

การพัฒนากระบวนการสกัดข้าที่มีประสิทธิภาพสูง
เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเชิงพาณิชย์

Development of Extraction Process of Galanga
for Medicinal and Commercial Uses

ผศ.ดร.	ปวีณา	ว่องตระกูล
ผศ.ดร.	สุนี	ชาญณรงค์
อ.	นิติกานต์	ธิปณัฏฐ์
อ.ดร.	วรัญญา	เนียมขำ
อ.ดร.	ปารภัทร	โคภารักษ์
อ.ดร.	กฤษณาพร	ตันเสถียร

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2565

ชื่อเรื่อง	การพัฒนากระบวนการสกัดชาที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อใช้ประโยชน์ทาง การแพทย์และเชิงพาณิชย์
ผู้วิจัย	ผศ.ดร.ปวีณา ว่องตระกูล ผศ.ดร.สุนี ชาญณรงค์ อ.นิติกานต์ ธิปันแก้ว อ.ดร.วรัญญา เนียมขำ อ.ดร.ปารภัทร ไศภารักษ์ อ.ดร.กฤษณาพร ต้นเสถียร
สถาบัน	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีที่พิมพ์	2567
สถานที่พิมพ์	
แหล่งที่เก็บรายงาน	
ฉบับสมบูรณ์	
จำนวนหน้างานวิจัย	106
คำสำคัญ	<i>Alpinia galanga</i> , สารต้านอนุมูลอิสระ, สารต้านเชื้อจุลินทรีย์, สารต้าน อักเสบ, 1'-อะเซตทอกซีชาวิกอล อะซีเตต
ลิขสิทธิ์	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการสกัดชาจากเหง้าชาแห้ง โดยใช้ตัวทำสกัดที่มีความปลอดภัยและประหยัด เหง้าชาสดได้ถูกนำมาผ่านกระบวนการต่างๆ จนได้ผงชาแห้ง ผงชาแห้ง 100 กรัม ถูกนำมาสกัดด้วยวิธี sonication และวิธีการแช่สกัดที่สภาวะต่างๆ กัน ตัวทำละลายที่ใช้คือ 95% เอทานอล, โพรพิลีน ไกลคอล ผสมเอทานอล (1:1) และกลีเซอรินผสมเอทานอล (1:1) สารสกัดที่ได้นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสาร 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) ซึ่งใช้เป็นมาร์กเกอร์ โดยวิธี TLC-densitometry เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพ หลังจากการระเหยเอาเอทานอลออกพบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีลักษณะเป็นของหนืด สีน้ำตาลอมส้ม ขณะที่สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายผสมของเอทานอลกับโพรพิลีน ไกลคอลและกลีเซอรินให้สารสกัดเหลวสีน้ำตาลอมส้ม หลังจากปรับวิธีสกัดเป็นวิธีการแช่สกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน พบว่าเมื่อระเหยแห้ง สารสกัดด้วยเอทานอลได้ความเข้มข้นของ ACA ร้อยละ $21.56 \pm$

0.12 โดยน้ำหนัก เมื่อสกัดด้วยตัวทำสกัดโพพิลีน ไกลคอลผสมเอทานอล ได้สาร ACA เข้มข้น ร้อยละ 1.17 ± 0.14 โดยน้ำหนัก และเมื่อสกัดด้วยตัวทำสกัดกลีเซอรินผสมเอทานอล ได้สาร ACA เข้มข้นร้อยละ 0.91 ± 0.004 โดยน้ำหนักปริมาณสาร ACA สกัดได้มากที่สุดเมื่อใช้เอทานอล เพราะเอทานอลจัดเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูง การผสมเอทานอลกับโพพิลีน ไกลคอลและกลีเซอรินพบว่าสกัดได้ดี สารสำคัญมีความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากสารสกัดที่ได้ประกอบด้วย ตัวทำละลายที่ไม่สามารถระเหยได้ในปริมาณมาก สารสกัดที่ได้นี้เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตั้งตำรับต่างๆ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้ สกัดได้ นำมา ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวม เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดที่ได้สกัดในตัวทำละลาย เอทานอลมีสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระจากวิธีการทดสอบอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) และ ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) พบว่า สารสกัดที่ได้ สกัดใน ตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด นอกจากนี้สารสกัดที่ได้ สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ รวมทั้งเมื่อทำการศึกษา ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดที่ได้สกัดในตัวทำละลายเอทานอล สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *S. epidermidis* และ *S. aureus* ได้ดีที่สุด และมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* อีกด้วย

Research Title	Development of Extraction Process of Galanga for Medicinal and Commercial Uses
Researchers	Asst. Prof. Paveena Wongtrakul, Ph.D. Asst. Prof. Sunee Channarong, Ph.D. Nitikarn Thipunkaew Warunya Niamkhum, Ph.D. Parapat Sobharaksha, Ph.D. Kritsanaporn Tansathien, Ph.D.
Institution	Faculty of Pharmaceutical Sciences, Huachiew Chalermprakiet University
Year of Publication	2024
Publisher	
Sources	
No. of Pages	106
Keywords	<i>Alpinia galanga</i> , antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, 1'-acetoxychavicol acetate
Copyright	Huachiew Chalermprakiet University

Abstracts

This research aimed to study the extraction processes of galanga form dried galanga powder using safe and economical solvents. Fresh galangal rhizomes underwent multiple processing steps to be converted into dried powder. A 100 g of powder was extracted using sonication and maceration using various conditions. The solvents were 95% ethanol, propylene glycol : ethanol (1:1), and glycerine : ethanol (1:1). The extracts were quantified for 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) content as a marker using the TLC densitometry method for quality control. After removing the ethanol, the resulted extracts using ethanol showed viscous, brownish-orange mass, while the extracts using the mixture of ethanol - propylene glycol and ethanol - glycerin resulted in brownish-

orange liquids. According to the final trialed extraction method, which was maceration at 50°C for 3 days, the concentration of ACA after ethanol removal yielded 21.56 ± 0.12 % w/w for ethanol extraction, 1.17 ± 0.14 % w/w for propylene glycol : ethanol (1:1), and 0.91 ± 0.004 % w/w for glycerin : ethanol (1:1). The highest amount of ACA resulted from ethanol extract, since this solvent has the highest extraction efficiency. The combination of ethanol with propylene glycol or glycerin was studied for trialing the extraction efficiency and they were found to be good. The concentrations of the active substance were low due to the high portion of non-volatile solvents. These liquid extracts were suitable for further formulation. In the bioactivities study of the extracts, radical-scavenging assays, total phenolic compounds, and total flavonoid compounds were performed to predict antioxidant activity. The results showed that the ethanolic galangal extract had the highest total phenolics and flavonoids. After that, the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) assays were used to determine the antioxidant capacities, the ethanolic galangal extract exhibited the best of an antioxidant activity. Besides, the ethanolic galangal extract also demonstrated anti-inflammatory activity. When antimicrobial activity was investigated, the ethanolic extract inhibited the growth of two types of bacteria, ie. *S. epidermidis* and *S. aureus*, including the fungal pathogen, *C. albicans*.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการพัฒนากระบวนการสกัดชาที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และเชิงพาณิชย์ สามารถสำเร็จมาได้ลุล่วงด้วยดี โดยได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ นอกจากนี้ยังได้รับความช่วยเหลือเรื่องอุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมีต่างๆ จากห้องปฏิบัติการเภสัชกรรมเทคโนโลยีและเภสัชอุตสาหกรรม ห้องปฏิบัติการเภสัชเคมี และเภสัชเวช ที่ให้การสนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์จำเป็นต่างๆ ในการทำวิจัยอย่างดียิ่ง โดยได้รับความช่วยเหลืออย่างดีของคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่าน ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งจบโครงการ ทางผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์ ดร. รุจิราลัย พูลทวี อาจารย์สุรียพร เอี่ยมศรี และ คุณวิไล ปาคำทอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในเรื่องการศึกษาฤทธิ์ทางจุลชีววิทยา จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้วิจัยยังต้องขอขอบคุณคุณมารุต เกิดแก้ว เกษตรกรผู้ปลูกชาพันธุ์ดี อันสร้างชื่อเสียงให้แก่จังหวัดสมุทรปราการมาตลอด และยังเป็นผู้สนับสนุนชาให้แก่ทีมวิจัยให้มีวัตถุดิบเหมาชาคุณภาพสูงเพื่อนำมาทำงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

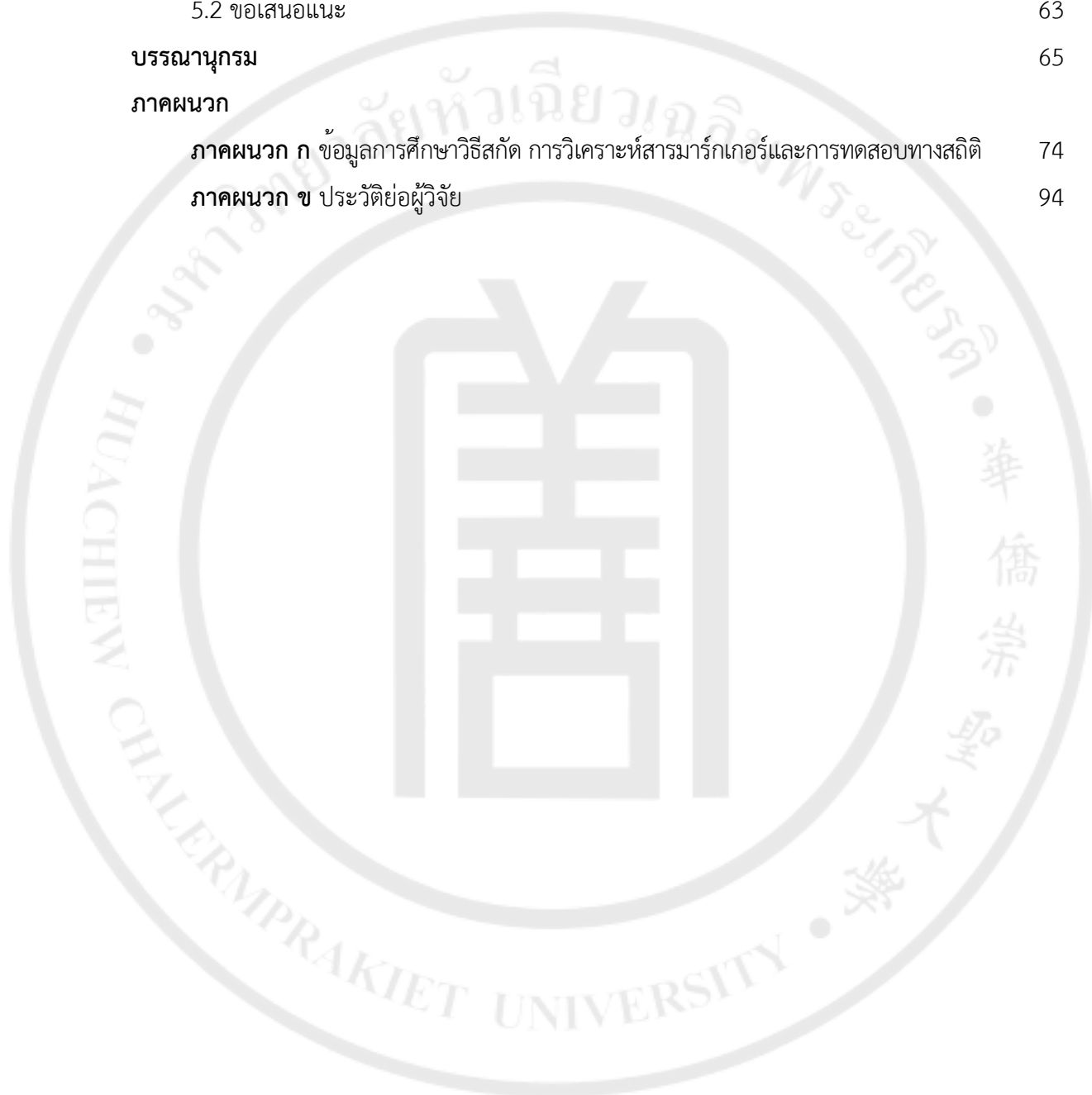
ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชำ	5
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.3 สารสำคัญที่พบในเหง้าชำ	10
2.4 วิธีการสกัดสมุนไพร	12
2.5 การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพร	15
2.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโดยเทคนิค TLC-densitometry	15
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	17
3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการทดลอง	18
3.3 วิธีทดลอง	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 ผลผลิตการเตรียมสมุนไพรชำแห้งจากเหง้าชำสด	33
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณ 1'- acetoxychavicol acetate (ACA) ในสารสกัดชำชนิดของเหลว	37
4.3 ผลการศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	43
4.4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดชำเพื่อการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และเครื่องสำอาง	51

บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	59
5.2 ข้อเสนอแนะ	63
บรรณานุกรม	65
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก ข้อมูลการศึกษาวีธีสกัด การวิเคราะห์สารมาร์กเกอร์และการทดสอบทางสถิติ	74
ภาคผนวก ข ประวัติย่อผู้วิจัย	94



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญในพืช	14
3.1	ตัวทำละลายและตัวทำละลายผสมที่ใช้ในการวิจัย	20
3.2	เกณฑ์ยอมรับผลความแม่นยำในรูปของร้อยละการคืนกลับ (% recovery)	26
3.3	เกณฑ์การยอมรับผลความเที่ยงใช้เกณฑ์ RSD, หรือ HORRAT, ตาม AOAC	27
3.4	รายการสารสกัดข่าที่นำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ	28
4.1	พื้นที่ใต้พีคของ standard ACA ความเข้มข้นต่างๆ	37
4.2	ปริมาณสารสกัดเหลวและสาร ACA ที่สกัดด้วยตัวทำละลายผสมโดยวิธี sonication	38
4.3	ปริมาณสารสกัดเหลวและสาร ACA ที่สกัดด้วยตัวทำละลายร่วมโดยวิธี maceration	39
4.4	ร้อยละของผลผลิตโดยประมาณ ที่ได้หลังการระเหยเอาเอทานอลออกโดยเทียบกับน้ำหนักตัวทำละลายที่ไม่ระเหยที่เวลาเริ่มต้น	41
4.5	น้ำหนักผงข่าแห้งที่ใช้สกัดและผลผลิตทั้งหมดที่สกัดได้ต่อผงข่าแห้ง 100 กรัม จากการแช่สกัดที่อุณหภูมิ 50°C นาน 3 วัน	42
4.6	ความเข้มข้นของ ACA และปริมาณสารที่สกัดจากการแช่สกัดที่อุณหภูมิ 50°C นาน 3 วัน	43
4.7	ผลการศึกษาความเหมาะสมของภูมิภาคเคลื่อนที่	45
4.8	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้เพื่อวิเคราะห์สาร ACA ในสารสกัดข่า	45
4.9	ผลการศึกษาความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์	47
4.10	ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงและพิสัยของกราฟมาตรฐานสาร ACA	48
4.11	ร้อยละการคืนกลับของสารมาตรฐานวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำ กลางและสูง	49
4.12	ผลการศึกษา repeatability	50
4.13	ผลการศึกษา intermediate precision	50
4.14	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดข่าที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และ quercetin ตามลำดับ (mean±S.D.) (n=3)	51
4.15	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข่าที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 6 วิธี เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซีจากการทดสอบ 2 วิธี ได้แก่ DPPH	54

	assay และ ABTS assay แสดงผลการทดลองด้วยค่า VEAC (mg) และ TEAC (mg) ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ (mean $\pm$ S.D.) (n=3)	
4.16	ร้อยละการยับยั้งการสลายโปรตีนของสารสกัดชาที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ (mean $\pm$ S.D.) (n=3)	56
4.17	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดชาในการต้านเชื้อ <i>C. albicans</i>	56
4.18	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดชาในการต้านเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ATCC12228 และ <i>S. aureus</i> ATCC6538	58



สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	สาร phenylpropanoids ที่แยกได้จากเหง้าของ <i>A. galanga</i>	12
4.1	ลักษณะเหง้าชาสด	33
4.2	ขั้นตอนการแยกใช้เฉพาะส่วนเหง้าใต้ดินและลักษณะข้าหั่นเป็นแว่น	34
4.3	ขั้นตอนการอบจนได้ข้าอบแห้ง	34
4.4	เครื่องมือที่ใช้การสกัดด้วยวิธี sonication และ maceration with shaking	35
4.5	การกรองสิ่งสกปรกให้ใสก่อนนำไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน	35
4.6	เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)	36
4.7	สารสกัดที่ได้หลังจากระเหยเอทานอลออก	36
4.8	กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ ACA ในเอทานอล	37
4.9	เปรียบเทียบปริมาณสาร ACA ที่สกัดได้ทั้งหมดจากการแยกกากและระเหยเอทานอล ออกจนหมดจากการสกัดด้วยวิธี sonication และ maceration	40
4.10	TLC chromatogram ของสารมาตรฐาน ACA และสารสกัดชนิดต่างๆ ในวัฏภาคเคลื่อนที่ 4 ระบบ	44
4.11	UV spectra (190 – 300 นาโนเมตร) ของสารมาตรฐาน ACA และสารสกัดชนิดต่างๆ (A) และ reflectance densitograms วัดที่ความยาวคลื่น 219 นาโนเมตรของสารมาตรฐาน ACA และสารสกัด (B)	47
4.12	Calibration curve แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ACA กับพื้นที่พีค	48
4.13	ปฏิกิริยาของสาร 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) กับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เมื่อกำหนดให้ R:H คือสารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระกลายเป็นสารที่ไม่มีพิษต่อร่างกาย และ R คืออนุมูลอิสระ	53
4.14	กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ⁺	54

- 4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งการสลายโปรตีน และความ
เข้มข้นของยาไดโคลฟีแนค โซเดียมที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.01, 0.1, 0.25, 0.4,
และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 55



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย

ข่า เป็นพืชที่พบมากในประเทศเขตร้อน จัดอยู่ในตระกูลเดียวกับขิง มีส่วนลำต้นอยู่ใต้ดิน เรียกว่า เหง้า ซึ่งมีลักษณะภายนอกเป็นสีขาว เนื้อในสีเหลือง แตกแขนงเป็นแง่ง มีรสเผ็ดร้อน มีกลิ่นหอม นิยมนำมาใช้ประกอบอาหารเพื่อดับกลิ่นคาว จากข้อมูลการส่งออกตลาดสมุนไพรของไทย (ม.ค.-มี.ค. 2565) พบว่ามีมูลค่าสูงถึง 219.55 ล้านบาท โดยส่งออกไปยังประเทศจีนเป็นอันดับที่ 1 รองลงมาคือ เมียนมา และญี่ปุ่น ตามลำดับ ทางผู้วิจัยจึงเล็งเห็นศักยภาพของข่าซึ่งเป็นสมุนไพรไทยที่จะนำมาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ เกิดโอกาสการขยายตลาดและเพิ่มช่องทางธุรกิจให้กับสินค้าทางการเกษตรในระดับอุตสาหกรรม และเป็นการตอบสนองความต้องการของประชาชนที่สนใจดูแลสุขภาพ

ข่า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Alpinia galanga* (L.) Willd. เป็นพืชสมุนไพรที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์เดียวกับขิง (วงศ์ Zingiberaceae) มีชื่อสามัญคือ galanga ชื่อสามัญอื่นอีกคือ กุกกักรโหหนิ (กลาง) ข่าหยวก (เหนือ) ข่าหลวง (ตะวันออกเฉียงเหนือ, เหนือ) สะเอเซย (กะเหรี่ยง แม่ฮ่องสอน) และ สะเอเคย (กะเหรี่ยง แม่ฮ่องสอน) ส่วนที่เป็นเหง้าหรือลำต้นใต้ดิน มีรสเผ็ดร้อน ขม ในทางสาธารณสุขมูลฐาน ข่าจัดเป็นสมุนไพร ที่ใช้รักษาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และแน่นจุกเสียด ทำได้โดยใช้เหง้าแก่สดหรือแห้ง ขนาดเท่าหัวแม่มือ ต้มน้ำดื่ม การใช้ในโรคกลากเกลื้อน ใช้โดยเอาหัวข่าแก่ๆ ล้างให้สะอาด ฝานเป็นแว่นบางๆ หรือทุบให้แตกนำไปแช่เหล้าขาวทิ้งไว้ 1 คืน ทำความสะอาดบริเวณที่เป็น และใช้ไม้บางๆ ชูคให้เป็นผิวสีแดง และใช้น้ำยาที่ได้มาทาบริเวณที่เป็น ทา 2 ครั้ง เช้า - เย็นทุกวัน จนกว่าจะหาย ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเหง้าข่า มีฤทธิ์ทำให้ไข่มแมลงฝ่อ กำจัดเชื้อราบางชนิดได้ ใช้ผสมกับสะเดาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงข่า ลดการบีบตัวของลำไส้ ขับน้ำดี ขับลม ลดการอักเสบ ยับยั้งแผลในกระเพาะอาหาร ข่าเชื้อแบคทีเรีย ข่าเชื้อราใช้รักษา กลากเกลื้อน (ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ ม.มหิดล) ส่วนข่าแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Alpinia officinarum* Hance อยู่ในวงศ์เดียวกับขิง มีชื่อสามัญคือ lesser galanga ชื่อไทยว่าข่าแดง เนื่องจากเมื่อเริ่มเจริญเติบโตเป็นเหง้าใต้ดินจะมีสีแดงและมีขนาดเล็กกว่าข่าหยวก ข่าชนิดนี้ไม่นิยมปลูกเพื่อการค้า

จากข้อมูลการเกษตรจังหวัดสมุทรปราการพบว่าข่าและตะไคร้เป็นพืชสมุนไพรที่มีการปลูกในพื้นที่มากที่สุด โดยข่าที่ปลูกมาก คือ ข่าตาแดง อาจมีความสับสนว่าเป็นข่าแดง โดยข่าตาแดงจัดว่าเป็นชนิด *A. galanga* เช่นกันแต่เหง้าเล็กกว่าเล็กน้อย มีชื่อสามัญว่า greater galanga ข่าชนิดนี้ปลูกมากในสมุทรปราการและนิยมปลูกมากกว่าข่าหยาบ เนื่องจากมีกลิ่นหอมกว่า ข่าเป็นพืชที่มีชื่อเสียงและเป็นที่ต้องการใช้รับประทานเป็นเครื่องเทศปรุงอาหาร สรรพคุณทางยาไทย ใช้แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ข่ามีฤทธิ์ที่ทางผู้วิจัยสนใจคือ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพที่ช่วยแก้ไขปัญหาด้านสุขภาพที่เกี่ยวข้องกับผิวหนัง จากรายงานการวิจัยพบว่าหนึ่งในสี่ของประชากรโลกเคยเป็นโรคติดเชื้อราที่ผิวหนัง หรือ ประมาณร้อยละ 20 - 25 โรคผิวหนังจากเชื้อรามักจะเกิดชุกชุมมากในเขตร้อนชื้น หากอุณหภูมิและความชื้นเพิ่มขึ้น เชื้อราจะมีโอกาสเกิด และเจริญเติบโตที่ผิวหนังได้มากขึ้น (วิรัตน์ ทองรอด, 2561) ซึ่งปัญหาด้านสุขภาพดังกล่าวยังสอดคล้องกับสถานการณ์ในประเทศไทยที่ในฤดูฝนจะเกิดน้ำท่วมเฉียบพลันในหลายพื้นที่และมีน้ำท่วมขัง โดยเฉพาะพื้นที่ในกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ส่งผลให้เกิดโรคผิวหนังต่างๆ ได้แก่ โรคน้ำกัดเท้า โรคกลากและเกลื้อน โรคผิวหนังอักเสบจากภูมิแพ้ โรคผิวหนังอักเสบจากแมลงสัตว์กัดต่อย และภาวะเท้ามีกลิ่นเหม็น ปัญหาดังกล่าวส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวันและผู้คนรอบข้าง งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะนำข่าซึ่งเป็นสมุนไพรไทย และปลูกได้มากในพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการในปริมาณมากและมีคุณภาพเป็นที่ยอมรับในท้องตลาดว่ามีคุณภาพดี มาทำการวิจัยโดยทำเป็นสารสกัดเพื่อสร้างนวัตกรรมสู่เชิงพาณิชย์ โดยพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มุ่งเน้นความเป็นสารธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ ที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลชีพหลายชนิดโดยเฉพาะโรคผิวหนัง ให้เป็นอีกส่วนหนึ่งของแผนการรักษาโรคผิวหนังได้ โดยข่าพันธุ์ที่ปลูกมากในจังหวัดสมุทรปราการและมีชื่อเสียง ได้แก่ ข่าหยาบ และข่าตาแดง ทั้งสองชนิดนี้เรียกว่า greater galanga ในด้านการใช้เป็นสมุนไพร ข่าเป็นพืชที่มีคุณค่าทางยาสูงเพราะจากงานศึกษาวิจัยพบว่าข่ามีสาร bioactive compounds หลายชนิด และถูกใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยาของแพทย์แผนจีนและอายุรเวทอินเดีย เพื่อแก้ปัญหาเบื่ออาหาร แก้อาเจียน ท้อง อาหารไม่ย่อย งานวิจัยพบว่าข่าประกอบด้วยสารจำพวกแทนนิน ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอล (Chouni & Paul, 2018) ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่อาจถูกพัฒนาเป็นยาได้ อย่างไรก็ตามกรรมวิธีที่ทำการสกัดจะเป็นตัวบ่งบอกว่าจะได้สารที่ได้เป็นกลุ่มไหนมากกว่ากัน ในปัจจุบันเทคโนโลยีการสกัดได้พัฒนามากขึ้นโดยใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น ultrasound-assisted extraction (Quoc, 2021) supercritical carbon dioxide fluid extractor (Lang & Wai, 2001) microwave-assisted extraction (Hamid Nour et al., 2021) ซึ่งพัฒนาขึ้นเพื่อลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้สามารถสกัดได้สาร bioactive ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามข้อมูลต่างๆ ที่มีในงานวิจัยเป็นการสกัดด้วยวิธีที่

แตกต่างกัน รวมทั้งเป็นข้าที่ปลูกในพื้นที่ของแต่ละท้องถิ่น สารสำคัญจึงอาจมีปริมาณแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม การใช้ประโยชน์จากสารสกัดข้ายังอยู่จำกัดในวงงานวิจัย จากฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจของข้า กลุ่มผู้วิจัยต้องการพัฒนาวิธีการสกัดข้าที่ประหยัดและปลอดภัย และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของข้าที่ปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ เพื่อให้ได้ข้อมูลทางด้านพิษเภสัชเคมีของข้าที่ปลูกในท้องถิ่น และยังเป็นการยกระดับห่วงโซ่เศรษฐกิจของข้า ซึ่งถึงแม้ข้าจะเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกมากในจังหวัดสมุทรปราการ แต่ราคาขายของพืชผลทางการเกษตรมักมีราคาต่ำและราคาอาจไม่แน่นอน บางฤดูกาลอาจล้นตลาด หากมีการพัฒนาสารสกัดข้ามาใช้ประโยชน์ได้ในเชิงพาณิชย์ จะทำให้เกษตรกรผู้ปลูกข้ามีรายได้ที่แน่นอนและยั่งยืนมากขึ้น

ด้านเทคโนโลยีหรือวิธีการสกัดข้าให้ได้สารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์และการใช้ประโยชน์ต่างๆ ของข้า นั้นได้มีผู้ศึกษาไว้หลายวิธีแตกต่างกัน เช่น แบบที่ใช้ทั่วไปคือการแช่สกัดด้วยเอทานอลหรือเมทานอล การต้มด้วยน้ำเดือด จากนั้นนำสิ่งสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยการระเหยในเครื่องระเหยแบบหมุน หรือการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เทคโนโลยีใหม่ๆ ที่เพิ่มเข้ามาเพื่อให้การสกัดมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ได้แก่ การใช้อัลตราซาวด์มาช่วยการสกัดข้า หรือการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับวิธีการแช่สกัด อาจสามารถเร่งให้สกัดสารได้มากขึ้น ประหยัดเวลาและตัวทำละลายที่ใช้ได้ ซึ่งการสกัดแต่ละวิธีนั้นทำให้ได้สารสกัดที่ไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารในข้ากับตัวทำละลาย อุณหภูมิ ระยะเวลาที่ทำการสกัดที่ต่างกัน ตามแต่วัตถุประสงค์ที่ต้องการ ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญไม่น้อยไปกว่ากันคือ สายพันธุ์ของข้าที่นำมาทำการวิจัย แหล่งเพาะปลูก อายุของเหง้าข้า เป็นต้น กลุ่มผู้วิจัยมีความสนใจ ในการวิจัยเพื่อพัฒนาและยกระดับห่วงโซ่เศรษฐกิจข้าที่ปลูกได้มากในจังหวัดสมุทรปราการ โดยเฉพาะข้าหยวกซึ่งได้ชื่อว่ามีคุณภาพดี มีชื่อเสียงเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และมีปลูกมากในจังหวัดนี้ เช่น พื้นที่ในตำบลบางบ่อ ซึ่งเกษตรกรใช้พื้นที่ว่างของบ่อเลี้ยงปลาสดหรือปลาอื่นๆ มาปลูกข้า โดยทำการสกัดสารสำคัญจากข้าหยวก (*Alpinia galanga* (L.) Willd.) ซึ่งเป็นคนละต้นกับข้าแดง *Alpinia officinarum* Hance. ที่ไม่พบว่ามีปลูกในเชิงเศรษฐกิจในจังหวัดสมุทรปราการ เพื่อเป็นข้อมูลทางวิชาการด้านสารสำคัญ โดยมุ่งเน้นไปที่วิธีการสกัดที่ประหยัด มีประสิทธิภาพ ได้สารกลุ่มที่ต้องการเพื่อนำไปใช้พัฒนาเป็นยาฆ่าเชื้อราและแบคทีเรีย รวมทั้งอาจได้สารสำคัญอื่นๆ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางได้ เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่า และยกระดับจากพืชที่เป็นอาหารให้เป็นสมุนไพรรักษาสุขภาพในแง่มุมต่างๆ นอกเหนือจากการใช้เป็นเครื่องเทศปรุงอาหาร งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีการสกัดให้ได้สารสำคัญสูง ด้วยวิธีที่ง่าย ประหยัด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีสกัดสารสกัดจากเหง้าชำที่ปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ ที่มีประสิทธิภาพดี ให้ได้สารสกัดในปริมาณมาก เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพในปริมาณสูง
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดชำ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำสารสกัดชำไปประยุกต์ใช้ทางเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. สกัดผงชำด้วยวิธีต่างๆ 3 วิธี ได้แก่ maceration (การแช่สกัด) sonication (การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง) และการแช่สกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อรวบรวมข้อมูล ด้านเทคนิคที่ดี ข้อดีข้อเสีย โดยทดลองปรับเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้ เพื่อให้ได้วิธีการสกัดที่เหมาะสม ได้สารสำคัญในปริมาณสูง ประหยัดเวลา ประหยัดพลังงานและมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
2. ทำการศึกษาพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารสำคัญด้วยวิธี TLC-densitometry ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและประหยัดเวลา เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญในสารสกัดชำ เพื่อทำมาตรฐานสารสกัด และเพื่อประโยชน์การนำไปใช้ในการตั้งตำรับที่มีสารสำคัญที่มีความเข้มข้นสม่ำเสมอ
3. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดชำที่ได้จากการสกัดวิธีต่างๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ *S. aureus* และฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีสกัดที่ดี เพื่อใช้ในการสกัดสมุนไพรชำ ให้ได้สารสำคัญในปริมาณมาก ในราคาประหยัดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
2. ได้ข้อมูลวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดชำโดยวิธี TLC-densitometry โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 1'-acetoxychavicol acetate (ACA)
3. ได้วิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นสารสำคัญในสารสกัดชำเพื่อใช้ในการตั้งตำรับให้มีคุณภาพสม่ำเสมอ
4. ได้ข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ *S. aureus* และฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* ของสารสกัดชำ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข่า

ข่า มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Alpinia galanga* (Linn.) Swartz. มีชื่อพ้อง คือ *Languas galanga* (Linn.) Stuntz. มีชื่ออื่น คือ ข่าหยวก (ภาคเหนือ) ข่าหลวง (ภาคเหนือ และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ข่าใหญ่ กุ๊กกโรหิณี (ภาคกลาง) สะเอเซย สะเอเคย (แม่ฮ่องสอน) ชื่อเรียกเป็นภาษาอังกฤษว่า greater galanga, false galanga หรือ galangal จัดเป็นพืชอยู่ในวงศ์ขิงหรือ Zingiberaceae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน เหง้ามีข้อหรือปล้องเห็นได้ชัด ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกัน ใบรูปหอกมีปลายแหลม รูปรีหรือเกือบขอบขนาน ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ โคนใบแหลมก้านใบมีขนเล็กน้อย กาบใบแผ่ออกหุ้มต้น ดอกเป็นช่อออกที่ปลายยอด ก้านช่อมีผิวเกลี้ยง ไม่มีขน แต่แกนกลางช่อมีขน ดอกมีขนาดเล็ก ใบประดับรูปไข่ กลีบเลี้ยงสีขาวอมเขียว มีขน โคนกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นหยักมนๆ กลีบดอกมีโคนเชื่อมติดกันเป็นหลอดสั้นๆ ปลายแยกเป็น 3 กลีบ มีกลีบบนหนึ่งกลีบ กลีบล่างสองกลีบ ที่โคนกลีบดอกมีผลรูปกลมหรือรี สีแดงอมส้ม เมื่อแก่จัดจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ภายในมี 2 - 3 เมล็ด (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ ม.มหิดล; สำนักงานพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยา ภูเก็ต) (องค์การมหาชน)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข่าเป็นพืชสมุนไพรที่ผู้ศึกษาทางเภสัชวิทยาไม่น้อยกว่าพืชอื่นๆ อาจเป็นเพราะเป็นพืชที่มีความปลอดภัยสูง เนื่องจากใช้เป็นอาหารมาช้านาน จนมีผู้กล่าวว่าสารสำคัญในข่าเป็นสมุนไพรพดุงทองคำ ด้วยพบสารสำคัญมากมาย รวมทั้งมีการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลอง และในหลอดทดลองพบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น anti-proliferative, apoptotic, anti-angiogenic (Chouni & Paul, 2018)

ในประเทศไทยมีการศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัด จากสมุนไพรและผักพื้นบ้านชนิดต่างๆ จำนวนมากรวมทั้งข่าด้วย ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของข่า ไม่ได้โดดเด่นมากนัก มีพืชสมุนไพรชนิดอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข่า แต่เพราะข่าเป็นพืชที่ถูกใช้เป็นอาหารมานาน มีความปลอดภัยสูง หากรู้วิธีสกัดที่เหมาะสมจะสามารถใช้ประโยชน์ได้อีกมากมาย การศึกษาสารต้านอนุมูล

อิสระในพืชนั้นมีการศึกษาด้วยตัวทำละลายหลายชนิด ผลด้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบได้จากต่างห้องปฏิบัติการจะให้ผลที่แตกต่างกันตามแต่ตัวทำสกัดและเทคนิคที่ใช้ในการสกัด หรือใช้สารอ้างอิงมาตรฐานต่างกัน ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบฤทธิ์ได้โดยตรง Mahae & Chaiseri (2009) ทำการศึกษาสกัดผงชาด้วย 50% ethanol และ ด้วยน้ำร้อน 80 องศาเซลเซียส ในสัดส่วน 1 ต่อ 10 นำไปศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่า สารสกัดด้วย ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวัดเป็น ORAC values พบว่ามีฤทธิ์ดีกว่าที่สกัดด้วยน้ำ 1.18 เท่า และมีฤทธิ์ดีกว่าส่วนที่เป็นน้ำมันหอมระเหย 4.69 เท่า และยังพบว่าการสกัดด้วย ethanol ได้สารประกอบฟีนอลมากกว่าที่สกัดด้วยน้ำ 3.5 เท่า เมื่อวิเคราะห์หาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์พบว่า การใช้ ethanol สามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ได้มากกว่าการสกัดด้วยน้ำ 8.5 เท่า ส่วนในน้ำมันหอมระเหยมีสารประกอบฟีนอลน้อยกว่าประมาณ 10 เท่าและไม่พบฟลาโวนอยด์ในน้ำมันหอมระเหย เมื่อวิเคราะห์ส่วนที่สกัดได้ด้วย 50% ethanol ด้วย GC-MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่วัดสารที่ระเหยได้ สารสำคัญที่พบส่วนใหญ่ คือสาร 1'-acetoxychavicol acetate หรือ ACA โดยตรวจพบ 3452.06 ± 1058.49 ไมโครกรัม/1 กรัม น้ำหนักแห้งของผงชา รองลงมาคือ chavicol (4-allylphenol), methyl eugenol และ eugenol พบว่ามี 84.11 ± 14.13 , 28.64 ± 4.37 และ 4.35 ± 0.95 ไมโครกรัม/1 กรัม น้ำหนักแห้งของผงชา ตามลำดับ (Mahae & Chaiseri, 2009) งานวิจัยอีกรายงานหนึ่งทำคล้ายกันคือสกัดชาด้วย 60% methanol, 60% ethanol และน้ำ พบว่าสารสกัดด้วย 60% methanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (Devi, Singh & Sharma, 2018) เนื่องจากสามารถสกัดได้สารประกอบฟีนอลมากกว่านั่นเอง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้ประโยชน์ในเครื่องสำอางเกี่ยวกับผิวได้ เช่น ครีม สบู่ การศึกษาฤทธิ์หลังจากการเตรียมเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์แล้วมักไม่ค่อยพบ เนื่องจากการทดสอบถูกรบกวนจากสารอื่นๆ ดังนั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงมักได้หลังจากการสกัดและก่อนเตรียมเป็นตำรับ ความคงทนด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาติดตามหลังการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ ด้วยโดยใช้เทคนิคที่เหมาะสม Ruangsawang & Niamsup (2021) ศึกษาความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาที่ผ่านกระบวนการต่างๆ ได้แก่ การต้ม การอบแห้งที่ 40 และ 60 องศาเซลเซียส แล้วทำการสกัดด้วย 70% ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อชา 10 กรัม พบว่าชาที่ผ่านการต้มและอบให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าชาสดเมื่อเทียบที่น้ำหนักชาเท่ากัน เพราะการผ่านขั้นตอนต่างๆ ดังกล่าวสารยังไม่ถูกออกซิไดซ์นั่นเอง และยังมีผลทำให้สารถูกสกัดออกมาง่ายขึ้น (Ruangsawang & Niamsup, 2021) Sani และคณะ (2019) ศึกษาสกัดชาหยวกด้วยตัวทำละลายสามชนิดคือ hexane, ethyl acetate และ methanol ผลพบว่า สารสกัดชาจาก methanol ให้สารสกัดหยาบในปริมาณมากที่สุด ซึ่งประกอบด้วยสารในกลุ่ม saponins, flavonoids, tannins, phenols, steroids และ terpenoid ขณะที่ hexane และ ethyl acetate สกัดไม่พบสารในกลุ่ม saponin และ tannin

ออกมา เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยหาเป็นค่า IC_{50} พบว่า สารสกัดด้วย methanol ให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่าสารสกัดที่สกัดด้วย ethyl acetate และ hexane คือ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 364.31, 475.87 และ 800.52 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Sani et al., 2019)

Al-Mosaw & Al-Salhie (2021) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาที่สกัดด้วย ethanol ในกลุ่มทดลองนกกระทา โดยแบ่งนกเป็นสี่กลุ่มคือ กลุ่มควบคุมให้อาหารและน้ำปกติ กลุ่มที่สองให้กิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อให้เกิดการอักเสบของตับ กลุ่มที่สามให้สารสกัดชาคู่กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กลุ่มที่สี่ให้สารสกัดชาอย่างเดียว เมื่อทำการเจาะเลือดวัดค่าเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ malonaldehyde (MDA), aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) ซึ่งเป็นสารที่แสดงถึงการอักเสบที่เกิดจากอนุมูลอิสระ พบกลุ่มที่ได้สารสกัดชาอย่างเดียวมีค่าเอนไซม์เหล่านี้ต่ำอย่างมีนัยสำคัญ และกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีค่าเอนไซม์เหล่านี้สูงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ส่วนกลุ่มที่สามได้รับทั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารสกัดชา มีค่าเอนไซม์ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม เมื่อดูเอนไซม์ชนิดดีที่ช่วยต้านอนุมูลอิสระในเลือดพบว่ากลุ่มที่ได้สารสกัดชา มีเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GPx) สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญด้วย (Al-Mosaw & Al-Salhie, 2021) การศึกษานี้ชี้ชัดว่าการรับประทานชาช่วยต้านอนุมูลอิสระในร่างกายของนกกระทาได้จริง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของงานวิจัยต่างๆ จะเน้นไปที่การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic compounds) ซึ่งต่างจากการศึกษาฤทธิ์ด้านอื่น เช่น การฆ่าเชื้อ ที่เน้นปริมาณสาร ACA การพัฒนาสารสกัดชามาใช้ประโยชน์ด้านสุขภาพนอกเหนือจากฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ด้านการใช้เป็นเครื่องสำอางได้มีการศึกษาอย่างเป็นระบบมากขึ้นในปัจจุบัน จากการสืบค้นข้อมูลพบว่ามีผู้ศึกษานำเอาสารสกัดชาไปเตรียมเป็นเครื่องสำอางต่างๆ เช่น ใช้เป็นสารกันแดด (Rizkita & Sakardi, 2021) รูปแบบยาเตรียมที่ผสมสารสกัดชา ได้แก่ ครีม เจล (Taurina & Andrie, 2013)

การสกัดเพื่อให้ได้สารสำคัญจากเหง้าชามาใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมตำรับยานั้น งานวิจัยส่วนใหญ่ใช้ ethanol ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 50% - 95% พบว่าการสกัดด้วย ethanol ให้ผลได้สารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าการสกัดด้วยน้ำอย่างเดียว โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลรวมและสาร 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) การสกัดด้วยน้ำจะพบว่ามีการศึกษาไว้น้อยกว่าการสกัดด้วย ethanol โดย Hasan et al. (2020) ได้ศึกษาวิธีการสกัดผงชาแห้งที่เตรียมจากการอบแห้งที่ 55 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำโดยการต้มที่อุณหภูมิ 40 – 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาต่างๆ กัน พบว่าสกัดได้ดีเมื่อต้มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ดிரองลงมาคือต้มเดือด 1 ชั่วโมง การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญในชาสามารถทนความร้อนได้

การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากข่า Oonmetta-aree et al. (2006) พบว่าสารสกัดด้วย ethanol สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* โดยศึกษาด้วยวิธี broth dilution มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดข่า เท่ากับ 0.325 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมี minimum bactericidal concentration (MBC) เท่ากับ 1.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีกลไกการยับยั้งเชื้อพบว่าเกิดจากการทำลายเยื่อหุ้มต่างๆ ในเซลล์และทำให้เกิดการรวมกลุ่มของ cytoplasm ของเชื้อ แต่สารสกัดไม่พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* เนื่องจากไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์แกรมลบที่มี lipopolysaccharide หุ้มอยู่ที่ผิวเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาพบอีกว่า สารสำคัญที่พบมากที่สุดในการสกัดด้วยวิธีนี้ คือ D,L-1'-acetoxychavicol acetate (Oonmetta-aree et al., 2006) การศึกษานี้สามารถนำสารสกัดไปใช้เป็นสารกันเสียในอาหารได้ (Zhang et al., 2021)

Voravuthihunchai et al. (2006) ศึกษาสารสกัดข่าด้วยตัวทำละลายสามชนิด คือ chloroform, methanol และน้ำ เพื่อศึกษาฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans*, *Salmonella Typhi* และ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) พบว่ามีเพียงสารสกัดจาก chloroform ที่ให้ผลยับยั้ง *S. aureus*, *S. mutans* และ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ได้ โดยสารหลักที่แยกได้ คือ 1'-acetoxychavicol acetate มีค่า MIC ต่อ *S. aureus* ทั้งสองชนิดเท่ากัน คือ 0.256 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Voravuthihunchai et al., 2006) เมื่อเทียบกับงานวิจัยที่สกัดด้วย ethanol ข้างต้น การสกัดด้วย chloroform จะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่า

Latha et al. (2009) ศึกษาสารสกัดข่าหยาบด้วย acetone พบว่าสามารถยับยั้ง *S. Typhi* (92%), *E. coli* (82%) และ *Enterococcus faecalis* ที่ดื้อต่อ vancomycin (8%) เมื่อศึกษาที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ซึ่งเป็น subinhibitory concentration) สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ 1'-acetoxychavicol acetate โดยมีกลไกยับยั้งการทำงานของพลาสมิด (plasmid) ซึ่งหากให้สารนี้ร่วมกับยาต้านแบคทีเรียจะช่วยให้ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น (Latha et al., 2009)

Rao et al. (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของข่าหยาบโดยสกัดด้วย methanol, acetone และ diethyl ether ในแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MTCC 2391, *Enterobacter aerogene*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* MTCC 1563, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 6642, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus epidermis* โดยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดจาก methanol มีฤทธิ์ดีที่สุด ใช้ได้ผลกับเชื้อทุกชนิดโดยมีค่า MIC = 0.04 – 1.28 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ MBC = 0.08 - 2.56 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดจากข่าจึงแสดง

ศักยภาพในการประยุกต์ใช้เป็นยาจากสมุนไพรต่อไป โดยเมื่อสกัดด้วย methanol สารที่พบมากที่สุด คือ 5-hydroxymethyl furfural (59.9%) ตามด้วย benzyl alcohol (57.6%), 1,8-cineole (15.65%), methylcinnamate (9.4%), 3-phenyl-2-butanone (8.5%) และ 1,2 benzenedicarboxylic acid (8.9%)

Prakaththagomol et al. (2012) ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของข้าหยวกด้วย ethanol, hexane และ ethyl acetate เทียบกับน้ำมันหอมระเหย ต่อเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, and *S. typhimurium* ATCC 14028 พบว่า สารสกัดข้าด้วย hexane ข้าเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่าสารสกัดด้วย ethanol และ ethyl acetate แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. typhimurium* ส่วนสารสกัดด้วย ethanol และ ethyl acetate ข้าเชื้อทั้งสามชนิดได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ essential oil ของข้าพบว่า essential oil สามารถฆ่าเชื้อทั้งสามชนิดและมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดหยาบ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างกันจะได้สารสำคัญที่มีฤทธิ์แตกต่างกันด้วย และงานวิจัยส่วนใหญ่ยังไม่ได้อธิบายโครงสร้างของสารที่พบในสารสกัด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดข้ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* ที่ก่อให้เกิดสิว ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางช่วยบรรเทาการเกิดสิว Niyomkam et al. (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดข้าที่สกัดด้วย ethyl acetate ต่อเชื้อ *P. acne* พบมีค่า MIC และ MBC ที่ใช้กับ *P. acne* เท่ากับ 0.62 และ 2.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Niyomkam et al., 2010)

สารสกัดที่เป็นน้ำมันหอมระเหย (essential oil) เป็นสารสกัดที่ได้จากการใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำจากเหง้าข้าสด Eff & Rahayu (2016) ได้ศึกษาพบว่า essential oil ของข้า มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. typhi* ได้ ซึ่ง essential oil ที่กลั่นด้วยไอน้ำให้ผลผลิต 0.03% และแยกสารต่างๆ ออกมาได้ 13 ชนิด แต่ไม่พบว่ามี 1'-acetoxychaviol acetate (ACA) รวมอยู่ด้วย เนื่องจากสารชนิดนี้ระเหยได้ไม่ดี นอกจากนี้ยังพบการศึกษาในสัตว์ทดลองที่เตรียม essential oil ของข้าให้อยู่ในรูปแบบอิมัลชัน ให้หนูที่ถูกบ่อนด้วยเชื้อ *S. typhi* รับประทานในขนาด 25, 50, 75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสามารถรักษาหนูทดลองให้หายจากการติดเชื้อ *S. typhi* ได้ดีเทียบเท่ากับหนูทดลองที่ได้รับ chloramphenicol ขนาด 8 มิลลิกรัม/250 กรัมของน้ำหนัก สารสำคัญที่คาดว่าเป็นตัวออกฤทธิ์ใน essential oil นี้ เป็นสารในกลุ่ม terpene และ sesquiterpene

Luangnarumitchai et al. (2007) ใช้น้ำมันหอมระเหยจากข้าหยวกมาทดลองยับยั้งเชื้อ *P. acne* จำนวน 5 สายพันธุ์พบว่า มีฤทธิ์ไม่ดีมากนัก มี clear zone ตั้งแต่ $8.6 \pm 0.8 - 9.8 \pm 2.0$ มิลลิเมตร ขณะที่ positive control (tetracycline 30 µg/disc) มี clear zone เท่ากับ $35.3 \pm 3.0 - 35.8 \pm 2.8$ มิลลิเมตร และน้ำมันหอมระเหยมีค่า MIC > 4% v/v. (Luangnarumitchai และคณะ, 2007) ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยของข้าไม่เหมาะที่จะนำมาใช้พัฒนาต่อ เนื่องจากต้องใช้ในปริมาณที่สูง

มากเพื่อให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อชนิดนี้ ในการศึกษาอื่นๆ ที่ใช้ essential oil ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ให้ผลการศึกษาร่วมกันว่าฤทธิ์ไม่ได้ดีมาก มีค่า MIC ค่อนข้างสูง (ยกเว้น *S. aureus*) และ MBC มากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* (Manwiwattanakul et al., 2014)

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของพืชสมุนไพรว่าชนิตของตัวทำละลายที่ใช้สกัดมีผลเช่นกัน Reka et al. (2023) ได้สกัดชาหยวกด้วยตัวทำละลาย hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Candida albicans* โดยใช้ clotrimazole 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็น positive control (inhibition zone = 36.10 มิลลิเมตร) พบสารสกัดจาก hexane ให้ inhibition zone มากที่สุด โดยมีโซนยับยั้งต่อ *C. albicans* และ *A. niger* เท่ากับ 20.20 ± 0.46 มิลลิเมตร และ 18.20 ± 0.46 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Reka et al., 2023) การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดอื่นๆ ใน *Candida* species ซึ่งเป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่มักเป็นปัญหาใหญ่ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง พบว่าสารสกัดด้วย ethanol ของเหง้าชาแห้ง สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida tropicalis* และ *Candida glabrata* ซึ่งศึกษาโดยวิธี disk diffusion มีค่า MIC เท่ากับ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Khodavandi et al., 2013)

งานวิจัยของ Khattak et al. (2005) ซึ่งศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Trichophyton longifusus* ของสารสกัดชาหยวกที่สกัดด้วย ethanol โดยวิธี agar tube dilution พบว่ามีสารสกัดยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ ได้ 60% และสามารถยับยั้ง *Aspergillus flavus*, *Microsporum canis* และ *Fusarium solani* ได้ 30%, 50% และ 40% ตามลำดับ (Khattak et al., 2005)

2.3 สารสำคัญที่พบในเหง้าชา

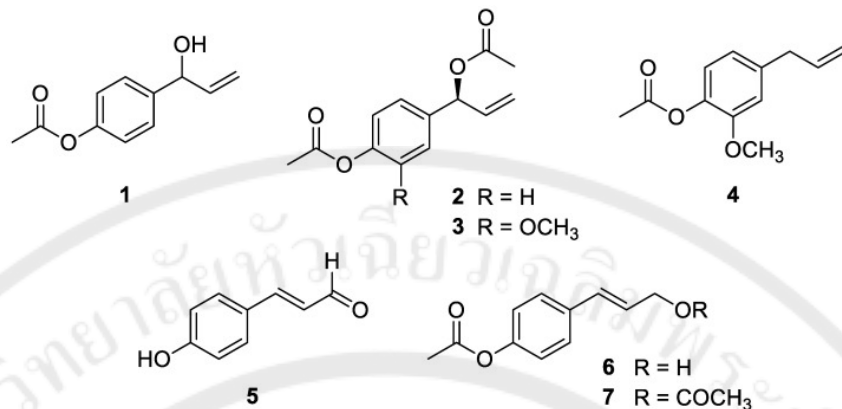
มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับสารที่พบในเหง้าชาไว้แตกต่างกันตามแต่ละห้องปฏิบัติการ ที่สามารถตรวจพบได้ทำให้สารที่พบมีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ขึ้นกับวิธีและตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษา Aljobair (2022) ได้รายงานผลการศึกษาสารประกอบฟีนอลในเหง้าชาที่สกัดด้วย methanol:water (8:2) ในสัดส่วนผงชาแห้ง 5 กรัมต่อตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร โดยคนนาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองแล้วระเหยแห้ง แล้วนำไปศึกษาส่วนประกอบของสารประกอบฟีนอล ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) พบสารสำคัญดังนี้ gallic acid (160.04), (+)-catechin (124.33), quercetin (105.34), catechol (100.18), isorhamnetin (82.2), trans-cinnamic acid (81.97), protocatechuic acid (71.46), syringic acid (37.09), apigenin 7 glucoside (16.40), caffeic acid (13.96), trans-ferulic acid (11.67), rutin trihydrate (11.47), resveratrol (6.66), p-coumaric acid (2.93), naringenin

(2.36), และ kaempferol (0.66) ในปริมาณเป็น มิลลิกรัม/100 กรัม ถึงแม้ว่างานวิจัยนี้ไม่ได้มีรายงานถึง acetoxychaviol acetate (ACA) แต่ทำให้รู้ว่าในเหง้าช่าประกอบด้วย gallic acid ในปริมาณสูงและสารประกอบฟีนอลอื่นๆ ในปริมาณที่สูงเช่นกัน

ACA เป็นสารหลักที่พบมากในพืชช่า เป็นสารที่มีกลิ่นและสามารถระเหยได้บ้าง มีผู้วิจัยศึกษาและแยกสารชนิดนี้ไว้มาก โดยเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มที่ชื่อว่า phenylpropanoids ซึ่งเป็นสารกลุ่มย่อยของ phenolic compounds ประเภท flavonoids อีกทีหนึ่ง เป็นสารที่ส่วนใหญ่เมื่อสกัดด้วย ethanol จะได้สารชนิดนี้ในปริมาณมากและเป็นสารหลักที่พบในช่า บางครั้งเรียกว่า galangal acetate ในงานวิจัยทบทวนวรรณกรรมของ Kojima-Yuasa & Matsui-Yuasa (2015) ได้อ้างอิงถึงฤทธิ์ต่างๆ ของ ACA ที่พบว่ามียุทธวิธีทางเภสัชวิทยาดังนี้ คือ anticancer, gastroprotective, xenobiotic protection, antiallergic, antimicrobial และ antidementia (Kojima-Yuasa & Matsui-Yuasa, 2015) นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาถึงการใช้ประโยชน์จากช่า เพื่อเป็นสารต้านมะเร็ง และพบว่าสารสำคัญที่มีฤทธิ์ดังกล่าวมักเป็นสารกลุ่ม phenylpropanoids นี้เอง

Lee et al. (2023) ได้ทำการสกัดเหง้าช่า 100 กรัม โดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลายด้วยวิธี reflux extraction นาน 2 ชั่วโมง โดยสกัดซ้ำสองครั้ง แล้วนำของเหลวที่สกัดได้ไประเหยให้แห้ง จากนั้นทำการเติมน้ำและ ethyl acetate จำนวนเท่ากัน เพื่อทำการแยกส่วนสาร (fractionated) ด้วยเทคนิค column chromatography พบว่าสามารถแยกสารกลุ่ม phenylpropanoids ได้จำนวน 7 ชนิด (ภาพที่ 2.1) และนำสารที่แยกได้ไปศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานชนิดที่ 1

โดยที่ 1'-S-1'-acetoxychavicol acetate (สาร 2), 1'-S-1'-acetoxyeugenol acetate (สาร 3) และ eugenyl acetate (สาร 4) ได้จากการแยกส่วนสารสกัดด้วย 95% ethanol ส่วนสาร 1, 5, 6 และ 7 ได้จากการแยกส่วนสารสกัดด้วย acetonitrile ผสมกับน้ำ เมื่อทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography แล้วนำมาศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้างอินซูลินในเซลล์ ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0 - 10 ไมโครโมลาร์ (μM) พบว่าสารชนิดที่ 1 - 4 มีฤทธิ์ต้านเบาหวานโดยการยับยั้ง α -glucosidase ได้ และเมื่อศึกษาด้วยเซลล์ INS-1 pancreatic β -cells ของหนูที่กระตุ้นด้วยกลูโคส พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนอินซูลินให้เพิ่มขึ้น โดยดูจากผลการทดลองที่สามารถเพิ่มค่าดัชนี glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) เมื่อทำเทียบกับเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัด โดยสารที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ 1'-S-1'-acetoxyeugenol acetate (สาร 3) และไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ในความเข้มข้นที่ทดลอง



ภาพที่ 2.1 สาร phenylpropanoids ที่แยกได้จากเหง้าของ *A. galanga*

(1 = (±)-1'-hydroxychavicol acetate, 2 = (1'S)-1'-acetoxychavicol acetate, 3 = (1'S)-1'-acetoxyeugenol acetate, 4 = eugenyl acetate, 5 = *trans-p*-coumaraldehyde, 6 = *trans-p*-acetoxycinnamyl alcohol และ 7 = *trans-p*-coumaryl diacetate)

งานวิจัยนี้ให้ข้อมูลด้านวิธีการสกัดที่พบว่า galangal acetate ชนิดที่ 2 - 4 สามารถสกัดได้ด้วย ethanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและตกค้างน้อย มีความเป็นพิษต่ำสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดสารสำคัญให้แคลง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพได้ สารที่ 1 - 4 เป็นสารที่งานวิจัยส่วนใหญ่อ้างอิงว่าเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งงานวิจัยนี้จะมุ่งไปที่การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ ACA (สารที่ 2) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์พบว่าเป็นชนิด 1'-S-1'-acetoxychavicol acetate มีทิศทางการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ (specific rotation) เป็นลบ มีค่าเท่ากับ -50 องศา

2.4 วิธีการสกัดสมุนไพร

วิธีการสกัดสมุนไพรมีหลายวิธี การเลือกใช้วิธีใดเพื่อสกัดสารขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น วัตถุประสงค์ที่ต้องการใช้สารสกัดนั้น ชนิดของสารสำคัญที่ต้องการหรือส่วนของพืชที่นำมาสกัด และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดก็จะเหมาะสมกับวิธีการสกัดแต่ละวิธีที่ใช้เช่นกัน (Patel et al., 2021)

วิธีการสกัดพืชสมุนไพร มีที่นิยมใช้ ได้แก่

1. การแช่สกัด (maceration)
2. การชง (percolation) การแช่ (infusion) และการตุ๋น (decoction)
3. การสกัดด้วยความร้อนแบบต่อเนื่องด้วยเครื่องซอกท์เลต (Soxhlet extraction)
4. การสกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux extraction)

5. การสกัดด้วยการกลั่น (distillation extraction)
6. Solid phase microextraction
7. การสกัดด้วยของไหลที่อยู่ในสภาวะเหนือจุดวิกฤติ (supercritical fluid extraction)
8. การใช้คลื่นไมโครเวฟในการช่วยสกัด (microwave assisted extraction)
9. การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในการช่วยสกัด (ultrasonic assisted extraction)

ในที่นี้จะขอกล่าวถึงรายละเอียดวิธีสกัดที่ใช้ในงานวิจัยโดยย่อ คือ การแช่สกัดและการสกัดด้วยวิธี การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในการช่วยสกัด (ultrasonic assisted extraction, UAE)

2.4.1 การแช่สกัด (maceration)

การแช่สกัด เป็นวิธีที่ง่ายและใช้กันมาอย่างยาวนานที่สุดในการสกัดสาร เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่ไม่แข็งมาก ทำโดยใช้ตัวทำละลายมาแช่พืชสมุนไพรให้ท่วม มีการเขย่า หรือการคนเป็นระยะๆ จนกระทั่งเนื้อสมุนไพรอ่อนนุ่ม และตัวทำละลายแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรและละลายเอาสารสำคัญออกมา โดยไม่ใช้ความร้อน การแช่สกัดเป็นวิธีที่ใช้เวลาค่อนข้างนาน โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 7 วันหรือนานกว่านั้น เพื่อให้ตัวทำละลายซึมเข้าไปและละลายเอาสารสำคัญให้แพร่ออกมาจากเนื้อเยื่อพืช การเร่งให้สารถูกสกัดได้เร็วขึ้นสามารถทำได้โดยการใช้พลังงานภายนอกช่วย เช่น การใช้ ultrasound หรือ microwave หรือการเพิ่มอุณหภูมิ ก็เป็นทางหนึ่ง que เพิ่มประสิทธิภาพการสกัด ทั้งนี้ขึ้นกับสารสำคัญในพืชว่าสามารถทนต่อความร้อนได้มากน้อยแค่ไหน รวมถึงเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่มีในห้องปฏิบัติการ

2.4.2 การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในการช่วยสกัด (ultrasonic assisted extraction, UAE)

คลื่นอัลตราโซนิก (ultrasonic waves) หมายถึง พลังงานที่เกิดจากคลื่นเสียงที่มีการสั่นของคลื่นประมาณ 20,000 ครั้งต่อวินาทีหรือสูงกว่า มีความถี่สูงกว่าคลื่นเสียงปกติ โดยทั่วไปแล้วคลื่นเสียงที่มนุษย์ได้ยินนั้นเกิดจากการสั่นสะเทือนของตัวกลางที่ยืดหยุ่น ที่มีความถี่อยู่ในช่วง 20 - 20,000 กิโลเฮิร์ต เครื่องคลื่นเสียงความถี่สูงทำงานด้วยความถี่ตั้งแต่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ไปจนถึงหลายกิกะเฮิร์ตซ์ (สุพิชญ์ชญา กลั่นทะกะสุวรรณ, 2562)

การสกัดด้วยอัลตราโซนิกเกิดขึ้นได้ด้วยกลไกที่ช่วยส่งเสริมการสกัด กล่าวคือเนื้อเยื่อพืชประกอบด้วยส่วนผนังเซลล์ชั้นนอกสุดที่เป็นสารที่มีความหนาและแข็งแรง ทำให้ยากต่อการสกัด การสกัดสารสำคัญออกจากชิ้นส่วนผนังพืชได้จะต้องเกิดกระบวนการสองขั้นตอน คือ กระบวนการที่ตัวทำละลายแพร่ผ่านผนังเซลล์ของพืชและละลายสารออกมาหลังจากผนังเซลล์ถูกทำลายลง อัลตราโซนิกช่วยเร่งให้เซลล์พืชดูดซับตัวทำละลายได้ดีกว่าการแช่สกัดธรรมดา กลไกการเพิ่มประสิทธิภาพของ

กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า ปรากฏการณ์ควิเตชัน (cavitation) ซึ่งคือ กระบวนการที่เกิดขึ้นกับตัวทำละลายเมื่อได้รับคลื่นอัลตราโซนิก การที่ของเหลวได้รับคลื่นอัลตราโซนิกจะถูกบีบอัด (compress) และคลายตัว (stretch) ซ้ำไปมาหลายพันรอบ ทำให้เกิดฟองอากาศขนาดเล็กๆ มากมาย ฟองอากาศจะใหญ่ขึ้นและแตกออก เมื่อแตกออกจะปลดปล่อยพลังงานออกมา แรงแกลจากฟองอากาศที่เกิดขึ้นจำนวนมากเกิดการสัมผัสกับเซลล์ของพืชสมุนไพรและทำให้เกิดการแตกออกของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ เครื่องมือที่ใช้สร้างคลื่นเสียงความถี่สูงมีได้ทั้งชนิดแทงจุ่ม (ultrasonic probe) และชนิดอ่าง (ultrasonic baths)

2.4.3 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ชนิดของสารสำคัญหรือสารประกอบในพืชสมุนไพรที่ต้องการสกัด มีความสำคัญต่อการเลือกตัวทำละลายสกัด เนื่องจากในพืชแต่ละชนิดจะประกอบด้วยสารประกอบมากมายหลายชนิด สารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันในด้านการละลายได้ในตัวทำละลายต่างๆ ต่างกัน สารที่มีขั้วจะสามารถละลายน้ำได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ เป็นต้น สารชนิดที่เป็นสารกึ่งมีขั้วที่สามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ เช่น แทนนิน ซาโปนิน ส่วนสารชนิดที่เป็นสารไม่มีขั้วจะไม่สามารถละลายน้ำได้แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายสารอินทรีย์ เช่น น้ำมันหอมระเหย เรซิน เป็นต้น ดังนั้นในการสกัดสารจะต้องรู้ว่าสารที่สนใจนั้นมีคุณสมบัติอย่างไร เพื่อที่จะได้เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม (ศิริวัลย์ สร้อยกล่อม, 2564) ตารางที่ 2.1 แสดงตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารกลุ่มต่างๆ ซึ่งสารในกลุ่ม phenylpropanoids เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มใหญ่คือ ฟลาโวนอยด์ และยังจัดอยู่ในกลุ่ม polyphenols อีกด้วย ดังนั้นจะพบว่าสามารถสกัดได้ดีในตัวทำละลายเกือบทุกชนิด สำหรับน้ำ (water) นั้นมักต้องมีการต้มด้วยอุณหภูมิค่อนข้างสูงและเวลานานจึงจะสกัดได้

ตารางที่ 2.1 ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญในพืช (Pandey & Tripathi, 2014)

Water	Ethanol	Methanol	Chloroform	Ether	Acetone
Anthocyanins	Tannins	Anthocyanins	Terpenoids	Alkaloids	Phenol
Starches	Polyphenols	Terpenoids	Flavonoids	Terpenoids	Flavonol
Tannins	Polyacetylenes	Saponins		Coumarins	
Saponins	Flavonols	Tannins		Fatty acids	
Terpenoids	Terpenoids	Xanthoxylines			
Polypeptides	Sterols	Totarol			
Lectins	Alkaloids	Quassinoids			
		Lactones			

Water	Ethanol	Methanol	Chloroform	Ether	Acetone
		Flavones			
		Phenones			
		Polyphenols			

2.5 การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพร

สารสกัดสมุนไพรที่เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) จะประกอบไปด้วยสารประกอบมากมายหลายชนิด การทำสารสกัดให้บริสุทธิ์ขึ้น (refined extract) สามารถทำได้หากมีความจำเป็น แต่ต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น เนื่องจากต้องใช้วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีอีกหลายชนิดมาทำให้บริสุทธิ์

การใช้สารสกัดหยาบมาเตรียมเป็นตำรับต่างๆ สามารถทำได้โดยการใช้ตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารที่ต้องการได้ในวงแคบ เช่น สารกลุ่มสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น และไม่สกัดสารที่ไม่ต้องการออกมา เช่น สารกลุ่มแป้งและน้ำตาล เป็นต้น

สมุนไพรที่มีคุณภาพต้องคำนึงถึงปริมาณสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ โดยจะต้องมีในปริมาณสูงตามเกณฑ์และมีความสม่ำเสมอทุกรอบการผลิต ซึ่งสมุนไพรวัตถุดิบเป็นพืชที่ปลูกตามธรรมชาติ จะมีความแตกต่างของสารสำคัญที่มาจากความแตกต่างของสถานที่ปลูก สายพันธุ์ และสภาวะแวดล้อมอื่นๆ เช่น สภาพอากาศและน้ำ ระยะเวลาการเก็บเกี่ยว วิธีการเก็บรักษาสมุนไพรก่อนนำมาผลิต ล้วนส่งผลให้สารสำคัญมีความไม่สม่ำเสมอได้ ดังนั้นหากทราบชนิดของสารออกฤทธิ์ก็จะสามารถควบคุมคุณภาพให้สม่ำเสมอได้โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารนั้นๆ ในทางปฏิบัติสารที่ออกฤทธิ์ในสมุนไพรที่เป็นสารเดี่ยวและออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจนมีค่อนข้างน้อย จึงอาจใช้สารเคมีในพืชชนิดอื่นๆ เป็นตัวแทนในการควบคุมคุณภาพได้เรียกว่า ตัวบ่งชี้ทางเคมี (chemical marker หรือ chemical indicator) การใช้ chemical fingerprint ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งในการควบคุมคุณภาพสารสกัดที่นอกจากจะรู้ถึงปริมาณสารสำคัญแล้ว ยังสามารถตรวจสอบการปนปลอมของสมุนไพรได้อีกด้วย

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโดยเทคนิค TLC-densitometry

โครมาโตกราฟีชั้นบาง (Thin-layer chromatography, TLC) (Dolowy & Pyka, 2014; ปวีณา อยู่วัฒนพงศ์ และคณะ, 2563) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานควบคุมคุณภาพเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเภสัชภัณฑ์ วัตถุดิบและสมุนไพร รวมถึงสามารถตรวจสอบสารปนเปื้อนและสิ่งเจือปนในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ รวมทั้งตำรับสมุนไพรที่แปรรูปแล้ว เทคนิคโครมาโตกราฟีชั้นบางมีข้อดี คือ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว เครื่องมือที่ใช้มีราคาไม่แพง และการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากและใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้หลายชนิดพร้อมกันในครั้งเดียว

นอกจากนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้ร่วมกับเครื่องมืออื่น ได้แก่ เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ เรียกชื่อเทคนิคนี้ว่า TLC-densitometry (โครมาโตกราฟฟีซินิตแผ่นบางร่วมกับเครื่องเดนสิโตมิเตอร์) เป็นเครื่องที่สามารถตรวจวัดปริมาณของสารที่อยู่บนแผ่น TLC หรือ paper chromatograph โดยใช้หลักการ scan ตามความเข้มของการดูดกลืนแสง/เรืองแสงของ band ที่ปรากฏบนแผ่น TLC แล้วแปลงสัญญาณเป็น densitogram ช่วยให้การวิเคราะห์/แยกสารด้วยเทคนิค TLC มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น การวิเคราะห์ปริมาณสารจะคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคที่เกิดจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงหรือค่าการเรืองแสงและปริมาณของสารตัวอย่าง

การใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟีซินิตแผ่นบางร่วมกับเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ มีข้อดี คือ เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย มีความไว ความถูกต้อง และความแม่นยำสูง ซึ่งในการวิเคราะห์สารสกัด จะต้องมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วยเสมอ

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องบดสมุนไพร (Cutting mill, RetschMuhle, Germany)
2. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
3. แร่ง (Tyler standard sieve no.12, Tyler, USA))
4. เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (Blender Model HR2155, Philips, Thailand)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า (Electronic balance, Ohaus, USA)
6. เครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (Rotary evaporator Model R-120, Buchi, Switzerland)
7. เครื่องเขย่า (Orbital shaker, Stuart, Germany)
8. อ่างคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic bath, Cole-Parmer, USA)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Circulating water bath, Clifton, USA)
10. Thin layer chromatography visualizer (Camag TLC Scanner 3, Switzerland)
11. Thin layer chromatography sample applicator (Camag Linomat V, Switzerland)
12. ชุดกรองสุญญากาศ (Vacuum Pump Model FY-1C, Sacco Australia)
13. ขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร
14. ขวดแก้วมีฝาปิดสนิทขนาด 1 ลิตร (ShottDuran®, Germany)
15. Autopipette (Pipetman®, Gilson, France)
16. 96-well plate
17. Microplate reader (Biochrom, EZ Read 2000, United Kingdom)
18. Vortex (Model G-560E, USA)
19. Volumetric flask
20. Erlenmeyer flask
21. Eppendorf ขนาด 2 มิลลิลิตร (Eppendorf®, Germany)
22. Magnetic bar and stirrer
23. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น MS 105

24. Test tube (Pyrex[®], FlexLab, Thailand)
25. ตู้ดูดควัน

3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในชาโดยวิธี TLC-densitometry

1. เหย้าชาสดที่ปลูกที่ในตำบลบางบ่อ อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ
2. 95% เอทานอล (ethanol) (VWR International, France)
3. 1'- acetoxychavicol acetate (ACA) (purity, 98.0%, LKT Labs, USA)
4. Precoated TLC plate (Merck, Germany)
5. โพรพิลีน ไกลคอล (Propylene glycol USP), บริษัทเอกตรงเคมีภัณฑ์
6. กลีเซอริน (Glycerin USP), บริษัทเอกตรงเคมีภัณฑ์
7. Syringe filter (Nylon 0.45 mm)
8. กระดาษกรอง (Whatman No.1, UK)
9. Plastic syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร (Nipro, Thailand)
10. Dichloromethane (Fisher Scientific, Germany)
11. Ethyl acetate (Fisher Scientific, Germany)
12. Vanillin (Loba Chemie, Mumbai, India)
13. Sulfuric acid (Qrec, New Zealand)
14. Absolute ethanol (EMSURE[®], Merck, Germany)

3.2.2 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดชา

1. Syringe filter (Nylon 0.45 mm)
2. กระดาษกรอง (Whatman No.1, UK)
3. Plastic syringe ขนาด 10 มล. (Nipro, Thailand)
4. Absolute ethanol (EMSURE[®], Merck, Darmstadt, Germany)
5. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical 95% (DPPH) (Aldrich Chem. Co., Milw., WI, USA)
6. Gallic acid (Fluka analytical, Germany)
7. Quercetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

8. Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck, Darmstadt, Germany)
9. Ascorbic acid (Rankem, RFCL Limited, India)
10. Dimethylsulfoxide (DMSO) (Loba chemie Pvt. Ltd., Mumbai, India)
11. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Fluka Analytical, Germany)
12. Bovine serum albumin (BSA) (Himedia laboratories Pvt. Ltd., Maharashtra, India)

3.3 วิธีทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างผงข่า

เหง้าข่าสดที่ใช้ในการศึกษา คือ *Alpinia galanga* (L.) Willd. วงศ์ Zingiberaceae นำมาจากตำบลบางเพรียง อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ โดยนำตัวอย่างมาระหว่างเดือนกรกฎาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2566 ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชโดยมีหมายเลขอ้างอิงงานวิจัย คือ QBG No. 108548 ทำการเตรียมผงข่าแห้งโดยการนำเหง้าข่ามาล้างให้สะอาด หั่นตามขวางให้เป็นชิ้นหนา 2 - 3 มิลลิเมตร นำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน ไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำไปบดเป็นผงด้วยเครื่องบดสมุนไพร (cutting mill) โดยใช้ตะแกรงเบอร์ 6 จากนั้นนำไปคัดขนาด โดยนำไปผ่านร่อนขนาด 12 mesh ผงข่าขนาดที่ใหญ่กว่ารูเปิดและค้างบนร่อนให้นำมาบดลดขนาดด้วยเครื่องบดชนิดเครื่องปั่นน้ำผลไม้ จากนั้นทำการคัดขนาดด้วยร่อนเบอร์ 12 รวบรวมและผสมผงข่าให้เข้ากันดี เก็บผงข่าใส่ถุงพลาสติก ปิดให้สนิท เก็บในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ โดยชั่งน้ำหนักผงข่าที่ได้และบันทึกผลคำนวณเป็นร้อยละผลผลิต

3.3.2 การศึกษาวิธีสกัดและการควบคุมคุณภาพสารสกัดข่า

ทำการทดลองเป็นสองช่วงคือ

- ช่วงที่ 1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัด ทำการศึกษาการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายผสมของตัวทำละลายสีเขียว (green solvent) ร่วมกับ ethanol โดยเปรียบเทียบวิธีสกัด 2 วิธีคือ วิธีการแช่สกัดพร้อมเขย่า (maceration with shaking) และวิธีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic assisted extraction, UAE) โดยทำการสกัดนาน 6 ชั่วโมง
- ช่วงที่ 2 การสกัดเพื่อเพิ่มปริมาณสารสกัด โดยปรับปรุงจากวิธีการสกัดช่วงที่ 1 ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายผสมของตัวทำละลายสีเขียว (green solvent) ร่วมกับ ethanol ใช้วิธีการแช่สกัด

ร่วมกับการใช้อุณหภูมิ (maceration with temperature) ทำการแช่สกัดนาน 3 วันโดยทดลองแบบเปลี่ยนตัวทำละลายและไม่เปลี่ยนตัวทำละลาย ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 ตัวทำละลายและตัวทำละลายผสมที่ใช้ในการวิจัย

ชนิดของตัวทำละลาย	ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้ต่อ 500 มิลลิลิตร (มิลลิลิตร (กรัม))		
	Ethanol	Glycerin	Propylene glycol (PG)
1 Ethanol	500 (400)	-	-
2 Propylene glycol	-	-	500 (514.2)
3 PG : Ethanol (1:1)	250 (200)	-	250 (257.1)
4 Glycerin : Ethanol (1:1)	250 (200)	250 (316.6)	-
5 Glycerin : Ethanol (3:7)	350 (280)	150 (189.96)	-

3.3.3 รายละเอียดวิธีการสกัด

1) การแช่สกัดพร้อมเขย่า (maceration with shaking): ทำโดยชั่งผงชา จำนวน 100 กรัม ใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 1 ลิตร เติมตัวทำละลายแต่ละชนิดลงไปจำนวน 500 มิลลิลิตร ปิดปาก flask ให้สนิท นำ flask ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า orbital shaker โดยใช้ความเร็วรอบที่เหมาะสม นาน 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมากรองแยกกากด้วยผ้าไนลอนจากนั้นนำไปกรองให้ใสด้วยชุดกรองเครื่อง vacuum pump แล้วนำไปประเหยเอา ethanol ออกด้วยเครื่อง rotating evaporator ซึ่งและบันทึกผลน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดใส่ขวดแก้วสีชาปิดสนิท และเก็บในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

2) การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic-assisted extraction): ทำโดยชั่งผงชา จำนวน 100 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1 ลิตร เติมตัวทำละลายแต่ละชนิดลงไปจำนวน 500 มิลลิลิตร ปิดปาก flask ให้สนิท นำ flask ไปสกัด โดยแช่ในอ่างคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลาทั้งหมด 6 ชั่วโมง โดยเปิดเครื่องในโหมดนอนรโมล ครั้งละ 45 นาที พักเครื่อง 15 นาที ทำซ้ำเช่นนี้จำนวน 8 รอบ โดยทำการเปลี่ยนน้ำเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 35 – 40 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา นำไปกรองแยกกากด้วยผ้าไนลอนจากนั้นนำไปกรองให้ใสด้วยชุดเครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นนำไปประเหยเอา ethanol ออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (rotary evaporator) ซึ่งและบันทึกผลน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดใส่ขวดแก้วสีชาปิดสนิท และเก็บในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

3) การแช่สกัดโดยใช้อุณหภูมิ (maceration with temperature): ทำโดยชั่งผงชาจำนวน 100 กรัม ใส่ขวดมีฝาปิดขนาด 1 ลิตร เติมตัวทำละลายแต่ละชนิดลงไปจำนวน 500 มิลลิลิตร ปิดปากขวดให้สนิท นำไปแช่ใน water bath ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน โดยเขย่าทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เมื่อครบเวลา นำมากรองแยกกากด้วยผ้าไนลอนจากนั้นนำไปกรองให้ใสด้วยชุดเครื่องกรองสุญญากาศ แล้วนำไประเหยเอา ethanol ออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (rotary evaporator) ซึ่งและบันทึกผลน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดใส่ขวดแก้วสีขาปิดสนิท และเก็บในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

3.3.4 การวิเคราะห์ 1'- acetoxychavicol acetate (ACA) ด้วยวิธี TLC-densitometry

การวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดช่วงที่ 1 คือ สารสกัดเหลว 4 ชนิด ได้แก่ สารสกัดใน glycerin และ PG ที่ระเหยเอา ethanol ออกจนหมดแล้ว โดยการศึกษาได้แยกออกมาทำการวิเคราะห์สาร ACA ก่อนเนื่องจากจำนวนตัวอย่างมีมาก เพราะทำการสกัดวิธีละ 3 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมเพียงอย่างเดียว โดยมีวิธีการดังนี้

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน ACA มา 0.00356 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย absolute ethanol จนครบ 10 มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นเป็น 0.356 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้เป็น stock solution นำไปใช้เตรียม standard curve โดยใช้ในปริมาตร 10 – 26 ไมโครมิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณสาร ACA = 3.56 – 9.968 ไมโครกรัม

2) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การทดลองนี้ จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร ACA ซึ่งใช้เป็น biomarker ของสารสกัดชา เพื่อการควบคุมคุณภาพสารสกัด โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin-layer chromatography; TLC) ร่วมกับเครื่องตรวจวัดปริมาณเดนซิโตมิเตอร์ โดยกำหนดวิธีวิเคราะห์และมีขั้นตอนการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ดังนี้

2.1) วัฏภาคคงที่ (stationary phase) : ใช้ TLC plate (TLC silica gel 60F254) ขนาด 20 x 10 cm แผ่นอลูมิเนียม

2.2) วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) : ทำการทดลองศึกษาความสามารถในการแยกส่วนประกอบในสารสกัดของ mobile phase โดยใช้ตัวทำละลายผสมและการทดลองดังนี้

(1) ตัวทำละลายผสมที่นำมาทดลองมี 4 ระบบ คือ 1) hexane : ethyl acetate, 8:2 v/v; 2) hexane : ethyl acetate : ethanol 8:2:1 v/v; 3) chloroform : ethyl acetate 8:2 v/v และ 4) dichloromethane : ethyl acetate 8:2 v/v

(2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน ACA (เข้มข้น 0.356 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน absolute ethanol)

(3) เตรียมสารละลายสารสกัดที่เจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสม คือ สารสกัดใน ethanol เตรียมให้มีความเข้มข้น 0.01 กรัม/มิลลิลิตร, สารสกัดใน glycerin : ethanol (1:1) เตรียมให้มีความเข้มข้น 0.5 กรัม/มิลลิลิตร, สารสกัดใน propylene glycol : ethanol (1:1) เตรียมให้มีความเข้มข้น 0.3 กรัม/มิลลิลิตร

(4) ทำการ spot สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ชนิดละประมาณ 5 ไมโครลิตร โดยใช้ไมโครปิเปต ลงบนแผ่น TLC ห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร รอให้ spot แห้งแล้วนำไปวางไว้ใน TLC tank ที่มีสารละลายตัวทำละลายเคลื่อนที่ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่ผสมใหม่ๆ และทิ้งให้อิ่มตัวนาน 20 นาทีก่อนใช้ โดยทดลองกับแผ่น TLC ให้ solvent front ซึมขึ้นแผ่น TLC จนเหลือขอบบน 1 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่นออกมาวางไว้ในตู้ดูดควัน นาน 20 นาที จากนั้นนำไปตรวจหาจุดสารที่แยกได้บนแผ่น TLC plate โดยส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร ใน visualization cabinet บันทึกภาพถ่ายด้วยกล้อง หากต้องการดูแถบสีให้พ่นด้วยสารละลายวานิลลิน 1% ในเอทานอล และตามด้วยสารละลายซัลฟูริก 10% ใน ethanol ให้ทั่วแผ่นนำไปวางในตู้อบที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ถ่ายภาพจุดที่ปรากฏบนแผ่น ทำเครื่องหมายจุดที่ปรากฏบนแผ่น TLC plate และระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ และคำนวณหาค่า R_f โดยใช้สูตร

$$R_f = \text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้} / \text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}$$

วิธการเคลื่อนที่ที่เหมาะสมประเมินจากค่า R_f ควรมีค่ามาก และระบบที่เลือกจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3) วิเคราะห์ด้วย TLC-densitometry

3.1) ผสม mobile phase ที่เตรียมไว้ (100 มิลลิลิตร) ใส่ลงใน tank นำกระดาษกรองไปวางไว้ข้าง tank ปิดฝา tank ให้สนิท เอียง tank ให้ solvent เปียกทั่วกระดาษกรองและวางกระดาษไว้ข้างผนัง tank แซ่ทิ้งไว้ให้บรรยากาศภายใน tank อิ่มตัวด้วย solvent นาน 30 นาที

3.2) เตรียมแผ่น TLC (Silica gel F254) ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร ทำการหยดสารละลายมาตรฐาน หรือตัวอย่างลงบนแผ่นด้วยเครื่องหยดสารอัตโนมัติ Linomat V ให้มีความ

กว้างของแถบเท่ากับ 8 มิลลิเมตร ตัวอย่างละ 3 แถบ บนแผ่น TLC โดยหยดให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC 1 เซนติเมตร

3.3) หย่อนแผ่น TLC ลงใน tank ที่เตรียมไว้ อย่างช้าๆ ในแนวดิ่ง ด้วยความระมัดระวัง โดยให้แถบหยดสารที่จะทดสอบอยู่ข้างล่าง สังเกตให้ดูว่าระดับตัวทำละลายนั้นจะต้องไม่ท่วมจุดที่หยดสาร ปิดด้วยฝา tank รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระดับที่ต้องการ คือ ประมาณ 2 เซนติเมตร จากขอบบนของแผ่น TLC ตำแหน่งนี้เรียกว่า “solvent front”

3.4) เมื่อทิ้งให้ mobile phase เคลื่อนที่จน solvent front ได้ระยะทางตามที่ต้องการ ยกแผ่น TLC ออก ทำเครื่องหมายตรง solvent front ปกป้องทิ้งไว้ให้แห้ง 10 นาที ในตู้ดูดควัน

3.5) นำแผ่น TLC ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 219 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง TLC scanner 3 (Camag, Switzerland) และบันทึกผล

3.6) นำแผ่น TLC ที่ตรวจวัดเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารสำคัญเรียบร้อยแล้ว ไปส่องด้วยเครื่องตรวจหาตำแหน่งสาร โดยนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต UV 254 นาโนเมตร และ UV 365 นาโนเมตร และถ่ายภาพเก็บไว้หากต้องการ

3.7) นำแผ่น TLC มาพ่นด้วยสารละลาย 1% vanillin และ 1% sulfuric acid ตามลำดับ จากนั้น นำแผ่น TLC ไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำแผ่น TLC มาถ่ายภาพเก็บไว้โดยทำเมื่อต้องการ

4) การเตรียม spraying reagent

เตรียม 1% vanillin sulphate โดยละลาย vanillin 1 g ใน 95% ethanol ให้ครบ 100 mL และเตรียม 0.1% sulfuric acid โดยปิเปตกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 mL ผสมลงใน 95% ethanol และปรับปริมาตรให้ครบ 100 mL

การศึกษาในช่วงที่สอง การทดลองต่อไปเป็นการศึกษาการสกัดด้วยการแช่สกัด โดยการปรับเปลี่ยนสภาวะในการแช่สกัดให้แตกต่างจากเดิม คือ การแช่สกัดโดยใช้อุณหภูมิช่วยในการสกัด คือ 50 องศาเซลเซียส ทำการแช่สกัดนาน 3 วัน ตัวทำละลายร่วมที่เลือกมาศึกษา คือ ethanol, PG : ethanol (1:1), และ glycerin : ethanol (1:1) เนื่องจากเป็นสัดส่วนตัวทำละลายผสมที่มีข้อมูลครบแล้วทั้งสองวิธี

การศึกษาในช่วงที่สองผู้วิจัยทำการทดลองความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (analysis method validation) ด้วย เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสาร ACA ได้อย่างถูกต้อง โดยทำการทดลองตามคำแนะนำโดยวิธีมาตรฐาน AOAC (Official Methods of Analysis of AOAC International, 2019)

3.3.5 การกำหนดวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน ACA ให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งอย่างละเอียดและละลายด้วย absolute ethanol

2) เตรียมสารละลายตัวอย่างของสารสกัดชาโดยเลือกมาศึกษาในการทดลองนี้ 3 ตัวอย่าง คือ

- สารสกัดด้วย ethanol : ชั่งสารสกัด 0.05 กรัม อย่างละเอียด ละลายให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วย absolute ethanol กรองด้วย 0.45 micron syringe filter เก็บในภาชนะปิดสนิท

- สารสกัดด้วย glycerin : ethanol (1:1) : ชั่งสารสกัด 0.5 กรัม อย่างละเอียด ละลายให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วย absolute ethanol กรองด้วย 0.45 micron syringe filter เก็บในภาชนะปิดสนิท

- สารสกัดด้วย propylene glycol : ethanol (1:1) : ชั่งสารสกัด 0.5 กรัม อย่างละเอียด ละลายให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วย absolute ethanol กรองด้วย 0.45 micron syringe filter เก็บในภาชนะปิดสนิท

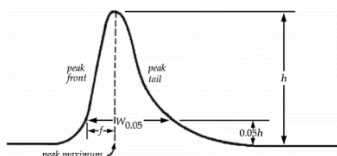
3) การตรวจสอบความถูกต้อง (method validation) ของวิธีวิเคราะห์ โดยทำการศึกษาในหัวข้อ ความจำเพาะ (specificity) ความเป็นเส้นตรง (linearity) และพิสัย (range) ความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (limit of detection) และ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจหาค่าได้ในเชิงปริมาณ (limit of quantitation) โดยมีวิธีศึกษาและเกณฑ์การยอมรับมีดังต่อไปนี้ คือ

Specificity (ความจำเพาะ)

ศึกษาความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ทำโดยการ spot สารมาตรฐานและตัวอย่างต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันบนแผ่น TLC นำไป develop ใน TLC chamber ด้วย mobile phase ที่เลือก จากนั้นทำการสแกนด้วยเครื่อง densitometer และทำการประเมินจากค่าต่างๆ 3 ค่า คือ

- Retention factor (R_f) ของพีคที่ได้จากตัวอย่างสารสกัด ที่ตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐาน ACA

- คำนวณค่า tailing factor จาก chromatogram โดยคำนวณใช้ความกว้างของพีคที่ความสูง 5% ของพีค ($W_{0.05}$) แล้วแบ่งพีคออกเป็นสองส่วนดังรูป และคำนวณโดยใช้สมการดังนี้



$$\text{Tailing factor} = W_{0.05}/2f$$

- คำนวณค่า peak purity index โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ซึ่งสามารถคำนวณค่านี้
ออกมาได้เลย

เกณฑ์ยอมรับผล specificity ใช้เกณฑ์ดังนี้

- ค่า retention factor (R_f) ของสารสำคัญในสารสกัดตัวอย่างต้องตรงกับสารมาตรฐาน
ACA

- ค่า peak purity index ของสารที่ตรวจต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 0.99
- Tailing factor ควรมีค่าใกล้ 1.0 แสดงว่าพีคมีความสมมาตร (symmetry) มีการแยกสาร
อื่นออกจากกันได้ดี

ความเป็นเส้นตรง (linearity) และพิสัย (range)

ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน ACA โดยการ spot สารละลายมาตรฐานเข้มข้น
0.515 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในปริมาตร 4 - 12 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของแถบต่างๆ เป็น
2.062 - 6.186 ไมโครกรัม/แถบ ทำการทดลองตามวิธีที่พัฒนาขึ้นและทำการวัดพื้นที่ใต้พีคของสาร
มาตรฐาน ACA สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับพื้นที่ที่พีค แล้วพิจารณาจาก
ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ของกราฟที่พลอตระหว่าง
ความเข้มข้น (แกน X) และผลที่วัดได้จากเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณสารบนแผ่น TLC คือพื้นที่ใต้พีค
(แกน Y) โดย R^2 ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 0.99 ส่วน range คือ พิสัยของวิธีวิเคราะห์ ประเมินจากผล
การศึกษา linearity, accuracy และ precision

ความแม่นยำ (accuracy)

ทำการวิเคราะห์ค่าการคืนกลับ (% recovery) ของสารมาตรฐาน ACA ที่ทำการ spike ที่ 3
ระดับความเข้มข้น (ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ให้ครอบคลุมช่วงของ calibration curve) ลงในตัวอย่างที่
ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ได้แก่ 2.028, 3.042, และ 4.056 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดย
ทดสอบกับสารสกัดทั้งสามชนิดที่รู้ความเข้มข้น เกณฑ์ยอมรับผลความแม่นยำในรูปของร้อยละการคืน
กลับ (% recovery) ใช้เกณฑ์ของ AOAC (Latimer, 2023) ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 เกณฑ์ยอมรับผลความแม่นยำในรูปของร้อยละการคืนกลับ (% recovery)

Concentrations	Recovery Limits
100 %	98-101%
10%	95-102%
1%	92-105%
0.1%	90-108%
0.01%	85-110%
10 µg/g (ppm)	80-115%
1 µg/g	75-120%
10 µg/kg (ppb)	70-125%

การศึกษานี้เนื่องจากสารที่ทำการวิเคราะห์เป็นสารสกัดที่สกัดโดยวิธีต่างๆ ดังนั้นปริมาณสารที่วิเคราะห์จึงไม่ทราบความเข้มข้นแน่นอน การใช้เกณฑ์ยอมรับผลการตรวจสอบความถูกต้องของความแม่นยำจึงกำหนดตามความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์ คือ 0.05% w/v คือ เกณฑ์การยอมรับร้อยละการคืนกลับ คือ 90 - 108%

Precision (ความเที่ยง)

การศึกษาความเที่ยง ทำ 2 แบบ คือ

Repeatability: ทำโดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันที่ระดับความเข้มข้น 100% (ช่วงกลางเส้นกราฟมาตรฐาน) โดยทำการ spot สารละลายมาตรฐาน (0.515 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในปริมาตร 6 มิลลิลิตร) จะมีความเข้มข้น 4.124 ไมโครกรัม (ทำจำนวน 6 ซ้ำ) คำนวณค่า %RSD ของผลวิเคราะห์

Intermediate precision: ทำโดยวิเคราะห์สาร standard ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 2.062, 4.124, และ 5.155 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยทำการวิเคราะห์ต่างวัน ประเมินผล precision โดยอ้างอิงตามเกณฑ์การยอมรับผลความเที่ยง (precision) ตามเกณฑ์ของ AOAC ซึ่งสามารถใช้เกณฑ์ RSD, หรือ HORRAT, จากค่า %RSD

ตารางที่ 3.3 เกณฑ์การยอมรับผลความเที่ยงใช้เกณฑ์ RSD_r หรือ $HORRAT_r^*$ ตาม AOAC

Concentrations	Repeatability (RSD_r)
100 %	1%
10%	1.5%
1%	2%
0.1%	3%
0.01%	4%
10 µg/g (ppm)	6%
1 µg/g	8%
10 µg/kg (ppb)	15%

* $HORRAT_r = RSD_r(\text{found, \%}) / RSD_r(\text{calculate, \%})$ โดย $RSD_r(\text{found, \%})$ คือ ค่า RSD ที่ได้จากการทดลอง ส่วน $RSD_r(\text{calculate, \%})$ คือ ค่า RSD_r จากตาราง เกณฑ์การยอมรับ precision คือ $HORRAT_r = 0.5 - 2$ การศึกษานี้ใช้ค่า $RSD_r(\text{found, \%})$ โดยเกณฑ์การยอมรับคือ 3%

ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (limit of detection; LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจหาค่าได้ในเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

ทำการทดลองโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานของ ACA ให้มีความเข้มข้นน้อยลงลง 10 เท่า โดยใช้ absolute ethanol ทำการวิเคราะห์โดยการ spot ลงบนแผ่น TLC ในปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 มิลลิเมตร จะมีปริมาณสาร ACA เท่ากับ 0.0505, 0.101, 0.151, 0.202, 0.253, 0.303, และ 0.354 ไมโครกรัม ตามลำดับ) ทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ นำผลพื้นที่ที่พิกะมาคำนวณหาร้อยละการคืนกลับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจพบพื้นที่ที่พิกได้เป็นค่า LOD ส่วนค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์เชิงปริมาณได้ถูกต้องเป็นค่า LOQ

3.3.6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข่าเพื่อการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และเครื่องสำอาง

จากการศึกษาสารสกัดข่าและการควบคุมคุณภาพสารสกัดข่าโดยวิธีการแช่สกัด (maceration) ให้ปริมาณ ACA ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดข่าโดยวิธีการใช้เครื่องเสียงความถี่สูง (ultrasonication) นอกจากนี้การสกัดข่าโดยวิธีการแช่สกัดใช้เครื่องมือไม่ยุ่งยากซับซ้อนและใช้พลังงานในการสกัดที่น้อยกว่าวิธีการใช้เครื่องเสียง จึงเลือกสารสกัด

ข้าที่สกัดโดยวิธีการแช่สกัดมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป โดยสารสกัดข้าที่ทำการศึกษาศักยภาพทางแพทย์และเครื่องสำอางระบุดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 รายการสารสกัดข้าที่นำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

ลำดับที่	รายการ	คำอธิบาย
1	M6H-EtOH	สารสกัดข้าที่แช่สกัดโดย 95% ethanol นาน 6 ชั่วโมง
2	M6H-PGEtOH	สารสกัดข้าที่แช่สกัดโดย Propylene glycol:95% ethanol (1:1) นาน 6 ชั่วโมง
3	M6H-GlyEtOH	สารสกัดข้าที่แช่สกัดโดย Glycerin:95% ethanol (1:1) นาน 6 ชั่วโมง
4	M3D-EtOH	สารสกัดข้าที่แช่สกัดโดย 95% ethanol นาน 3 วัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
5	M3D-PGEtOH	สารสกัดข้าที่แช่สกัดโดย Propylene glycol:95% ethanol (1:1) นาน 3 วัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
6	M3D-GlyEtOH	สารสกัดข้าที่แช่สกัดโดย Glycerin:95% ethanol (1:1) นาน 3 วัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

1) การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

1.1) การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 80, 120, 160 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในตัวทำละลาย DI water และเตรียมสารละลายสารสกัดข้าในตัวทำละลาย DMSO ปิเปตสารตัวอย่างทดสอบลงใน 96-well plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร/หลุม เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (1:15) ในตัวทำละลาย DI water หลุมละ 195 ไมโครลิตร/หลุม ผสมสารแต่ละหลุมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 20% w/v sodium carbonate ในตัวทำละลาย DI water ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในทุกหลุม ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS microplate reader ที่ 755 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid มาสร้างเป็น standard curve โดยค่า Y คือค่าการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 755 นาโนเมตร และค่า X คือความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid

ใช้กราฟสารละลายมาตรฐานคำนวณหาปริมาณ total phenolic ของสารสกัดชา เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid โดยรายงานผลเป็นค่า gallic acid equivalent (GAE) ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g_{extract})

1.2) การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในตัวทำละลาย 95% ethanol และเตรียมสารละลายสารสกัดชาในตัวทำละลาย DMSO ปิเปตสารตัวอย่างทดสอบลงใน 96-well plate หลุมละ 25 ไมโครลิตร/หลุม เติมน้ำ 95% ethanol หลุมละ 25 ไมโครลิตร/หลุม สารละลาย 0.67% w/v aluminium chloride (AlCl₃) ในตัวทำละลาย DI water หลุมละ 75 ไมโครลิตร/หลุม และ 0.0654% w/v potassium acetate (CH₃CO₂K) ในตัวทำละลาย DI water หลุมละ 75 ไมโครลิตร/หลุม ผสมสารแต่ละหลุมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Biochrom, EZ Read 2000, United Kingdom) ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin มาสร้างเป็น standard curve โดยค่า Y คือค่าการดูดกลืนแสงของ quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรและค่า X คือความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin ใช้กราฟสารละลายมาตรฐานคำนวณหาปริมาณ total flavonoid ของสารสกัดชา เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน quercetin โดยรายงานผลเป็นค่า quercetin equivalent (QE) ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg QE/g_{extract})

1.3) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

(1) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ทำโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำสารละลายปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ในตัวทำละลาย 95% ethanol ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ใน 96-well plate หลังจากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง และวัดผลการทดลองที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid คำนวณหาค่า % inhibition ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(Ac-As)/Ac] \times 100 \quad (1)$$

โดยที่ Ac เป็นค่า absorbance ของกลุ่มควบคุม (control) ในขณะที่ As เป็นค่า absorbance ของกลุ่มตัวอย่าง

(2) ด้วยวิธี ABTS radical assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ทำโดยเตรียมสารละลาย ABTS stock ด้วยการละลาย ABTS จำนวน 0.095 กรัม และ potassium persulfate จำนวน 0.0165 กรัม ใน deionized water ใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร สารละลาย Stock ที่ได้ เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้ หลังจากนั้นเติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน 96-well plate บ่มเป็นระยะเวลา 15 นาที พร้อมกับเขย่าเบาๆ ก่อนนำไปวัดผลการทดลองที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เปรียบเทียบกับ ascorbic acid และ trolox ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน ค่า % inhibition คำนวณดังสมการที่ (1)

1.4) การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธี protein denaturation assay

เตรียมสารละลาย 10% (W/V) BSA, phosphate buffer saline (PBS) pH 6.4, และตัวอย่างสารสกัดฆ่าที่ความเข้มข้น 5 mg%, และ positive control คือ diclofenac sodium ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ซึ่งประกอบด้วย 10% BSA 160 ไมโครลิตร, PBS pH 6.4 1120 ไมโครลิตร และสารตัวอย่างหรือ positive control 800 ไมโครลิตร มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิด การเสื่อมสภาพของโปรตีน แล้วจึงปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการสลายโปรตีน ดังสมการที่ (2)

$$\% \text{ การยับยั้งการสลายโปรตีน} = \left(1 - \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มควบคุม}} \right) \times 100 \quad (2)$$

1.5) การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

(1) การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ของสารสกัดฆ่า ด้วยวิธี agar diffusion test

ทำการ subculture เชื้อรา *C. albicans* ลงบนอาหารเพาะเชื้อ SDA แล้วนำไปบ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเตรียมหัวเชื้อราทดสอบ โดยชุดโคโลนีสีขาวขึ้นจำนวน 10 โคโลนี มาใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.85% NaCl นับจำนวนเชื้อ ให้อยู่ในช่วงระหว่าง $1 \times 10^7 - 5 \times 10^7$ โคโลนี/มิลลิลิตร (CFU/mL) โดยการใช้วิธี direct microscopic count แล้วจึงป้ายเชื้อราทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ให้ทั่ว plate ทำการเจาะเนื้อวุ้นอาหารทดสอบให้เป็นหลุมสำหรับหยอดสารละลายทดสอบโดยใช้ cork borer จากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่างในตัวทำละลาย 50% DMSO แล้วกรองสารละลายผ่านจานกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร หลังจากนั้นหยอดสารละลายทดสอบที่ผ่านการกรองลงในหลุมทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้ incubator ที่ อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของขอบเขตการยับยั้ง (inhibition zone) ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบหลุมทดสอบ ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (หน่วย: มม.) เปรียบเทียบกับ positive control คือ clotrimazole ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ negative control คือ 50% DMSO

(2) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี agar well diffusion test

ทำการ subculture เชื้อ *S. epidermidis* ATCC12228 และ *S. aureus* ATCC6538 ลงบนอาหารเพาะเชื้อ TSA นำไปบ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียทดสอบให้มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร โดยใช้วิธี direct microscopic count แล้วจึงป้ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ให้ทั่ว plate ทำการเจาะเนื้อวุ้นอาหารทดสอบให้เป็นหลุมสำหรับหยอดสารละลายทดสอบโดยใช้ cork borer จากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่างในตัวทำละลาย 50% DMSO แล้วกรองสารละลาย ผ่านจานกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร หลังจากนั้นหยอดสารละลายทดสอบที่ผ่านการกรองลงในหลุมทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของขอบเขตการยับยั้ง (inhibition zone) ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบหลุมทดสอบ ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (หน่วย: มม.) เปรียบเทียบกับ positive control คือ levofloxacin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ negative control คือ 50% DMSO

3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูล ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แสดงผลการทดสอบเป็นค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ one-way ANOVA และ post-hoc Tukey HSD



บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลผลิตการเตรียมสมุนไพรข่าอบแห้งจากเหง้าข่าสด



ภาพที่ 4.1 ลักษณะเหง้าข่าสด

4.1.1 ขั้นตอนการผลิตผงข่าแห้งจากเหง้าข่าสด

1) เหง้าข่าสดจำนวน 115 กิโลกรัม (กิโลกรัมละ 40 บาท) เมื่อแยกส่วนลำต้นเหนือดินออกนำเฉพาะส่วนเหง้าไปซังน้ำหนักได้เหง้าข่าทั้งสิ้น 80.9 กิโลกรัม คิดเป็นน้ำหนักลำต้นเหนือดิน 34.1 กิโลกรัม ดังนั้นเมื่อคิดจากวัตถุดิบที่ซื้อมาทั้งหมดจะได้เหง้าข่าจริงร้อยละ 70.35

2) นำเหง้ามาล้างน้ำซ้า ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ หั่นตามขวางหนา 2-3 มิลลิเมตร นำเข้าตู้อบลมร้อน 60 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง เก็บข่าอบแห้งใส่ถุงพลาสติกและปิดให้สนิท

3) ทำการบดข่าแห้งด้วยเครื่องบดสมุนไพร นำผงข่าที่ได้มาแรงคัดขนาดด้วยร่อนเบอร์ 12 ทำการผสมผงข่าทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นชั่งน้ำหนักและคำนวณร้อยละผลผลิตที่ได้ดังนี้

- ผลผลิตจากการอบครั้งที่ 1: น้ำหนักข่าสด 50 กิโลกรัมคิดเฉพาะส่วนเหง้า = 35.5 กิโลกรัม ได้ผงข่า = 2374.3 กรัม

- ผลผลิตจากการอบครั้งที่ 2: น้ำหนักข่าสด 65 กิโลกรัม คิดเฉพาะส่วนเหง้า = 45.4 กิโลกรัม ได้ผงข่า = 3119.0 กรัม เมื่อรวมผงข่า 2 ครั้งได้ผงข่าทั้งสิ้น 5493.3 กรัม คิดเป็นร้อยละผลผลิต = $(5.4933 \times 100) / 80.9 = 6.79$

(หมายเหตุ: เกิดการสูญเสียไปในขั้นตอนการอบและการบดลดขนาดและการร่อน ดังนั้นในการศึกษานี้ ผงข่าแห้ง 1 กิโลกรัมจะได้จากข่าสดประมาณ 14.7 กิโลกรัม คิดเป็นราคาผงข่าผงประมาณ กิโลกรัมละ 588 บาท)



ภาพที่ 4.2 ขั้นตอนการแยกใช้เฉพาะส่วนเหง้าใต้ดินและลักษณะชำหั่นเป็นแว่น



ภาพที่ 4.3 ขั้นตอนการอบจนได้ชำแห้ง

4.1.2 รูปขั้นตอนการสกัดผงชา มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้



Sonication

Maceration with shaking

ภาพที่ 4.4 เครื่องมือที่ใช้การสกัดด้วยวิธี sonication (ซ้าย) และ maceration with shaking (ขวา)



ภาพที่ 4.5 การกรองสิ่งสกัดให้ใสก่อนนำไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน



ภาพที่ 4.6 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)



ภาพที่ 4.7 สารสกัดที่ได้หลังจากระเหยเอทานอลออก

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณ 1'- acetoxychavicol acetate (ACA) ในสารสกัดชาชนิดของเหลว

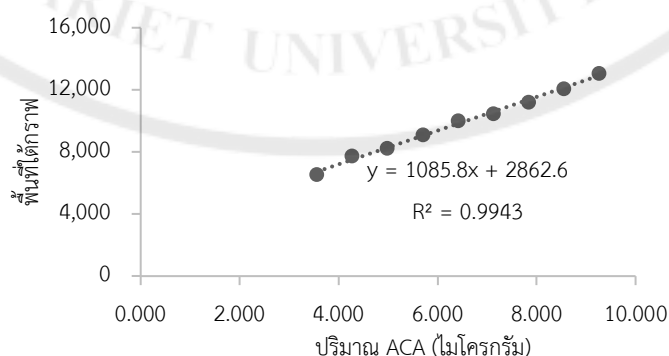
4.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC-densitometry

จากการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน ACA ด้วยเทคนิค TLC-densitometry ทำโดยหยดสารด้วยเครื่องหยดในขนาดความกว้างของแถบ 8 มิลลิเมตร ในปริมาตรต่างๆ คือ 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, และ 26 ไมโครลิตร ($n = 3$) ได้ผลค่า R_f , พื้นที่ใต้กราฟ ดังตารางที่ 4.1 และนำค่าปริมาณ ACA ไปพล็อตกับค่า peak area และคำนวณ linear regression ได้สมการเส้นตรง คือ $Y = 1085.8X + 2862.6$ มี $R^2 = 0.9943$ และนำไปใช้คำนวณหาปริมาณ ACA ในสารสกัดต่อไป โดยปริมาณที่เหมาะสมที่ใช้ในการหยดสาร ACA เพื่อการคำนวณได้ถูกต้อง มีค่าอยู่ระหว่าง 3.560 – 9.256 ไมโครกรัม

ตารางที่ 4.1 พื้นที่ใต้พีคของ standard ACA ความเข้มข้นต่างๆ

แถบที่	ปริมาตรที่หยด (ไมโครลิตร)	ค่า R_f	ปริมาณสาร ACA (ไมโครกรัม)	ความสูง	พื้นที่ใต้พีค
1	10	0.73	3.560	105.33	6,528.15
2	12	0.73	4.272	121.91	7,738.18
3	14	0.73	4.984	131.82	8,234.44
4	16	0.73	5.696	144.49	9,080.56
5	18	0.72	6.408	157.12	10,020.79
6	20	0.73	7.120	161.58	10,465.16
7	22	0.72	7.832	170.69	11,195.82
8	24	0.72	8.544	182.41	12,078.10
9	26	0.73	9.256	196.52	13,042.82

เมื่อนำค่าปริมาณสาร ACA มาพล็อตกับพื้นที่ใต้กราฟ จะได้เป็นกราฟมาตรฐานดังรูป



ภาพที่ 4.8 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ ACA ในเอทานอล

4.2.2 การศึกษาปริมาณสาร ACA ในสารสกัดเหลวที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายผสม

วิธีนี้จะใช้ตัวทำละลายแบบตัวทำละลายร่วม 4 แบบ คือ PG, PG : ethanol (1:1), glycerin : ethanol (1:1) และ glycerin : ethanol (3:7) โดยแบ่งการสกัดเป็น 2 เทคนิค คือ การสกัดด้วยการ sonication และ maceration with agitation เมื่อครบเวลาที่สกัด 6 ชั่วโมง แล้วนำสิ่งสกัดไปทำการระเหยเอาเอทานอลออก ซึ่งน้ำหนักและนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ ACA ในสารสกัดเหลว

ตารางที่ 4.2 เป็นผลการสกัดด้วยเทคนิค sonication สารสกัดหยาบที่ได้หลังจากการระเหยเอาเอทานอลออกจนหมด เช่นการสกัดด้วยเอทานอลเมื่อระเหยแห้งจะมีน้ำหนักสารสกัดหยาบทั้งหมด 19.73 กรัม วิเคราะห์หาปริมาณสาร ACA ได้เท่ากับร้อยละ 27.12 คิดเป็นปริมาณสาร ACA ที่สกัดได้จากผงชา 100 กรัม ได้เป็น 5.35 ± 0.06 กรัม

ส่วนตัวทำละลายในตัวอย่างอื่นๆ น้ำหนักสารสกัดหยาบและความเข้มข้นของ ACA ที่วิเคราะห์ได้จะแตกต่างกันตามปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ คือ โพรพิลีน ไกลคอล หรือกลีเซอริน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่ระเหย ปริมาณสาร ACA ที่สกัดได้ จะน้อยกว่าที่สกัดด้วยเอทานอล โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณ ACA ที่สกัดได้ต่อผงชาแห้ง 100 กรัม ระหว่าง 1.22 ± 0.15 กรัม ถึง 1.75 ± 0.26 กรัม

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารสกัดเหลวและสาร ACA ที่สกัดด้วยตัวทำละลายผสมโดยวิธี sonication

ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ความเข้มข้น เฉลี่ย (% ACA)	ปริมาณ ACA ในสารสกัดที่ได้** (กรัม)
Ethanol	19.73*	27.12 ± 0.30	5.35 ± 0.06
PG	324.46 ± 11.31	0.45 ± 0.01	1.46 ± 0.08
PG : ethanol (1:1)	167.10 ± 12.39	0.74 ± 0.15	1.22 ± 0.15
Glycerin : ethanol (1:1)	216.41 ± 15.77	0.66 ± 0.01	1.42 ± 0.09
Glycerin : ethanol (3:7)	121.50 ± 6.94	1.45 ± 0.24	1.75 ± 0.26

*n = 1

**มีตัวทำละลายบางส่วนที่ติดอยู่กับผงพืชเปียกจึงคิดเฉพาะที่แยกออกมาได้เท่านั้น และเป็นผลจากการสกัดจากผงชาแห้ง 100 กรัม เท่ากันทุกวิธี

ตารางที่ 4.3 เป็นผลการสกัดด้วยเทคนิค maceration เช่นเดียวกันกับการสกัดด้วยวิธีแรก สารสกัดเหลวที่ได้จะมีร้อยละความเข้มข้นของสาร ACA แตกต่างกันไปแต่ตัวทำละลายที่ใช้ เมื่อสกัดด้วยเอทานอลจะสกัดได้ 3.16 ± 0.31 กรัม ปริมาณสาร ACA ที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายที่ไม่

ระเหยอื่นๆ มีค่าเฉลี่ยปริมาณ ACA ที่สกัดได้ต่อผงชาแห้ง 100 กรัม ระหว่าง 1.41 ± 0.02 กรัม ถึง 2.52 ± 0.27 กรัม

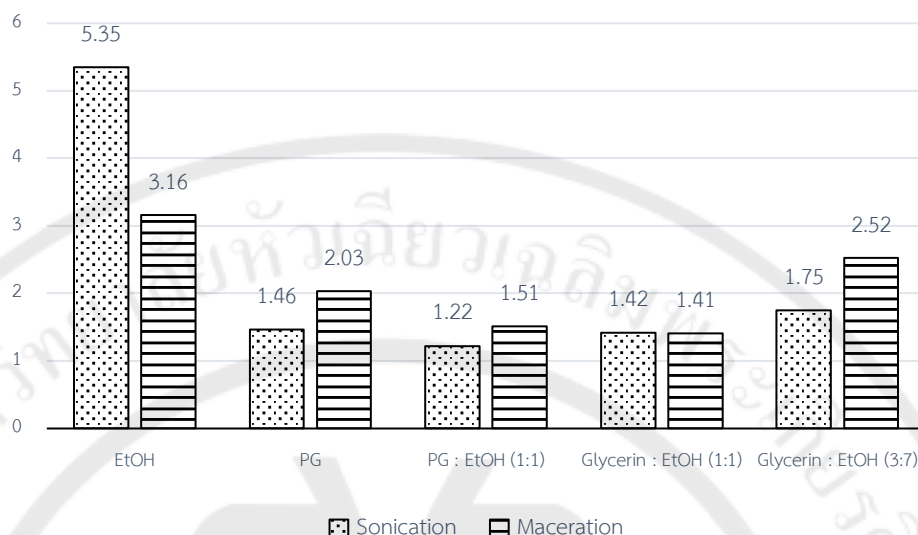
ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารสกัดเหลวและสาร ACA ที่สกัดด้วยตัวทำละลายร่วมโดยวิธี maceration

ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (% ACA)	ปริมาณ ACA ในสารสกัดที่ได้** (กรัม)
Ethanol	16.35*	19.34 ± 1.89	3.16 ± 0.31
PG	318.17 ± 8.05	0.62 ± 0.05	2.03 ± 0.16
PG : ethanol (1:1)	216.58 ± 10.30	0.70 ± 0.06	1.51 ± 0.08
Glycerin : ethanol (1:1)	189.65 ± 5.01	0.74 ± 0.09	1.41 ± 0.02
Glycerin : ethanol (3:7)	137.08 ± 7.54	1.84 ± 0.10	2.52 ± 0.27

*n = 1

**มีตัวทำละลายบางส่วนที่ติดอยู่กับผงพืชเปียกจึงคิดเฉพาะที่แยกออกมาได้เท่านั้น และเป็นผลจากการสกัดจากผงชาแห้ง 100 กรัม เท่ากันทุกวิธี

เมื่อทำการเปรียบเทียบเทคนิคการสกัดด้วยวิธี sonication และ maceration เฉพาะการสกัดด้วยตัวทำละลายเดี่ยว และตัวทำละลายผสม (ไม่รวมตัวทำละลายชนิดเอทานอล ซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดและเป็นที่รู้จักกันทั่วไปแล้ว) โดยการทดสอบทางสถิติด้วย one-way ANOVA และ post-hoc Tukey HSD ด้วยโปรแกรมออนไลน์ (Vasavada, 2016) พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย กลีเซอริน:เอทานอล (3:7) โดยวิธีการแช่สกัดมีความเข้มข้นของ ACA ($1.84 \pm 0.08\%$) มากกว่าวิธี sonication ($1.39 \pm 0.33\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และการสกัดด้วยตัวละลายร่วมนี้ สามารถสกัดได้สาร ACA ได้มากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($**p < 0.01$) ทั้งการสกัดด้วยการแช่สกัด และการ sonication ส่วนการสกัดด้วยตัวทำละลายกลีเซอริน : เอทานอล (3:7) ด้วยการแช่สกัด หรือ sonication สกัดได้สาร ACA ที่มีความเข้มข้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) จากการทดลองนี้จึงพบว่า การสกัดผงชาด้วยวิธีการ maceration ดีกว่าวิธี sonication ดังนั้นในการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมที่มีความหนืดค่อนข้างสูง วิธีการสกัดที่ดีกว่าคือ การแช่สกัดพร้อมเขย่า



ภาพที่ 4.9 เปรียบเทียบปริมาณสาร ACA ที่สกัดได้ทั้งหมดจากการแยกกากและระเหยเอทานอลออกจนหมดจากการสกัดด้วยวิธี sonication และ maceration

ภาพที่ 4.9 เป็นการเปรียบเทียบเทคนิคที่ใช้สกัดทั้งสองวิธี เมื่อใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดจากการทดลองจะพบว่า เทคนิคการสกัดด้วยวิธี sonication เมื่อใช้ตัวทำละลายที่เป็นเอทานอล จะสกัดสาร ACA ได้มากกว่าวิธีการแช่สกัดร่วมกับการเขย่า โดยสกัดได้ ACA 5.35 ± 0.06 กรัมต่อผงข่า 100 กรัม ขณะที่เมื่อใช้วิธีการแช่สกัดร่วมกับการเขย่า สกัดสาร ACA ได้เท่ากับ 3.16 ± 0.31 กรัมต่อผงข่า 100 กรัม

ส่วนตัวทำละลายสกัดที่ใช้โพรพิลีน ไกลคอลเดี่ยวๆ เป็นการทดลองเพื่อศึกษาการใช้ตัวทำละลายที่มีประโยชน์ทางยาและเครื่องสำอางเป็นตัวทำสกัดที่พร้อมนำไปใช้เตรียมตำรับได้ เป็นวิธีที่ประหยัดเวลาและพลังงานในการระเหยเอทานอล ออกจากหลังพบว่าได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นมากพอสมควร และสามารถนำไปใช้ในตำรับที่มีส่วนผสมของโพรพิลีน ไกลคอลได้ ข้อด้อยของวิธีนี้คือตัวทำละลายมีความหนืดมาก ยากต่อการกรองเอาตะกอนออก

ส่วนตัวทำละลายผสมอื่นๆ ได้แก่ โพรพิลีน ไกลคอลผสมกับเอทานอล หรือกลีเซอรินผสมกับเอทานอล ซึ่งเอทานอลถูกผสมลงไปเพื่อลดความหนืดและเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสาร และกรองตะกอนออกง่ายขึ้นมาก ผลการวิเคราะห์สาร ACA พบว่าวิธีการแช่สกัดร่วมกับการเขย่าสามารถสกัดสารได้ดีกว่าวิธี sonication เล็กน้อย (ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) ยกเว้นการสกัดด้วย กลีเซอรินผสมเอทานอล 3:7 ที่ได้มากกว่าชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีปริมาณเอทานอลที่มากขึ้น

เทคนิคการสกัดด้วยวิธี sonication ที่ใช้หลักการ cavitation คือ คลื่นเสียงความถี่สูงจะก่อให้เกิดฟองอากาศขนาดเล็กจำนวนมากตลอดเวลา แทรกไปในของเหลวและผงพืชสมุนไพร ทำให้เกิด

อุณหภูมิสูงและเกิดแรงดันเฉพาะจุดทำให้เกิดเป็นแรง shear force และช่วยให้ผนังเซลล์พืชแตกจึงช่วยสกัดสารออกมาได้ (Ranjha et al., (2021)

ข้อควรระวังในการสกัดด้วยวิธี sonication คือ มีความร้อนเกิดขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการสกัด หากอุณหภูมิไม่สูงเกินไปจะช่วยละลายสารออกจากผนังพืชได้ดีขึ้นด้วย จึงต้องทำการควบคุมอุณหภูมิโดยการเปลี่ยนน้ำในอ่างอัลตราโซนิกไม่ให้เกิน 40 องศา เพราะการสะสมความร้อนมากๆ อาจทำให้สารที่ไม่ทนความร้อนสลายตัวได้ ส่วนวิธีการแช่สกัดเป็นวิธีที่เหมาะสมกับของเหลวหรือตัวทำละลายสกัดที่หนืดเนื่องจากการเขย่าตลอดเวลาทำให้ผนังพืชสัมผัสตัวทำละลายได้ทั่วถึงและอุณหภูมิจะคงที่ตลอดเวลาเหมาะกับสารที่ไม่ทนความร้อนหรืออุณหภูมิสูง

ตารางที่ 4.4 แสดงข้อมูลร้อยละผลผลิตสารสกัดเหลวที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายและเทคนิคการสกัดที่แตกต่างกัน โดยนำวิธีสกัดทั้งสองวิธีมาหาร้อยละผลผลิตที่ทำการเปรียบเทียบโดยใช้น้ำหนักตัวทำละลายชนิดไม่ระเหยเมื่อเวลาเริ่มต้นที่ผสมอยู่ในตัวทำละลายผสมโดยไม่รวมน้ำหนักเอทานอลมาคำนวณ ได้ร้อยละผลผลิตของวิธี maceration มีค่าสูงกว่าวิธี sonication โดยจากการสังเกตและเปรียบเทียบการสกัดโดยวิธี sonication และ maceration เวลานาน 6 ชั่วโมง วิธีการแช่สกัดจะทำให้ผนังขุ่นมากกว่า และเมื่อถึงขั้นตอนการแยกกากจากสิ่งสกัดโดยการบีบทำได้ง่ายกว่าจึงได้สารสกัดในปริมาณมากกว่า ผงขาวจากวิธีการแช่สกัดจะบวมเพราะดูดซับตัวทำละลายได้ดีจากการเขย่าและสามารถละลายเอาสารสำคัญและเม็ดแป้งออกจากผนังได้มากกว่าวิธี sonication แต่อย่างไรก็ตามทั้งวิธีที่สกัดด้วยตัวทำละลายผสมนี้ ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้อย่างเต็มที่เนื่องจากมีรายละเอียดในการเตรียมแตกต่างกัน เช่นผู้เตรียมอาจบีบสิ่งสกัดออกมาได้มากน้อยแตกต่างกันในแต่ละครั้งที่ทดลอง ทำให้เกิดการสูญเสียระหว่างวิธีการสกัดที่ต่างกันและควบคุมให้เหมือนกันได้ยาก การเปรียบเทียบโดยใช้ค่าความเข้มข้นของสาร ACA จึงน่าจะเปรียบเทียบได้ดีกว่าโดยเปรียบเทียบกับตัวทำละลายชนิดเดียวกันเท่านั้น พบว่าการสกัดโดยวิธีการแช่สกัดได้สารสกัดที่มีร้อยละความเข้มข้นมากกว่า sonication เล็กน้อย

ตารางที่ 4.4 ร้อยละของผลผลิตโดยประมาณ ที่ได้หลังการระเหยเอาเอทานอลออกโดยเทียบกับน้ำหนักตัวทำละลายที่ไม่ระเหยที่เวลาเริ่มต้น

ตัวทำละลายสกัด	น้ำหนักตัวทำ	Sonication		Maceration	
	ละลายที่ไม่ระเหย เมื่อเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนัก เฉลี่ย (กรัม)	ร้อยละ ผลผลิต	น้ำหนัก เฉลี่ย (กรัม)	ร้อยละ ผลผลิต
PG	514.20	324.46	63.1	328.17	63.8
PG : EtOH (5:5)	257.10	167.73	65.2	216.58	84.2
Glycerin : EtOH (5:5)	316.60	216.41	68.4	189.65	59.9

ตัวทำละลายสกัด	น้ำหนักตัวทำ	Sonication		Maceration	
	ละลายที่ไม่ระเหย เมื่อเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนัก เฉลี่ย (กรัม)	ร้อยละ ผลผลิต	น้ำหนัก เฉลี่ย (กรัม)	ร้อยละ ผลผลิต
Glycerin : EtOH (3:7)	189.96	121.50	64.0	137.08	72.2

4.2.3 การพัฒนาวิธีการสกัดเพื่อให้มีประสิทธิภาพการสกัดสารดียิ่งขึ้น

การทดลองต่อไปเป็นการศึกษาการสกัดด้วยการแช่สกัด โดยการปรับเปลี่ยนสถานะในการแช่สกัดให้แตกต่างจากเดิม คือ การแช่สกัดโดยใช้อุณหภูมิช่วยในการสกัด คือ 50 องศาเซลเซียส โดยการแช่สกัดนาน 3 วัน โดยตัวทำละลายและตัวทำละลายร่วมที่เลือกมาศึกษา คือ ethanol, PG : ethanol (1:1) และ glycerin : ethanol (1:1)

ตารางที่ 4.5 เป็นข้อมูลผลผลิตหลังจากการปรับเปลี่ยนและเพิ่มวิธีการสกัดหลังจากการศึกษาครั้งแรกในหัวข้อ 4.2.2 ที่ทำเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัด พบว่าการสกัดโดยวิธีการแช่สกัดสามารถสกัดสารได้ดีกว่าวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูง จึงเลือกวิธีนี้มาใช้ในการสกัดสารให้มีปริมาณมากขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและการตั้งตำรับต่อไป

ตารางที่ 4.5 น้ำหนักผงข่าแห้งที่ใช้สกัดและผลผลิตทั้งหมดที่สกัดได้ต่อผงข่าแห้ง 100 กรัม จากการแช่สกัดที่อุณหภูมิ 50°C นาน 3 วัน

ตัวทำละลาย	นน. ผงข่า (กรัม)	นน. สารสกัด ทั้งหมด (กรัม)	% w/w ของสารสกัดที่ได้
EtOH	100	37.57	37.57
Glycerin : ethanol (1:1)	100	254.7	254.7
PG : ethanol (1:1)	100	268.44	268.44

ตารางที่ 4.6 เป็นผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร ACA แต่ละวิธีที่ปรับเปลี่ยนไปจากการศึกษาครั้งแรกที่ทำเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัด พบว่าการใช้ความร้อนและเพิ่มเวลาในการสกัดทำให้สามารถสกัดสาร ACA ได้เพิ่มมากขึ้น โดยมีการเขย่าขวดสกัดสารวันละครั้ง

ตารางที่ 4.6 ความเข้มข้นของ ACA และปริมาณสารที่สกัดจากการแช่สกัดที่อุณหภูมิ 50°C นาน 3 วัน

ตัวทำละลาย	นน. ผงชา (กรัม)	นน. สารสกัด ต่อผงชา 100 กรัม	ความเข้มข้น ACA เฉลี่ย (% w/w)	นน. ACA ต่อผง ชา 100 กรัม (กรัม)
EtOH	100	37.57	21.56 ± 0.12	8.10 ± 0.04
Glycerin : ethanol (1:1)	100	254.7	0.91 ± 0.004	2.32 ± 0.01
PG : ethanol (1:1)	100	268.44	1.17 ± 0.14	3.14 ± 0.02

4.3 ผลการศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

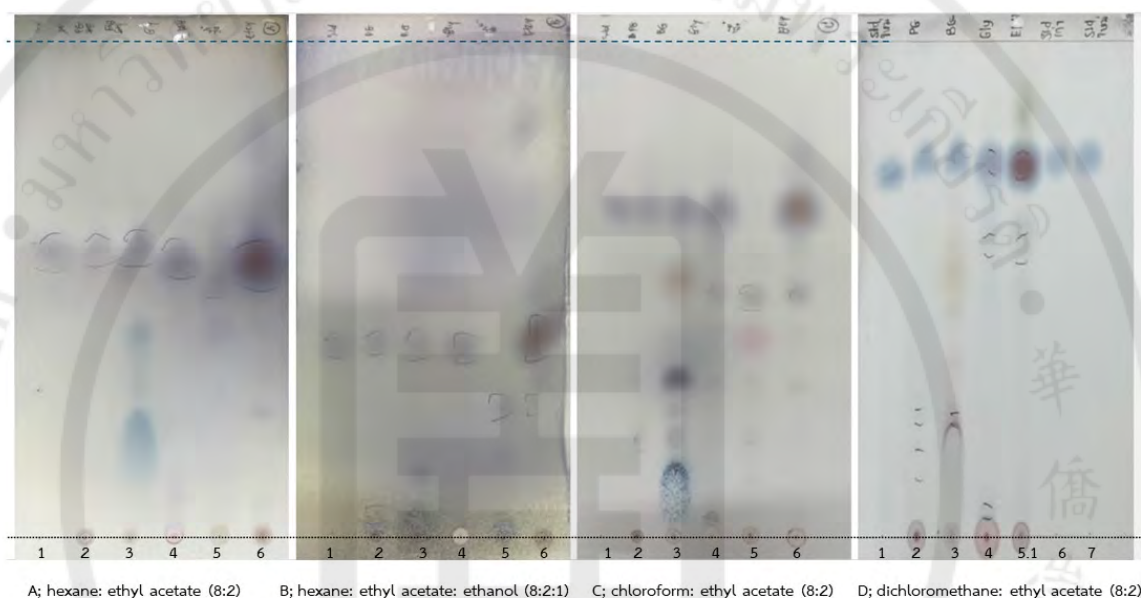
TLC-densitometer คือ การใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางร่วมกับเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ โดยเดนซิโตมิเตอร์ (densitometer) เป็นเครื่องที่สามารถตรวจวัดปริมาณของสารที่อยู่บนแผ่น TLC โดยใช้หลักการ scan ตามความเข้มของการดูดกลืนแสงหรือเรืองแสงของแถบสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC แล้วแปลงสัญญาณเป็น densitogram ช่วยให้การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค TLC มีความถูกต้องแม่นยำ

ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อเลือกตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่มีหลักการเลือกคือ หา ระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกสารออกจากกันได้ดี โดยนิยมใช้ตัวทำละลายมากกว่า 1 ชนิดเพราะตัวทำละลายแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการแยกสารชนิดต่างๆ ที่ผสมอยู่ให้แยกจากกันตามความสามารถในการละลายสารที่ต่างกัน ตามสภาพความเป็นขั้ว (polarity) ของสารที่แตกต่างกันในสารสกัด แผ่น TLC silica gel 60 F₂₅₄ เป็น แผ่นโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง ชนิด classical silica TLC plates มี pore size 60 angstrom เคลือบด้วยสาร fluorescent indicator F254 ตัวดูดซับชนิดซิลิกาเจลนี้สามารถดูดซับสารในกลุ่มต่างๆ ที่มีความเป็นขั้วแตกต่างกันได้กว้าง อาจดูดซับสารต่างๆ ด้วยกลไก hydrogen bonding, dipole-dipole interaction, หรือแรง Van der Waals จึงเหมาะกับสารสกัดในพืชกลุ่มต่างๆ การใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าจะพาสารเคลื่อนที่เร็วกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย ตัวทำละลายที่นิยมใช้เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ที่นิยมใช้ในการแยกสารเรียงตามความมีขั้วน้อยไปมากมีดังนี้ คือ petroleum ether < hexane < carbon tetrachloride < benzene < chloroform < dichloromethane < ether < ethyl acetate < acetone < ethanol < methanol < water ตามลำดับ

การศึกษานี้เริ่มต้นจากการทบทวนวรรณกรรมของสารที่ใช้เป็นมาร์กเกอร์ คือ สาร ACA ในชาเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็น phenylpropanoid เป็นสารที่มีขั้วปานกลาง ระเหยได้น้อย ละลายได้ดีใน

ตัวทำละลายหลายชนิด ได้แก่ hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol และ methanol ลักษณะทางเคมีของ ACA มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 234.25 g/mol ตามโครงสร้างเป็น chavicol acetate ที่มีการเติมหมู่ acetoxy ที่ตำแหน่งที่ 1 (NCBI, 2024)

จากการทดลองหาระบบวิฤภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.10 และตารางที่ 4.7



ภาพที่ 4.10 TLC chromatogram ของสารมาตรฐาน ACA และสารสกัด ในวิฤภาคเคลื่อนที่ 4 ระบบ

(Spot: 1 = ACA; 2 = สารสกัดใน propylene glycol; 3 = สารสกัดใน butylene glycol; 4 = สารสกัดใน glycerin; 5 = สารสกัดข่าที่ซื้อ; 5.1 = สารสกัดข่าด้วยเอทานอล; 6 = ACA; 7 = ACA)

ภาพที่ 4.10 เป็น TLC chromatogram ของสารมาตรฐาน ACA และสารสกัดตัวอย่างต่างๆ พบว่า TLC แผ่น A และ B ใช้วิฤภาคเคลื่อนที่ ระบบที่ 1 และ 2 ซึ่งใช้ hexane เป็นตัวกลางหลัก มีความเป็นขั้วต่ำเกินไป ทำให้แยกสาร ACA ได้ไม่ดี จึงทำการเปลี่ยนเป็น chloroform (ระบบ 3) และ dichloromethane (ระบบที่ 4) ที่มีขั้วมากขึ้น พบว่า TLC แผ่น C และ D นี้ ให้แถบที่แยกจากกันได้ดีขึ้น โดยตัดสินจากการมองด้วยตา หลังจากพ่นด้วยสารละลาย 1% วานิลลินและ 10% ซัลฟูริก แอซิด ผู้วิจัยเลือกระบบวิฤภาคคงที่ระบบที่ 4 (dichloromethane : ethyl acetate (8:2)) มาใช้ในการวิจัยต่อไป เนื่องจาก dichloromethane มีความเป็นพิษน้อยกว่า chloroform และยังสามารถ

แยกแถบสารอื่นๆ ออกจากกันได้ดีกว่า โดยสารมาตรฐาน ACA มีค่า R_f ประมาณ 0.75 ส่วนค่า R_f ของแถบที่ตรวจพบในสารสกัดข้าวโพดต่างๆ พบมีค่าเท่า 0.76 แสดงว่าเป็นสาร ACA ด้วย

ตารางที่ 4.7 เป็นผลการศึกษาความเหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ได้ค่า R_f ของสาร ACA และสารสกัดข้าวโพดที่ดูดซับขึ้นไปเป็นระยะทางเท่ากับสารมาตรฐาน ACA

ตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาความเหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

วัฏภาคเคลื่อนที่	ค่า R_f			
	ACA	Soft extract	Glycerin liquid extract	PG liquid extract
Hexane: ethyl acetate (8:2)	0.57	0.56	0.58	0.58
Hexane: ethyl acetate: ethanol (8:2:1)	0.42	0.39	0.40	0.40
Chloroform: ethyl acetate (8:2)	0.65	0.65	0.65	0.65
Dichloromethane: ethyl acetate (8:2)	0.75	0.76	0.76	0.76

ซึ่งจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

1) ความจำเพาะ (specificity)

ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ทำการ spot ลงบนแผ่น TLC ด้วยวิธีการดังตารางที่ 4.8 เป็นค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้วิเคราะห์สาร ACA และในสารสกัด

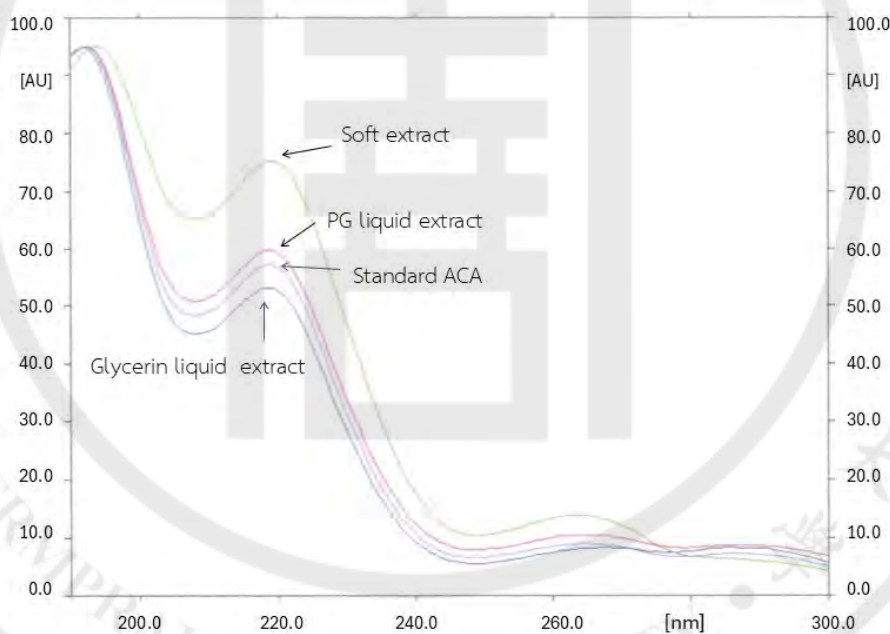
ตารางที่ 4.8 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้เพื่อวิเคราะห์สาร ACA ในสารสกัดข้าว

พารามิเตอร์	วิธีที่ใช้
Plate	TLC plate silica gel F254, aluminium size 20 x 10 cm
Mobile phase	Dichloromethane: ethyl acetate (8:2 v/v)
Spotted volume	1 – 12 microliters
Saturation time	20 minutes
Solvent front	80 mm.
Visualization	254 nm, 365 nm
Detection	Camag Scanner 3, ที่ 219 nm

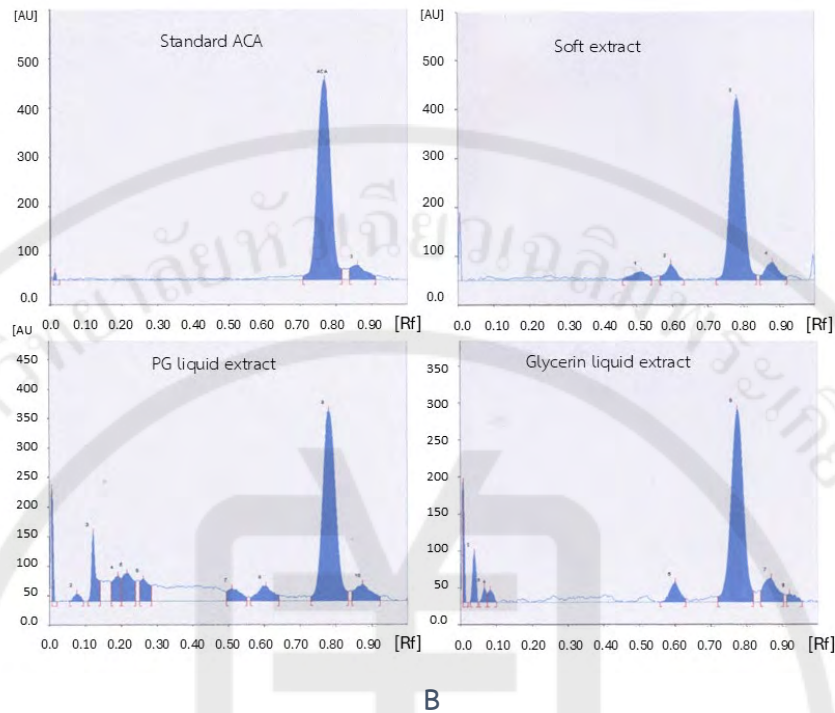
ภาพที่ 4.11 เป็น UV spectra ที่สแกนตั้งแต่ความยาวคลื่น 190 – 300 นาโนเมตร เปรียบเทียบระหว่างสารมาตรฐาน ACA และสารสกัดตัวอย่างต่างๆ (ภาพที่ 4.11 A) จะพบว่ามีค่าการดูดกลืนสูงสุดอยู่ที่ 219 นาโนเมตร จึงนำค่าความยาวคลื่นนี้ไปใช้กำหนด เพื่อวัดปริมาณและอ่านเป็น densitograms ของสารมาตรฐานและ ACA ที่แยกได้จากสารสกัดชา ได้เป็นพิกัดแสดงในภาพที่ 4.11 B

กราฟในภาพ 4.11 B ใช้คำสั่งจากโปรแกรมเพื่อทำการเปรียบเทียบ spectrum ของสารสกัดเทียบกับของสารมาตรฐาน ACA ที่ 3 จุด คือ peak start (s), peak apex (m), and peak end (e) positions ของแถบสาร ได้เป็นค่าความบริสุทธิ์ของพิก (peak purity) ค่าที่แสดงว่าพิกที่พบเป็นพิกของสารที่ถูกแยกออกมาเป็นชนิดเดียว จะมีค่าเข้าใกล้ 1.0

Densitograms ในภาพที่ 4.11 B สามารถนำมาคำนวณหา tailing ของพิก ค่าที่ดีจะมีค่าเข้าใกล้ 1.0 แสดงถึงความสมมาตร (symmetry) ของพิกแยกออกมาได้และเป็นสารเดี่ยว



A



ภาพที่ 4.11 UV spectra (190 – 300 นาโนเมตร) ของสารมาตรฐาน ACA และ สารสกัดชนิดต่างๆ (A) และ reflectance densitograms วัดที่ความยาวคลื่น 219 นาโนเมตร ของสารมาตรฐาน ACA และ สารสกัด (B)

ตารางที่ 4.9 แสดงค่า R_f ที่ได้จากการคำนวณด้วยเครื่องตรวจวัดสาร densitometer มีค่าใกล้เคียงกันแสดงว่า แฉกที่แยกออกมาจากสารสกัดเป็นสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน และจากค่า peak purity และ tailing factor บอกได้ว่าแฉกที่แยกออกมาเป็นสารเดี่ยว แสดงว่าวิธีที่วิเคราะห์มีความจำเพาะและระบบมีความเหมาะสม

ตาราง 4.9 ผลการศึกษาความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์

สารมาตรฐานและสารตัวอย่าง	R_f	Peak purity		Tailing factor
		$r_{(s,m)}$	$r_{(m,e)}$	
Standard ACA	0.78	-	-	1.0
Soft extract	0.79	0.9999	0.9997	1.0
Glycerin liquid extract	0.78	0.9997	0.9997	1.0
PG liquid extract	0.77	0.9999	0.9998	1.0

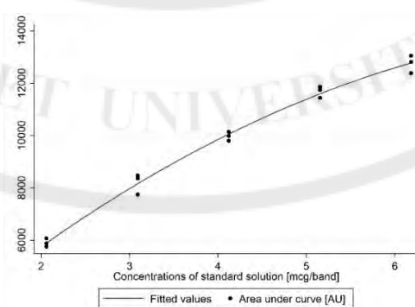
2) ความเป็นเส้นตรง (linearity) และ range (พิสัย)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2.062 – 6.186 ไมโครกรัม ได้ผลพื้นที่พิกัดตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงและพิสัยของกราฟมาตรฐานสาร ACA

ปริมาตรที่ spotted (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น ของ ACA (ไมโครกรัม)	พื้นที่พิก			ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงมาตรฐาน
		Run 1	Run 2	Run 3	
4	2.062	5870.78	5744.1	6060.47	5902.29 $\pm$ 159.23
6	3.093	8358.38	7739.17	8467.16	8103.17 $\pm$ 392.69
8	4.124	9980.4	9798.51	10137.7	9968.12 $\pm$ 169.76
10	5.155	11743.6	11434.2	11853.5	11643.9 $\pm$ 217.38
12	6.186	13046.9	12383.2	12817.9	12600.5 $\pm$ 337.10

เมื่อนำไปพล็อตระหว่างความเข้มข้น (แกน x) และพื้นที่พิก (แกน y) เพื่อทำการวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression analysis) และวิเคราะห์ถดถอยไม่ใช่เส้นตรง (polynomial analysis) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ StataNow/BE 18.5 โดยใช้ข้อมูลทุกค่ามาคำนวณ (ไม่ใช่ค่าเฉลี่ย) พบว่า ค่า r^2 มีค่าเท่ากับ 0.9817 และ 0.9995 ตามลำดับ จึงใช้สมการ polynomial มาใช้เป็น calibration curve โดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้น (แกน x) กับพื้นที่พิก (แกน y) คือ $y = -169.85x^2 + 3069.6x + 286.6$ โดยใช้ค่าพิสัยอยู่ในช่วงความเข้มข้น 2.062 – 6.186 ไมโครกรัม/แกลบ (ภาพที่ 4.12 ตามเกณฑ์ AOAC หากค่า $r^2 > 0.99$ แสดงว่า calibration curve สามารถใช้ได้)



ภาพที่ 4.12 Calibration curve แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ACA กับพื้นที่พิก

3) ความแม่นยำ (accuracy)

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ โดยวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คือ ACA ที่ความเข้มข้น 2.028, 3.042, 4.056 ไมโครกรัม และ spiked ลงในสารสกัดทั้ง 3 ตัวอย่าง ได้ค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ของสาร ACA มีค่าอยู่ในช่วง 92.08 - 96.68, 93.34 - 97.66, 93.87 - 99.27 เมื่อทดสอบด้วยเมทริกซ์ของสารสกัด soft extract, glycerin liquid extract และ propylene glycol liquid extract ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) ซึ่งทุกค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 90 - 108 ผ่านเกณฑ์ยอมรับของ AOAC Appendix K Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (Latimer, 2023) ถือว่ามีความถูกต้อง ค่าเฉลี่ยของการทดลองในเมทริกซ์ของสารสกัดแต่ละตัวอย่างแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ร้อยละการคืนกลับของสารมาตรฐานวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำ กลางและสูง

สารสกัด	ความเข้มข้น ของ ACA ใน ตัวอย่าง (mg)	ความเข้มข้น ของ ACA ที่ เติม (mg)	ความเข้มข้นของ ACA ที่พบ (mg)			%การคืนกลับ (n = 3)
			Run 1	Run 2	Run 3	
Soft extract		2.028	1.920	1.915	1.946	95.02 ± 0.82
	0.704	3.042	2.949	2.981	2.893	96.68 ± 1.46
		4.056	3.705	3.799	3.700	92.08 ± 1.28
Glycerin liquid extract		2.028	1.974	1.877	1.828	93.34 ± 3.66
	0.305	3.042	2.937	3.009	2.951	97.49 ± 1.25
		4.056	3.913	3.979	3.991	97.66 ± 1.04
PG liquid extract		2.028	1.939	1.874	1.898	93.87 ± 1.62
	0.804	3.042	3.017	3.058	2.984	99.27 ± 1.22
		4.056	3.798	3.837	3.818	94.12 ± 0.48

4) Precision (ความเที่ยง)

ผลการทดสอบความเที่ยงพบว่า เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเดิมซ้ำ 6 ครั้ง ได้ค่า repeatability %RSD เท่ากับ 1.62 (ตารางที่ 4.12) และ intermediate precision %RSD เท่ากับ 2.54 (ตารางที่ 4.13) แสดงว่าวิธีทดสอบมีความเที่ยง โดย %RSD มีค่าไม่เกิน 3 % ตามเกณฑ์การยอมรับที่ปริมาณสารสำคัญมีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1% ตาม AOAC Appendix K Guidelines for

Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (Latimer, 2023)

ตารางที่ 4.12 ผลการศึกษา repeatability (n = 6)

ACA (mg)	พื้นที่พีค	ACA ที่วิเคราะห์ได้ (mg)	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงมาตรฐาน	%RSD
4.124	10268.50	4.252	4.299 $\pm$ 0.076	1.62
	10413.24	4.342		
	10514.90	4.406		
	10345.87	4.300		
	10372.44	4.316		
	10154.86	4.183		

ตารางที่ 4.13 ผลการศึกษา intermediate precision

Day	ACA (mg)	Measured ACA (mg)			Mean $\pm$ SD	%RSD (n = 3)	%RSD (n = 18)
		Run 1	Run 2	Run 3			
1	2.062	2.052	1.999	2.133	2.061 $\pm$ 0.067	3.26	2.54
	4.124	4.078	3.972	4.173	4.074 $\pm$ 0.101	2.47	
	5.155	5.268	5.034	5.355	5.219 $\pm$ 0.166	3.18	
2	2.062	2.153	2.129	2.052	2.111 $\pm$ 0.053	2.50	
	4.124	3.995	4.013	4.189	4.066 $\pm$ 0.107	2.64	
	5.155	5.007	4.894	4.984	4.962 $\pm$ 0.060	1.20	

5) ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจหาค่าได้ในเชิงปริมาณ (LOQ)

ค่า LOD หาจากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน ACA ความเข้มข้น 0.05 – 0.40 ไมโครกรัม พบว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เครื่อง densitometer สามารถอ่านค่าได้ คือ 0.101 ไมโครกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง (LOQ) คือ 0.253 ไมโครกรัม

จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่า วิธี TLC-densitometry ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์หาปริมาณ ACA ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดี่ยวที่สกัดด้วยเอทานอลและตัวทำละลายผสมเมื่อระเหยเอทานอลออกแล้ว คือสารสกัดในโพรพิลีน ไกลคอล และกลีเซอรินได้ถูกต้องและแม่นยำ สามารถนำวิธีการนี้ไปใช้ในการควบคุมคุณภาพสารสกัดได้ในคราวต่อไป เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพทั้งพืชสมุนไพรและสารสกัด

4.4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสำหรับการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และเครื่องสำอาง

4.4.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดชา

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical) ดังนั้น สารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกสูงจะมีความเชื่อมโยงกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดหรือรู้จักกันในชื่อวิธี Folin-Ciocalteu (F-C) redox colorimetric assay เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและถูกนำมาใช้วิเคราะห์อย่างแพร่หลาย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 760 - 765 นาโนเมตร รีเอเจนต์ F-C จะทำหน้าที่ออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลิก ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นส่งผลให้สารละลายของรีเอเจนต์เปลี่ยนสีจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำเงิน ดังนั้นสารประกอบที่มีปริมาณฟีนอลิกสูง สารละลายจะมีสีน้ำเงินเข้ม (Molole et al., 2022)

ผลการทดสอบเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัดชาที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid โดยรายงานผลเป็น gallic acid equivalent (GAE) (มิลลิกรัม; mg) ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม พบว่า สารสกัดชา M3D-EtOH ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด คือ GAE เท่ากับ 32.99 ± 1.19 ตามด้วย M6H-EtOH, M3D-PGEtOH, M3D-GlyEtOH, M6H-GlyEtOH และ M6H-GEtOH ตามลำดับ

ตารางที่ 4.14 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/g_{extract}) และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g_{extract}) ในสารสกัดชาที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และ quercetin ตามลำดับ (mean $\pm$ S.D.) (n=3)

ลำดับที่	ตัวอย่าง	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g _{extract})	ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g _{extract})
1	M6H-EtOH	22.59 ± 1.10	8.61 ± 0.23
2	M6H-GlyEtOH	5.16 ± 0.46	N/A

ลำดับที่	ตัวอย่าง	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g _{extract})	ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g _{extract})
3	M6H-PGEtOH	2.72 ± 0.60	N/A
4	M3D-EtOH	32.99 ± 1.19	11.27 ± 0.27
5	M3D-GlyEtOH	6.38 ± 0.57	N/A
6	M3D-PGEtOH	6.74 ± 0.64	N/A

*N/A คือ not applicable (ไม่มีข้อมูลเนื่องจากไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content)

สารฟลาโวนอยด์เป็น secondary metabolites ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยฤทธิ์ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล (OH) อิสระ (Panche et al., 2016) การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในการทดลองนี้ใช้วิธี Aluminum chloride colorimetric method โดยอาศัยหลักการพื้นฐานของปฏิกิริยาการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนของอะลูมิเนียมฟลาโวนอยด์ (Aluminium – flavonoid complex) หรือคีเลตของ Al(III)-flavonoids เนื่องจากมีกลุ่มออกซิ (oxo) และไฮดรอกซิล (hydroxyl) จำนวนมาก ซึ่งสารฟลาโวนอยด์มี affinity ที่ดีในการจับกับไอออนของโลหะ เช่น Al(III) โดยส่วนใหญ่จะจับกันในอัตราส่วน 1:1 ขึ้นอยู่กับสภาวะการทดสอบและค่า pH สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้ที่ความยาวคลื่นระหว่าง 400-550 นาโนเมตร (Shraim et al., 2021) ผลการทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดชา ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน quercetin แสดงผลทดสอบเป็นค่า quercetin equivalent (QE) (มิลลิกรัม; mg) ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg QE/g_{extract}) พบว่า สารสกัดชา M3D-EtOH ให้ค่า QE เท่ากับ 11.27 ± 0.27 mg QE/g_{extract} ซึ่งสูงที่สุด ตามด้วย M6H-EtOH (8.61 ± 0.23 mg QE/g_{extract}) ในขณะที่สารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย Gly:EtOH (1:1) และ PG:EtOH (1:1) ไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ที่ทั้งที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 3 วัน

1.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชา

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

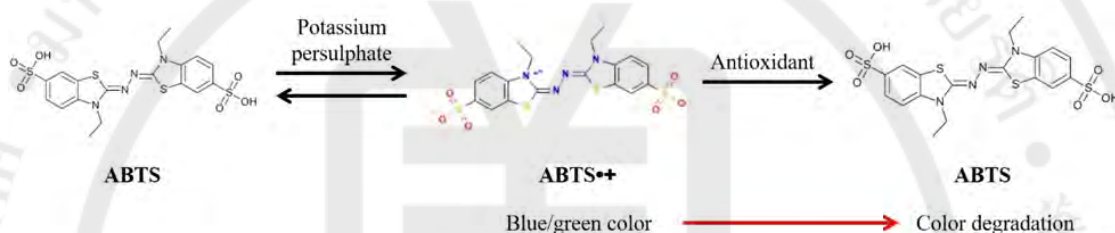
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถของสารในการต้านปฏิกิริยาออกชเดชั่น โดยใช้ 2, 2-diphenyl-1-picryldrazyl (DPPH) เพื่อศึกษากลไกที่สารต้านอนุมูล



สารอนุมูลอิสระ DPPH มีความเสถียรมาก เมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่สามารถให้อะตอมไฮโดรเจน และสามารถถูกกลืนแสงยูวีได้ หรือเกิดปฏิกิริยารีดักชัน จะทำให้สีของ DPPH เปลี่ยนไปจากสีม่วงเป็นไม่มีสี โดยความจางของสีที่เกิดขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับความสามารถของสารในการกำจัด DPPH (Škrovánková et al., 2012) โดยในการทดลองได้ใช้ ascorbic acid หรือกรดวิตามินซีเป็นสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของกรดวิตามินซีที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 (IC₅₀) คือ 24.11 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดข้าที่สกัดในสภาวะที่แตกต่างกัน มาทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี ซึ่งแสดงค่าในรูป ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (VEAC) ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม พบว่าสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ ซึ่งมีค่า VEAC แสดงดังตารางที่ 4.15 โดยสารสกัดข้า M3D-EtOH ให้ค่า VEAC เท่ากับ 8.66 ± 0.17 mg/g_{extract} ซึ่งสูงที่สุด ตามด้วย M6H-EtOH, M3D-PGEtOH, M3D-GlyEtOH, M6H-GlyEtOH, และ M6H-PGEtOH ตามลำดับ

จากภาพที่ 4.14 วิธี ABTS เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใช้หลักการของ ABTS substrate เมื่อถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate) จะทำให้เกิดโมโนไอออนบวกของอนุมูลอิสระของ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS•+) ที่ทำให้สารละลายเป็นสีฟ้าอมเขียวในสภาวะก่อนทำปฏิกิริยาที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ในน้ำ โดยอนุมูลอิสระนี้จะถูกทำให้สีจางลง

เมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ (Liang & Kitts, 2014) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ในการทดลองนี้ แสดงค่าเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินอีในรูป alpha-tocopherol equivalent antioxidant capacity (TEAC) ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม เมื่อนำสารสกัดเข้าที่สกัดในสภาวะที่ต่างกันมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ โดยสารสกัดเข้าที่ทำการสกัดด้วยวิธี M6H-EtOH ให้ค่า TEAC เท่ากับ $67.31 \pm 2.57 \text{ mg/g}_{\text{extract}}$ ซึ่งสูงที่สุด ตามด้วย M3D-EtOH, M3D-PGEtOH, M3D-GlyEtOH, M6H-GlyEtOH, และ M6H-PGEtOH ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.15



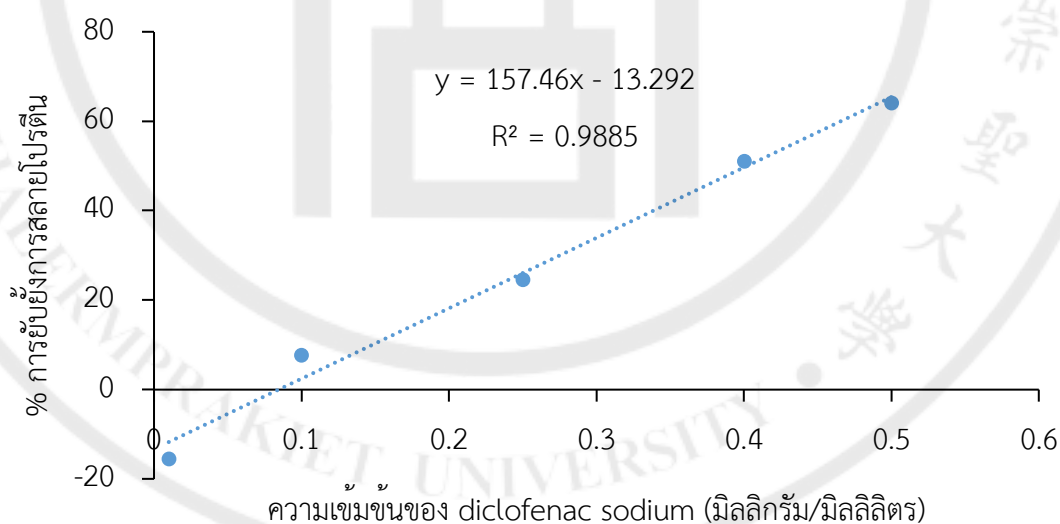
ภาพที่ 4.14 กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+}

ตารางที่ 4.15 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเข้าที่สกัดด้วยวิธีที่ต่างกัน 6 วิธี เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซีจากการทดสอบ 2 วิธี ได้แก่ DPPH assay และ ABTS assay แสดงผลการทดลองด้วยค่า VEAC (mg) และ TEAC (mg) ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ (mean $\pm$ S.D.) (n=3)

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	
		ค่า VEAC ของ DPPH (mg/g _{extract})	ค่า TEAC ของ ABTS (mg/g _{extract})
1	M6H-EtOH	7.27 ± 0.40	67.31 ± 2.57
2	M6H-GlyEtOH	2.19 ± 0.27	8.29 ± 0.40
3	M6H-PGEtOH	1.82 ± 0.24	6.36 ± 0.50
4	M3D-EtOH	8.66 ± 0.17	52.07 ± 2.88
5	M3D-GlyEtOH	3.00 ± 0.38	12.28 ± 0.90
6	M3D-PGEtOH	3.18 ± 0.11	12.87 ± 0.65

4.4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธี protein denaturation assay

จากผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธี protein denaturation ของสารสกัดชา โดยใช้ ยา ไดโคลฟีแนค โซเดียม (diclofenac sodium) เป็นสารกลุ่มควบคุมเชิงบวก พบว่ายาไดโคลฟีแนค โซเดียม มีความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสลายโปรตีนได้ 50% หรือ 50% inhibitory concentration (IC₅₀) อยู่ที่ 0.40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งคำนวณจากสมการในภาพที่ 4.15 เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการสลายโปรตีนของสารสกัดชาที่ได้จากการสกัดแต่ละวิธีที่ความเข้มข้น 5 mg% พบว่าสารสกัดชาทั้งหมดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสลายโปรตีนค่อนข้างต่ำ โดยสารสกัดชาด้วยวิธีการแช่สกัดในตัวทำละลาย PG และ 95% ethanol ในอัตราส่วน 1:1 และสารสกัดชาในตัวทำละลาย glycerin และ 95% ethanol ในอัตราส่วน 1:1 เป็นระยะเวลา 3 วัน มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสลายโปรตีนคือ 6.79 ± 2.20 และ 7.60 ± 3.71 ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสลายโปรตีนสูงกว่าสารสกัดชาที่แช่สกัดใน 95% ethanol (5.11 ± 1.39) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดชาแช่สกัดใน 95% ethanol ที่สกัดด้วยวิธี sonication ที่เวลา 6 ชั่วโมง มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสลายโปรตีนเพียงเล็กน้อย (3.69 ± 0.85) ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.16



ภาพที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งการสลายโปรตีน และความเข้มข้นของยาไดโคลฟีแนค โซเดียม ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.01, 0.1, 0.25, 0.4, และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ตารางที่ 4.16 ร้อยละการยับยั้งการสลายโปรตีนของสารสกัดชาที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ (mean $\pm$ S.D.) (n=3)

ลำดับที่	ตัวอย่าง	การยับยั้งการสลายโปรตีน (%) (n = 3)
1	M6H-EtOH	3.69 $\pm$ 0.85
2	M6H-GlyEtOH	N/A*
3	M6H-PGEtOH	N/A*
4	M3D-EtOH	5.11 $\pm$ 1.39
5	M3D-GlyEtOH	6.79 $\pm$ 2.20
6	M3D-PGEtOH	7.603.71

*N/A คือ not applicable (ไม่มีข้อมูลเนื่องจากไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ที่ความเข้มข้น 5 mg%)

4.4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดชา

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* ของสารสกัดชา

จากผลการทดสอบพบว่า สารสกัดชาที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *C. albicans* ได้แก่ M3D-EtOH และ M6H-EtOH ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 14.67 ± 0.87 และ 13.67 ± 0.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยพบว่า M3D-EtOH สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด ในขณะที่ clotrimazole ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (Inhibition zone) เท่ากับ 36.73 ± 0.95 มิลลิเมตร และ 50% DMSO ซึ่งเป็น negative control ไม่เกิดโซนยับยั้ง

ตารางที่ 4.17 เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดชาในการต้านเชื้อ *C. albicans*

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (mean $\pm$ SD) (mm)
1	M6H-EtOH	5	13.67 $\pm$ 0.26
2	M6H-GlyEtOH	5	0
3	M6H-PGEtOH	5	0
4	M3D-EtOH	5	14.67 $\pm$ 0.87
5	M3D-GlyEtOH	5	0
6	M3D-PGEtOH	5	0
7	Clotrimazole	1	36.73 $\pm$ 0.95
8	ACA	1	0

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (mean $\pm$ SD) (mm)
9	50% DMSO	-	0

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ATCC12228 และ *S. aureus* ATCC6538 ของสารสกัดข่า

จากผลการทดสอบพบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ดีที่สุดคือ M3D-EtOH มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 42 ± 1.58 มิลลิเมตร รองลงมาคือ M6H-EtOH มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 40.58 ± 0.58 มิลลิเมตร ในขณะที่ M6H-GlyEtOH, M6H-PGEtOH, M3D-GlyEtOH, และ M3D-PGEtOH ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. epidermidis* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า ACA ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 32.25 ± 0.90 mm ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร ACA ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในสารสกัดข่ามีบทบาทในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดตามปริมาณ ACA ที่พบเพื่อหาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. epidermidis* พบว่า M6H-GlyEtOH ต้องใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 70.42 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 33.58 ± 1.10 มิลลิเมตร, M6H-PGEtOH ต้องใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 62.89 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 28.33 ± 1.37 มิลลิเมตร, M3D-GlyEtOH ต้องใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 50.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 22.25 ± 0.27 มิลลิเมตร และ M3D-PGEtOH ต้องใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 50.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 30.58 ± 0.66 มิลลิเมตร จึงจะเห็นประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่า ACA มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 16.50 ± 1.50 มิลลิเมตร สารสกัดข่าที่แสดงฤทธิ์ดีที่สุดคือ M3D-EtOH มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 33 ± 0.00 มิลลิเมตร รองลงมาคือ M6H-EtOH มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 21.67 ± 0.58 มิลลิเมตร ในขณะที่ M6H-GlyEtOH, M6H-PGEtOH, M3D-GlyEtOH, และ M3D-PGEtOH ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดตามปริมาณ ACA ที่พบในสาร

สกัด ยังคงพบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดไม่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ดังนั้นจากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ *S. aureus* ของสารสกัดฆ่า พบว่าสารสกัดฆ่าที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดคือ M3D-EtOH รองลงมาคือ M6H-EtOH ซึ่งสารสกัดที่สกัดด้วย 2 วิธีนี้ มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ได้ดีกว่า *S. aureus* และสารสำคัญ ACA ยังมีบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดอีกด้วย

ตารางที่ 4.18 เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดฆ่าในการต้านเชื้อ *S. epidermidis* ATCC12228 และ *S. aureus* ATCC6538

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (mean $\pm$ SD) (mm)	
			<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
			ATCC6538	ATCC12228
1	M6H-EtOH	5	21.67 $\pm$ 0.58	40.58 $\pm$ 0.58
2	M6H-GlyEtOH	5	0	0
3	M6H-PGEtOH	5	0	0
4	M3D-EtOH	5	33 $\pm$ 0.00	42 $\pm$ 1.58
5	M3D-GlyEtOH	5	0	0
6	M3D-PGEtOH	5	0	0
7	ACA	1	16.50 $\pm$ 1.50	32.25 $\pm$ 0.90
8	Levofloxacin	0.01	26.17 $\pm$ 0.47	28.17 $\pm$ 0.90
9	50% DMSO	-	0	0

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยส่วนที่ 1 เรื่องการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและการควบคุมคุณภาพมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ACA จากการศึกษาพบว่า

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดผงชาแห้ง ระหว่างวิธีการ sonication และ maceration เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ คือ ethanol, PG, PG : ethanol (1:1), glycerin : ethanol (1:1), glycerin : ethanol (3:7) ในอัตราส่วนผงชาแห้ง : ตัวทำละลาย เท่ากับ 1 : 5 พบว่าการสกัดชาแห้งด้วย ethanol สามารถสกัดสารสำคัญ ACA ได้มากกว่าการใช้ตัวทำละลายผสม และการสกัดด้วยวิธี sonication ด้วยเอทานอลทำให้ได้สารสำคัญ ACA ในปริมาณสูงที่สุด ส่วนการสกัดด้วยตัวทำละลาย PG และ glycerin ผสมกับ ethanol พบว่าสารสำคัญ ACA ถูกสกัดได้มากขึ้น เมื่อตัวทำละลายผสมนั้นมีปริมาณ ethanol สูงขึ้น การใช้ PG และ glycerin ทำให้ตัวทำละลายมีความหนืด ทำให้การแช่สกัดพร้อมเขย่าสามารถสกัดสารสำคัญ ACA ได้ดีกว่าวิธี sonication แม้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกระบบตัวทำละลายที่ศึกษา แต่การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงก่อให้เกิดความร้อนสูงในตัวอย่างที่ทำการสกัด ซึ่งทำให้ควบคุมอุณหภูมิของการสกัดได้ยากกว่าการใช้วิธีการสกัดด้วยการแช่สกัด แต่อาจต้องใช้เวลาในการแช่สกัดนานเพียงพอ เพื่อให้สารสำคัญละลายออกมาในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดในปริมาณสูง การเกิดความร้อนสูงในตัวอย่างที่ทำการสกัดอาจก่อให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญได้ สารสกัดที่ได้ภายหลังการระเหย ethanol ออกหมดแล้ว มีสีน้ำตาลอมส้ม ลักษณะหนืดข้น มีลักษณะเหนียวและละลายกลับคืนมาได้ยาก ส่วนสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมกับ ethanol เมื่อระเหยเอา ethanol ออกหมดแล้ว ได้สารสกัดมีลักษณะหนืดเหลว ไหลได้ สีน้ำตาลอมส้ม ไม่มีตะกอน สามารถตวงหรือชั่งตามปริมาณที่ต้องการนำไปใช้ได้ง่าย

จากผลการทดลองข้างต้น จึงได้ทำการวิจัยต่อเพื่อเพิ่มปริมาณสารสกัด โดยเลือกวิธีการแช่สกัด ร่วมกับการควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ทำการแช่สกัดนาน 3 วัน เขย่าวันละ 1 ครั้ง โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดคือ ethanol และตัวทำละลายผสมกับ ethanol ในอัตราส่วน 1:1 และใช้อัตราส่วนผงชาแห้ง : ตัวทำละลายในการสกัด เท่ากับ 1 : 5 ผลการศึกษาพบว่า ethanol เป็นตัวทำ

ละลายหลักที่สกัดสารสำคัญ ACA ได้ในปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ PG : ethanol (1:1) และ glycerin : ethanol (1:1) ตามลำดับ การเพิ่มระยะเวลาและอุณหภูมิในการสกัดทำให้ได้ปริมาณสารสำคัญ ACA เพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยประมาณสองเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การแช่สกัดและเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า PG เป็นตัวทำละลายที่ดีของสารสำคัญ ACA เมื่อเทียบกับ glycerin และยังทำให้สารสกัดที่ได้มีความหนืดน้อยกว่า glycerin จึงทำให้การกรองแยกผงทำได้ง่ายกว่า เนื่องจากมีรายงานการสลายตัวของ ACA เป็น 1'-hydroxy chavicol, p-coumayldiacetate, และ p-acetoxy cinnamic alcohol ด้วยปฏิกิริยา hydrolysis หรือ isomerization (Yang & Eilerman, 1999) การใช้ตัวทำละลาย ethanol, glycerin หรือ propylene glycol ในการสกัด แทนการใช้น้ำจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสม Ramanunny et al. (2022) ได้ทำการวิเคราะห์ ACA ในเหง้าชาที่ปลูกในประเทศอินเดีย โดยทำการสกัดเหง้าชาด้วย ethanol ด้วยการ sonication เป็นเวลา 15 นาทีต่อด้วยการแช่สกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณสาร ACA ด้วยเครื่อง RP-HPLC พบปริมาณสาร ACA เท่ากับ $3.89 \pm 0.23\%$ w/w ของเหง้าชาแห้ง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษานี้ เมื่อแช่สกัดเหง้าชาด้วย ethanol เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์หา ACA ด้วยเครื่อง TLC-densitometer ในสารสกัดได้ $3.16 \pm 0.31\%$ w/w จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการนำ TLC-densitometer มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ACA เป็นอีกหนึ่งทางเลือกของการวิเคราะห์หาสารสำคัญจากพืช โดยสามารถวิเคราะห์หา ACA ในตัวทำละลาย ethanol หรือ glycerin และ propylene glycol ที่ใช้ในการสกัดได้

Mahae & Chaiseri (2009) รายงานว่าการแช่สกัดชาใน 50% ethanol ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สกัดได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 31.49 ± 4.09 mg GAE g^{-1} ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับการสกัดชาด้วย ethanol จากงานวิจัยนี้ (32.99 ± 1.19 mg GAE g^{-1}) ส่วน Quoc et al. (2021) รายงานว่าความเป็นขั้วของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อการสกัดสารสำคัญโดยเฉพาะสารในกลุ่ม phenolic compounds โดยพบว่า 60% acetone เป็นตัวทำละลายที่ดีกว่าในการสกัด phenolic compounds จากเหง้า *Alpinia galanga* (L.) Willd. ด้วยวิธี sonication เมื่อเปรียบเทียบกับ 60% ethanol และ 60% methanol ซึ่งมีความเป็นขั้วสูงกว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้จากการสกัดด้วย 60% acetone (7.49 ± 0.19 mg GAE g^{-1}) มีค่าใกล้เคียงกับการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วม glycerin : ethanol (1:1) ในงานวิจัยนี้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.16 ± 0.46 mg GAE g^{-1} และ 6.38 ± 0.57 mg GAE g^{-1} เมื่อสกัดโดยการแช่สกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมงและ 3 วัน ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปัจจัยด้านชนิดตัวทำละลาย วิธีการสกัดและระยะเวลาการสกัด รวมทั้งอุณหภูมิในการสกัด มีผลต่อการสกัดสารสำคัญจากพืชตัวอย่าง การใช้แต่ละปัจจัยร่วมกันจะเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารได้

งานวิจัยส่วนที่ 2 เรื่องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดชาเพื่อการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และเครื่องสำอาง

จากผลการศึกษางานวิจัยส่วนที่ 1 พบว่าสารสกัดชาที่แช่สกัดโดยกระบวนการ maceration ให้สารสำคัญ ACA ที่สูงกว่ากระบวนการสกัดโดยวิธี sonication เมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาการแช่สกัด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการแช่สกัดชามีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่สกัดออกมาได้ งานวิจัยของ Nadzir et al. (2020) ยังพบว่าระยะเวลาการแช่สกัดและอุณหภูมิยังมีผลต่อปริมาณ total phenolic content และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาอีกด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสารสกัดชาที่สกัดโดยวิธีการแช่สกัดที่ใช้ระยะเวลาแช่สกัดและอุณหภูมิในการแช่สกัดที่ต่างกันมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารกลุ่มฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่ง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ต่อไป นอกจากนี้การแช่สกัดด้วยวิธี maceration ยังใช้เครื่องมือที่ไม่ยุ่งยาก ไม่ซับซ้อนและใช้พลังงานในการสกัดที่น้อยกว่าวิธีการใช้เครื่องเสียงความถี่สูง (sonication) อีกด้วย

จากผลการศึกษาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดชาพบว่า สารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol (EtOH) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 3 วัน ให้ปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย Gly:EtOH (1:1) และ PG:EtOH (1:1) ทั้งที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 3 วัน โดยสารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ปริมาณ 1 กรัม มีปริมาณฟีนอลิกรวมเทียบเท่ากับ gallic acid ปริมาณ 22.59 – 32.99 มิลลิกรัม และสารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ปริมาณ 1 กรัม มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเทียบเท่ากับ quercetin ปริมาณเท่ากับ 8.61 – 11.27 มิลลิกรัม จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวทำละลายเอทานอลเพียงชนิดเดียว สามารถสกัดสารในกลุ่มฟีนอลิกออกมาได้ดีกว่าการใช้ตัวทำละลายผสมโพรพิลีน ไกลคอล และกลีเซอริน ซึ่งมีงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่าเอทานอลมีประสิทธิภาพในการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ gallic acid และ quercetin ออกมาได้ดีกว่าตัวทำละลาย methanol, acetone และน้ำ (Salih et al., 2021) แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย Gly:EtOH (1:1) และ PG:EtOH (1:1) พบสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมดในปริมาณที่ต่ำ อาจเนื่องมาจากความมีขั้ว (polarity) ชนิดและอัตราส่วนปริมาณของตัวทำละลายซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกที่สกัดได้ในพืชสมุนไพร (Garcia-Salas et al., 2010) รวมทั้งเกิดจากการที่ตัวทำละลายไม่ระเหยจึงไม่สามารถทำให้เข้มข้นขึ้นได้ ปริมาณสารสำคัญจึงเจือจางกว่า

เมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาผ่านกลไกการต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) พบว่าสารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 3 วัน มี

ความสามารถในการต้านการเกิด oxidation โดยทำหน้าที่เป็น free radical scavenger ได้ดีกว่า สารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย Gly:EtOH (1:1) และ PG:EtOH (1:1) ทั้งที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 3 วัน โดยสารสกัดจากเหง้าชาที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS^{•+} อยู่ในช่วง 77.25 – 92.7% และ 73.24 – 95.0% ที่ความเข้มข้น 500 และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากผลการศึกษานี้สอดคล้องกับปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกรวมที่พบในสารสกัดชา ที่บ่งชี้ว่าสารกลุ่มฟีนอลิกมีบทบาทสำคัญที่ทำให้สารสกัดชา มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol ปริมาณ 1 กรัม มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับ ascorbic acid ปริมาณ 7.27 – 8.66 มิลลิกรัม โดยความเข้มข้น IC₅₀ ของ ascorbic acid เท่ากับ 24.11 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol ปริมาณ 1 กรัม มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับ trolox ปริมาณ 52.07 – 67.31 มิลลิกรัม โดยความเข้มข้น IC₅₀ ของ trolox เท่ากับ 49.18 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยที่ให้ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันผู้วิจัย การศึกษาของ Yoon et al. (2023) ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากเหง้าชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS^{•+} เท่ากับ 81.8 และ 99.8% ตามลำดับ สารสำคัญ ACA ที่พบเป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดชา มีโครงสร้างเป็น acetate ester ของ chavicol ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่ม phenylpropanoid (Mahae et al., 2009) อาจมีบทบาทและทำงานร่วมกับ polyphenols ในการทำหน้าที่ยับยั้งการเกิด oxidation (Kubota et al., 2001)

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดชาด้วยวิธี protein denaturation assay พบว่า สารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 3 วัน มีความสามารถในการต้านการอักเสบได้ดีกว่าสารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย Gly:EtOH (1:1) และ PG:EtOH (1:1) ทั้งที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 3 วัน แต่อย่างไรก็ตาม สภาวะทดสอบที่ความเข้มข้น 5 mg% พบว่า สารสกัดชา มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งการเกิด autoantigen ที่เกิดจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (protein denaturation) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดการอักเสบ (Mirke et al., 2020; Williams et al., 2008) และไม่สามารถทำการศึกษาในสภาวะที่ความเข้มข้นสูงขึ้นได้ เนื่องจากตัวทำละลาย DMSO ที่ใช้ในการละลายสารสกัดมีผลต่อการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (Arakawa et al., 2007) ดังนั้นจึงควรศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดชาด้วยวิธีอื่นๆ เพิ่มเติม

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ *S. aureus* ของสารสกัดชาพบว่า สารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 3 วัน มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ได้ดีกว่าสารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย Gly:EtOH (1:1) และ

PG:EtOH (1:1) ทั้งที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 3 วัน โดยสารสกัดชาทั้ง 2 ชนิดนี้ มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ได้ดีกว่า *S. aureus* และสารสำคัญ ACA ยังมีบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดอีกด้วย Oonmetta-aree et al. (2006) ยังชี้ให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลจากชามีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* (inhibition zone เท่ากับ 22.33 mm) เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ (inhibition zone เท่ากับ 14.67 mm) และสารสกัดเอทานอลจากชา มี minimum inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 0.325 mg/mL ในขณะที่งานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดชา M3DEtOH มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 mg/mL นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* ของสารสกัดชาให้ผลที่สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยสารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 3 วัน มีความสามารถในการต้านเชื้อรา *C. albicans* การศึกษาของ Janssen et al. (1985) ชี้ให้เห็นว่า ปริมาณ ACA ที่ความเข้มข้น 23.1 - 252 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ผู้วิจัยพบว่าสารสำคัญ ACA ไม่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรา *C. albicans* เมื่อเปรียบเทียบกับ clotrimazole ที่ความเข้มข้นเดียวกัน 1% w/w ซึ่งเป็นความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อราที่ขายในท้องตลาด แต่อย่างไรก็ตามสารสำคัญในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดชา ได้แก่ kaempferol, kaempferide, galangin, quercetin และ alpinin อาจมีบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อรา *C. albicans* อีกด้วย

ดังนั้นจากผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดชา พบว่าสารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยเอทานอลเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 3 วัน ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่าสารสกัดชาที่แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย Gly:EtOH (1:1) และ PG:EtOH (1:1) โดยมีฤทธิ์เป็น antioxidant, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ *S. aureus* รวมถึงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคบนผิวหนัง สารสำคัญหลัก ACA และสารประกอบฟีนอลิกทั้ง polyphenols และ flavonoids ที่พบในสารสกัดชา มีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทำให้สารสกัดชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีประสิทธิภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และเครื่องสำอางในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การเตรียมสารสกัดชาเพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์ แหล่งปลูกชาที่มีคุณภาพเป็นสิ่งสำคัญมาก ผู้ผลิตสามารถเลือกชาจากพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการซึ่งมีชื่อเสียงด้านคุณภาพมานาน หรือพื้นที่ปลูกชาเชิงพาณิชย์อื่นเช่น ฉะเชิงเทรา อ่างทอง สุพรรณบุรี หากต้องการเหมาชาในปริมาณมากควรติดต่อเกษตรกรในพื้นที่เพื่อการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบชาตั้งแต่ต้นทาง

2. การเตรียมสารสกัดเข้าใน glycerin หรือ propylene glycol จำเป็นต้องใส่สารกันเสีย เช่น sodium benzoate หรือสารกลุ่มพาราเบน
3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความปลอดภัยหรือผลกระทบของวิธีสกัดต่อความคงตัวของสารสกัดเข้า
4. ทำการพัฒนาสารสกัดเข้าให้อยู่ในรูปแบบตำรับยารักษาโรคทางผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อ
5. ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของตำรับที่พัฒนาขึ้น

บรรณานุกรม

1. ข้าเหลือง. [อินเทอร์เน็ต]. ปทุมธานี: สำนักงานพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว (องค์การมหาชน). [เข้าถึงเมื่อ 2566 กันยายน 18]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.wisdomking.or.th/th/tree-knowledge/ข้าเหลือง>
2. ปวีณา อ้วยวัฒนพงศ์, อภิญา กิริติเมธากุลม, อนวัช มิตรประทาน. (2563) การประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ file:///C:/Users/Cp5900095/Downloads/TLC%20&%20Image%20analysis.pdf
3. วิรัตน์ ทองรอด (2561). โรคผิวหนังจากเชื้อราที่พบบ่อย. *วารสารยาน่ารู้*, 61(3), 85-93. https://www.pat.or.th/attachment/25610711/3_ya-na-roo_no3_jul-sept2018_no-ad.pdf
4. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ข้า [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพมหานคร: คณะ. เภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล [สืบค้นเมื่อ 17 กันยายน 2565]. สืบค้นจาก: <https://medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/alpinia.html>
5. สุพิชญ์ชญา กลั่นทะกะสุวรรณ การใช้แอลตราโซนิคช่วยสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิศวกรรมอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ พ.ศ. 2562.
6. Aljobair, M.O. (2022). Chemical composition, antimicrobial properties, and antioxidant activity of galangal rhizome. *Food Science and Technology*, 42. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.45622>
7. Al-Mosawy, A.M.S., & Al-Salhi, K.C.K. (2021). The effect of alcoholic extract of rhizomes of greater galangal (*Alpinia galanga* L.) on the serum antioxidant enzymes for Japanese quail during oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 34(1), 171-179. <https://bjas.bajas.edu.iq/index.php/bjas/article/view/336/204>
8. Arakawa, T., Kita, Y., & Timasheff, S.N. (2007). Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. *Biophysical Chemistry*, 131(1-3), 62-70.

9. Chouni, A., & Paul, S. (2018). A review on phytochemical and pharmacological potential of *Alpinia galanga*. *Pharmacognosy Journal*, 10(1), 9-15.
10. Devi, K.R, Singh, P.P., Devi, M.M., & Sharma, G.J. (2018). Evaluation of antioxidant activities of *Alpinia galanga* (L.) Willd. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 15(4). Doi: <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2700>
11. Dolowy M, & Pyka A. TLC--densitometric method for qualitative analysis of betamethasone and its related compounds in pharmaceutical preparations. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014;71(6):922-32
12. Eff, A.R.Y., & Rahayu, S.T. (2016). The antibacterial effects of essential oil from galangal rhizome *Alpinia galanga* (Linn.) pierreon rat (*Rattus norvegicus* L.) were infected by *Salmonella typhi*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(7), 189-93.
13. Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Gutierrez, A.F. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15, 8813–8826.
14. Hamid Nour, A., Ruth Oluwaseun, A., Hamid Nour, A., Suliman Omer, M., & Ahmed, N. (2021). Microwave-assisted extraction of bioactive compounds (Review). *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.96092
15. Janssen, A., & Scheffer, J. (1985). Acetoxychavicol acetate, an antifungal component of *Alpinia galanga*. *Planta Medica*, 51(6), 507–511.
16. Karami, Z., Emam-Djomeh, Z., Mirzaee, H.A., Khomeiri, M., Mahoonak, A.S., & Aydani, E. (2015). Optimization of microwave assisted extraction (MAE) and soxhlet extraction of phenolic compound from licorice root. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3242-3453. doi: 10.1007/s13197-014-1384-9.
17. Khattak, S., Saeed-ur-Rehman, Ullah Shah, H., Ahmad, W., & Ahmadm, M. (2005). Biological effects of indigenous medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galanga*. *Fitoterapia*, 76(2), 254-257. doi: 10.1016/j.fitote.2004.12.012. PMID: 15810156.

18. Khodavandi, A., Tahzir, N.A.B., Cheng, P.W., & Chen, P.Y.V. (2013). Antifungal activity of rhizome coptidis and *Alpinia galanga* against *Candida* species. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7(3), 1725-1730.
19. Kojima-Yuasa, A., & Matsui-Yuasa, I. (2020). Pharmacological effects of 1'-acetoxychavicol acetate, a major constituent in the rhizomes of *Alpinia galanga* and *Alpinia conchigera*. *Journal of Medicinal Food*, 23(5), 465–475. doi: 10.1089/jmf.2019.4490.
20. Kubota, K., Ueda, Y., Yasuda, M. & Masuda, A. (2001). Occurrence and antioxidative activity of 1'-acetoxychavicol acetate and its related compounds in the rhizomes of *Alpinia galanga* during cooking. pp. 601-607. In A.M. Spanier, F. Shahidi, T.H. Parliment, and C.-T. Ho (eds.). *Food Flavors and Chemistry: Advances of the New Millennium*. Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
21. Lang, Q., & Wai, C.M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review. *Talanta*, 53(4), 771-782. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00557-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00557-9).
22. Latha, C., Shriram, V.D., Jahagirdar, S.S., Dhakephalkar, P.K., & Rojatkar, S.R. (2009). Antiplasmodial activity of 1'-acetoxychavicol acetate from *Alpinia galanga* against multi-drug resistant bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3), 522-525. doi: 10.1016/j.jep.2009.03.028.
23. Lee, D., Son, S.R., Qi, Y., Kang, K.S., & Jang, D.S. (2023). (1'S)-1'-Acetoxyeugenol acetate enhances glucose-stimulated insulin secretion. *Plants (Basel)*, 12(3), 579. doi: 10.3390/plants12030579.
24. Lertsatitthanakorn, P., Manwiwattanakun, K., Paengnakorn, N., & Khunkitti, W. (2014). Antibacterial activity of an effective essential oil formulated in liquid soap against skin bacteria. *Chiang Mai Journal of science*, 41(1), 71-83. <http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/>
25. Liang, N. & Kitts, D.D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*. 19(11):19180-19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>

26. Luangnarumitchai, S., Lamlerthton, S. & Tiyafoonchai, W. (2007). Antimicrobial activity of essential oils against five strains of *Propionibacterium acnes*. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(1-4), 60-64.
27. Mahae, N., & Chaiseri, S. (2009). Antioxidant activities and antioxidative components in extracts of *Alpinia galanga* (L.) Sw. *Agriculture and Natural Resources*, 43(2), 358-369.
<https://li01.tci-thaijo.org/index.php/anres/article/view/244680>
28. Mirke, N. B., Shelke, P. S., Malavdkar, P. R., & Jagtap, P. N. (2020). In vitro protein denaturation inhibition assay of *Eucalyptus globulus* and Glycine max for potential anti-inflammatory activity. *Innovations in Pharmaceuticals and Pharmacotherapy*, 8(2), 28.
29. Molole, G. J., Gure, A., & Abdissa, N. (2022). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of *Commiphora mollis* (Oliv.) Engl. resin. *BMC Chemistry*, 16(1), 48. Doi: 10.1186/s13065-022-00841-x
30. Nadzir, M. M., Idris, F. N., & Yi, C. J. (2020). Phenolic compounds and antioxidant activities of macerated *Alpinia Galanga* stems and leaves. *ASEAN Engineering Journal*, 10(1), 40-48.
31. Natthakan, R., Nguyen, T.T.A, & Huynh, D.T. (2019). Extraction and encapsulation of lesser galangal (*Alpinia officinarum*) essential oil using microwave pretreatment and spray drying. *Journal of Agriculture and Development*, 18(3), 57-63.
32. Nik Hasan, M.K., Kamarazaman, I.S., Azman, M., & Abd Rashid, L. (2020). Preparation of *Alpinia galanga* water extract with high antioxidant properties. *Asian Journal of Pharmacognosy*, 4(1), 43-48.
<http://www.pharmacognosyasia.com/Files/Other/AJPV4I1p4348.pdf>
33. Niyomkam, P., Kaewbumrung, S., Kaewnpparat, S., & Panichayupakaranant, P. (2010). Antibacterial activity of Thai herbal extracts on acne involved microorganism. *Pharmaceutical Biology*, 48(4), 375-380.
DOI: 10.3109/13880200903150443

34. Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., & Eumkeb, G. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Technology*, 39(10), 1214-1220.
doi: 10.1016/j.lwt.2005.06.015
35. Panche, A.N., Diwan, A.D., & Chandra, S.R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. Doi: 10.1017/jns.2016.41.
36. Pandey, A., & Tripathi, S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2(5):115-119.
37. Patel, M., Dave, K., & Patel, P. (2021). A review on different extraction method of plants: innovation from ancient to modern technology. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, Special Issue, 10(12):511-527.
38. Prakatthagomol, W., Sirithunyalug, J., & Okonogi, S. (2012). Comparison of antibacterial activity against food-borne bacteria of *Alpinia galanga*, *Curcuma longa*, and *Zingiber cassumunar*. *Chiang Mai University Journal of Natural Science*, 11(2), 177.
39. Quoc, L.P.T. (2021). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Alpinia galanga* (L.) Willd. rhizome. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 86(4);323-328. <https://hrcak.srce.hr/file/388192>
40. Ramanunny, A.K., Wadhwa, S., Gulati, M., Gupta, S., Porwal, O., Jha, N.K., Gupta, P.K., Kumar, D., Prasher, P., Duah, K., Saqr, A.A., Almawash, S., & Singh, S.K. (2022). Development and validation of RP-HPLC method for 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) and its application in optimizing the yield of ACA during its isolation from *Alpinia galanga* extract as well as its quantification in nanoemulsion. *South African Journal of Botany*, 149, 887-898.
41. Rao, K., Ch, B., Narasu, L.M., & Giri, A. (2010). Antibacterial activity of *Alpinia galanga* (L) Willd crude extracts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(3), 871-84. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8900-9>

42. Ranjha, M.M.A.N., Irfan, S., Lorenzo, J.M., Shafique, B., Kanwal, R., Pateiro, M. Arshad, R.N., Wang, L., Nayik, G.A., Roobab, U., et al. (2021). Sonication, a potential technique for extraction of phytoconstituents: A systematic review. *Processes*, 9(1406). <https://doi.org/10.3390/pr9081406>
43. Reka, L., Godage, C.M., Wijayabandara, J., & Siriwardhene, A. (2023). Evaluation of antifungal activity of *Languas galangal* rhizome and development of a topical antifungal cream. *Medicines (Basel)*, 10(6), 34.
doi: 10.3390/medicines10060034.
44. Rizkita, C.W., & Sukardi. (2021). Effectiveness of sunscreen on *galangal* (*Alpinia galangal*) crude extract using the microwave-assisted extraction method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 733 012096.
DOI 10.1088/1755-1315/733/1/012096.
45. Ruangsawang, S., & Niamsup, H. (2021). Antioxidant activity of galangal: effects of cooking methods. *BMB conference 2021*.
<http://www.scisoc.or.th/BMBThailand/images/Proceedings/S2/S2-P-02.pdf>
46. Salih, A.M., Al-Qurainy, F., Nadeem, M., Tarroum, M., Khan, S., Shaikhaldein, H.O., Al-Hashimi, A., Alfagham, A., & Alkahtani, J. (2021). Optimization method for phenolic compounds extraction from medicinal plant (*Juniperus procera*) and phytochemicals screening. *Molecules*, 26(24), 7454.
47. Sani, S.A., Mohd Faik, A.A., Abdulla, R., & Kunasekaran, S. (2019). Phytochemical, antioxidant and antibacterial activities of two kinds of Sabah Zingberaceae. *Journal of Physics: Conference Series*, 1358 012012.
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1358/1/012012/pdf>
48. Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT-Food Science and Technology*, 150, 111932. Doi: 10.1016/j.lwt.2021.111932
49. Škrovánková, S., Mišurcová, L., & Machu, L. (2012). Chapter Three - antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. In J. Henry

- (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 67, pp. 75-139). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394598-3.00003-4>
50. Taurina, W., & Andrie, M. (2013). Formulation of lengkuas rhizome (*Alpinia galanga* L.) extract's gel as antifungal with hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) and carbopol base. *Traditional Medicine Journal*, 18(3), 157-161. (<https://www.neliti.com/publications/180943/formulation-of-lengkuas-rhizome-alpinia-galanga-l-extracts-gel-as-antifungal-wit>)
 51. Trimanto T., Hapsari, L., & Dwiyantri D. (2021). *Alpinia galanga* (L.) Willd: Plant morphological characteristic, histochemical analysis, and review on pharmacological. *AIP Conference Proceeding*, 2353 (1): 030021. [Online URL: <https://doi.org/10.1063/5.0052687>] accessed on October 20, 2023
 52. Vasavada, N. (2016). One-way anova with post-hoc Tukey HSD test calculator. https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/
 53. Voravuthihunchai, S.P., Limsuwan, S., Supapol, O., & Subhadhirasakul, S. (2006). Antibacterial activity of extract from family Zingiberaceae against foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*, 26(4), 325-334.
 54. Williams, L.A., O'Connar, A., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J.A., Conrad, J., Vogler, B., Rosner, H., & Kraus, W. (2008). The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Medical Journal*, 57(4), 327-331.
 55. Yang, X., & Eilerman, R. G. (1999). Pungent principal of *Alpinia galangal* (L.) Swartz. and its applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1657-1662. doi:10.1021/jf9808224.
 56. Yoon, S. Y., Kim, B. H., Jang, Y. A., & Kim, S. G. (2023). Antioxidant and anti-aging effects of *Alpinia galanga* L. rhizome extracts and preservation of antioxidant effects in W/O type emulsion. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 66, 424-435.

- 57 Zhang, D., Zou, L., Wu, D., Zhuang, Q., Li, H., Mavumengwana, V., Corke, H., & Gan, R. (2021). Discovery of 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) as a promising antibacterial compound from galangal (*Alpinia galanga* (Linn.) Willd). *Industrial Crops and Products*, 171 113883. Doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113883.



ภาคผนวก

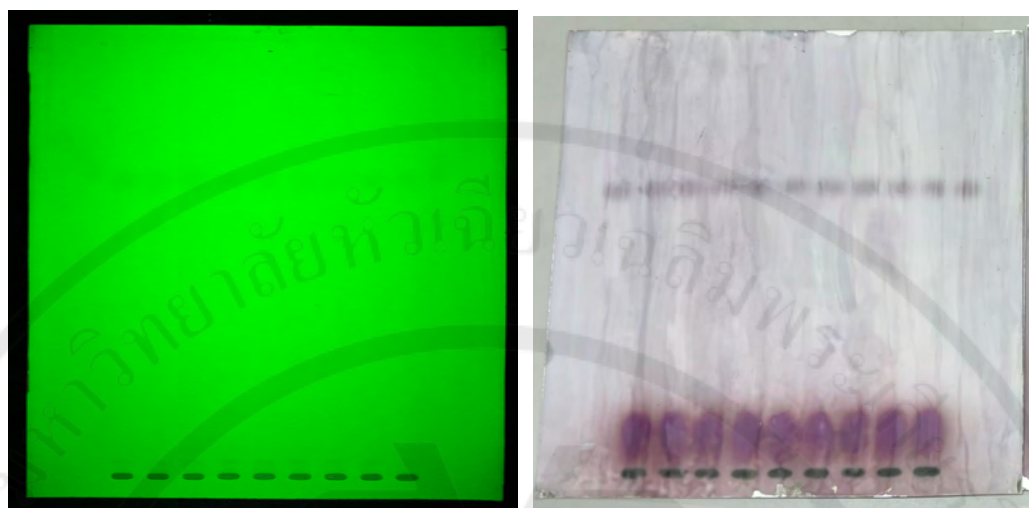


ภาคผนวก ก

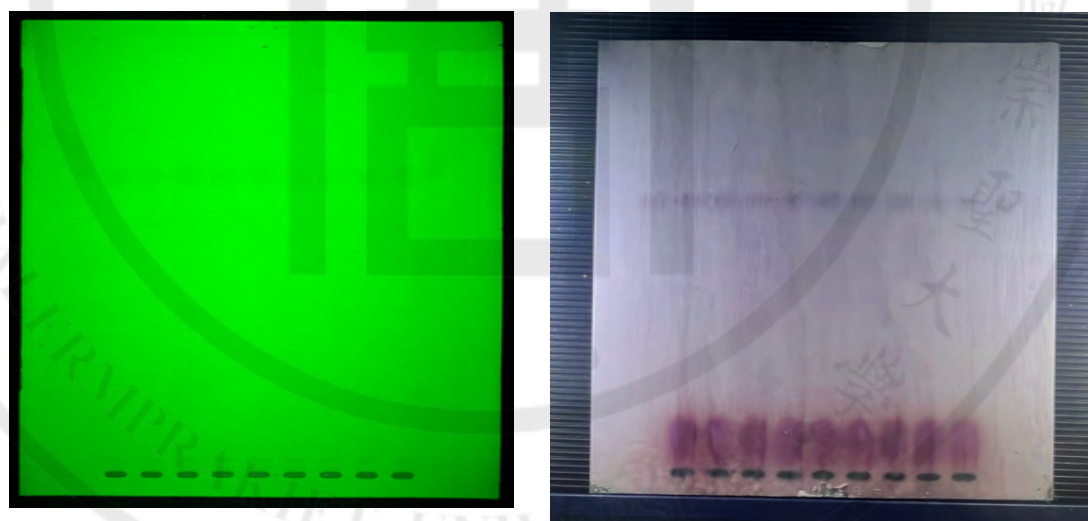
ข้อมูลการศึกษาวิธีสกัด การวิเคราะห์สารมาร์กเกอร์และการทดสอบทางสถิติ

ตารางที่ ก.1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหายาโดยวิธี sonication นาน 6 ชั่วโมง

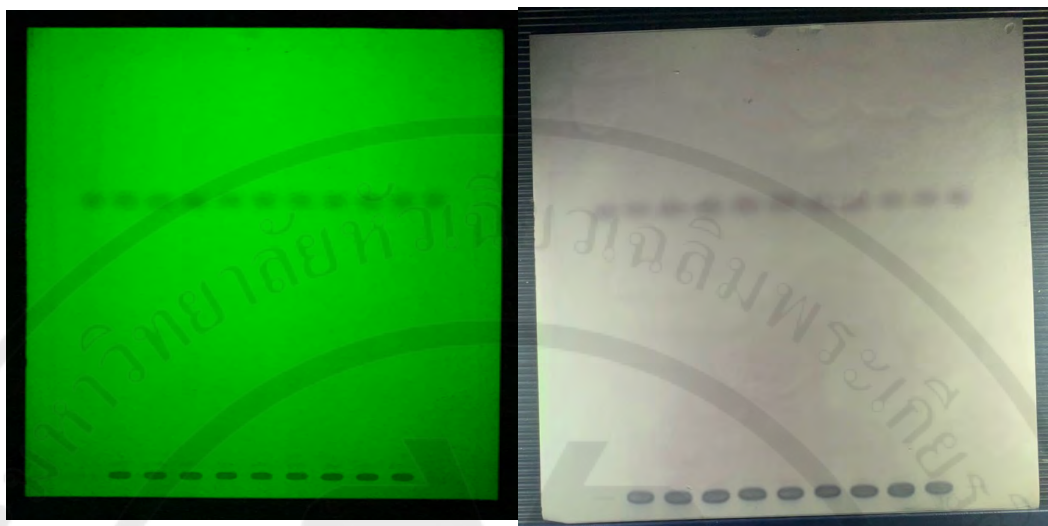
ตัวทำสกัด	ชื่อตัวอย่าง	น้ำหนักผงข่า (g)	น้ำหนักสารสกัดที่ ระเหยแล้ว (g)
Propylene glycol	D	100.21	333.97
	E	100.22	311.95
	F	100.08	327.46
Propylene glycol:ethanol 1:1	A	100.00	153.53
	B	100.00	173.38
	C	100.00	176.29
Glycerin : ethanol 1:1	J	100.05	208.00
	K	100.02	234.60
	L	100.06	206.62
Glycerin : ethanol 3:7	G	100.05	123.48
	H	100.43	127.23
	I	100.01	113.78



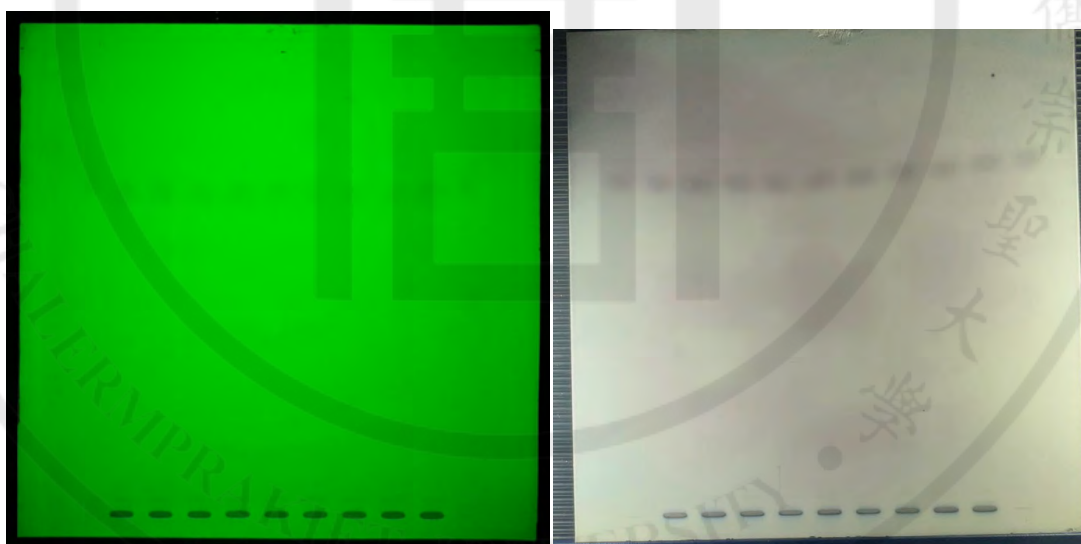
ภาพที่ ก.1 TLC-densitometry chromatoplate ของวิธี sonication ด้วย propylene glycol ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (A) และ ภายใต้ visible light หลังทำการสเปรย์ด้วย vanillin และ sulfuric acid (B)



ภาพที่ ก.2 TLC-densitometry chromatoplate ของวิธี sonication ด้วย propylene glycol : ethanol 1:1 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (A) และ ภายใต้ visible light หลังทำการสเปรย์ด้วย vanillin และ sulfuric acid (B)



รูปที่ ๓.3 TLC-densitometry chromatoplate ของวิธี sonication ด้วย glycerin : ethanol 1:1 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (A) และ ภายใต้ visible light หลังทำการสเปรย์ด้วย vanillin และ sulfuric acid (B)



รูปที่ ๓.4 TLC-densitometry chromatoplate ของวิธี sonication ด้วย glycerin : ethanol 3:7 1 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (A) และ ภายใต้ visible light หลังทำการสเปรย์ด้วย vanillin และ sulfuric acid (B)

ตารางที่ ก.2 ปริมาณ ACA ของสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี sonication ด้วย propylene glycol

Track	Sample conc. (mg/mL)	Vol. (μ L)	Area (AU)	ใน 10 μ L มี ACA (μ g)	ใน 10 mL มี ACA (mg)	ACA ที่ ได้ (mg/g extract)	crude extract ที่ ได้ทั้งหมด (g)	% ACA in crude extract	น้ำหนัก ACA ที่สกัดได้ (g)
1	Std ACA	18	8426.9	5.125	2.847	-	-	-	
2	D	10	7464.3	4.238	4.238	4.209	333.97	0.421	1.406
3	(1.00696	10	8106.5	4.830	4.830	4.796	333.97	0.480	1.602
4	g/10 mL) (100.696)	10	8186.9	4.904	4.904	4.870	333.97	0.487	1.626
5	E	10	7762.3	4.513	4.513	4.479	311.95	0.448	1.397
6	(1.00755	10	7442.0	4.218	4.218	4.186	311.95	0.419	1.306
7	g/10 mL) (100.755)	10	7727.1	4.480	4.480	4.447	311.95	0.445	1.387
8	F	10	7549.5	4.317	4.317	4.258	327.46	0.426	1.394
9	(1.01381	10	7422.2	4.199	4.199	4.142	327.46	0.414	1.356
10	g/10 mL) (101.381)	10	8516.1	5.207	5.207	5.136	327.46	0.514	1.682
11	Std ACA	18	10217.2	6.773	3.763	-	-	-	

Position Rf = 0.62 – 0.70, Max Rf = 0.69

ตารางที่ ก.3 ปริมาณ ACA ในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี sonication ด้วย propylene glycol:ethanol 1:1

Track	Sample conc. (mg/mL)	Vol. (μL)	Area (AU)	ใน 10 μL มี ACA (μg)	ใน 10 mL มี ACA (mg)	ACA ที่ ได้ (mg/กรัม extract)	crude extract ที่ ได้ ทั้งหมด (g)	% ACA in crude extract	น้ำหนัก ACA ที่สกัด ได้ (g)
1	Std ACA	18	11168.9	7.650	4.250				
2	A	10	12905.8	9.250	9.250	9.133	153.53	0.913	1.402
3	(1.01281	10	12842.7	9.191	9.191	9.075	153.53	0.908	1.393
4	g/10 mL) (101.281)	10	12616.6	8.983	8.983	8.870	153.53	0.887	1.362
5	B	10	10809.3	7.319	7.319	7.244	173.38	0.724	1.256
6	(1.01028	10	10684.5	7.204	7.204	7.131	173.38	0.713	1.236
7	g/10 mL) (101.028)	10	9960.3	6.537	6.537	6.470	173.38	0.647	1.122
8	C	10	9974.7	6.550	6.550	6.458	176.29	0.646	1.138
9	(1.01428	10	9595.5	6.201	6.201	6.114	176.29	0.611	1.078
10	g/10 mL) (101.428)	10	9458.2	6.074	6.074	5.989	176.29	0.599	1.056
11	Std ACA	18	8475.1	5.169	2.872				

Position Rf = 0.63 – 0.73, Max Rf = 0.68

ตารางที่ ก.4 ปริมาณ ACA ในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี sonication ด้วย glycerin : ethanol 1:1

Track	Sample conc. (mg/mL)	Vol. (μ L)	Area (AU)	ใน 10 μ L มี ACA (μ g)	ใน 10 mL มี ACA (mg)	ACA ที่ ได้ (mg/g extract)	crude extract ที่ได้ ทั้งหมด (g)	% ACA in crude extract	น้ำหนัก ACA ที่สกัด ได้ (g)
1	Std ACA	18	10232.3	6.787					
2	J	10	9999.70	6.573	6.573	6.558	208.0	0.656	1.364
3	(1.00226	10	10313.80	6.862	6.862	6.847	208.0	0.685	1.424
4	g/10 mL) (100.226)	10	10220.40	6.776	6.776	6.761	208.0	0.676	1.406
5	K	10	10036.40	6.607	6.607	6.574	234.6	0.657	1.542
6	(1.00497	10	9878.20	6.461	6.461	6.429	234.6	0.643	1.508
7	g/10 mL) (100.497)	10	10150.10	6.712	6.712	6.678	234.6	0.668	1.567
8	L	10	10065.70	6.634	6.634	6.596	206.62	0.660	1.363
9	(1.00575	10	9669.10	6.269	6.269	6.233	206.62	0.623	1.288
10	g/10 mL) (100.575)	10	10214.80	6.771	6.771	6.733	206.62	0.673	1.391
11	Std ACA	18	8379.60	5.081					

Position R_f = 0.62 – 0.70, Max R_f = 0.69

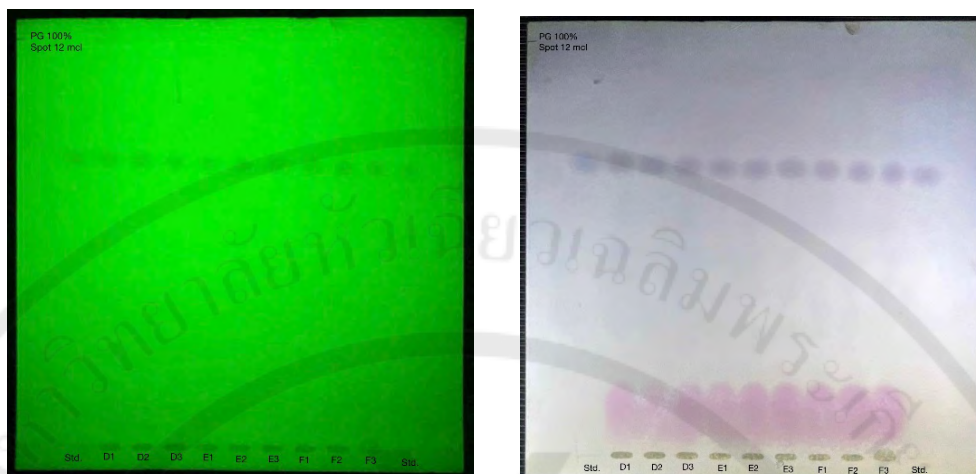
ตารางที่ ก.5 ปริมาณ ACA ในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี sonication ด้วย glycerin : ethanol 3:7

Track	Sample conc. (mg/mL)	Vol. (μ L)	Area (AU)	ใน 5 μ L มี ACA (μ g)	ใน 10 mL มี ACA (mg)	ACA ที่ ได้ (mg/g extract)	crude extract ที่ได้ ทั้งหมด (g)	% ACA in crude extract	น้ำหนัก ACA ที่สกัด ได้ (g)
1	Std ACA	18	7308.1	4.094	2.275				
2	G	5	7749.8	4.501	9.002	8.916	123.48	0.892	1.101
3	(1.00969	5	8304.4	5.012	10.024	9.927	123.48	0.993	1.226
4	g/10 mL) (100.969)	5	9238.9	5.872	11.745	11.632	123.48	1.163	1.436
5	H	5	10219.8	6.776	13.552	13.217	127.23	1.322	1.682
6	(1.02531	5	11549.4	8.000	16.001	15.606	127.23	1.561	1.986
7	g/10 mL) (102.531)	5	12103.9	8.511	17.022	16.602	127.23	1.660	2.112
8	I	5	12898.9	9.243	18.486	17.880	113.78	1.788	2.034
9	(1.03391	5	12278.6	8.672	17.344	16.775	113.78	1.678	1.909
10	g/10 mL) (103.391)	5	11224.9	7.702	15.403	14.898	113.78	1.490	1.695
11	Std ACA	18	8745.7	5.418	3.010				

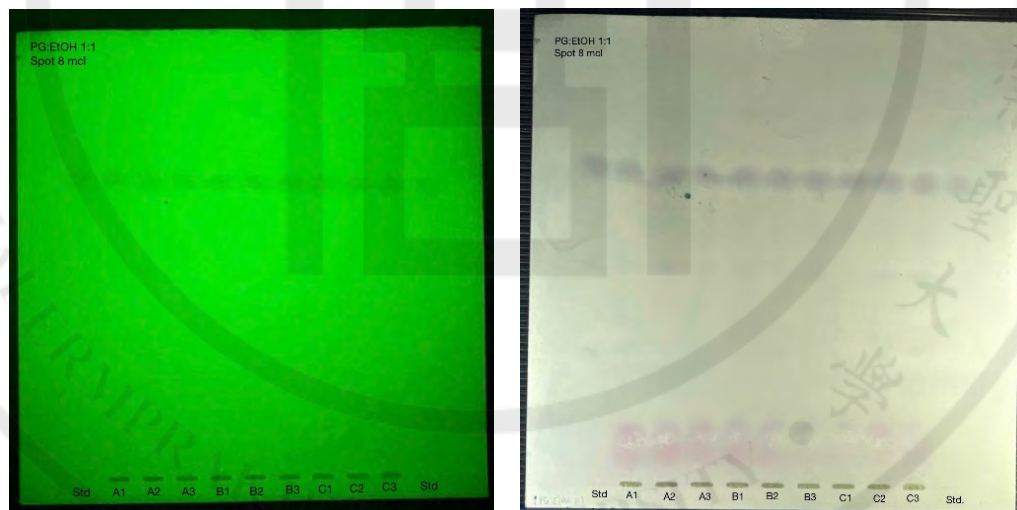
Position Rf = 0.68 – 0.79, Max Rf = 0.72-0.75

ตารางที่ ก.6 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบโดยวิธี maceration นาน 6 ชั่วโมง

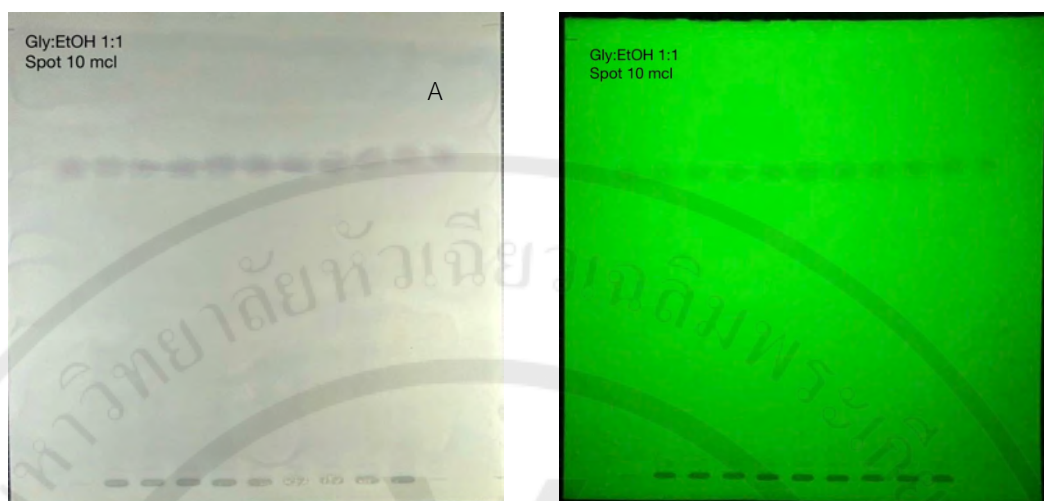
ตัวทำสกัด	ชื่อตัวอย่าง	น้ำหนักผงขำ (g)	น้ำหนักสารสกัดที่ ระเหยแล้ว (g)
Propylene glycol	D	100.0	319.06
	E	100.0	331.07
	F	100.0	334.05
Propylene glycol:ethanol 1:1	A	100.0	228.46
	B	100.0	211.25
	C	100.0	210.04
Glycerin : ethanol 1:1	G	100.0	184.04
	H	100.0	191.23
	I	100.0	192.88
Glycerin : ethanol 3:7	J	100.0	145.42
	K	100.0	135.09
	L	100.0	130.73



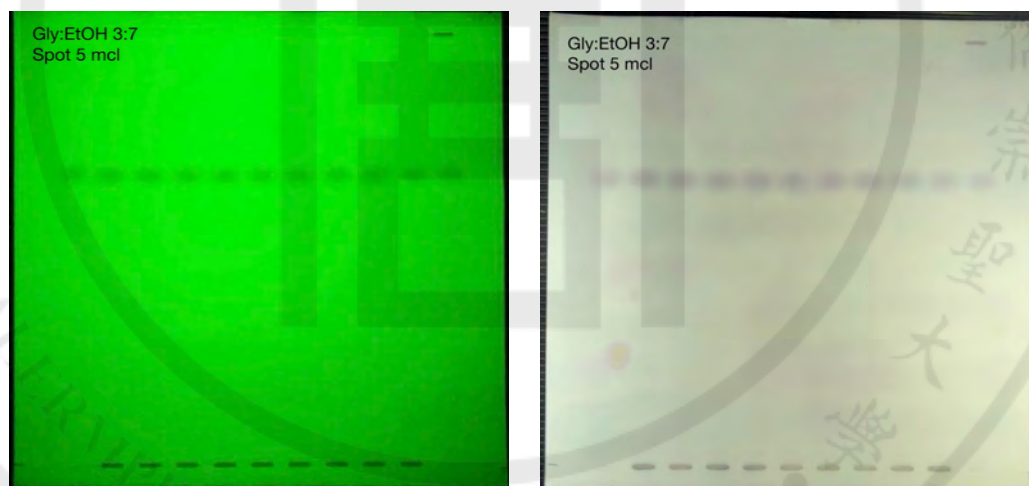
ภาพที่ ก.5 TLC chromatoplate ของวิธี maceration ด้วย propylene glycol ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (A) และ ภายใต้ visible light หลังทำการสเปรย์ด้วย vanillin และ sulfuric acid (B)



ภาพที่ ก.6 TLC chromatoplate ของวิธี maceration ด้วย propylene glycol : ethanol 1:1 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (A) และ ภายใต้ visible light หลังทำการสเปรย์ด้วย vanillin และ sulfuric acid (B)



ภาพที่ ก.7 TLC chromatoplate ของวิธี maceration ด้วย glycerin : ethanol 1:1 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (A) และ ภายใต้ visible light หลังทำการสเปรย์ด้วย vanillin และ sulfuric acid (B)



ภาพที่ ก.8 TLC chromatoplate ของวิธี maceration ด้วย glycerin : ethanol 3:7 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (A) และ ภายใต้ visible light หลังทำการสเปรย์ด้วย vanillin และ sulfuric acid (B)

ตารางที่ ก.7 ปริมาณ ACA ในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี maceration ด้วย propylene glycol

Track	Sample conc. (mg/mL)	Vol. (μ L)	Area (AU)	ใน 12 μ L มี ACA (μ g)	ใน 10 mL มี ACA (mg)	ACA ที่ ได้ (mg/g extract)	crude extract ที่ได้ ทั้งหมด (g)	% ACA in crude extract	น้ำหนัก ACA ที่สกัด ได้ (g)
1	Std ACA	18	10216.5	6.773	3.763				
2	D 1.0906 g/10 mL	12	11260.9	7.735	6.446	5.910	319.06	0.591	1.886
3		12	11696.1	8.135	6.780	6.216	319.06	0.622	1.983
4		12	12757.2	9.113	7.594	6.963	319.06	0.696	2.222
5	E 1.0409 g/10 mL	12	11906.6	8.329	6.941	6.668	331.07	0.667	2.208
6		12	12084.7	8.493	7.078	6.800	331.07	0.680	2.251
7		12	11362.1	7.828	6.523	6.267	331.07	0.627	2.075
8	F 1.0242 g/10 mL	12	10354.9	6.900	5.750	5.614	334.05	0.561	1.875
9		12	10015.5	6.588	5.490	5.360	334.05	0.536	1.791
10		12	10575.3	7.103	5.919	5.780	334.05	0.578	1.931
11	Std ACA	18	8810.2	5.478	3.043				

Position R_f = 0.65 – 0.75, Max R_f : D = 0.69, E = 0.70, F = 0.71

ตารางที่ ก.8 ปริมาณ ACA ในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี maceration ด้วย propylene glycol:ethanol 1:1

Track	Sample conc. (mg/mL)	Vol. (mL)	Area (AU)	ใน 8 μ L มี ACA (μ g)	ใน 10 mL มี ACA (mg)	ACA ที่ ได้ (mg/g extract)	crude extract ที่ ได้ ทั้งหมด (g)	% ACA in crude extract	น้ำหนัก ACA ที่สกัด ได้ (g)
1	Std ACA	18	7568.6	4.334	2.408				
2	A 1.0052 g/10 mL	8	8450.3	5.146	6.433	6.399	228.46	0.640	1.462
3		8	8411.1	5.110	6.388	6.355	228.46	0.635	1.452
4		8	8431.9	5.129	6.412	6.378	228.46	0.638	1.457
5	B 1.0269 g/10 mL	8	9076.8	5.723	7.154	6.967	211.25	0.697	1.472
6		8	9073.9	5.720	7.151	6.963	211.25	0.696	1.471
7		8	8954.8	5.611	7.013	6.830	211.25	0.683	1.443
8	C 1.0032 g/10 mL	8	9295.1	5.924	7.405	7.382	210.04	0.738	1.550
9		8	9418.9	6.038	7.548	7.524	210.04	0.752	1.580
10		8	9646.1	6.247	7.809	7.784	210.04	0.778	1.635
11	Std ACA	18	8050.9	4.778	2.655				

Position R_f = 0.64 – 0.75, Max R_f : A = 0.70, B = 0.70, C = 0.69

ตารางที่ ก.9 ปริมาณ ACA ในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี maceration ด้วย glycerin : ethanol 1:1

Track	Sample conc. (mg/mL)	Vol. (mL)	Area (AU)	ใน 10 μL มี ACA (μg)	ใน 10 mL มี ACA (mg)	ACA ที่ ได้ (mg/g extract)	crude extract ที่ได้ ทั้งหมด (g)	% ACA in crude extract	น้ำหนัก ACA ที่สกัด ได้ (g)
1	Std ACA	18	10521.2	7.053	3.919				
2	G	10	9613.7	6.218	6.218	6.120	184.04	0.612	1.126
3	1.0159	10	9940.4	6.519	6.519	6.416	184.04	0.642	1.181
4	g/10 mL	10	10390.8	6.933	6.933	6.825	184.04	0.682	1.256
5	H	10	12507.3	8.883	8.883	8.784	191.23	0.878	1.680
6	1.0112	10	12413.1	8.796	8.796	8.698	191.23	0.870	1.663
7	g/10 mL	10	11957.3	8.376	8.376	8.283	191.23	0.828	1.584
8	I	10	11294.1	7.765	7.765	7.682	192.88	0.768	1.482
9	1.0109	10	10902.1	7.404	7.404	7.324	192.88	0.732	1.413
10	g/10 mL	10	10785	7.296	7.296	7.218	192.88	0.722	1.392
11	Std ACA	18	9337.6	5.963	3.313				

Position R_f = 0.66 – 0.75, Max R_f : G =0.70, H = 71, I = 0.72

ตารางที่ ก.10 ปริมาณ ACA ในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี maceration ด้วย glycerin : ethanol 3:7

Track	Sample conc. (mg/mL)	Vol. (mL)	Area (AU)	ใน 5 μL มี ACA (μg)	ใน 10 mL มี ACA (mg)	ACA ที่ ได้ (mg/g extract)	crude extract ที่ได้ ทั้งหมด (g)	% ACA in crude extract	น้ำหนัก ACA ที่สกัด ได้ (g)
1	Std ACA	18	11307.5	7.778	4.321				
2	J	5	13314.2	9.626	19.251	18.826	145.42	1.883	2.738
3	1.0226	5	13627.5	9.914	19.829	19.390	145.42	1.939	2.820
4	g/10 mL	5	13991.3	10.249	20.499	20.046	145.42	2.005	2.915
5	K 1.0230	5	12856.5	9.204	18.408	17.994	135.09	1.799	2.431
6	g/10 mL	5	13006.1	9.342	18.684	18.264	135.09	1.826	2.467
7		5	13330.5	9.641	19.281	18.848	135.09	1.885	2.546
8	L	5	12976.6	9.315	18.630	18.438	130.73	1.844	2.410
9	1.0104	5	12480.9	8.858	17.717	17.534	130.73	1.753	2.292
10	g/10 mL	5	11968.5	8.386	16.773	16.600	130.73	1.660	2.170
11	Std ACA	18	10908.5	7.410	4.117				

Position Rf = 0.63 – 0.71, Max Rf = 0.67

การทดสอบทางสถิติ

การทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบปริมาณ ACA ที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ 8 วิธี (ข้างต้น)

เปรียบเทียบวิธีการสกัดโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน analysis of variance, F test จากนั้นเปรียบเทียบพหุคูณเพื่อทดสอบว่าค่าเฉลี่ยคู่ใดแตกต่างกัน โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้วิธีของ Tukey's HSD

ตารางที่ ก.11 อักษรแทนวิธีการสกัด 8 วิธี ที่เป็นอิสระต่อกันและผลการทดสอบทางสถิติ

A	B	C	D	E	F	G	H
Sonication Propylene glycol	Sonication PG:EtOH (1:1)	Sonication Gly:EtOH (1:1)	Sonication Gly:EtOH (3:7)	Macerat ion Propylene glycol	Macerat ion PG:EtOH (1:1)	Macerat ion Gly:EtOH (1:1)	Macerat ion Gly:EtOH (3:7)

One-way ANOVA test:

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares, SS	Mean square MS	F statistic	p-value
Between group	7	4.8297	0.69	53.3468	6.57E-10
Within group	16	0.2069	0.0129		
total	23	5.0366			

Tukey HSD results

Treatments pair	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p value	Tukey HSD inference
A vs B	4.366	0.0992	insignificant
A vs C	3.1476	0.3887	insignificant
A vs D	15.1794	0.0010	** p<0.01
A vs E	2.5891	0.5991	insignificant
A vs F	3.7568	0.2058	insignificant
A vs G	4.4168	0.0930	insignificant
A vs H	21.1192	0.0010	** p<0.01
B vs C	1.2184	0.9000	insignificant
B vs D	10.8134	0.0010	** p<0.01
B vs E	1.7769	0.9000	insignificant
B vs F	0.6092	0.9000	insignificant
B vs G	0.0508	0.9000	insignificant
B vs H	16.7532	0.0010	** p<0.01
C vs D	12.0319	0.0010	** p<0.01

Treatments pair	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD P value	Tukey HSD inference
C vs E	0.5584	0.9000	insignificant
C vs F	0.6092	0.9000	insignificant
C vs G	1.2692	0.9000	insignificant
C vs H	17.9716	0.0010	** p<0.01
D vs E	12.5903	0.0010	** p<0.01
D vs F	11.4226	0.0010	** p<0.01
D vs G	10.7627	0.0010	** p<0.01
D vs H	5.9398	0.0121	* p<0.05
E vs F	1.1676	0.9000	insignificant
E vs G	1.8276	0.8841	insignificant
E vs H	18.5301	0.0010	** p<0.01
F vs G	0.66	0.9000	insignificant
F vs H	17.3624	0.0010	** p<0.01
G vs H	16.7024	0.0010	** p<0.01

ตารางที่ ก.12 การเตรียมสารสกัดเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ ACA ด้วยวิธีที่ทดสอบความถูกต้องแล้ว

Samples	Weight of extract (g)	Final volume (mL)	Final conc. g/mL	Dilute 1:1 (g/mL)*	Spotted volume
Sonication 6 h (EtOH)	0.0956	10	0.0096	0.0048	4 μ L
Maceration 6 h (EtOH)	0.1461	10	0.0146	0.0073	4 μ L
Maceration 50°C 3 cycles (EtOH)	0.1045	10	0.0105	0.0052	4 μ L
Maceration 50°C 3 days (EtOH)	0.0488	10	0.0049	-	4 μ L
Maceration 50°C 3 days (Gly:EtOH (1:1))	0.5182	10	0.0518	-	6 μ L
Maceration 50°C 3 days (PG:EtOH (1:1))	0.5205	10	0.0521	-	6 μ L

*เจือจาง 1:1 เพื่อให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.0050 g/mL สำหรับสารสกัดแห้ง

ตารางที่ ก.13 ปริมาณ ACA ในการสกัดด้วยวิธีต่างๆ

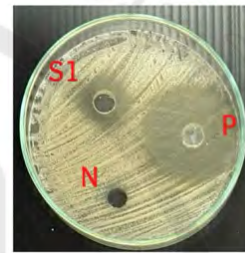
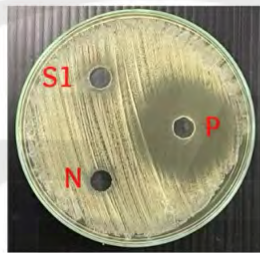
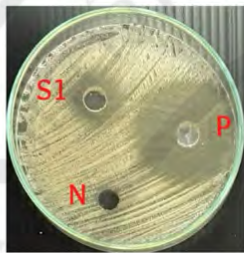
Volume of test solution (uL)	Peak area	Estimated ACA (mcg) in a spot	ACA in 1 mL (mcg)	ACA in 1 g (mcg)	ACA in 1 g (mg)	ACA in 100 g (g)	Mean (SD)
Sonication 6 h (EtOH)	11670.12	5.211	1302.75	271406.25	271.41	27.14	27.12 (0.30)
	11736.36	5.262	1315.50	274062.50	274.06	27.41	
	11588.13	5.148	1287.00	268125.00	268.13	26.81	
Maceration 6 h (EtOH)	11483.08	5.070	1267.42	173619.59	173.62	17.36	19.34 (0.03)
	12759.95	6.170	1542.48	211298.60	211.30	21.13	
	12267.01	5.702	1425.47	195269.45	195.27	19.53	
Maceration 3 cycles (EtOH)*	13086.87	6.528	1632.00	313846.15	313.85	31.38	30.90 (0.46)
	12918.57	6.338	1584.50	304711.54	304.71	30.47	
	12988.99	6.416	1604.00	308461.54	308.46	30.85	
Maceration 3 days (EtOH)	10268.8	4.253	1063.25	216989.80	216.99	21.70	21.56 (0.12)
	10201.67	4.212	1053.00	214897.96	214.90	21.49	
	10206.96	4.215	1053.75	215051.02	215.05	21.51	
Maceration 3 days (Gly:EtOH)	7654.53	2.849	474.83	9166.67	9.17	0.92	0.91 (0.004)
	7618.63	2.833	472.17	9115.19	9.12	0.91	
	7607.75	2.827	471.17	9095.88	9.10	0.91	
Maceration 3 days (PG:EtOH)	9199.9	3.635	605.83	11628.28	11.63	1.16	1.17 (0.14)
	9297.2	3.688	614.67	11797.82	11.80	1.18	
	9217.19	3.644	607.33	11657.07	11.66	1.17	

*เนื่องจากตัวทำละลายที่แยกออกมาปริมาณมากกว่าวิธีอื่นประมาณ 3 เท่า ดังนั้นจึงได้สารสกัดแห้ง 2 ส่วนที่มีความเข้มข้นไม่เท่ากัน เมื่อนำสองส่วนมาคำนวณรวมกันจะได้ความเข้มข้นเป็น 28.40%w/w ดังแสดงในรายงานบทที่ 4

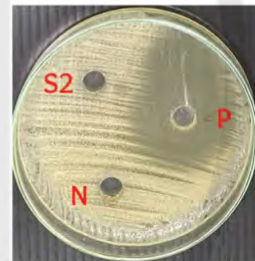
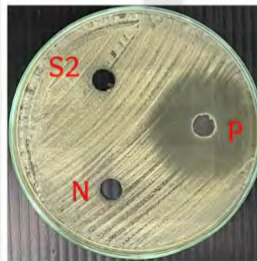
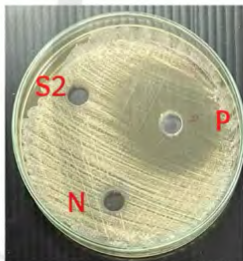
ภาพที่ ก.9 ภาพแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางยับยั้งของสารสกัดเข้าในการต้านเชื้อ *Candida albicans* จากการทดสอบด้วย agar diffusion assay

- โซนสารทดสอบ (S)
- โซนยา Clotrimazole 1 mg/mL (Positive control; P)
- โซน DMSO (Negative control; N) โดยจะหยอดสารแต่ละหลุม 100 μ L

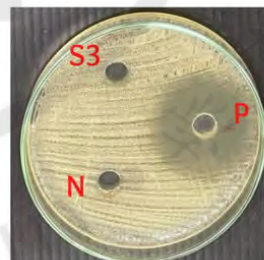
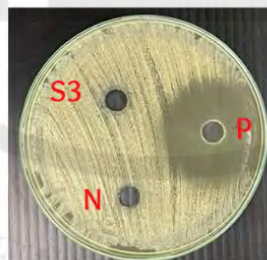
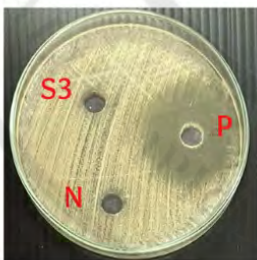
1. ข่า ; EtOH M3D 5 mg/mL (S1)



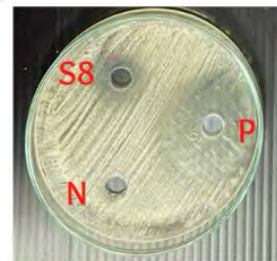
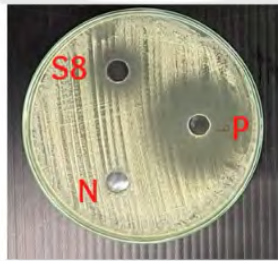
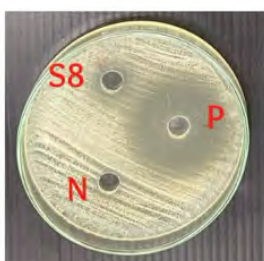
2. ข่า ; PG:EtOH M3D 5 mg/mL (S2)



3. ข่า ; Gly:EtOH M3D 5 mg/mL (S3)



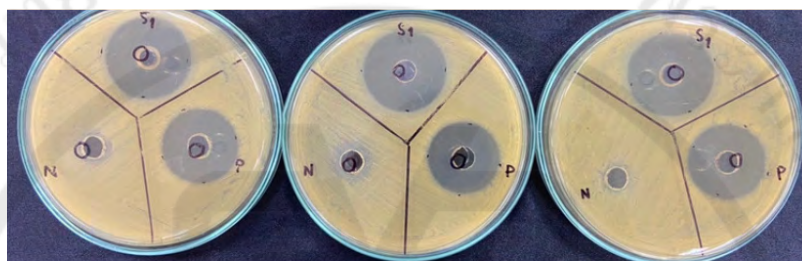
4. ข่า ; EtOH M6H 5 mg/mL



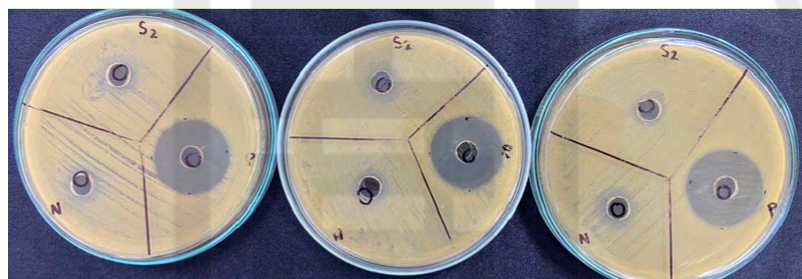
ภาพที่ ก.10 ภาพแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางยับยั้งของสารสกัดเข้าในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC6538 จากการทดสอบด้วย agar diffusion assay

- สารทดสอบ (S)
- Levofloxacin 10 mcg/mL (Positive control; P)
- DMSO (Negative control; N)

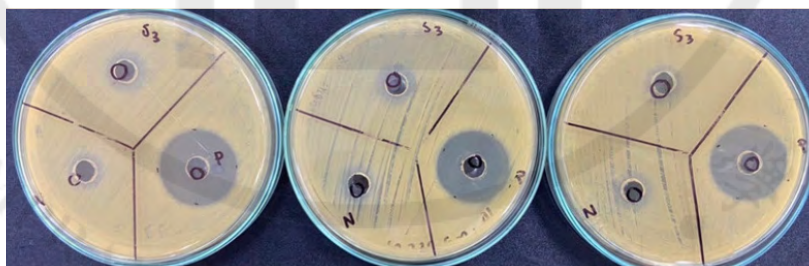
1. ข่า ; EtOH M3D (S1)



2. ข่า ; PG:EtOH M3D 5 mg/mL (S2)



3. ข่า ; Gly:EtOH M3D 5 mg/mL (S3)



4. ข่า ; EtOH M6H 5 mg/mL (S8)

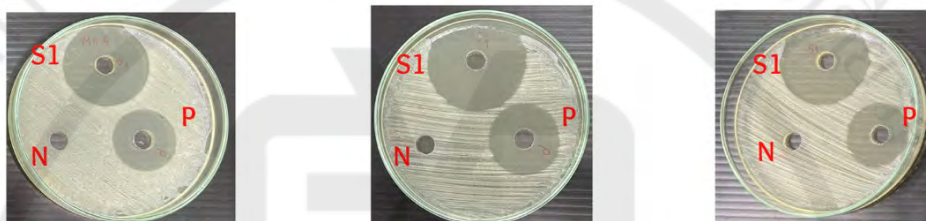


ภาพที่ ก.11 ภาพแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางยับยั้งของสารสกัดเข้าในการต้านเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 จากการทดสอบด้วย agar diffusion assay

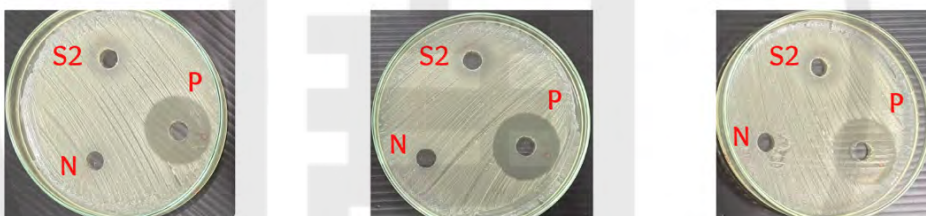
- สารทดสอบ (S)
- Levofloxacin 10 mcg/mL (Positive control; P)
- DMSO (Negative control; N)

ผลการทดสอบ

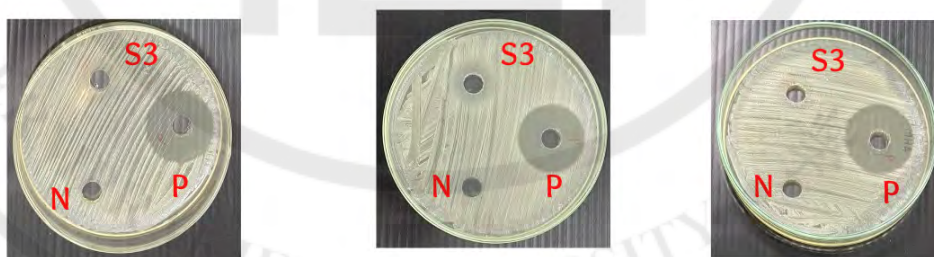
1. ข่า ; EtOH M3D (S1)



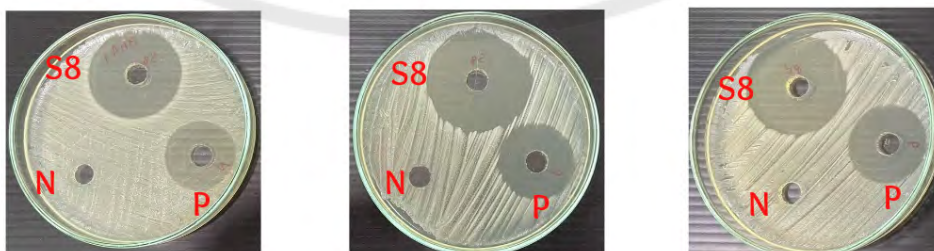
2. ข่า ; PG:EtOH M3D 5 mg/mL (S2)



3. ข่า ; Gly:EtOH M3D 5 mg/mL (S3)



4. ข่า ; EtOH M3D 5 mg/mL (S8)



ภาคผนวก ข
ประวัติย่อผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ – นามสกุล ปวีณา ว่องตระกูล
ประวัติการศึกษา คุณวุฒิ ภ.บ.
สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คุณวุฒิ ภ.ม. (เภสัชกรรม)
สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คุณวุฒิ วท.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สถาบัน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
สถานที่ติดต่อ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1234

ผู้วิจัย

ชื่อ – นามสกุล สุนี ชาญณรงค์
ประวัติการศึกษา คุณวุฒิ ภ.บ.
สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล
คุณวุฒิ วท.ม. (เภสัชศาสตร์)
สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล
คุณวุฒิ ปร.ด. (เภสัชการ)
สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1704

