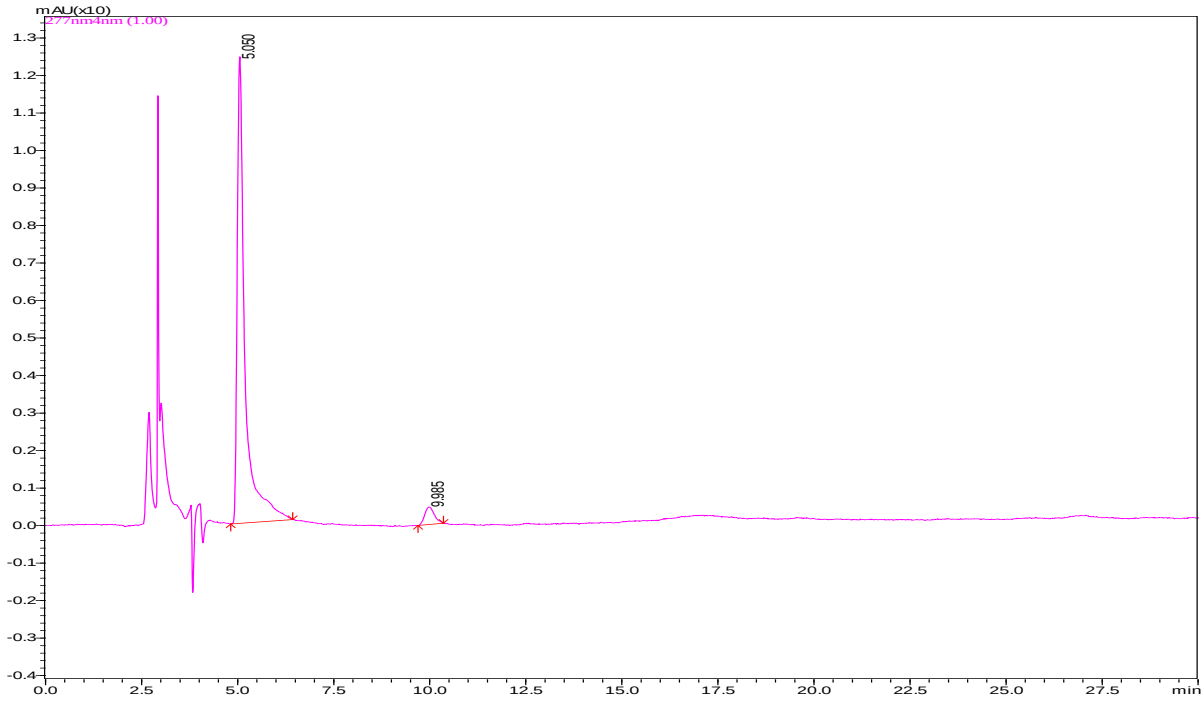
Table of MRM conditions for amino acid on LCMS/MS

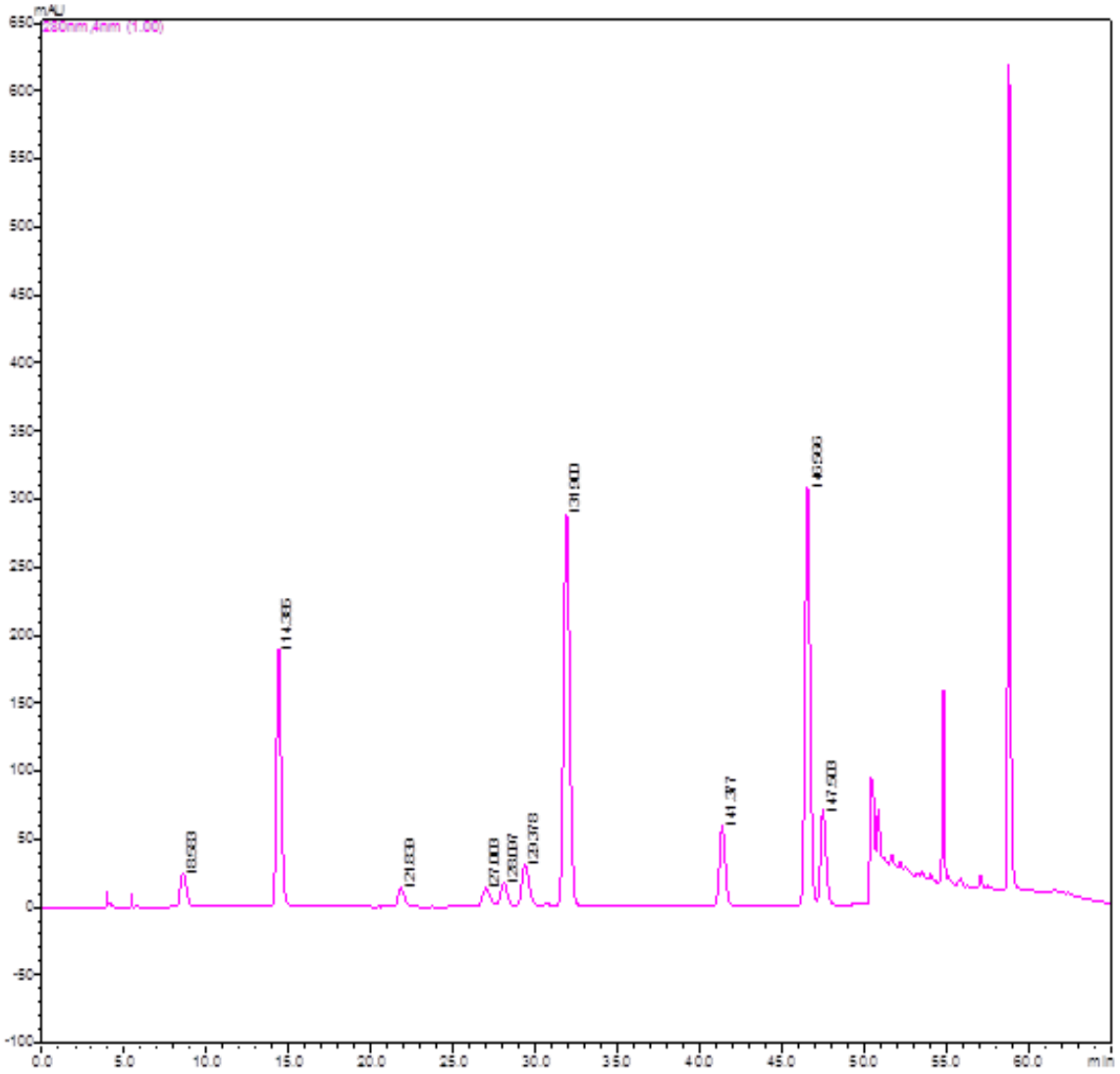
No.	Amino acid	Retention time (min)	Precursor ion $[M+H]^+$(m/z)	Product ion (m/z)	Q1 Pre Bias (V)	Collision energy (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	Arg	1.843	147.05	84.01	-17.0	-17.0	-18.0
2	His	1.967	156.05	10.05	-12.0	-13.0	-23.0
3	Ile	2.006	175.05	70.00	-26.0	-27.0	-29.0
4	Leu	2.163	120.00	74.00	-14.0	-10.0	-18.0
5	Lys	3.177	118.05	72.05	-13.0	-13.0	-15.0
6	Met	3.748	150.05	104.00	-20.0	-18.0	-29.0
7	Phe	5.658	132.10	68.00	-14.0	-14.0	-18.0
8	Thr	6.107	132.10	86.00	-15.0	-14.0	-20.0
9	Trp	8.942	166.05	120.05	-12.0	-12.0	-14.0
10	Val	11.105	205.00	188.00	-18.0	-13.0	-14.0

Arg: arginine; His: histidine; Ile: Isoleucine; Leu: leucine; Lys: lysine; Met: methionine; Phe: phenylalanine; Thr: threonineTrp: tryptophan; Val: valine

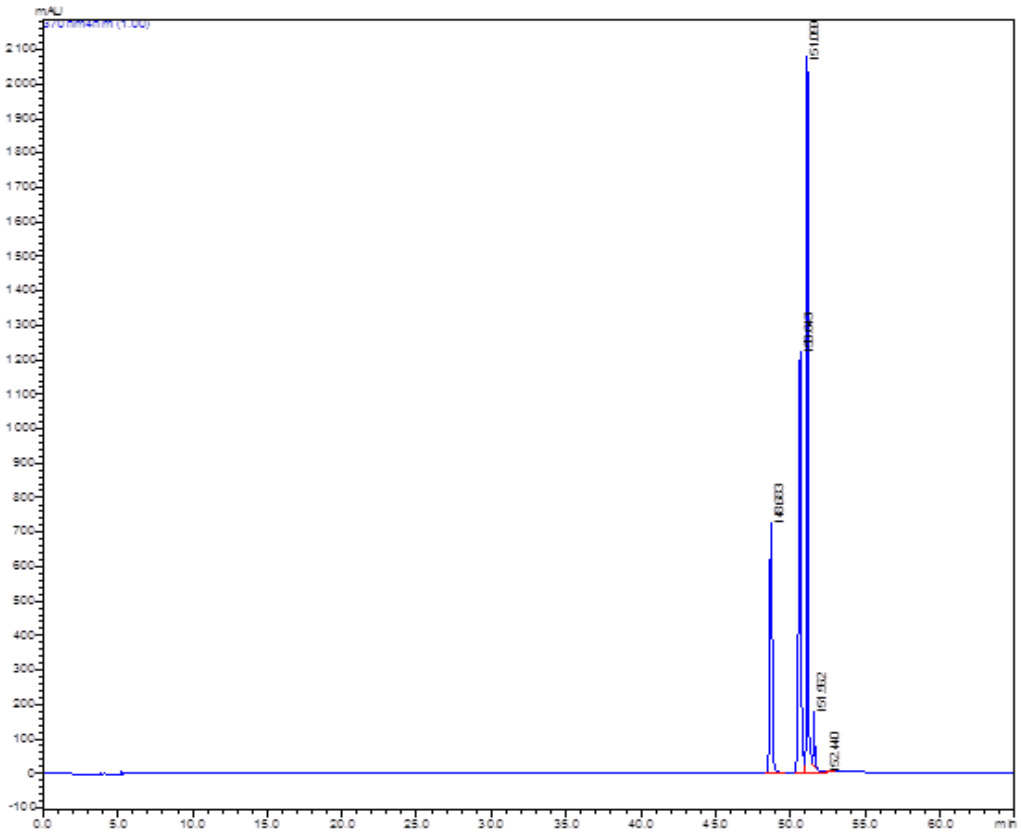
ภาพ B กราฟมาตรฐาน ไอโซฟลาโวนในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด

rt ของ Genistein = 5.050 นาที, Daizein = 9.985 นาที

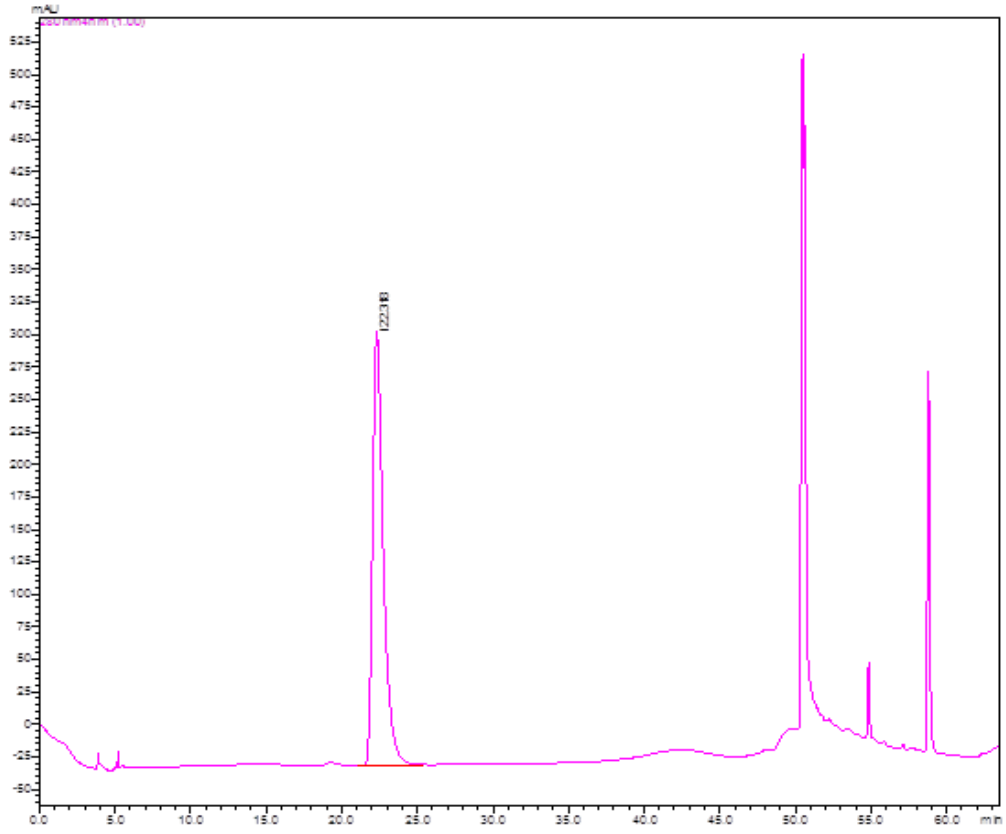




ภาพ C โครมาโตรแกรม สารมาตรฐาน สารประกอบฟีนอลิก (สำหรับใช้ในถั่วอัลฟัลฟ่าแห้งอัดเม็ด)



ภาพ D โครมาโตรแกรม สารมาตรฐาน สารประกอบฟลาโวนอยด์



ภาพ E โครมาโตรแกรม สารมาตรฐาน Catechin