



เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

การเตรียมนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดกระชายและกาแฟ
สำหรับผลิตภัณฑ์ชะลอวัย

PREPARATION OF NANOEMULSION CONTAINING FINGER ROOT
AND ROBUSTA COFFEE FOR ANTI-AGING PRODUCTS

โชติรส กิจสมชีพ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
พ.ศ. 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

การเตรียมนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดกระชายและกาแฟสำหรับผลิตภัณฑ์ชะลอวัย
PREPARATION OF NANOEMULSION CONTAINING FINGER ROOT
AND ROBUSTA COFFEE FOR ANTI-AGING PRODUCTS

โชติรส กิจสมชีพ

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

สอบวันที่ 12 กรกฎาคม พ.ศ. 2565

อนุมัติ

รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุปกรณ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.ธนิกานต์ แสงนิม
ประธานกรรมการสอบ

รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุปกรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุปกรณ์

อาจารย์ ดร.ปารภัทร ไศภารักษ์

กรรมการสอบ

ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

อาจารย์ ดร.ปารภัทร ไศภารักษ์

กรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทรวินยานุชิต

คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

การเตรียมนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดกระชายและกาแฟสำหรับผลิตภัณฑ์ชะลอวัย

นางสาวโชติรส กิจสมชีพ

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุปกรณ์

บทคัดย่อ

กระชายและกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าเป็นสารธรรมชาติที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ และใช้เป็นยาพื้นบ้านในหลายส่วนของโลก ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในสกัดพืชทั้งสองชนิดที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยประเมินเทคนิคการสกัดที่ใช้กันทั่วไป 2 วิธี ได้แก่การสกัดด้วยอัลตราซาวด์และมาเซอร์ชันด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน 4 ชนิด คือ เอทานอล 50%, เอทานอล 80%, เอทานอล 100% และอะซิโตน และทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม, วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟจากวิธีด้วยอัลตราซาวด์โดยใช้เอทานอล 80% และเอทานอล 50% เป็นตัวทำละลายในการสกัดตามลำดับ ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดและ IC_{50} ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกระบวนการสกัดแบบอื่นๆ สารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟที่มีการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดจะถูกนำมาใช้ในการเตรียมเป็นสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟในอัตราส่วน 0.5:0.5 (CFR) และประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดเดี่ยว จากการศึกษาความคงตัวของสารสกัดผสม CFR หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมลดลงเล็กน้อย (8.7%) และค่า IC_{50} เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (จาก 7.13 เป็น 9.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยวิธี DPPH และจาก 725.72 เป็น 858.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยวิธี ABTS) ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีสกัดและความมีขี้้วของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกันมีความสำคัญต่อปริมาณและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระชายและกาแฟ โดยสารสกัดผสม CFR มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดเดี่ยวและความคงตัวจึงนำมาตั้งตำรับนาโนอิมัลชัน โดยประกอบด้วย coconut oil, Cremophor® RH40 (สารลดแรงตึงผิว), ethanol (สารลดแรงตึงผิวร่วม) และสารสกัดผสม CFR ด้วยวิธี spontaneous emulsification ได้ทำการศึกษาปริมาณ coconut oil, Cremophor® RH40 และ ethanol

ที่เหมาะสมโดยพิจารณาขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย การกระจายตัวของขนาดหยดอนุภาค (PI) และค่าซีต้าโพเทนเชียล ในสูตรตำรับประกอบด้วย 1% coconut oil, 4% Cremophor® RH40 (สารลดแรงตึงผิว), 20% ethanol (สารลดแรงตึงผิวร่วม), 1% สารสกัดผสม CFR และน้ำ สูตรตำรับมีความคงตัว และมีขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย 60.57 ± 0.12 นาโนเมตร, ค่า PI เฉลี่ย 0.27 ± 0.03 , ค่า pH 6.12 ± 0.01 และค่า IC_{50} ที่ 7.13 ± 0.01 $\mu\text{g/ml}$ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) นำมาใช้ในการดูภาพของขนาดหยดอนุภาค และแสดงให้เห็นอนุภาคที่เกือบเป็นทรงกลม นอกจากนี้การศึกษาความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสม CFR ถูกนำมาใช้ในการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือนที่อุณหภูมิห้อง, อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิ 45°C และในสภาวะร้อนสลับเย็น (45 °C และ 4 °C) จำนวน 6 รอบ โดยนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ผลการวิจัยพบว่าตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสม CFR ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45°C และในสภาวะร้อนสลับเย็น (45 °C และ 4 °C) จำนวน 6 รอบ แสดงให้เห็นขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ลดลง ในขณะที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง มีขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย, การกระจายตัวของขนาดหยดอนุภาค (PI), ค่าซีต้าโพเทนเชียล และค่า pH ค่อนข้างคงที่ อย่างไรก็ตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสม CFR ก็ลดลงเล็กน้อยเช่นกัน จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นความคงตัวของสารสกัดผสม CFR ในสูตรตำรับนาโนอิมัลชันซึ่งเป็นข้อมูลที่มีคุณค่า และควรเก็บรักษาตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสม CFR ไว้ในที่เย็น

คำสำคัญ: สารสกัดกระชาย สารสกัดกาแฟ สารประกอบฟีนอลิกรวม ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ดีพีพีเอส เอบีทีเอส สารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ นาโนอิมัลชัน

PREPARATION OF NANOEMULSION CONTAINING FINGER ROOT AND ROBUSTA COFFEE FOR ANTI-AGING PRODUCTS

Chotiroad Kitsomchip

Master of Science (Cosmetic Science)

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ratana Indranupakorn

ABSTRACT

Fingerroot and robusta coffee are natural substances known to be beneficial for human health and used as a folk medicine in many parts of the world. The efficacy of extraction techniques and solvents on the recovery of total phenolic compounds and antioxidant capacity of both plants were investigated. Assessment of two commonly used extraction techniques [ultrasound-assisted extraction and maceration with stirring] with four different extraction solvents (50% ethanol, 80% ethanol, 100% ethanol and acetone) were used in this study. The antiradical scavenging activity was analyzed by total phenolic content; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging assays. The results revealed that fingerroot and robusta coffee extracts from ultrasound-assisted extraction and using 80% and 50% ethanol as an extraction solvent, respectively, showed the highest total phenolic content and the lowest IC_{50} compared to the other extraction processes. The fingerroot and robusta coffee extracts, containing the highest radical scavenging activity, were used for preparing the combined mixtures of fingerroot and robusta coffee (CFR) in the weight ratios of 0.5:0.5 and evaluated the antioxidant capacity. The results revealed that CFR extract showed significant increase of total phenolic content and resulted in its strong radical scavenging activity compared to when they were assayed independently. Stability results indicated that the total phenolic content of CFR extract was slightly decreased, by around 8.7% and the IC_{50} values of CFR extract showed slightly increased from 7.13 to 9.06 $\mu\text{g/mL}$ in DPPH assay and from 725.72 to 858.65 $\mu\text{g/mL}$ ABTS assay after storage at room temperature over 1 month. Findings suggested that the extraction methods

and different solvent polarity play significant roles in determining the most suitable method for production of radical scavenging contents and radical scavenging activity from fingerroot and robusta coffee. The CFR extract, which enhances radical scavenging activity and is quite stable, was used for formulation. Nanoemulsions were prepared from coconut oil, Cremophor[®] RH40 (surfactant), ethanol (co-surfactant) and CFR extract by spontaneous emulsification method. Effect of coconut oil, Cremophor[®] RH40 and ethanol mass ratio on nanoemulsion formulations were evaluated for the further optimization of the system, characterized by droplet size, polydispersity index (PI) and zeta potential. The formulation containing 1% coconut oil, 4% Cremophor[®] RH40, 20% ethanol, 1% CFR extract and water was stable and had the required droplet size (60.57 ± 0.12 nm), in relation with PI of 0.27 ± 0.03 , zeta potential of -33.43 ± 0.64 mV, pH value of 6.12 ± 0.01 and IC_{50} value of 7.13 ± 0.01 μ g/ml. Transmission electron microscopy (TEM) was used to image the droplets and revealed the nearly spherical particles. In addition, stability studies of the CFR extract nanoemulsions were evaluated in terms of physicochemical properties and antioxidant capacity over periods of 6 months at room temperature, 4°C and 45°C and under heating-cooling 6 cycles, compared with that of the nanoemulsion using ascorbic acid as a positive control. It was found that all the CFR extract nanoemulsions stored at 45°C and under heating-cooling 6 cycles showed gradually increased droplet sizes with decreased scavenging activity, while all stored at 4°C and room temperature quite stable droplet sizes PI, zeta potential and pH. However, the scavenging activity of the CFR extract nanoemulsions was also slightly decreased. These findings provide valuable information that the stability of CFR extract was enhanced in the nanoemulsion formulation and storage in cool place.

Keywords: Finger root, Robusta coffee, Total phenolic compounds, Antioxidant capacity, DPPH, ABTS, Combined mixtures (CFR), Nanoemulsion

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. รัตนา อินทรานุกกรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษัชกรหญิง ดร.ธนิกานต์ แสงนิ่ม ประธานกรรมการสอบ และอาจารย์ ดร.ปารภัทร โสภารักษ์ ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง) และกรรมการสอบ ที่ได้ให้ความรู้ แนวคิด และข้อเสนอแนะ จนกระทั่งงานวิจัยลุล่วงด้วยดี ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหาและ ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรวิทยาศาสตรเครื่องสำอาง คณะเภสัชศาสตร์ ที่ให้ความรู้ และคำแนะนำ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท กลุ่มวิชาเภสัชกรรม เทคโนโลยีและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ได้เอื้ออำนวยในการเบิกจ่ายสารเคมีและอุปกรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการส่งกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้อง และเพื่อนที่ร่วมเรียนกันมาในระดับมหาบัณฑิตที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาที่อบรมสั่งสอน เป็นตัวอย่างที่ดีในทุกๆด้าน โดยเฉพาะด้านความอดทน ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำพร้อมช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง และให้โอกาสการเรียนรู้ แก่ข้าพเจ้า ขอบพระคุณสำหรับการดูแล ความเอาใจใส่และเป็นกำลังใจอันสำคัญยิ่งทำให้ผู้เขียนสามารถผ่านพ้นทุกปัญหา และประสบความสำเร็จในการเรียน

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้

โชติรส กิจสมชีพ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญแผนภูมิ	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 คำย่อ หรือสัญลักษณ์	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 กระชาย	6
2.2 กาแฟ	8
2.3 การสกัดสารจากสมุนไพร	10
2.4 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัด	11
2.5 นาโนอิมัลชัน	14
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
2.7 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย	19
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย	
3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	20
3.2 วัสดุดิบ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	21
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดกระชาย	33
4.2 การเตรียมสารสกัดกาแฟ	45
4.3 การเตรียมสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ	56
4.4 การพัฒนาสูตรตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน	64
4.5 การเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ	69
4.6 การทดสอบความคงตัวของทางกายภาพ	72
4.7 การทดสอบความคงตัวของทางเคมี	87

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย	94
5.2 ข้อเสนอแนะ	97
บรรณานุกรม	98
หนังสือยินยอมการเผยแพร่ผลงานวิจัย	103

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ข้อมูลเปรียบเทียบลักษณะต้น ใบ ดอก ผล และปริมาณคาเฟอีนของสายพันธุ์กาแฟ	9
3.1	สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาปริมาณของ coconut oil ในตำรับ โดยใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวคงที่	28
3.2	สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวในตำรับ โดยใช้ปริมาณ coconut oil คงที่	29
3.3	สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาปริมาณสารลดแรงตึงผิวร่วมในตำรับ	29
3.4	สูตรการเตรียมนำรับนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาสารวิตามินซีในตำรับ	30
3.5	สูตรการเตรียมนำรับนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาคัดเลือกสารสกัดผสมระหว่าง กระชายและกาแฟในตำรับ	30
3.6	สูตรการเตรียมนำรับนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาสารสกัดผสมระหว่างกระชาย และกาแฟในตำรับ	31
4.1	% yield และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดกระชายจากวิธี ultrasonic extraction โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ	34
4.2	% yield และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดกระชายจากวิธี maceration โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ	35
4.3	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ (n=3)	36
4.4	ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลาย ที่แตกต่างกัน (n=5)	37
4.5	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธี และตัวทำละลายต่างกันด้วยวิธี DPPH assay (n=5)	40
4.6	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธี และตัวทำละลายต่างกันด้วยวิธี ABTS assay (n=5)	43
4.7	ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายที่ใช้ วิธีการสกัด และสารละลายในการสกัดต่างกัน	44

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่	
4.8 ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายที่ใช้วิธีการสกัด และสารละลายในการสกัดต่างกัน (ต่อ)	44
4.9 % yield และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดกาแฟจากวิธี ultrasonic extraction โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ	46
4.10 % yield และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดกาแฟจากวิธี maceration โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ	46
4.11 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ (n=3)	48
4.12 ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (n=5)	49
4.13 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายต่างกันด้วยวิธี DPPH assay (n=5)	51
4.14 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายต่างกันด้วยวิธี ABTS assay (n=5)	54
4.15 ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟที่ใช้วิธีการสกัด และสารละลายในการสกัดต่างกัน	55
4.16 ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟที่ใช้วิธีการสกัด และสารละลายในการสกัดต่างกัน (ต่อ)	55
4.17 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ (n=3)	57
4.18 ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (n=5)	58
4.19 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายต่างกันด้วยวิธี DPPH assay (n=5)	60
4.20 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายต่างกันด้วยวิธี ABTS assay (n=5)	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

4.21	ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชาย และสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ	63
4.22	การศึกษาปริมาณของ coconut oil ในตำรับ โดยใช้ปริมาณ สารลดแรงตึงผิวคงที่	65
4.23	การศึกษาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวในตำรับ โดยใช้ปริมาณ coconut oil คงที่	66
4.24	การศึกษาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวร่วมในตำรับ	67
4.25	สูตรตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน	68
4.26	สูตรตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี	68
4.27	การประเมินขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย ค่าการกระจายเฉลี่ย (PI) ค่าซีต้าโพเทนเชียลเฉลี่ย ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่า IC ₅₀ เฉลี่ย (DPPH) ของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ	70
4.28	สูตรตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ	70
4.29	การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน	73
4.30	การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน	74
4.31	การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสม ระหว่างกระชายและกาแฟที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน	75
4.32	การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	77
4.33	การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	78
4.34	การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสม ระหว่างกระชายและกาแฟที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	80

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่	
4.35 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	81
4.36 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	82
4.37 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสม ระหว่างกระชายและกาแฟที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	83
4.38 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ	85
4.39 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี ที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ	86
4.40 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสม ระหว่างกระชายและกาแฟที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ	86
4.41 การประเมินความคงตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน	88
4.42 การประเมินความคงตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน	88
4.43 การประเมินความคงตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสม ระหว่างกระชายและกาแฟที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน	89
4.44 การประเมินความคงตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	89
4.45 การประเมินความคงตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	90
4.46 การประเมินความคงตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสม ระหว่างกระชายและกาแฟที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	90

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

4.47	การประเมินความคงตัวของตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	91
4.48	การประเมินความคงตัวของตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	91
4.49	การประเมินความคงตัวของตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน	92
4.50	การประเมินความคงตัวของตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ	92
4.51	การประเมินความคงตัวของตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ	93
4.52	การประเมินความคงตัวของตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ	93

สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิที่	
2.1 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย	19
3.1 แผนผังการสกัดกระชายและการสกัดกาแฟ	22



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
2.1	กระชาย	6
2.2	ผงกาแฟ	8
2.3	โครงสร้างของคาเฟอีน	10
2.4	กลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	11
4.1	ลักษณะของกระชายก่อนและหลังอบแห้ง และผงกระชาย	33
4.2	กราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชาย	37
4.3	กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของต่างๆสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay	39
4.4	ตัวอย่างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol โดยใช้วิธี ultrasonic กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay	40
4.5	กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay	42
4.6	ตัวอย่างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol โดยใช้วิธี ultrasonic กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay	42
4.7	ลักษณะของผงกาแฟ	45
4.8	กราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกาแฟ	48
4.9	กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่

- 4.10 ตัวอย่างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol โดยใช้วิธี ultrasonic กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay 51
- 4.11 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay 53
- 4.12 ตัวอย่างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol โดยใช้วิธี ultrasonic กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay 53
- 4.13 ลักษณะของสารละลายใส สีน้ำตาลดำของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ 56
- 4.14 กราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ 58
- 4.15 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay 59
- 4.16 ตัวอย่างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay 60
- 4.17 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay 61
- 4.18 ตัวอย่างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay 62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.19	ตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน (ซ้าย) ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (กลาง) และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ (ขวา)	69
4.20	ลักษณะนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	71
4.21	ลักษณะนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	71
4.22	ลักษณะนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	72

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีสารสกัดจากธรรมชาติเป็นที่นิยมเพิ่มมากขึ้น เพราะมีความปลอดภัยมากกว่าสารสังเคราะห์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาตินั้นมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกับสารออกฤทธิ์ทางเคมีอื่นๆ อีกทั้งยังมีความปลอดภัยจากความเป็นพิษ หรือผลข้างเคียงจากสารเคมีอีกด้วย (1) ปัจจุบันมีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีอย่างมาก ส่งผลให้มีการวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพรมารับอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากธรรมชาตินั้นๆ จึงส่งผลให้ผู้บริโภคมีความสนใจใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสมุนไพรมากยิ่งขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยต่างๆ พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรนั้นอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ที่มีประโยชน์มากมายทั้งทางการแพทย์ สุขภาพ และความงาม อีกทั้งสารสกัดสมุนไพรที่นำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ ได้มีการแยกสารออกฤทธิ์ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารเจือย หรือสารรบกวน (interfering substances) ซึ่งจัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญ (1) เนื่องจากการเพิ่มมูลค่าสารสกัด และทำให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

กระชาย (*Boesenbergia pandurata*, finger root) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จัดอยู่ในวงศ์ขิง Zingiberaceae กระชายเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ให้ประโยชน์ทั้งในแง่อาหารและรักษาโรค จึงถูกจัดเป็นสมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน ใช้แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ อาการจุกเสียด แน่นท้อง ในเหง้ากระชายประกอบด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และน้ำมันหอมระเหย (essential oils) หลายชนิด โดยฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ chalcones (เช่น cardamonin, pinocembrin) และ flavanones (เช่น pinostrobin, alpinetin) ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่พบ เช่น geraniol, camphor, 1,8-cineole เป็นต้น (2) จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกระชาย พบว่ามีฤทธิ์หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity) ฤทธิ์ต้านไวรัส (antiviral activity) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer activity) เป็นต้น (2) นอกจากนี้ยังมีการนำกระชายมาใช้ในกลุ่มของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (inhibitory effect in melanogenesis biosynthesis and tyrosinase activity) (3) ด้วย

กาแฟ (*Coffea* sp., coffee) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดบริเวณทวีปแอฟริกา มีหลายสายพันธุ์เช่น *Coffea Arabica* L., *C. Robusta* L. จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae (4) ในเมล็ดกาแฟอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด ได้แก่ กลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

คาเฟอีน (caffeine) กรดคลอโรเจนิค (chlorogenic acid) และไตรโกเนลไลน์ (trigonelline) โดยสารประกอบฟีนอลิกที่พบเป็นจำพวกโพลีฟีนอล มีส่วนช่วยป้องกันมะเร็ง ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดสมอง สารคาเฟอีนมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ (5) อีกด้วย

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำสารสกัดผสมของกระชายและกาแฟมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยนำไปประยุกต์ใช้ในตำรับผลิตภัณฑ์ชะลอวัยในรูปแบบนาโนอิมัลชัน ซึ่งนาโนอิมัลชันมีข้อดีกว่าอิมัลชันทั่วไป คือ เป็นอิมัลชันที่มีความคงตัวทางจลนศาสตร์ (kinetically stable) ทำให้ไม่พบการรวมตัวกันของอนุภาคแบบ coagulation และ flocculation (6) มีประสิทธิภาพในการนำส่งสารสำคัญในการออกฤทธิ์สู่ผิวหนังและสะดวกต่อการนำไปใช้ จัดเป็นระบบนำส่งยาที่ได้รับความสนใจทางเครื่องสำอางอย่างแพร่หลาย (7)

ผลวิจัยนี้จะประโยชน์ต่อผู้บริโภคที่มีผิวหมองคล้ำ มีริ้วรอย ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอุตสาหกรรมผลิตยาสมุนไพร อาหารเสริมสุขภาพ และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรไทยได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดจากกระชายและกาแฟให้มีปริมาณสารสำคัญและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง
2. เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารสำคัญของสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟ รวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ
3. เตรียมตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดจากข้อ 2 ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด
4. ประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันจากข้อ 3

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาเปรียบเทียบวิธี (ultrasonic extraction และ maceration) และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดกระชายและกาแฟ (50% ethanol, 80% ethanol, absolute ethanol และ acetone) ที่ให้ปริมาณสารสำคัญสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง
2. เตรียมสูตรตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานด้วยเทคนิค Spontaneous Emulsification
3. ประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันเบื้องต้น (ที่อุณหภูมิห้อง, 4 °C และ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน และสภาวะเร่ง (heating cooling cycle) จำนวน 6 รอบ)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. รู้วิธีการเตรียมสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟด้วยวิธีการสกัดและใช้ตัวทำละลายที่ให้ปริมาณสารสำคัญสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นประโยชน์สำหรับอุตสาหกรรมผลิตยาสมุนไพรอาหารเสริมสุขภาพ และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟ
3. พัฒนาความรู้ด้านสมุนไพรที่ได้จากภูมิปัญญาไทยมาเพิ่มมูลค่าให้แก่ผลิตภัณฑ์และสามารถนำมาใช้เชิงพาณิชย์ได้
4. นำความรู้ด้านเทคโนโลยีมาใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง และสามารถใช้เป็นแนวทางในการตั้งตำรับสมุนไพรชนิดอื่นได้
5. ผลิตภัณฑ์นาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟเพื่อใช้ในการชะลอวัยสามารถนำไปใช้ได้จริงในอนาคต

1.5 คำย่อ หรือสัญลักษณ์

°C	องศาเซลเซียส
%	ร้อยละ
PI	Polydispersity Index
TEM	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope)
nm	นาโนเมตร
n	จำนวนซ้ำ
r ²	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient)
SD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)
% RSD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (relative standard deviation)
mean	ค่าเฉลี่ย
g	กรัม
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
% v/v	ร้อยละปริมาตรต่อปริมาตร
% w/v	ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร
% w/w	ร้อยละน้ำหนักโดยน้ำหนัก

mg/ml	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
µg/ml	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µg/g	ไมโครกรัมต่อกรัม
mM	มิลลิโมล
ml/min	มิลลิลิตรต่อนาที
mg/g dry weight	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
IC ₅₀	ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่งของปริมาณอนุมูลอิสระทั้งหมด
% inhibition	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
mV	มิลลิโวลต์
<i>P</i>	ระดับนัยสำคัญทางสถิติ (critical <i>p</i> -value)
มก./กรัม	มิลลิกรัมต่อกรัม
ซม.	เซนติเมตร
มม.	มิลลิเมตร

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระดาษ

- 2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์
- 2.1.2 องค์ประกอบ
- 2.1.3 การนำมาใช้ประโยชน์ทางยา
- 2.1.4 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2.2 กาแฟ

- 2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์
- 2.2.2 องค์ประกอบ
- 2.2.3 การนำมาใช้ประโยชน์ทางยา

2.3 การสกัดสารจากสมุนไพร

2.4 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัด

- 2.4.1 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม
- 2.4.2 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

2.5 นาโนอิมัลชัน

- 2.6.1 การสร้างนาโนอิมัลชัน
- 2.6.2 ความคงตัวของนาโนอิมัลชัน

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย

2.1 กระชาย

ภาพที่ 2.1 กระชาย



ที่มา: คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2010 : ออนไลน์ (8)

ชื่ออื่น : หัวละแอน ชิงแดง ชิงทราย ชิงกระชาย กะแอน ระแอน ว่านพระอาทิตย์

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Boesenbergia pandurata* Holtt.

ชื่อพ้อง : *Boesenbergia rotunda* (Linn.) Mansf., *Kaempferia pandurata* Roxb.,
Gastrochilus panduratum (Roxb.) Ridl.

ชื่อวงศ์ : Zingiberaceae

ส่วนที่ใช้ : เหง้า และราก (8)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพืชล้มลุก มีลำต้นใต้ดินเรียกว่าเหง้า มีรากติดเป็นกระจุกเป็นที่สะสมอาหารเป็นรูปทรงกระบอกปลายเรียวแหลม ผิวสีน้ำตาลอ่อน เนื้อสีเหลือง มีกลิ่นหอม ส่วนที่อยู่เหนือดินประกอบด้วยโคนก้านใบที่เป็นกาบหุ้มซ้อนกันสูง กาบใบมีสีแดงเรื่อๆ แผ่นใบรูปรี ปลายแหลม โคนแหลมหรือมน ขอบเรียบ ดอกออกเป็นช่อที่ยอด ช่อดอกมีใบประดับเรียงทแยงกัน ดอกที่ปลายช่อจะบานสวย กลีบดอกสีขาว หรือขาวอมชมพู มีลักษณะเป็นถุงแยกเป็น 2 กลีบ (8)

2.1.2 องค์ประกอบ เหง้ากระชายประกอบด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และน้ำมันหอมระเหย (essential oils) ฟลาโวนอยด์ที่พบเป็นองค์ประกอบ เช่น chalcones และ flavanones น้ำมันหอมระเหยที่พบ เช่น geraniol, camphor, 1,8-cineole (2)

2.1.3 การนำมาใช้ประโยชน์ทางยา เหง้ากระชายมีสรรพคุณทางยาใช้แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ อาการจุกเสียด แน่นท้อง (8)

2.1.4 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกระชาย พบว่ามีฤทธิ์หลากหลาย เช่น

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

Shindo และคณะ (11) ได้ศึกษาสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชาย พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่พบในกระชาย ได้แก่ 4-hydroxypanduratin A, panduratin A, cardamonin, 2,6-dihydroxy-4-methoxychalcone, pinocembrin และ pinostrobin เมื่อพิจารณาปริมาณองค์ประกอบทางเคมีและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าองค์ประกอบทางเคมีหลักที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ panduratin A และ 4-hydroxypanduratin A

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

Panthong และคณะ (12) พบว่า สาร 5,7-dimethoxyflavone (5,7-DMF) ที่แยกได้จากเหง้ากระชายมีสมบัติต้านการอักเสบเทียบได้กับยามาตรฐานหลายชนิด คือ aspirin, indomethacin, hydrocortisone และ prednisolone จากการศึกษาสมบัติต้านการอักเสบของสารดังกล่าวในสัตว์ทดลองด้วยวิธีการต่างๆ พบว่าสาร 5,7-DMF สามารถต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันได้ดีกว่าแบบเรื้อรัง โดยแสดงสมบัตียับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูขาว นอกจากนี้สาร 5,7-DMF ยังสามารถยับยั้งการสร้างสาร prostaglandin อย่างมีนัยสำคัญเมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในช่องปอดของหนูขาว

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)

Thongson และคณะ (13) พบว่า สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยสารละลาย 50% ethanol มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ในทุกสายพันธุ์จาก 4 สายพันธุ์ ในขณะที่สารสกัดจากขิงและขมิ้นไม่มีผลการยับยั้งแบคทีเรีย *L. monocytogenes* นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยของกระชายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

ฤทธิ์ต้านไวรัส (antiviral activity)

Cheenpracha (14) ได้ทำการแยกสารสำคัญจากสารสกัด methanol ของกระชาย ได้แก่ panduratin C, panduratin A, hydroxypanduratin A, helichrysetin, 2,4,6-trihydroxy hydrochalcone และ uvangoletin แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัส HIV-1 พบว่าสารสำคัญ panduratin A และ hydroxypanduratin A มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการต่างๆ ของ HIV-1 protease ได้ดี HIV-1 protease เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการแบ่งตัวของไวรัส HIV-1

2.2 กาแฟ

ภาพที่ 2.2 ผงกาแฟ



ที่มา: ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2010 : ออนไลน์ (9)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Coffea sp.* (*Coffea arabica*, *C. robusta*, etc.)

ชื่อวงศ์ : Rubiaceae

ส่วนที่ใช้ : เมล็ด

2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ปัจจุบันมีประเทศต่างๆมากกว่า 50 ประเทศที่ปลูกกาแฟ บริเวณที่เหมาะสมสำหรับการปลูกกาแฟ คือ บริเวณพื้นที่ระหว่างเส้นละติจูดบริเวณเส้นรุ้งที่ 23.5 องศาใต้เส้นศูนย์สูตร พื้นที่เพาะปลูกจะต้องมีแสงแดดพอสมควรและมีร่มเงา มีฝนค่อนข้างชุก อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ ประมาณ 15 °C กาแฟแยกออกเป็นสายพันธุ์ใหญ่ๆ 2 สายพันธุ์ คือพันธุ์อาราบิก้า (*arabica*) เป็นพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับปลูกในพื้นที่ที่มีความสูงตั้งแต่ 2,500 ฟุตขึ้นไป ส่วนพันธุ์โรบัสต้า (*robusta*) เป็นพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับปลูกในพื้นที่ราบหรือในพื้นที่ที่มีความสูงต่ำกว่า 1,500 ฟุต ในด้านของกลิ่นของกาแฟ กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้ามีกลิ่นที่หอมกว่ากาแฟพันธุ์โรบัสต้า (4, 10) ดังข้อมูลเปรียบเทียบในตารางที่ 1

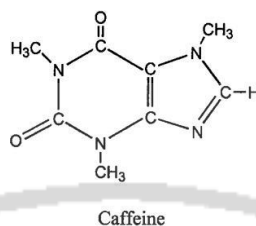
ตารางที่ 2.1 ข้อมูลเปรียบเทียบลักษณะต้น ใบ ดอก ผล และปริมาณคาเฟอีนของสายพันธุ์กาแฟ

กาแฟอาราบิก้า		กาแฟโรบัสต้า	
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Coffea Arabica</i> L.	ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Coffea Robusta</i> L.
ชื่อวงศ์	Rubiaceae	ชื่อวงศ์	Rubiaceae
ชื่อสามัญ	Coffee	ชื่อสามัญ	Coffee
ชื่อที่เรียก	กาแฟ	ชื่อที่เรียก	กาแฟใบใหญ่
ต้นกาแฟจัดเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ที่มีความสูงของต้นประมาณ 2 – 4 เมตร ในปัจจุบันเพาะปลูกกันมากในเขตร้อนชื้น และกึ่งเย็น		ลำต้นเจริญเติบโตมาจากรากแก้ว มีลักษณะเป็นข้อและปล้อง โคนใบจะอยู่ตามข้อของลำต้น เมื่อต้นโตขึ้นใบจะร่วงไป	
ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงตรงข้าม ลักษณะของใบเป็นรูปขอบขนาน หรือรูปไข่ ปลายใบแหลม โคนแหลมเล็กน้อย ส่วนขอบใบเรียบ		ใบเป็นใบเดี่ยว เกิดที่ข้อเป็นคู่ตรงข้าม โคนใบและหลายใบเรียวแหลม ส่วนขอบใบหยักเป็นคลื่น กลางใบกว้าง ผิวใบเรียบนุ่มเป็นมัน	
ดอกเป็นตามซอกใบ กลีบดอกเป็นสีขาวติดกัน เป็นหลอด ดอกมีกลิ่นหอม		ดอกจะออกจากกิ่งแขนง ข้อที่ออกดอกออกผลแล้ว ในปีต่อไปก็จะไม่ออกดอก และให้ผลอีก	
ผลเป็นผลสด ลักษณะของผลเป็นรูปไข่แกมรูปทรงกลม โดยผลอ่อนจะเป็นสีเขียว แต่เมื่อสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีแดง		ผลมีลักษณะเป็นรูปทรงรี ก้านผลสั้น ผลดิบเป็นสีเขียว เมื่อสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง สีส้ม และสีแดง	
มีกลิ่นหอม ทำให้เมื่อดื่มแล้วรู้สึกได้ถึงมีชีวิตชีวา โดยกาแฟชนิดนี้จะมีปริมาณของคาเฟอีนต่ำ		เมื่อดื่มแล้วจะรู้สึกได้ถึงความนุ่ม ชุ่มคอ กาแฟชนิดนี้จะมีปริมาณของคาเฟอีนสูงกว่ากาแฟอาราบิก้าเป็น 2 เท่า	

ที่มา: สมศักดิ์ วรรณศิริ. 2545 (4)

2.2.2 องค์ประกอบ ในเมล็ดกาแฟอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด ได้แก่ กลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก คาเฟอีน (caffeine) กรดคลอโรเจนิค (chlorogenic acid) และ ไตรโกเนลไลน์ (trigonelline) (4) นอกจากนี้คาเฟอีน ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มเมทิลแซนทีน (methylxanthine) มีสูตรโมเลกุล คือ $C_8H_{10}N_4O_2$ (1,3,7-trimethylxanthine) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย (5)

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของคาเฟอีน



ที่มา: Food Network Solution. 2019 : ออนไลน์ (15)

2.2.3 การนำมาใช้ประโยชน์ทางยา สารประกอบพีนอลิกที่พบเป็นจำพวกโพลีฟีนอล มีส่วนช่วยป้องกันมะเร็ง ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดสมอง (16)

2.3 การสกัดสารจากสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสาร ในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ ได้แก่

1. การใช้ตัวทำละลายสกัด (solvent extraction)
 - 1.1 มาเซอเรชัน (maceration)
 - 1.2 เพอร์โคเลชัน (percolation)
 - 1.3 การสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction)
2. การกลั่น (distillation) การบีบหรือการอัด (compression) เอ็นฟลอยเรจซ์ (enfleurage) ใช้กับสารที่ระเหยได้
3. การสกัดด้วยอัลตราโซนิก (ultrasonic assisted extraction)
4. การสกัดสารด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid extraction)
5. การสกัดด้วยวิธี pervaporation

วิธีที่นำมาใช้ในการเตรียมสารสกัดในงานวิจัยนี้ คือ

1. การสกัดด้วยอัลตราโซนิก

เป็นวิธีการสกัดโดยโดยใช้คลื่นเสียงที่ให้พลังงานสูง โดยมีความถี่สูงที่ 20-100 กิโลเฮิร์ตซ์ ร่วมในการสกัด ถ้าเป็นพืชสดจะเกิดกระบวนการแพร่ของตัวทำละลายผ่านผนังเซลล์ และชะสารสำคัญออกจากเซลล์ ถ้าเป็นพืชแห้งจะเกิดกระบวนการดูดน้ำและพองตัวเกิดเป็นโพรงเมื่อผนังเซลล์ของพืชแตกออก จะทำให้เพิ่มอัตราเร็วของการสกัด แต่อาจเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ต่อสารโดยตรง เพราะขณะที่ใช้การสกัดอัลตราโซนิกทำให้เกิดช่องว่างและมีอากาศแทรกเข้าไปในตัวทำละลาย

2. การใช้ตัวทำละลายสกัดแบบมาเซอร์ชัน

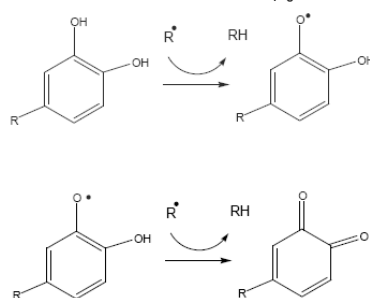
เป็นวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืช โดยวิธีการจะหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายจนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่ม และตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในของสมุนไพรออกมาได้ การหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท ทิ้งไว้ 12-24 ชั่วโมงหรือมากกว่านั้น หรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ในระหว่างที่หมักสมุนไพรอยู่นั้นควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกาก (marc) ออกจากตัวทำละลาย วิธีการสกัดนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงแมกนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีที่ใช้น้ำยาสกัดน้อย จึงประหยัด และเนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อน จึงเหมาะสมกับการสกัดสารออกฤทธิ์ที่ไม่ทนต่อความร้อน

2.4 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัด

2.4.1 การหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม

สารฟีนอลิกมีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน (aromatic ring) แทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซี (hydroxyl group) โดยมากเป็นสารที่มีขี้ ละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ (alcohol) ได้ดี กลไกของสารจำพวกฟีนอลิกที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ เมื่อมีอนุมูลอิสระมาดีออกซิไดส์ไป แต่เนื่องจากในโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนที่หนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (delocalization) มีผลทำให้โครงสร้างมีความเสถียร จึงไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป โดยถ้าในโครงสร้างของสารฟีนอลิกมีความสามารถในการพันธะดีโลคัลไลซ์ (delocalization) มากหรือมีคอนจูเกทของอิเล็กตรอนมากก็จะยิ่งช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้มาก (17)

ภาพที่ 2.4 กลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



ที่มา: ธีระวิวรรณ์ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง. 2549 (17)

ในการทดสอบจะนำสารที่ต้องการทดสอบมาเติมสาร Folin-Ciocalteu reagent และตามด้วย sodium carbonate จากนั้นทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm. ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer จึงนำค่ามาคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมเฉลี่ยในรูปของมิลลิกรัมของ gallic acid equivalents (GAE) เทียบกับ standard curve ที่สร้างจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ในเมทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Gallic acid หรือ 3, 4, 5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมี คือ $C_7H_6O_5$ คุณสมบัติของ gallic acid คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี (18)

2.4.2 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระหรืออาจเรียกว่าสารกำจัดอนุมูลอิสระ คือสารที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) เช่น การเกิดออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation) โดยสามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิดคือ

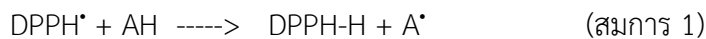
1. Preventive antioxidant ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ
2. Scavenging antioxidant ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น
3. Chain breaking antioxidant ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH[•]) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}) ฯลฯ ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะวิธี DPPH[•] และ ABTS^{•+}

1. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH[•])

เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ ในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH[•], diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลง จนเป็นสีเหลือง (ดังสมการ 1) ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มีดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสี

ที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้



$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ DPPH[•] ค่อนข้างเสถียร ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน (interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรบกวนแล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน

2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+})

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS^{•+} ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS^{•+} ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS^{•+} ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง (ดังสมการ 2) และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+}



ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ABTS^{•+} ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ ABTS^{•+} ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

โดยในการทดสอบทั้ง 2 วิธีจะใช้สารในการเปรียบเทียบ คือ L-ascorbic acid ให้เป็น positive control

2.5 นาโนอิมัลชัน

นาโนอิมัลชันมีความคงตัวทางจลนศาสตร์ เนื่องจากมีตัวกั้นซึ่งเป็นชั้นดูดซับของสารทำอิมัลชัน หรือสารลดแรงตึงผิวที่บริเวณระหว่างผิวของน้ำมันและน้ำ ตัวกั้นชนิดนี้อาจมีไฟฟ้าสถิต หรืออาจเกิดขวางโดยธรรมชาติที่ช่วยป้องกันหยดอิมัลชันจากการเข้าใกล้ และทำหน้าที่เสริมความคงตัวของฟิล์มของเหลวบางระหว่างหยดของเหลวที่อยู่ใกล้ชิดกัน (19) มีความหนืดต่ำ และมีลักษณะโปร่งแสง มีความคงตัวทางกายภาพระยะยาว (ที่ไม่จับกลุ่ม หรือไม่รวมหยด) บางครั้งอาจหมายถึงระบบที่เข้าใกล้ความคงตัวทางอุณหพลวัต (20) นอกจากนี้นาโนอิมัลชันยังเป็นระบบที่มีลักษณะบอบบางโดยธรรมชาติ จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้นาโนอิมัลชันเป็นระบบที่ได้รับความสนใจทั้งในการศึกษา และการนำไปประยุกต์ใช้ เช่น สารทางเครื่องสำอางอย่างแพร่หลาย และทางอุตสาหกรรมเภสัชกรรมนำนาโนอิมัลชันมาใช้เป็นระบบนำส่งยา

นาโนอิมัลชันมีข้อดีหลายประการ (20) เช่น นาโนอิมัลชันมีขนาดหยดที่เล็กมากทำให้ลดแรงโน้มถ่วงของโลกที่มากกระทำต่อหยดภายในอิมัลชัน และการเคลื่อนที่แบบบราวน์ (Brownian motion) ช่วยให้ชนะแรงโน้มถ่วงของโลกได้ ทำให้สามารถป้องกันการเกิดครีม (creaming) หรือการตกตะกอนระหว่างการเก็บรักษา สามารถใช้ได้อย่างง่ายบนผิว ไม่ระคายเคือง มีลักษณะโปร่งใส มีความหนืดไม่มาก ทำให้ระบบนี้มีสมบัติที่ดึงดูดต่อการใช้และให้ความรู้สึกที่ดีบนผิว นอกจากนี้อนุภาคอิมัลชันขนาดเล็กจะไม่อุดตันรูขุมขนแล้วยังยอมให้อากาศและน้ำไหลผ่านได้ ช่วยให้สารสำคัญแพร่ผ่านลงสู่ผิวหนังได้อย่างรวดเร็ว (มีพื้นที่ผิวของระบบมาก) นอกจากนี้นาโนอิมัลชันยังช่วยให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำมันและน้ำที่ยาวนานกว่า เนื่องจากมีหยดเล็กขนาดนาโนเมื่อเทียบกับอิมัลชันปกติ ซึ่งช่วยเอื้อต่อการปลดปล่อยสารสำคัญออกจากหยดของวัฏภาคกระจายและขนาดหยดที่เล็กทำให้นาโนอิมัลชันสามารถกระจายตัวบนพื้นผิวได้อย่างสม่ำเสมอ นาโนอิมัลชันจึงอาจใช้แทนไลโปโซม (liposome) และเวซิเคิล (vesicles) ซึ่งมีความคงตัวน้อยกว่านาโนอิมัลชันได้

2.5.1 การสร้างนาโนอิมัลชัน

ส่วนประกอบที่จำเป็นโดยพื้นฐานของการเตรียมอิมัลชัน ได้แก่ น้ำมัน น้ำ สารลดแรงตึงผิว และพลังงานที่ก่อให้เกิดการเข้ากันของอิมัลชัน การสร้างนาโนอิมัลชันด้วยการใช้พลังงาน ทำได้ด้วยการให้แรงเฉือนทางกล มีหลายกระบวนการที่เกิดขึ้นระหว่างการสร้างอิมัลชันชนิดนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดการแตกของหยดของเหลว การดูดซับของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว และการชนกันของหยดของเหลว (ที่อาจจะทำให้เกิดการรวมหยด และมีขนาดหยดที่ใหญ่ขึ้น) กระบวนการเหล่านี้ อาจเกิดขึ้นพร้อมๆ กันระหว่างการสร้างอิมัลชัน การสร้างหยดของเหลวขนาดเล็กจึงจำเป็นต้องใช้พลังงานเพิ่มขึ้นและ/หรือใช้สารลดแรงตึงผิวที่เพิ่มขึ้นและมีปัจจัยจำนวนมากที่ต้องควบคุมระหว่างการสร้างนาโนอิมัลชัน ได้แก่ การเลือกส่วนผสมที่เหมาะสม การควบคุมลำดับของการเติมสารประกอบ และการให้แรงเฉือนในลักษณะที่สามารถแตกหยดของเหลวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของหยดอนุภาคขนาดเล็กขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมัน (oil) สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และตัวทำละลายที่เหมาะสม (solvent optimization) (21)

การเตรียมนาโนอิมัลชัน สามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธี (22) ได้แก่

1. การทำอิมัลชันโดยใช้พลังงานสูง (high-energy emulsification methods)
2. การทำอิมัลชันโดยใช้พลังงานต่ำ (low-energy emulsification methods) มี 2 วิธี ได้แก่ อุณหภูมิการกลับวัฏภาค (phase-inversion temperature, PIT) และ spontaneous emulsification (23)

2.5.2 ปัญหาความไม่คงตัวของนาโนอิมัลชัน

ความไม่คงตัวหลักที่เกิดกับนาโนอิมัลชันมี 2 แบบ คือ 1. Ostwald ripening เป็นปัญหาความไม่คงตัวที่เกิดกับนาโนอิมัลชันซึ่งเกิดจากความสามารถในการละลายของหยดอนุภาคขนาดใหญ่และเล็กมีความแตกต่างกัน ทำให้เกิดการแพร่ของของเหลวชั้นภายในผ่านของเหลวชั้นภายนอก เกิดการเติบโตของอนุภาคขนาดใหญ่มากขึ้นและอนุภาคขนาดเล็กหายไป (24) ในทางทฤษฎี Ostwald ripening ควรจะทำให้เกิดการรวมกันของหยดอนุภาคจนเกิดการแยกวัฏภาคของอิมัลชัน (phase separation) แต่ในทางปฏิบัติไม่เป็นเช่นนั้นเนื่องจากการรวมตัวนั้นจะลดลงเมื่อขนาดหยดอนุภาคเพิ่มขึ้น 2. Coalescence (25) เป็นการรวมกันของหยดอนุภาคเล็กๆจะเกิดเป็นอนุภาคที่ขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อหยดอนุภาคเข้าใกล้กันจะเกิดฟิล์มของเหลวบาง (liquid thin film) ระหว่างหยดอนุภาค การเกิดการรวมตัวกันเป็นผลมาจากการแตกออกของฟิล์มในบางจุดของฟิล์มก่อน ซึ่งความคงทนของฟิล์มนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สมบัติทางกายภาพของฟิล์ม สมบัติและความเหมาะสมของสารทำอิมัลชัน แรงหรือแรงดันที่เกิดขึ้นภายในฟิล์ม และการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงเชิงความร้อนหรือเชิงกล

ความคงตัวที่ดีของนาโนอิมัลชันสามารถอธิบายได้จากการเกิด steric stabilization ในตำรับที่ใช้สารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) และ/หรือใช้โพลิเมอร์ และยังมีผลมาจากอัตราส่วนของความหนาของชั้นที่ดูดซับ (adsorbed layer thickness) กับรัศมีของหยดภายในอิมัลชัน สารที่ทำให้เกิดอิมัลชันไม่เพียงเป็นการป้องกันการรวมตัวของหยดอนุภาคทางกลเท่านั้น ยังเป็นตัวทำให้เกิดศักย์ไฟฟ้าบนผิวของหยดอนุภาคอีกด้วย (zeta potential) ยิ่งค่าศักย์ไฟฟ้านี้เป็นลบมากเท่าไร ความคงตัวของอิมัลชันก็มากขึ้นเท่านั้น ซึ่งศักย์ไฟฟ้านี้จะสร้างแรงผลักเมื่อหยดอนุภาคเข้ามาใกล้กันจึงช่วยลดการเกิดการรวมตัวของหยดอนุภาคได้ โดยหากค่าศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า -30 mV สามารถบ่งบอกได้ว่าอิมัลชันนั้นมีความคงตัวที่ดี (26) นอกจากนี้การใช้สารลดแรงตึงผิวแบบผสมในอัตราส่วนที่เหมาะสมยังช่วยให้ความคงตัวของนาโนอิมัลชันสูงขึ้นอีกด้วย

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาของดวงกลม เรือนงาม (27) ที่ศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดสารที่มีประโยชน์ที่มีฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระ วิธีการสกัดสารแบบดั้งเดิมเป็นวิธีการสกัดที่ง่ายแต่สิ้นเปลืองตัวทำละลาย ได้แก่ การสกัดโดยชุดซอกซ์เลต (soxhlet) การสกัดด้วยวิธีการแช่ (maceration) นอกจากนี้ยังมีวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมด้วยในการสกัด (ultrasound assisted extraction, UAE) และวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมด้วยในการสกัด (microwave assisted extraction, MAE) และได้มีการพัฒนาการสกัดวิธีใหม่ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นที่ยอมรับ เนื่องจากง่ายต่อการแยกตัวทำละลายออกเมื่อสกัดเสร็จสมบูรณ์ คือวิธีการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติ (subcritical water extraction, SWE) และวิธีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะวิกฤติยวดยิ่ง (supercritical carbon dioxide extraction, SCCO)

จากการศึกษาของธนศักดิ์ แซ่เลี้ยวและคณะ (28) ที่ศึกษาเกี่ยวกับผลของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถต้านออกซิเดชันของกระชายเหลือง (*B. pandurata*) ทำโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างกัน ได้แก่ อะซิโตน, 80% เอทานอล, 80% เมทานอล และน้ำ สารสกัดของแต่ละตัวทำละลายถูกนำมาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบความสามารถต้านออกซิเดชันจากการศึกษาโดยวิธี DPPH และ ABTS พบว่ากระชายเหลืองที่สกัดด้วยอะซิโตนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ การสกัดด้วย 80% เอทานอล, 80% เมทานอล และน้ำตามลำดับ

จากการศึกษาของพิชญา ฤทธิ์เจริญ (29) ที่ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเครื่องสำอางของสารสกัดกระชายเหลือง กระชายแดง และกระชายดำ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด คือน้ำปราศจากไอออน เมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน พบว่าสารสกัดจากกระชายแดงที่สกัดด้วยเอทานอล ให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 394.19 ± 0.31 มิลลิกรัมสมมูลของเคออสตินต่อกรัมสารสกัด และสารสกัดจากกระชายเหลืองที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 208.54 ± 0.08 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าสารสกัดกระชายต่างชนิดกันมีปริมาณฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกัน ซึ่งสารสกัดดังกล่าวมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางต่อไปได้

จากการศึกษาของจิรัชญา ศิริวัฒน์ และวัลย์พร ปัญญาแจ้งสกุล (30) ที่ศึกษาปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่มชา และกาแฟสำเร็จรูปพร้อมดื่ม ซึ่งศึกษาโดยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตริกที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร ผลจากการศึกษาปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่มชา และกาแฟสำเร็จรูปพร้อมดื่ม พบว่าเครื่องดื่มชาสำเร็จรูปมีปริมาณคาเฟอีนมากกว่าชาสำเร็จรูป

จากการศึกษาของ Belay A. et al. (31) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการสกัดคาเฟอีนจากผงกาแฟบด โดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) ซึ่งสามารถอ่านค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับในช่วงเวลาที่มีการเปลี่ยนขั้วไฟฟ้าของคาเฟอีนบริสุทธิ์ในน้ำและไดคลอโรมีเทน โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 272 และ 274.7 nm ตามลำดับ สำหรับการหาปริมาณคาเฟอีนในกาแฟ วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว เพราะการสกัดโดยใช้ไดคลอโรมีเทนจะช่วยให้ได้ปริมาณของคาเฟอีนได้ดีกว่าการใช้ น้ำ และสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกไปได้อย่างดี

จากการศึกษาของ Ploypradub C. et al. (32) ที่ศึกษาปริมาณคาเฟอีนที่สกัดได้สำหรับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระนั้น ได้ศึกษาสภาพขั้วที่ต่างกันของตัวทำละลาย (เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ) พบว่าเอทิลอะซิเตทเหมาะสมที่สุดในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากผงเมล็ดกาแฟบด และกากกาแฟ เนื่องจากสภาพความมีขั้วของเอทิลอะซิเตทอยู่ในระดับปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับเฮกเซน และน้ำ ทำให้สามารถสกัดเอาสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้ดีกว่า จึงส่งผลให้ค่า IC_{50} ค่อนข้างต่างกัน พร้อมทั้งสอดคล้องกับปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษาด้วยวิธี FRAP มักจะใช้สองวิธีในการยืนยันผลของสารต้านอนุมูลอิสระคู่กันที่ได้แสดงผลออกมาว่าค่อนข้างสูงกว่าสารสกัดชนิดอื่น และในส่วนของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP พบว่าสารสกัดของผงเมล็ดกาแฟบดกับกากกาแฟ จะแสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

จากการศึกษาของ Rafael และ Marta de (5) ที่ศึกษาสายพันธุ์ของกาแฟอาราบิก้า และโรบัสต้าที่ผ่านกระบวนการคั่ว (coffee roast) พบว่ากาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าจะแสดงปริมาณของ caffeine เท่ากับ $2.35 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ และกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าจะแสดงปริมาณของ caffeine เท่ากับ $1.35 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ และจากการศึกษา ยังพบอีกว่ากาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าจะแสดงปริมาณของ caffeine อยู่ในช่วงระหว่าง $0.88\text{-}1.61 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ส่วนกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าจะแสดงปริมาณของ caffeine อยู่ในช่วงระหว่าง $1.57\text{-}2.68 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ แสดงให้เห็นว่ากาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าจะมีปริมาณของ caffeine มากกว่ากาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า

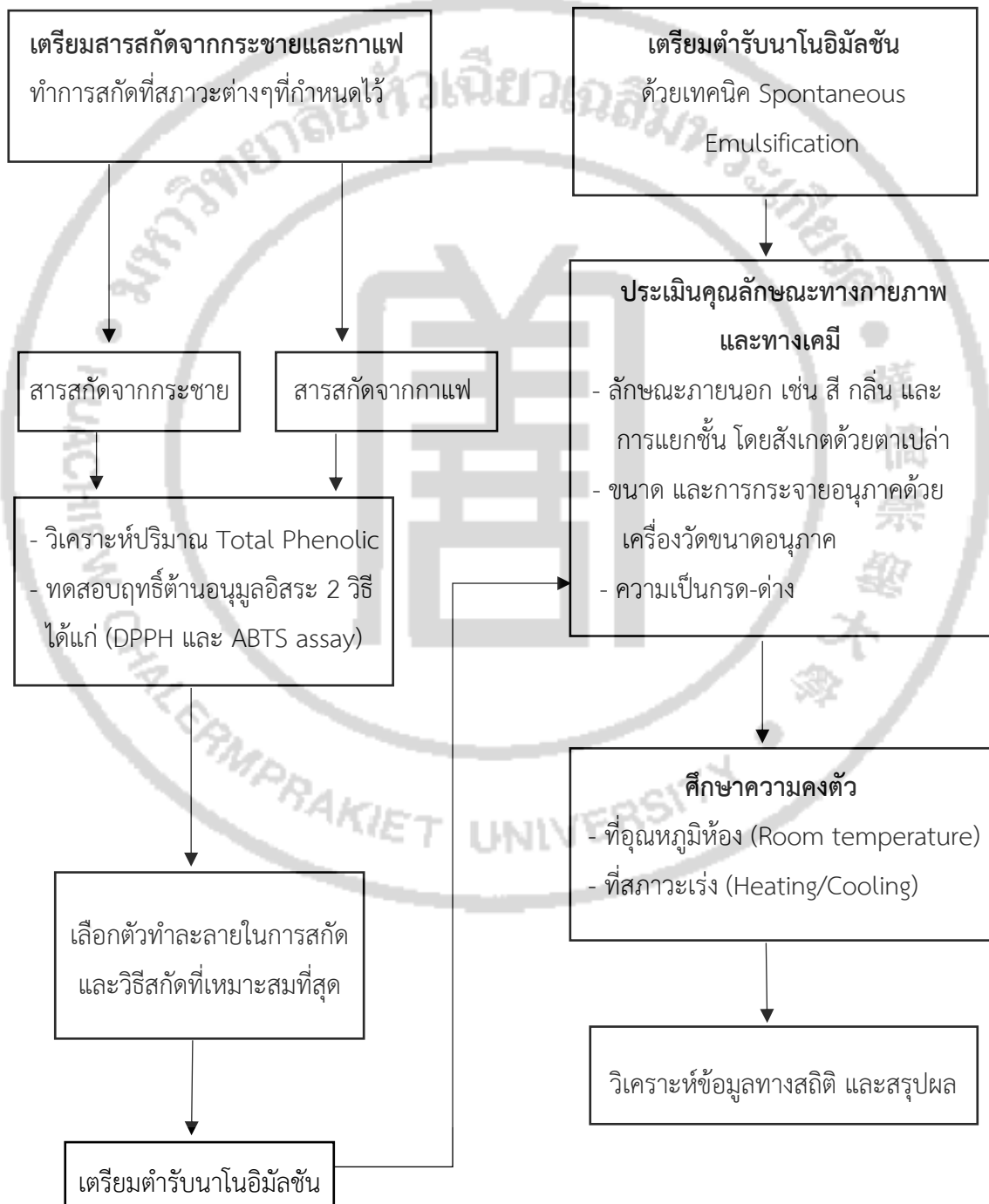
จากการศึกษาของณพัชร บัวฉุน และเยาวนารถ งามนนท์ (33) ที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพื้งกาสา โดยนำรากชะเอมไทย และผลพื้งกาสามาสกัดด้วยเอทานอล ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดระหว่างสารสกัดหยาบชะเอมไทย และพื้งกาสาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และนำสารสกัดหยาบชะเอมไทย และพื้งกาสาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์โลชั่น ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบพื้งกาสา มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 55.20 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และ 52.81 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

ปริมาณแทนนินทั้งหมดเท่ากับ 35.20 $\mu\text{g/mL}$ และ 17.80 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ สารสกัดหยาบ
ชะเอมไทย และพื้งกาสาพบสารประกอบกลุ่มสารหลัก คือ flavonoids แต่ตรวจไม่พบกลุ่ม
steroids, alkaloids และ terpenes สารสกัดหยาบชะเอมไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50}
เท่ากับ 12.02 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่ BHA และ BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.54 และ 12.86 $\mu\text{g/mL}$
ตามลำดับ สารสกัดหยาบผลพื้งกาสามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.94 $\mu\text{g/mL}$,
BHA และ BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.54 และ 12.86 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ อัตราส่วนฤทธิ์ต้าน
อนุมูลอิสระที่ดีที่สุดคือ อัตราส่วนที่ 1 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.09 $\mu\text{g/mL}$ และเมื่อนำมาพัฒนา
ผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิวจากสารสกัดหยาบชะเอมไทย และพื้งกาสา พบว่าโลชั่นมีเนื้อเป็นสีขาว
ลักษณะทางกายภาพคงตัวที่ดี ไม่มีกลิ่น และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.6



2.7 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย

แผนภูมิที่ 2.1 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย



บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องชั่งวิเคราะห์ ความละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง, OHAUS, ARC120 ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องชั่งวิเคราะห์ ความละเอียดทศนิยม 5 ตำแหน่ง, Mettler Toledo, MS105 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์)
3. เครื่อง Magnetic stirrer, Heidolph, MR 3001 ประเทศเยอรมัน
4. เครื่อง Ultrasonic extraction, MRC DC-250H สาธารณรัฐประชาชนจีน
5. เครื่อง Rotary evaporator, BUCHI, R-210 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
6. เครื่อง UV-VIS spectrophotometer, Jasco V-630, Jasco Corporation ประเทศเยอรมัน
7. เครื่อง Vortex Mixer Scientific Industries, G560E ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. เครื่อง Freeze dryer, Christ, Alpha 1-2 LDplus ประเทศเยอรมัน
9. เครื่อง pH meter, Schott Instrument, Lab 850
10. เครื่องวัดขนาดอนุภาค, Delsa™ Nano C, BECKMAN COULTER® ประเทศญี่ปุ่น
11. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM), JEM-1400 , JEOL Limited ประเทศญี่ปุ่น
12. ตู้อบลมร้อน Memmert®, D06062 model 600 ประเทศเยอรมัน
13. ตู้เย็น MITSUBISHI®, MR-F50C/ST ประเทศไทย
14. Erlenmeyer flask 500, 250 mL
15. Round bottom flask 1000 mL
16. Receiving flask 1000 mL
17. Beaker 25, 50, 100, 150, 250, 600 และ1000 mL
18. Volumetric flask 10 mL
19. Pipet 1, 2, 4, 5 และ10 mL
20. Micropipet 100 และ1000 mL, Eppendorf Research plus ประเทศเยอรมัน
21. Tips, Eppendorf Research plus ประเทศเยอรมัน
22. Cylinder 10, 25, 50, 100, 500, และ 1000 mL

23. Test tube พร้อมฝาปิดขนาด 10 mL
24. Stirring rod
25. Dropper
26. Funnel
27. Rank
28. Parafilm และ aluminum foil
29. กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman™ No.1)
30. ซ้อนเขา
31. ขวดแก้วสีชา
32. ขวดเก็บดำรับนาโนอิมัลชัน และสารสกัดมีฝาปิด ขนาด 50 ml

3.2 วัสดุดิบ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระชาย จากตลาดทรัพย์สินจันทร์ผ้าน กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
2. ผงกาแฟพันธุ์โรบัสต้า เขาช่อง
3. Ethanol, Emsure ประเทศเยอรมัน
4. Acetone, Normapur ประเทศเยอรมัน
5. สารมาตรฐาน Gallic acid, Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน
6. สารละลาย Folin-Ciocalteu, Merck KgaA ประเทศเยอรมัน
7. Sodium carbonate (Na_2CO_3), Ajax FineChem Laboratory Chemicals ประเทศออสเตรเลีย
8. Methanol, Emsure ประเทศเยอรมัน
9. Aluminium chloride (AlCl_3), Ajax FineChem Laboratory Chemicals ประเทศออสเตรเลีย
10. สารมาตรฐาน L-ascorbic acid, Riedel-de Haën สาธารณรัฐประชาชนจีน
11. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Aldrich Chemical company, Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน
13. Potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), Aldrich Chemical company, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

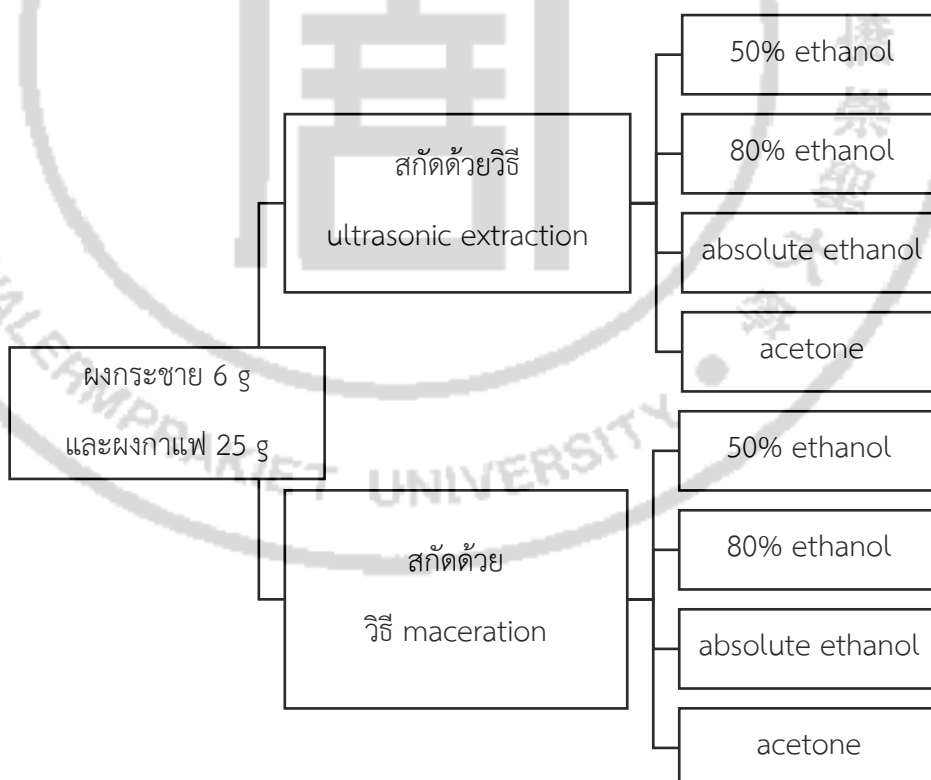
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟ

1. นำกระชายสดมาล้างทำความสะอาด ผานเป็นแผ่นบางๆ แล้วนำไปอบแห้งที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดกระชายแห้งให้เป็นผง บันทึกรน้ำหนักและเก็บในภาชนะที่แห้งปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้สกัด ส่วนผงกาแฟโรบัสต้าจะใช้ในการสกัดด้วย

2. ทำการสกัดผงกระชายและกาแฟด้วยวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยใช้วิธีการสกัด 2 วิธี คือ ultrasonic extraction และ maceration แต่ละวิธีใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ 50% ethanol, 80% ethanol, absolute ethanol และ acetone ดังแสดงในแผนภูมิที่ 3.1

แผนภูมิที่ 3.1 แผนผังการสกัดกระชายและการสกัดกาแฟ



1. การสกัดด้วย ultrasonic extraction

1. ชั่งผงกระชาย 6 g และผงกาแฟ 25 g อย่างละ 4 flasks
2. สกัดผงกระชายและผงกาแฟแต่ละ flask ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (50% ethanol, 80% ethanol, absolute ethanol และ acetone ด้วย ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที
3. กรองสารสกัดที่ได้จากข้อ 2 ด้วยกระดาษกรอง
4. ทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง รวมสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้งเข้าด้วยกัน
5. ทำสารสกัดที่ได้จากข้อ 4 ให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ (rotary evaporator) และ/หรือ freeze dry
6. นำ dry residue ที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก เพื่อมาคำนวณหาค่าร้อยละของสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักแห้ง (% yield)

2. การสกัดด้วยวิธี maceration

1. ชั่งผงกระชาย 6 g และผงกาแฟ 25 g ใส่ใน erlenmeyer flask อย่างละ 4 flasks
2. สกัดผงกระชายและผงกาแฟแต่ละ flask ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (50% ethanol, 80% ethanol, absolute ethanol และ acetone) ด้วยวิธี maceration เป็นเวลา 1 วัน
3. กรองสารสกัดที่ได้จากข้อ 2 ด้วยกระดาษกรอง
4. ทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง รวมสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง เข้าด้วยกัน
5. ทำสารสกัดที่ได้จากข้อ 4 ให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ (rotary evaporator) และ/หรือ freeze dry
6. นำ dry residue ที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก เพื่อมาคำนวณหาค่าร้อยละของสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักแห้ง (% yield)

3.3.2 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม

ทำการหาปริมาณฟีนอลิกรวมจากสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Siddiqui N และคณะ (34) ดังนี้

1. เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu 10% v/v

ปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu มาจำนวน 10 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบ 100 mL

2. เตรียม Sodium carbonate (Na_2CO_3) 7.5% w/v

ชั่ง Sodium carbonate (Na_2CO_3) จำนวน 7.5 g ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบ 100 mL

3. เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid

ชั่งสารมาตรฐาน gallic acid จำนวน 0.0001 g ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบ 10 mL จากนั้นเจือจาง ให้ได้ 6 ความเข้มข้น ดังนี้ 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 $\mu\text{g/mL}$

4. เตรียมสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

เตรียมสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ โดยเจือจางสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

ขั้นตอนการทดลอง

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 1 mL ผสมกับสารละลาย 10 % v/v Folin-Ciocalteu จำนวน 5 mL รอ 3 นาที
2. เติม 7.5% w/v Na_2CO_3 จำนวน 4 mL
3. เขย่าให้เข้ากัน นำไปเก็บในที่มืด 30 นาที
4. เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer ที่ 765 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
5. นำค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน โดยการแทนค่า y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟที่ความยาวคลื่น 765 nm ที่ได้จากการทดลอง เพื่อหาค่า x ซึ่งเป็นปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ (mg) ใน 1 mL

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

1. ปิเปตสารสกัดแต่ละแบบ จำนวน 1 mL ผสมกับสารละลาย 10 % v/v Folin-Ciocalteu จำนวน 5 mL รอ 3 นาที
2. เติม 7.5% w/v Na_2CO_3 จำนวน 4 mL
3. เขย่าให้เข้ากัน นำไปเก็บในที่มืด 1 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer ที่ 765 nm ทำการทดลอง 5 ซ้ำ
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณเข้ากับสมการของกราฟมาตรฐาน จะได้ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1. DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Ahmad R และคณะ (35) ดังนี้

1. เตรียมสารละลาย DPPH
ชั่ง DPPH จำนวน 0.0029 g ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 150 mL
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid
ชั่งสารมาตรฐาน L-ascorbic acid มาจำนวน 0.0001 g ใน volumetric flask 10 mL ปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบ 10 mL จากนั้นเจือจางให้ได้ 5 ความเข้มข้น ดังนี้ 0.25, 0.5, 1, 5 และ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
3. เตรียมสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

เตรียมสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟโดยเจือจางสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

ขั้นตอนการทดลอง

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid หรือสารสกัด จำนวน 500 μL ผสมกับสารละลาย DPPH จำนวน 4.0 mL
2. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 5.0 mL ด้วย DI water
3. เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที
4. เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer ที่ 520 nm
5. คำนวณ % inhibition = $[(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$
โดยที่ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม
 A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหรือสารมาตรฐาน
6. สร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง %inhibition และความเข้มข้น รายงานผลเป็นค่า IC_{50} เปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid กับสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

2. ABTS assay

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ดัดแปลงจากงานวิจัยของพิชญา ลักษณะวิลาศ (36) ดังนี้

1. เตรียมสารละลาย ABTS
ชั่งสาร $\text{ABTS}^{•+}$ มาจำนวน 0.14400 g ปรับปริมาตรด้วย DI Water จนครบ 40 mL ได้สารละลาย $\text{ABTS}^{•+}$ ความเข้มข้น 7 mM
2. เตรียมสารละลาย potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)
ชั่ง potassium persulfate มา 0.03310 g ปรับปริมาตรด้วย DI Water จนครบ 50 mL ได้สารละลาย potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 mM
3. เตรียมสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid
ชั่ง L-ascorbic acid มาจำนวน 0.00300 g ใน volumetric flask 10 mL ปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบ 10 mL ได้ความเข้มข้น 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จากนั้นเจือจางให้ได้ 5 ความเข้มข้น ดังนี้ 96, 97, 98, 99 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

4. เตรียมสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

เตรียมสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟโดยเจือจางสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

ขั้นตอนการทดลอง

1. Oxidize สารละลาย ABTS^{•+} ด้วย K₂S₂O₈ โดยนำสารละลาย ABTS^{•+} มาผสมกับสารละลาย K₂S₂O₈ ในอัตราส่วน 2:3 mL แล้วเก็บในที่มืด 4 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้สารละลาย ABTS^{•+}
2. นำสารละลาย ABTS^{•+} ที่ได้มาลองวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer ที่ 734 nm ไปเจือจางด้วย DI water จนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.02
3. ดูดสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดแต่ละความเข้มข้นจำนวน 200 µL ผสมกับสารละลาย ABTS^{•+} ที่ถูก oxidized แล้วจำนวน 1.8 mL ทิ้งไว้ 30 นาที
4. เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer ที่ 734 nm
5. คำนวณ % inhibition = $[(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}] \times 100$
โดยที่ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม
A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหรือสารมาตรฐาน
6. สร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง % inhibition และความเข้มข้น รายงานผลเป็นค่า IC₅₀ เปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid กับสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

3.3.4 การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay จากนั้นทำการคัดเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เพื่อนำไปตั้งตำรับนาโนอิมัลชัน

3.3.5 การเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

เตรียมตำรับนาโนอิมัลชันด้วยเทคนิค spontaneous emulsification โดยใช้ส่วนผสมของน้ำมันประกอบด้วย coconut oil, Cremophor® RH40 และ ethanol ผสมส่วนผสมน้ำมันให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วผสมลงในน้ำเป็นสายอย่างช้าๆ พร้อมทั้งคนตลอดเวลาด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก ความเร็วรอบประมาณ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปประเหยภายใต้ความดันต่ำโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน ทำการประเมินสูตรตำรับที่เตรียมได้ โดยพิจารณาจากการเกิดการแยกชั้นด้วยตาเปล่า ตรวจสอบขนาดอนุภาคและการกระจาย (PI, polydispersity index) ด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค (Delsa Nano C Beckman Coulter®) สูตรตำรับที่เหมาะสมจะต้องมีลักษณะภายนอกที่ดี ไม่เกิดการแยกชั้น มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร (37)

การเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน (Negative control)

1. การศึกษาปริมาณของ coconut oil ในตำรับโดยใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวคงที่

ศึกษาปริมาณของ coconut oil ที่มีความเหมาะสมสำหรับการตั้งตำรับนาโนอิมัลชัน โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของ coconut oil ให้แตกต่างกัน ได้แก่ 1%, 5%, 10% และ 15% และใช้ Cremophor® RH40 เป็นสารลดแรงตึงผิว เตรียมตำรับนาโนอิมัลชันตามวิธีที่กล่าวข้างต้น เพื่อคัดเลือกสูตรตำรับที่มีความคงตัว และมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร

ตารางที่ 3.1 สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาปริมาณของ coconut oil ในตำรับ โดยใช้ปริมาณ Cremophor® RH40 คงที่

วิธภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)			
		A1	A2	A3	A4
A	coconut oil	1	5	10	15
	Cremophor® RH40	6	6	6	6
	ethanol	40	40	40	40
B	น้ำ qs.	100	100	100	100

2. การศึกษาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวในตำรับโดยใช้ปริมาณ coconut oil คงที่

ศึกษาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวที่มีความเหมาะสมสำหรับการตั้งตำรับนาโนอิมัลชัน โดยเลือกตำรับที่ดีที่สุดจากการศึกษาข้อ 1 มา และปรับเปลี่ยนปริมาณของสารลดแรงตึงผิวให้แตกต่างกัน ได้แก่ 2%, 4%, 6% และ 8% และคงความเข้มข้นของ coconut oil ในสูตรตำรับที่เลือกไว้เตรียมตำรับนาโนอิมัลชันตามวิธีที่กล่าวข้างต้น เพื่อคัดเลือกสูตรตำรับที่มีความคงตัว และมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร

ตารางที่ 3.2 สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาปริมาณของ Cremophor® RH40 ในตำรับโดยใช้ปริมาณ coconut oil คงที่

วิธภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)			
		B1	B2	B3	B4
A	coconut oil	1	1	1	1
	Cremophor® RH40	2	4	6	8
	ethanol	40	40	40	40
B	น้ำ qs.	100	100	100	100

3. การศึกษาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวร่วมในตำรับ

ศึกษาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวร่วมที่มีความเหมาะสมสำหรับการตั้งตำรับนาโนอิมัลชัน ซึ่งเลือกใช้ ethanol เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม โดยเลือกตำรับที่ดีที่สุดจากการศึกษาข้อ 2 มา และปรับเปลี่ยนปริมาณของสารลดแรงตึงผิวร่วมให้แตกต่างกัน ได้แก่ 20%, 30%, 40% และ 50% เตรียมตำรับนาโนอิมัลชัน ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น เพื่อคัดเลือกสูตรตำรับที่มีความคงตัว และมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร

ตารางที่ 3.3 สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาปริมาณของ ethanol ในตำรับ

วิธภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)			
		C1	C2	C3	C4
A	coconut oil	1	1	1	1
	Cremophor® RH40	4	4	4	4
	ethanol	20	30	40	50
B	น้ำ qs.	100	100	100	100

การเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control)

โดยใช้สารมาตรฐาน L-ascorbic acid หรือวิตามินซี เพื่อศึกษาสารวิตามินซีในตำรับนาโนอิมัลชัน

ตารางที่ 3.4 สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาสารวิตามินซีในตำรับ

วิธภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)
A	coconut oil	1
	Cremophor® RH40	4
	ethanol	20
B	L-ascorbic acid	1
	น้ำ qs.	100

การเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ เพื่อศึกษาสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟในตำรับนาโนอิมัลชัน

ตารางที่ 3.5 สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาการคัดเลือกสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟในตำรับ

วิธภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)		
		F1	F2	F3
A	coconut oil	1	1	1
	Cremophor® RH40	4	4	4
	ethanol	20	20	20
	finger root	0.5	1	2
B	coffee	0.5	1	2
	น้ำ qs.	100	100	100

ตารางที่ 3.6 สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟในตำรับ

วิธภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)
A	coconut oil	1
	Cremophor® RH40	4
	ethanol	20
	finger root	0.5
B	coffee	0.5
	น้ำ qs.	100

3.3.6 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

1. ลักษณะภายนอก

ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชัน เช่น สี กลิ่น หรือการแยกชั้น เป็นต้น โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า (visual observation)

2. การวัดขนาดและการกระจายอนุภาค (size and polydispersity index; PI)

ทำการวัดขนาดอนุภาคและการกระจายอนุภาคในตำรับด้วย (รุ่น Delsa™ Nano C, Beckmann Coulter® Japan) ที่อุณหภูมิ 25°C แต่ละตัวอย่างวัดซ้ำ 6 ครั้ง

3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ทำการวัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง Eutech™ pH 700 ที่อุณหภูมิ 25°C วัดซ้ำ 3 ครั้ง

4. การวัดค่าซีต้าโพเทนเชียล (zeta potential)

ทำการวัดค่าซีต้าโพเทนเชียลของตำรับนาโนอิมัลชันด้วยเครื่องวัดซีต้าโพเทนเชียล (รุ่น Delsa™ Nano C, Beckmann Coulter® Japan) การวัด 1 ครั้ง กำหนดรอบวัด 30 รอบ แต่ละตัวอย่างทำการวัดซ้ำ 6 ครั้ง

5. การตรวจสอบสัณฐานวิทยา (Morphology) และโครงสร้าง

โดยเลือกตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดมาอย่างละ 1 ตำรับ และทำการตรวจสอบสัณฐานวิทยา และโครงสร้างของนาโนอิมัลชันก่อนการเติมและหลังการเติมสารสกัดด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM) โดยหยดตัวอย่างลงบนคอปเปอร์กริด (copper grid) และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หยด 2% ของ

สารละลายกรดฟอสโฟทังสติก (phosphotungstic acid) ที่งัวให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

3.3.7 การทดสอบความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ

1. การประเมินความคงตัวทางกายภาพ (physical appearance)

ทำการประเมินความคงตัวทางกายภาพในสภาวะปกติ โดยบรรจุลงในขวดแก้วสีชา ปิดฝาให้สนิท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) อุณหภูมิ 45 °C และอุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน พิจารณาการแยกชั้น สี การวัดขนาดอนุภาค และการกระจายอนุภาค ในตัวอย่างทุกเดือน ประเมินความคงตัวทางกายภาพของนาโนอิมัลชันในสภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) โดยนำตัวอย่างมาบรรจุลงในขวดแก้วสีชาปิดฝาให้สนิท นำขวดนาโนอิมัลชันใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คิดเป็น 1 รอบ ทำสลับกันจนครบ 6 รอบ

2. การประเมินความคงตัวทางเคมี (chemical appearance)

ทำการประเมินความคงตัวทางเคมีในสภาวะปกติ ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพด้วยวิธี DPPH assay ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) อุณหภูมิ 45 °C และอุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน และสภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ

บทที่ 4

ผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดกระชาย

ลักษณะทางกายภาพของเหง้ากระชายสดที่นำมาสกัดมีลักษณะเป็นคล้ายรูปทรงกระบอก ปลายเรียวแหลม ตรงกลางเหง้าพองกว่าส่วนหัวและท้าย เปลือกมีสีเหลืองอมน้ำตาล เนื้อในเหง้ามีสีเหลืองนวล (ภาพที่ 4.1) มีกลิ่นหอมฉุน

ได้นำกระชายสดปริมาณ 4 กิโลกรัม ล้างทำความสะอาด ผานเป็นแผ่นบางๆ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นบดให้เป็นผงได้ปริมาณผงกระชาย 462.50 กรัม คิดเป็นร้อยละ 11.56 โดยผงกระชายมีสีน้ำตาลอ่อน ดังภาพที่ 4.1

ภาพที่ 4.1 ลักษณะของกระชายก่อนและหลังอบแห้ง และผงกระชาย



กระชายก่อนอบแห้ง

กระชายหลังอบแห้ง

ผงกระชาย

จากแนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า วิธีสกัดกระชาย (*Boesenbergia pandurata*) ที่ให้องค์ประกอบสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง 2 วิธี คือวิธี maceration และ ultrasonic extraction โดยปริมาณสารสำคัญในสารสกัดที่ได้จากวิธีสกัดแต่ละวิธีนี้แตกต่างกันตามชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ยังไม่เคยมีงานวิจัยที่เปรียบเทียบวิธีสกัดและใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันจากตัวอย่างกระชายที่มาจากแหล่งเดียวกัน ผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีสกัดทั้ง 2 วิธีดังกล่าวข้างต้น โดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมสารสกัดกระชายที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำผงกระชายมาสกัดด้วยวิธี ultrasonic extraction และวิธี maceration โดยแต่ละวิธีใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ 50% ethanol, 80% ethanol, absolute ethanol และ acetone จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้ง และคำนวณหาค่าร้อยละของสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักผงกระชายแห้ง (% yield) และบันทึกลักษณะทางกายภาพของสารสกัดก่อนและหลังการทำให้แห้ง รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 % yield และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดกระชายจากวิธี ultrasonic extraction โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชนิดของตัวทำละลาย	น้ำหนักผงกระชาย (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของน้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักผงกระชาย(%yield)	ลักษณะทางกายภาพ	
				ก่อนทำให้แห้ง	หลังทำให้แห้ง
50% ethanol	6.0084	0.7830	13.03	สารละลายสีน้ำตาลอ่อน ชุ่มเล็กน้อย	ผงสีน้ำตาลอ่อน
80% ethanol	6.0146	0.9672	16.08	สารละลายใส สีเหลืองเข้ม	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม
absolute ethanol	6.0220	0.1075	1.79	สารละลายใส สีเหลืองอ่อน	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม
acetone	6.0212	0.1968	3.27	สารละลายใส สีเหลืองอ่อน	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม

ตารางที่ 4.2 % yield และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดกระชายจากวิธี maceration โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชนิดของตัวทำละลาย	น้ำหนักผงกระชาย (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของน้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักผงกระชาย(%yield)	ลักษณะทางกายภาพ	
				ก่อนทำให้แห้ง	หลังทำให้แห้ง
50% ethanol	6.0136	0.8285	13.78	สารละลายสีน้ำตาลอ่อนขุ่นเล็กน้อย	ผงสีน้ำตาลอ่อน
80% ethanol	6.0187	0.9487	15.76	สารละลายใสสีเหลืองเข้ม	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
absolute ethanol	6.0118	0.2842	4.73	สารละลายใสสีเหลืองอ่อน	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
acetone	6.0049	0.3554	5.92	สารละลายใสสีเหลืองอ่อน	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

จากการเตรียมสารสกัดกระชายด้วยวิธีและตัวทำละลายข้างต้นพบว่า สารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol โดยใช้วิธี ultrasonic extraction ให้ร้อยละของน้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักผงกระชาย (% yield) มากที่สุด คือ 16.08% โดยก่อนทำให้แห้งมีลักษณะเป็นสารละลายใสสีเหลืองเข้ม และหลังทำให้แห้งมีลักษณะเป็นของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม ส่วนสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย absolute ethanol โดยใช้วิธี ultrasonic extraction ให้ร้อยละของน้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักผงกระชาย (% yield) น้อยที่สุด คือ 1.79% โดยก่อนทำให้แห้งมีลักษณะเป็นสารละลายใสสีเหลืองอ่อน และหลังทำให้แห้งมีลักษณะเป็นของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชาย

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชายโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Siddiqui N. และคณะ (34) ปริมาณฟีนอลิกรวมหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ) ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย มิลลิกรัมต่อกรัมกรดแกลลิก (mg/g gallic acid equivalent, GAE)

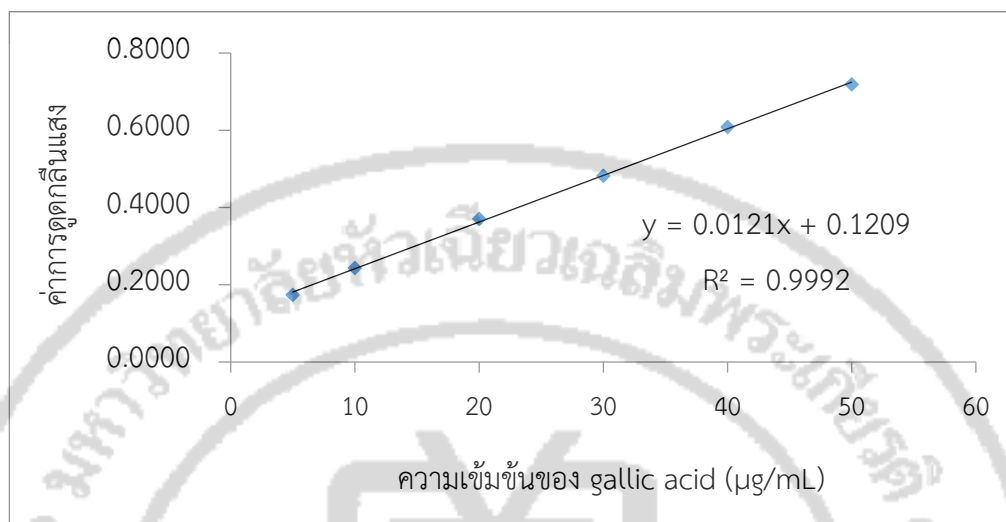
ผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย gallic acid ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 5-50 $\mu\text{g/mL}$ ที่ความยาวคลื่น 765 nm (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แสดงในตารางที่ 4.3 และนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid ดังแสดงในภาพที่ 4.2

การคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมได้จากกราฟมาตรฐาน gallic acid จากสมการ $y = 0.0121x + 0.1209$ ($R^2 = 0.9992$) โดยการแทนค่า y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดกระชายที่ความยาวคลื่น 765 nm ที่ได้จากการทดลอง เพื่อหาค่า x ซึ่งเป็นปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชาย (mg) ใน 1 mL ซึ่งจะนำไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชายทั้งหมด โดยแสดงในหน่วย mg/g gallic acid equivalent, GAE (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ($n = 3$)

ความเข้มข้น ของ gallic acid ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm			
	n1	n2	n3	ค่าเฉลี่ย \pm SD
5	0.1985	0.2305	0.0924	0.1738 \pm 0.0723
10	0.2415	0.264	0.2245	0.2433 \pm 0.0198
20	0.3523	0.4201	0.3396	0.3707 \pm 0.0433
30	0.4874	0.5334	0.4252	0.4820 \pm 0.0543
40	0.5482	0.5623	0.7155	0.6087 \pm 0.0928
50	0.5564	0.8304	0.7691	0.7186 \pm 0.1438

ภาพที่ 4.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชาย



ตารางที่ 4.4 ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (n = 5)

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชาย (mg GAE/g extract)					ปริมาณเฉลี่ย ± SD
		n1	n2	n3	n4	n5	
ultrasonic	50% ethanol	49.00	50.44	47.94	48.47	52.88	49.75 ± 1.98
	80% ethanol	79.93	82.00	85.36	78.47	82.32	81.62 ± 2.61
	absolute ethanol	58.13	59.09	59.96	58.80	55.53	58.30 ± 1.68
	acetone	56.53	59.63	55.90	54.53	55.69	56.46 ± 1.92

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชาย (mg GAE/g extract)					
		n1	n2	n3	n4	n5	ปริมาณเฉลี่ย ± SD
		maceration	50% ethanol	76.63	77.24	76.82	
	80% ethanol	74.57	78.28	83.14	80.14	81.45	79.52 ± 3.29
	absolute ethanol	71.77	71.68	71.19	71.19	71.42	71.45 ± 0.27
	acetone	34.41	39.27	38.13	37.95	39.58	38.47 ± 0.92

ผลการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่า สารสกัดกระชายที่ใช้ตัวทำละลาย 80% ethanol ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นๆ และใช้วิธีสกัดเดียวกัน โดยสารที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด คือ 81.62 ± 2.61 mg GAE/g extract รองลงมา เป็นสารที่สกัดด้วยวิธี maceration ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 79.52 ± 3.29 mg GAE/g ส่วนสารสกัดกระชายที่ใช้ตัวทำละลาย acetone และสกัดด้วยวิธี maceration ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมต่ำสุดเท่ากับ 38.47 ± 0.92 mg GAE/g

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

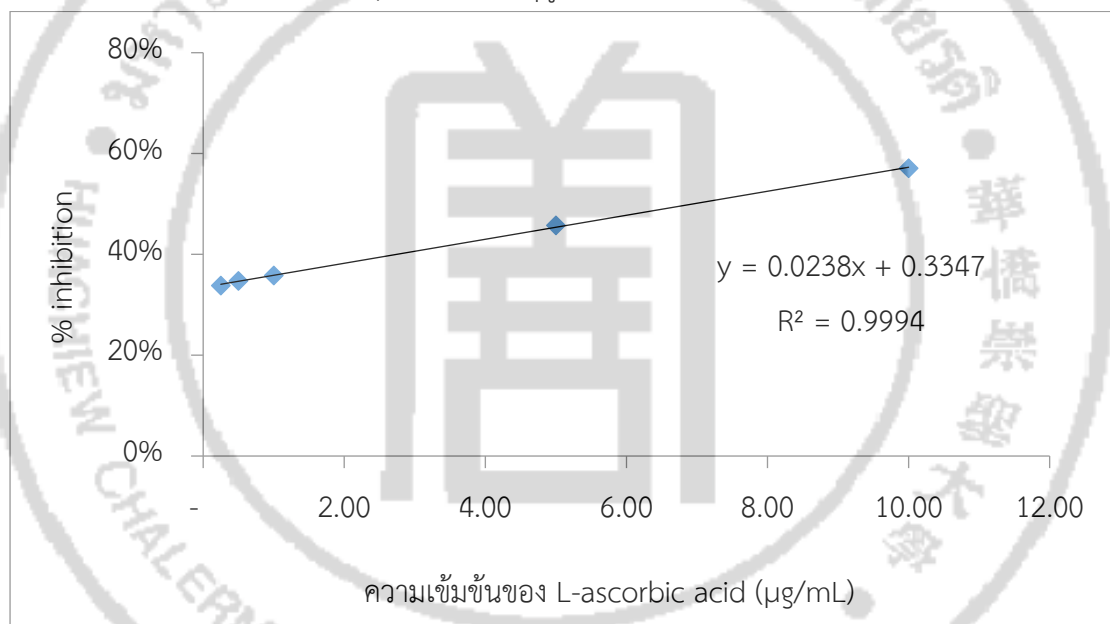
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชาย 2 วิธี ได้แก่ DPPH และ ABTS assay โดยวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid

1. DPPH assay

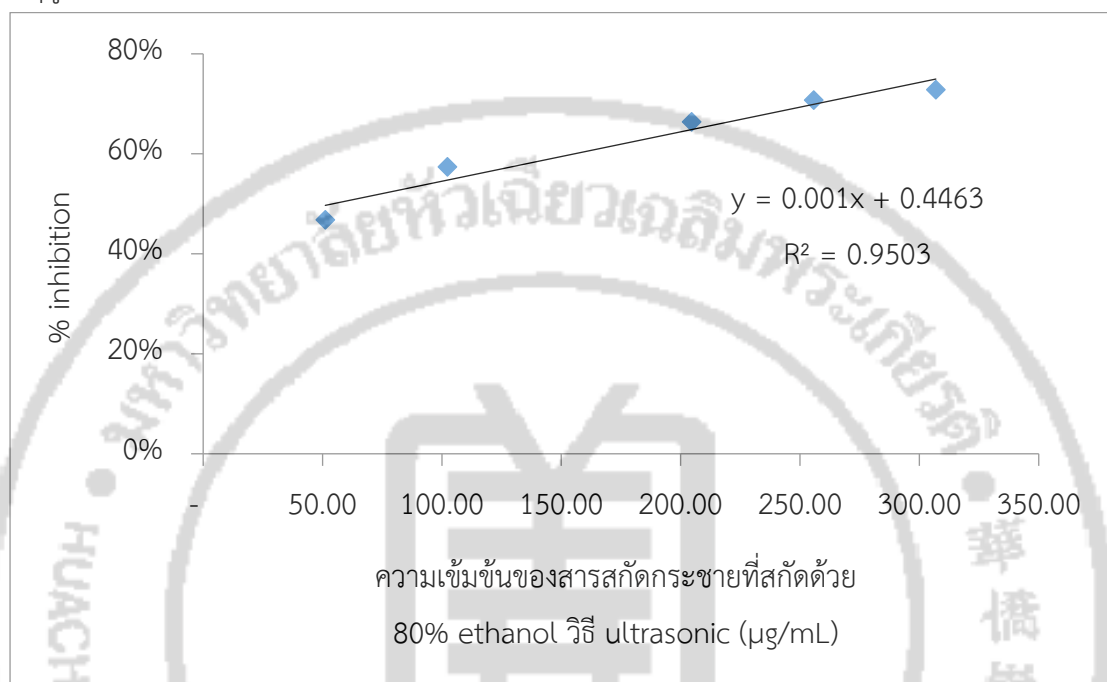
การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Ahmad R และคณะ (35) DPPH assay เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระชายในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร และสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ

ในการศึกษาได้บันทึกค่าการดูดกลืนของตัวอย่างสารสกัดกระชายแบบต่างๆที่เจือจางทั้ง 5 ความเข้มข้น นำไปคำนวณหาค่าร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างสารสกัดกระชายที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) จากกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) กับตัวอย่างสารสกัดกระชาย เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid (ดังแสดงในภาพที่ 4.3-4.4 และตารางที่ 4.5)

ภาพที่ 4.3 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay



ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol โดยใช้วิธี ultrasonic กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay



ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายต่างกันด้วยวิธี DPPH assay (n=5)

สารทดสอบ		IC ₅₀ (µg/mL)					IC ₅₀ เฉลี่ย ± SD
วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	n1	n2	n3	n4	n5	
ultrasonic	50% ethanol	127.59	114.88	119.00	111.83	108.71	116.40 ± 7.32
	80% ethanol	52.22	51.23	48.50	54.30	44.63	50.18 ± 3.74
	absolute ethanol	67.33	68.05	68.27	67.58	67.20	67.69 ± 0.46
	acetone	108.77	107.07	107.84	107.71	105.73	107.42 ± 1.12

สารทดสอบ		IC ₅₀ (µg/mL)					
วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	n1	n2	n3	n4	n5	IC ₅₀ เฉลี่ย ± SD
maceration	50% ethanol	164.62	73.45	105.43	72.56	67.42	96.70 ± 40.84
	80% ethanol	94.61	75.86	87.69	79.98	85.48	84.73 ± 7.21
	absolute ethanol	181.85	174.21	173.00	172.92	171.53	174.70 ± 4.10
	acetone	208.22	206.61	206.72	204.02	205.46	206.21 ± 1.57
L-ascorbic acid		4.76	5.48	6.94	7.92	4.37	5.89 ± 1.52

พบว่าสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol จะให้สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ และแตกต่างกันตามวิธีสกัด โดยสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol และใช้วิธี ultrasonic มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมี IC₅₀ เท่ากับ 50.18 ± 3.74 µg/mL ตามด้วยสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol แต่ใช้วิธี maceration มี IC₅₀ เท่ากับ 84.73 ± 7.21 µg/mL ส่วนสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย acetone พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด มี IC₅₀ เท่ากับ 206.21 ± 1.57 µg/mL

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid พบว่าสารมาตรฐาน L-ascorbic acid มีฤทธิ์มากกว่าสารสกัดกระชาย 8.52 เท่า

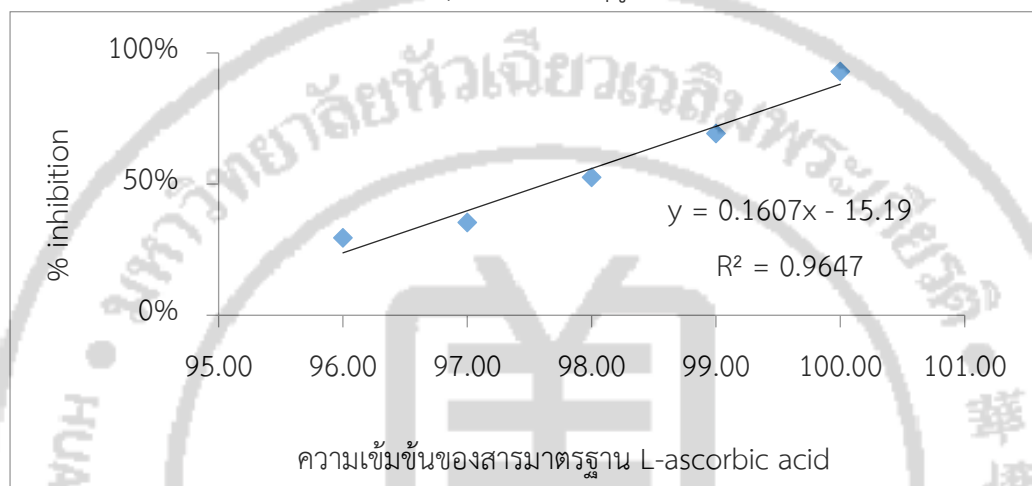
2. ABTS assay

เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจากงานวิจัยของพิชญา ลักษณะวิลาศ (36) โดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติมโซเดียมเปอร์ซัลเฟต (K₂S₂O₈) และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร สามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ทำเช่นเดียวกับ DPPH assay

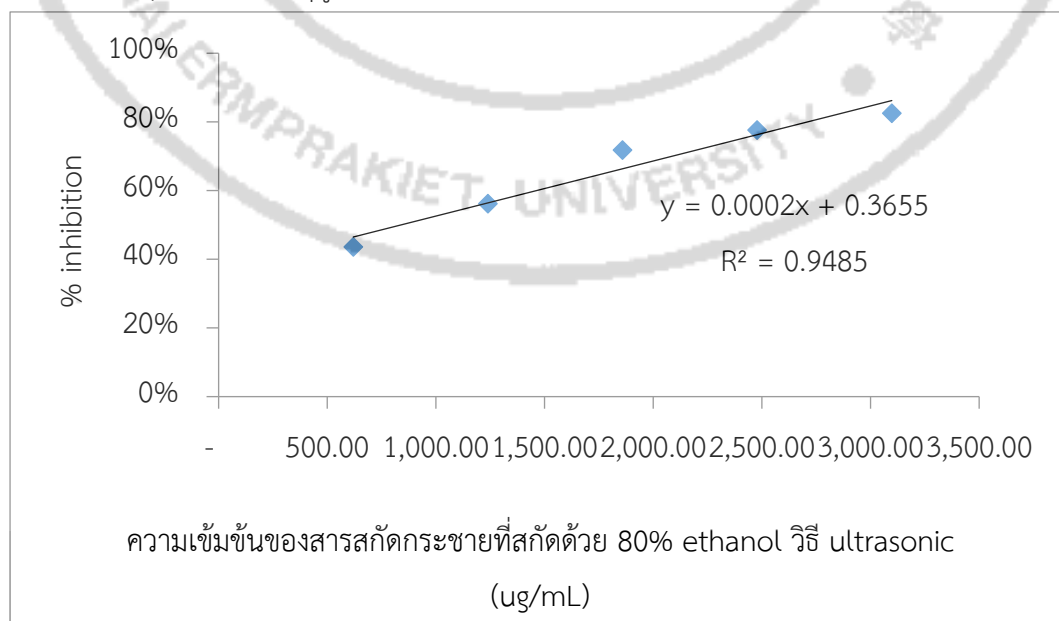
ในการศึกษาได้บันทึกค่าการดูดกลืนของตัวอย่างสารสกัดกระชายแบบต่างๆที่เจือจางทั้ง 5 ความเข้มข้น นำไปคำนวณหาค่าร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างสารสกัดกระชายที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) จากกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) กับตัวอย่าง

สารสกัดกระชาย (รูปที่ 4.5-4.6) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid (ดังแสดงในภาพที่ 4.5-4.6 และตารางที่ 4.6)

ภาพที่ 4.5 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay



ภาพที่ 4.6 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 80% ethanol โดยใช้วิธี ultrasonic กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay



ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดกระชายโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ดังตารางที่ 4.6 พบว่าสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol วิธี ultrasonic มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมี IC_{50} เท่ากับ 848.17 ± 66.79 $\mu\text{g/mL}$ ตามด้วยสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol วิธี maceration มี IC_{50} เท่ากับ 922.51 ± 17.42 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย acetone พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด โดยมี IC_{50} เท่ากับ $3,515.50 \pm 50.77$ $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดกับสารมาตรฐานของ L-ascorbic acid พบว่า L-ascorbic acid มีฤทธิ์มากกว่าสารสกัดจากกระชาย 8.68 เท่า

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธี และตัวทำละลายต่างกันด้วยวิธี ABTS assay (n=5)

สารทดสอบ		IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					IC_{50} เฉลี่ย \pm SD
วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	n1	n2	n3	n4	n5	
ultrasonic	50%ethanol	2,416.77	2,433.58	2,482.27	2,465.75	2,370.07	$2,433.69 \pm 43.94$
	80%ethanol	865.34	792.68	838.94	790.55	953.36	848.17 ± 66.79
	absolute ethanol	1,978.97	1,929.43	2,015.13	1,966.36	1,966.84	$1,971.35 \pm 30.73$
	acetone	2,191.87	2,149.48	2,256.04	2,311.64	2,218.95	$2,225.59 \pm 61.86$
maceration	50%ethanol	1,165.06	1,088.71	1,116.16	1,036.77	1,184.47	$1,118.24 \pm 59.35$
	80%ethanol	924.20	925.62	895.47	944.18	923.07	922.51 ± 17.42
	absolute ethanol	1,439.35	1,421.60	1,421.40	1,396.44	1,353.17	$1,406.39 \pm 33.44$
	acetone	3,550.96	3,478.06	3,458.88	3,507.89	3,581.73	$3,515.50 \pm 50.77$
L-ascorbic acid		97.76	97.79	97.76	97.63	97.67	97.72 ± 0.07

การคัดเลือกสารสกัดกระชายที่มีปริมาณสารสำคัญสูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาความคงตัว

กระชายที่สกัดด้วยวิธีสกัด และตัวทำละลายต่างๆมีปริมาณสารฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.7-4.8) พบว่าสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic extraction และใช้ 80% ethanol เป็นตัวทำละลาย มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay จึงเลือกสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic และใช้ 80% ethanol เป็นตัวทำละลายไปทดสอบความคงตัว

ตารางที่ 4.7 ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายที่ใช้วิธีการสกัดและสารละลายในการสกัดต่างกัน

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณ ฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	IC ₅₀	
			DPPH (µg/mL)	ABTS (µg/mL)
ultrasonic	50% ethanol	49.75 ± 1.98	116.40 ± 7.32	2,433.69 ± 43.94
	80% ethanol	81.62 ± 2.61	50.18 ± 3.74	848.17 ± 66.79
	Absolute ethanol	58.30 ± 1.68	67.69 ± 0.46	1,971.35 ± 30.73
	acetone	56.46 ± 1.92	107.42 ± 1.12	2,225.59 ± 61.86

ตารางที่ 4.8 ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายที่ใช้วิธีการสกัดและสารละลายในการสกัดต่างกัน (ต่อ)

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณ ฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	IC ₅₀	
			DPPH (µg/mL)	ABTS (µg/mL)
maceration	50% ethanol	77.98 ± 1.56	96.70 ± 40.84	1,118.24 ± 59.35
	80% ethanol	79.52 ± 3.29	84.73 ± 7.21	922.51 ± 17.42
	Absolute ethanol	71.45 ± 0.27	174.70 ± 4.10	1,406.39 ± 33.44
	acetone	38.47 ± 0.92	206.21 ± 1.57	3,515.50 ± 50.77

4.2 การเตรียมสารสกัดกาแฟ

ลักษณะทางกายภาพของกาแฟมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นหอม ดังภาพที่ 4.7

ภาพที่ 4.7 ลักษณะของผงกาแฟ



จากแนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า วิธีสกัดกาแฟ (*Coffea Robusta* L.) ที่ให้องค์ประกอบสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง 2 วิธี คือวิธี maceration และ ultrasonic extraction โดยปริมาณสารสำคัญในสารสกัดที่ได้จากวิธีสกัดแต่ละวิธีนี้แตกต่างกันตามชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ยังไม่เคยมีงานวิจัยที่เปรียบเทียบวิธีสกัด และใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันจากตัวอย่างกาแฟที่มาจากแหล่งเดียวกัน ผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีสกัดทั้ง 2 วิธีดังกล่าวข้างต้น โดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมสารสกัดกาแฟที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำผงกาแฟมาสกัดด้วยวิธี ultrasonic extraction และวิธี maceration โดยแต่ละวิธีใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ 50% ethanol, 80% ethanol, absolute ethanol และ acetone จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้ง และคำนวณหาค่าร้อยละของสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักผงกาแฟแห้ง (% yield) และบันทึกลักษณะทางกายภาพของสารสกัดก่อนและหลังการทำให้แห้ง รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.9 และ 4.10

ตารางที่ 4.9 % yield และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดกาแฟจากวิธี ultrasonic extraction โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชนิดของ ตัวทำละลาย	น้ำหนักผง กาแฟ (กรัม)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ร้อยละของน้ำหนัก สารสกัดต่อน้ำหนัก ผงกาแฟ (%yield)	ลักษณะทางกายภาพ	
				ก่อนทำให้แห้ง	หลังทำให้แห้ง
50% ethanol	25.0022	9.6571	38.63	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ	ผงสีน้ำตาลดำ
80% ethanol	25.0012	3.9744	15.90	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลดำ
absolute ethanol	25.0062	3.2394	12.95	สารละลายใส สีน้ำตาลเข้ม	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลดำ
acetone	25.0020	2.5924	10.37	สารละลายใส สีน้ำตาลเข้ม	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลดำ

ตารางที่ 4.10 % yield และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดกาแฟจากวิธี maceration โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชนิดของ ตัวทำละลาย	น้ำหนักผง กาแฟ (กรัม)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ร้อยละของน้ำหนัก สารสกัดต่อน้ำหนัก ผงกาแฟ (%yield)	ลักษณะทางกายภาพ	
				ก่อนทำให้แห้ง	หลังทำให้แห้ง
50% ethanol	25.1000	9.2341	36.79	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ	ผงสีน้ำตาลดำ
80% ethanol	25.0730	5.0378	20.09	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลดำ
absolute ethanol	25.0698	2.7442	10.95	สารละลายใส สีน้ำตาลเข้ม	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลดำ
acetone	25.0731	2.5997	10.37	สารละลายใส สีน้ำตาลเข้ม	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลดำ

จากการเตรียมสารสกัดกาแฟด้วยวิธีและตัวทำละลายข้างต้นพบว่า สารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol โดยใช้วิธี ultrasonic extraction ให้ร้อยละของน้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักผงกาแฟ (% yield) มากที่สุด คือ 38.63% โดยก่อนทำให้แห้งมีลักษณะเป็นสารละลายใสสีน้ำตาลดำ และหลังทำให้แห้งมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม ส่วนสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย acetone โดยใช้วิธี ultrasonic extraction และวิธี maceration ให้ร้อยละของน้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักผงกาแฟ (% yield) น้อยที่สุด คือ 10.37% โดยก่อนทำให้แห้งมีลักษณะเป็นสารละลายใสสีน้ำตาลเข้ม และหลังทำให้แห้งมีลักษณะเป็นของเหลวหนืด สีน้ำตาลดำ

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกาแฟ

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกาแฟโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Siddiqui N. และคณะ (34) ปริมาณฟีนอลิกรวมหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ) ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย มิลลิกรัมต่อกรัมกรดแกลลิก (mg/g gallic acid equivalent, GAE)

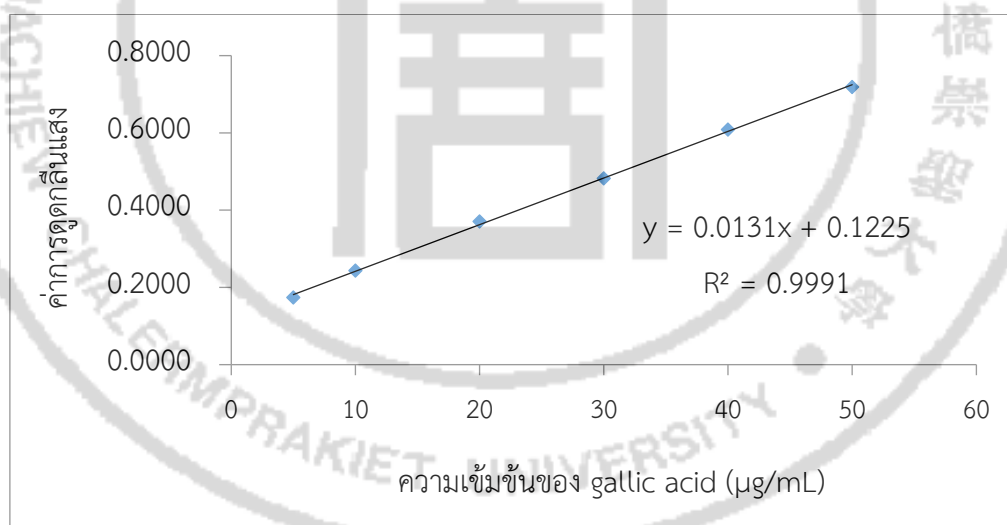
ผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย gallic acid ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 5-50 $\mu\text{g/mL}$ ที่ความยาวคลื่น 765 nm (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แสดงในตารางที่ 4.11 และนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid ดังแสดงในภาพที่ 4.8

การคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมได้จากกราฟมาตรฐาน gallic acid จากสมการ $y = 0.0131x + 0.1225$ ($R^2 = 0.9991$) โดยการแทนค่า y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดกาแฟที่ความยาวคลื่น 765 nm ที่ได้จากการทดลอง เพื่อหาค่า x ซึ่งเป็นปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกาแฟ (mg) ใน 1 mL ซึ่งจะนำไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกาแฟทั้งหมด โดยแสดงในหน่วย mg/g gallic acid equivalent, GAE (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.11 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ (n = 3)

ความเข้มข้น ของ gallic acid ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm			
	n1	n2	n3	ค่าเฉลี่ย \pm SD
5	0.1985	0.2005	0.0924	0.1971 \pm 0.0042
10	0.2415	0.264	0.2445	0.2500 \pm 0.0122
20	0.3523	0.4201	0.3696	0.3807 \pm 0.0352
30	0.4874	0.5334	0.5052	0.5087 \pm 0.0240
40	0.6482	0.6623	0.6155	0.6420 \pm 0.0240
50	0.7564	0.8304	0.7691	0.7853 \pm 0.0396

ภาพที่ 4.8 กราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกาแฟ



ตารางที่ 4.12 ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายที่แตกต่างกัน
(n = 5)

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกาแฟ (mg GAE/g extract)					
		n1	n2	n3	n4	n5	ปริมาณเฉลี่ย ± SD
ultrasonic	50% ethanol	75.25	74.30	77.12	73.27	76.28	75.24 ± 1.53
	80% ethanol	57.12	60.22	61.04	59.00	58.10	59.46 ± 1.58
	absolute ethanol	55.17	58.42	59.12	56.58	57.23	57.30 ± 1.55
	acetone	56.93	54.95	52.90	55.92	53.89	54.92 ± 1.60
maceration	50% ethanol	75.20	72.11	74.23	73.18	71.14	73.17 ± 1.62
	80% ethanol	64.22	66.26	67.21	65.13	63.19	65.20 ± 1.59
	absolute ethanol	53.99	55.96	56.97	57.98	54.99	55.98 ± 1.57
	acetone	53.63	51.74	52.68	54.64	55.57	53.65 ± 1.52

ผลการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.12 พบว่า สารสกัดกาแฟที่ใช้ตัวทำละลาย 50% ethanol ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นๆ และใช้วิธีสกัดเดียวกัน โดยสารที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด คือ 75.24 ± 1.53 mg GAE/g extract รองลงมา เป็นสารที่สกัดด้วยวิธี maceration ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 73.17 ± 1.62 mg GAE/g ส่วน สารสกัดกาแฟที่ใช้ตัวทำละลาย acetone และสกัดด้วยวิธี maceration ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมต่ำสุดเท่ากับ 53.65 ± 1.52 mg GAE/g

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

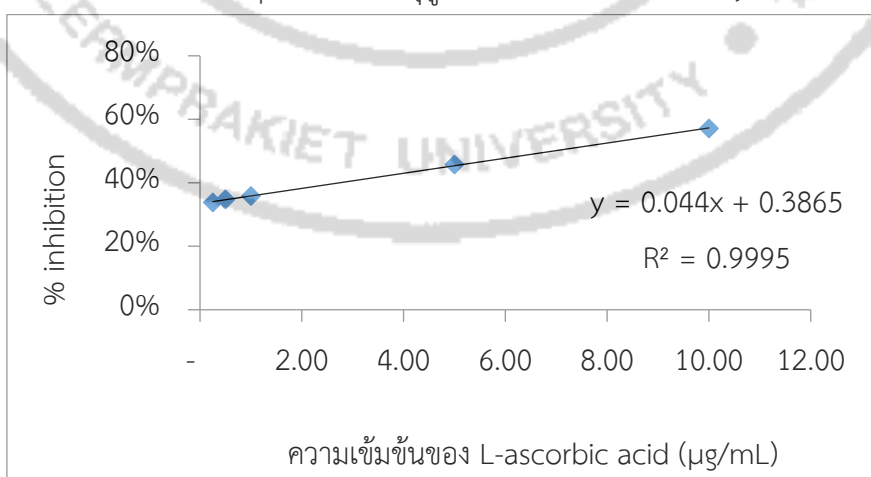
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟ 2 วิธี ได้แก่ DPPH และ ABTS assay โดยวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid

1. DPPH assay

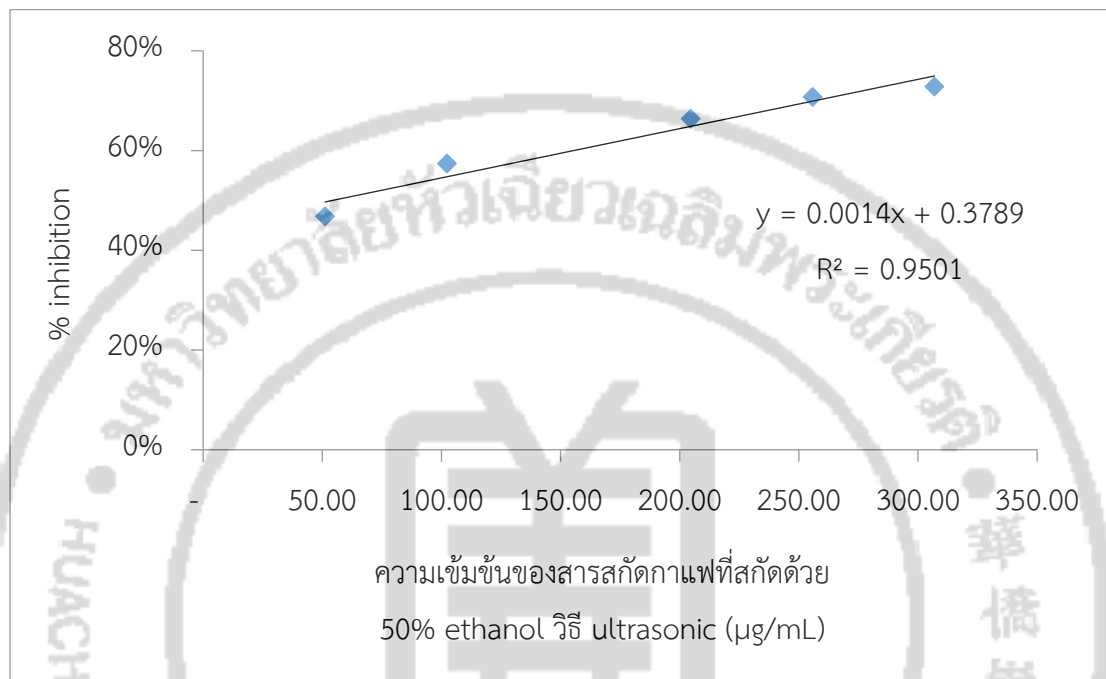
การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Ahmad R และคณะ (35) DPPH assay เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกาแฟในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร และสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ

ในการศึกษาได้บันทึกค่าการดูดกลืนของตัวอย่างสารสกัดกาแฟแบบต่างๆที่เจือจางทั้ง 5 ความเข้มข้น นำไปคำนวณหาค่าร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างสารสกัดกาแฟที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) จากกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) กับตัวอย่างสารสกัดกาแฟ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid (ดังแสดงในภาพที่ 4.9-4.10 และตารางที่ 4.13)

ภาพที่ 4.9 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay



ภาพที่ 4.10 ตัวอย่างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol โดยใช้วิธี ultrasonic กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay



ตารางที่ 4.13 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายต่างกันด้วยวิธี DPPH assay (n=5)

สารทดสอบ		IC ₅₀ (µg/mL)					IC ₅₀ เฉลี่ย ± SD
วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	n1	n2	n3	n4	n5	
ultrasonic	50% ethanol	55.52	57.24	54.45	56.10	57.60	56.18 ± 1.28
	80% ethanol	70.12	71.00	69.50	71.16	70.23	70.40 ± 0.68
	absolute ethanol	82.20	81.42	83.28	81.89	82.77	82.31 ± 0.73
	acetone	110.12	112.23	111.56	111.78	110.45	110.23 ± 0.90

สารทดสอบ		IC ₅₀ (µg/mL)					
วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	n1	n2	n3	n4	n5	IC ₅₀ เฉลี่ย ± SD
maceration	50% ethanol	58.32	57.04	59.03	59.10	58.28	58.35 ± 0.83
	80% ethanol	84.76	85.23	83.98	85.45	84.42	84.77 ± 0.60
	absolute ethanol	125.82	124.99	123.96	126.51	125.86	125.43 ± 0.98
	acetone	144.20	145.02	143.12	145.30	144.15	144.36 ± 0.86
L-ascorbic acid		5.54	4.95	6.73	6.87	5.67	5.95 ± 0.82

พบว่าสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol จะให้สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ และแตกต่างกันตามวิธีสกัด โดยสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol และใช้วิธี ultrasonic มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมี IC₅₀ เท่ากับ 56.18 ± 1.28 µg/mL ตามด้วยสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol แต่ใช้วิธี maceration มี IC₅₀ เท่ากับ 58.35 ± 0.83 µg/mL ส่วนสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย acetone พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด มี IC₅₀ เท่ากับ 144.36 ± 0.86 µg/mL

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid พบว่าสารมาตรฐาน L-ascorbic acid มีฤทธิ์มากกว่าสารสกัดกาแฟ 9.44 เท่า

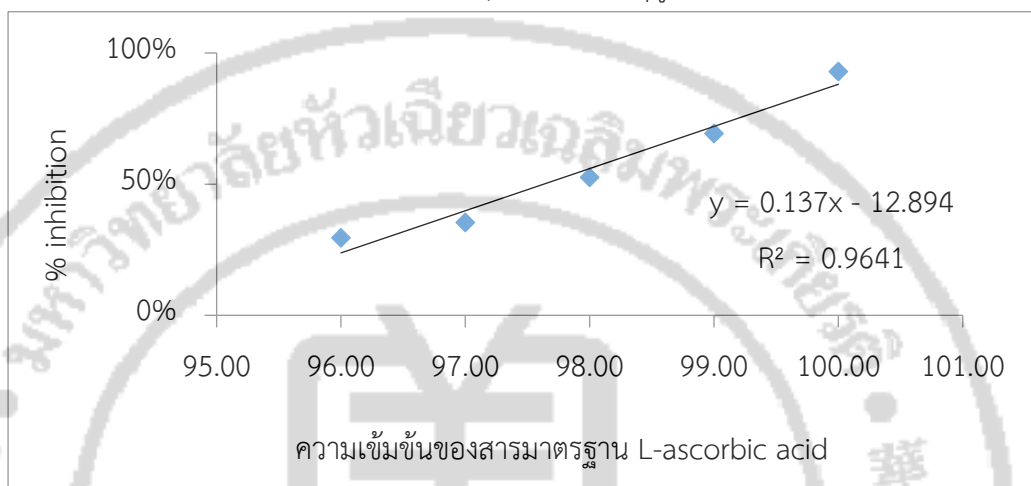
2. ABTS assay

เป็นการวัดความสามารถในต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจากงานวิจัยของพิชญ์ ลักษณะวิไลศ (36) โดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติมโซเดียมเปอร์ซัลเฟต (K₂S₂O₈) และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร สามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟได้จากการคำนวณที่จำลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ทำเช่นเดียวกับ DPPH assay

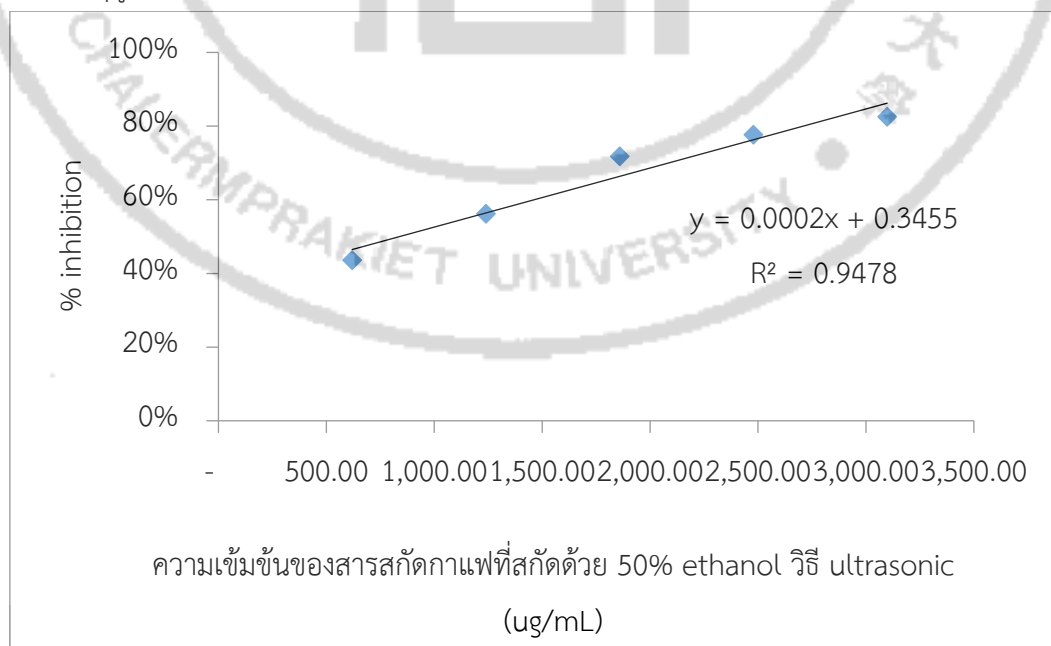
ในการศึกษาได้บันทึกค่าการดูดกลืนของตัวอย่างสารสกัดกาแฟแบบต่างๆที่เจือจางทั้ง 5 ความเข้มข้น นำไปคำนวณหาค่าร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างสารสกัดกาแฟที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) จากกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) กับตัวอย่าง

สารสกัดกาแฟ (รูปที่ 4.11-4.12) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid (ดังแสดงในภาพที่ 4.11-4.12 และตารางที่ 4.14)

ภาพที่ 4.11 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay



ภาพที่ 4.12 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 50% ethanol โดยใช้วิธี ultrasonic กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay



ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดกาแฟโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ดังตารางที่ 4.14 พบว่าสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol วิธี ultrasonic มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมี IC_{50} เท่ากับ $920.81 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$ ตามด้วยสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol วิธี maceration มี IC_{50} เท่ากับ $1,024.38 \pm 0.77 \mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย acetone พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด โดยมี IC_{50} เท่ากับ $2,232.34 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดกับสารมาตรฐานของ L-ascorbic acid พบว่า L-ascorbic acid มีฤทธิ์มากกว่าสารสกัดจากกาแฟ 9.40 เท่า

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายต่างกันด้วยวิธี ABTS assay (n=5)

สารทดสอบ		IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					IC_{50} เฉลี่ย \pm SD
วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	n1	n2	n3	n4	n5	
ultrasonic	50%ethanol	920.38	921.15	921.03	920.35	921.12	920.81 ± 0.41
	80%ethanol	1,204.72	1,203.99	1,205.38	1,202.98	1,204.64	$1,204.34 \pm 0.91$
	absolute ethanol	1,550.18	1,551.22	1,552.04	1,550.09	1,551.13	$1,550.93 \pm 0.81$
	acetone	2,056.75	2,055.89	2,057.42	2,056.84	2,057.33	$2,056.85 \pm 0.61$
maceration	50%ethanol	1,024.28	1,025.03	1,023.16	1,025.07	1,024.36	$1,024.38 \pm 0.77$
	80%ethanol	1,122.48	1,121.78	1,122.56	1,123.03	1,123.05	$1,122.58 \pm 0.52$
	absolute ethanol	1,944.16	1,945.03	1,943.08	1,946.00	1,944.17	$1,944.49 \pm 1.09$
	acetone	2,232.24	2,231.89	2,233.42	2,231.78	2,232.36	$2,232.34 \pm 0.65$
L-ascorbic acid		98.90	98.95	96.98	97.97	96.93	97.95 ± 0.99

การคัดเลือกสารสกัดกาแฟที่มีปริมาณสารสำคัญสูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาความคงตัว

กาแฟที่สกัดด้วยวิธีสกัด และตัวทำละลายต่างๆมีปริมาณสารฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.15-4.16) พบว่าสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic extraction และใช้ 50% ethanol เป็นตัวทำละลาย มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay จึงเลือกสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic และใช้ 50% ethanol เป็นตัวทำละลายไปทดสอบความคงตัว

ตารางที่ 4.15 ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟที่ใช้วิธีการสกัดและสารละลายในการสกัดต่างกัน

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณ ฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	IC ₅₀	
			DPPH (µg/mL)	ABTS (µg/mL)
ultrasonic	50% ethanol	75.24 ± 1.53	56.18 ± 1.28	920.81 ± 0.41
	80% ethanol	59.46 ± 1.58	70.40 ± 0.68	1,204.34 ± 0.91
	Absolute ethanol	57.30 ± 1.55	82.31 ± 0.73	1,550.93 ± 0.81
	acetone	54.92 ± 1.60	110.23 ± 0.90	2,056.85 ± 0.61

ตารางที่ 4.16 ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟที่ใช้วิธีการสกัดและสารละลายในการสกัดต่างกัน (ต่อ)

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณ ฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	IC ₅₀	
			DPPH (µg/mL)	ABTS (µg/mL)
maceration	50% ethanol	73.17 ± 1.62	58.35 ± 0.83	1,024.38 ± 0.77
	80% ethanol	65.20 ± 1.59	84.77 ± 0.60	1,122.58 ± 0.52
	Absolute ethanol	55.98 ± 1.57	125.43 ± 0.98	1,944.49 ± 1.09
	acetone	53.65 ± 1.52	144.36 ± 0.86	2,232.34 ± 0.65

4.3 การเตรียมสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

โดยเตรียมสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก หรือในอัตราส่วน 0.5:0.5 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟมีลักษณะเป็นสารละลายใส สีน้ำตาลดำ มีกลิ่นหอมผสมกระชายและกาแฟ ดังภาพที่ 4.13

ภาพที่ 4.13 ลักษณะของสารละลายใส สีน้ำตาลดำของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ



จากแนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า วิธีสกัดกระชาย (*Boesenbergia pandurata*) และวิธีสกัดกาแฟ (*Coffea Robusta L.*) ที่ให้องค์ประกอบสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง 2 วิธี คือวิธี maceration และ ultrasonic extraction โดยปริมาณสารสำคัญในสารสกัดที่ได้จากวิธีสกัดแต่ละวิธีนี้แตกต่างกันตามชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ โดยตัวทำละลายแตกต่างกันเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแฟที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic extraction และใช้ 80% ethanol เป็นตัวทำละลาย มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay และสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic extraction และใช้ 50% ethanol เป็นตัวทำละลาย มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay

ผู้วิจัยจึงสนใจเลือกสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic โดยใช้ 80% ethanol เป็นตัวทำละลาย และสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic โดยใช้ 50% ethanol เป็นตัวทำละลาย มาศึกษาโดยเตรียมเป็นสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก หรือในอัตราส่วน 0.5:0.5 โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Siddiqui N. และคณะ (34) ปริมาณฟีนอลิกรวมหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ) ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย มิลลิกรัมต่อกรัมกรดแกลลิก (mg/g gallic acid equivalent, GAE)

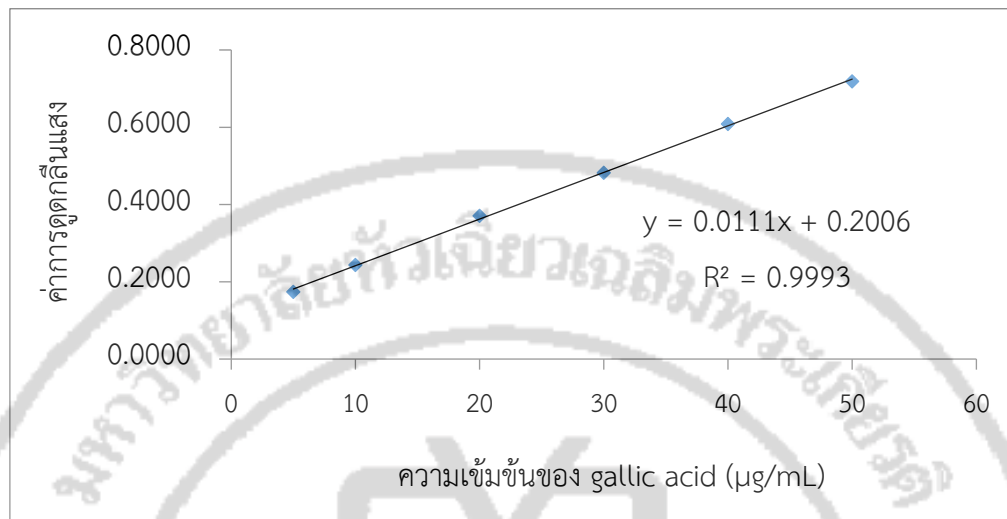
ผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย gallic acid ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 5-50 $\mu\text{g/mL}$ ที่ความยาวคลื่น 765 nm (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แสดงในตารางที่ 4.17 และนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid ดังแสดงในภาพที่ 4.14

การคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมได้จากกราฟมาตรฐาน gallic acid จากสมการ $y = 0.0111x + 0.2006$ ($R^2 = 0.9993$) โดยการแทนค่า y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่ความยาวคลื่น 765 nm ที่ได้จากการทดลอง เพื่อหาค่า x ซึ่งเป็น ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ (mg) ใน 1 mL ซึ่งจะนำไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพทั้งหมด โดยแสดงในหน่วย mg/g gallic acid equivalent, GAE (ตารางที่ 4.18)

ตารางที่ 4.17 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ($n = 3$)

ความเข้มข้น ของ gallic acid ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm			
	n1	n2	n3	ค่าเฉลี่ย \pm SD
5	0.2585	0.2510	0.2524	0.2540 \pm 0.0040
10	0.3007	0.3140	0.3059	0.3069 \pm 0.0067
20	0.4220	0.4245	0.4306	0.4257 \pm 0.0044
30	0.5814	0.5342	0.5092	0.5416 \pm 0.0367
40	0.6422	0.6604	0.6197	0.6408 \pm 0.0204
50	0.7532	0.7384	0.7603	0.7506 \pm 0.0112

ภาพที่ 4.14 กราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ



ตารางที่ 4.18 ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ (n = 5)

ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ (mg GAE/g extract)	
n1	333.65
n2	334.09
n3	332.98
n4	331.86
n5	333.72
ปริมาณเฉลี่ย ± SD	333.26 ± 0.88

ผลการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพพบว่า สารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด คือ 333.26 ± 0.88 mg GAE/g extract

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

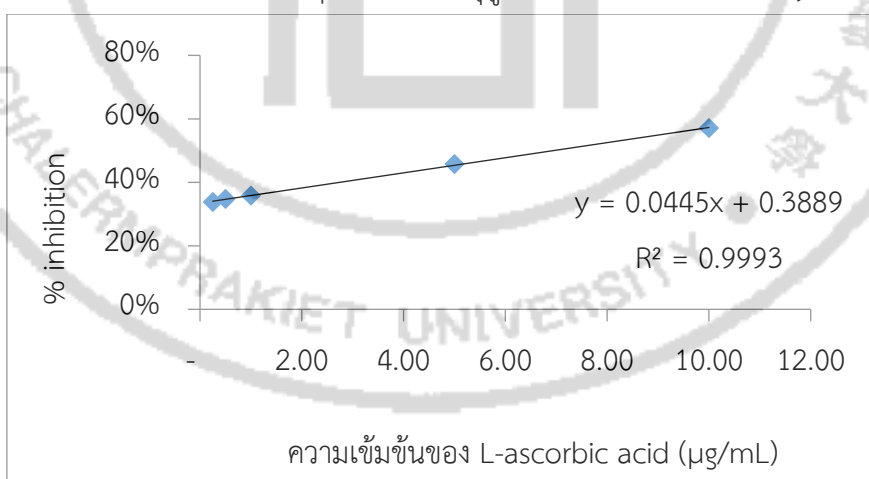
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ 2 วิธี ได้แก่ DPPH และ ABTS assay โดยวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid

1. DPPH assay

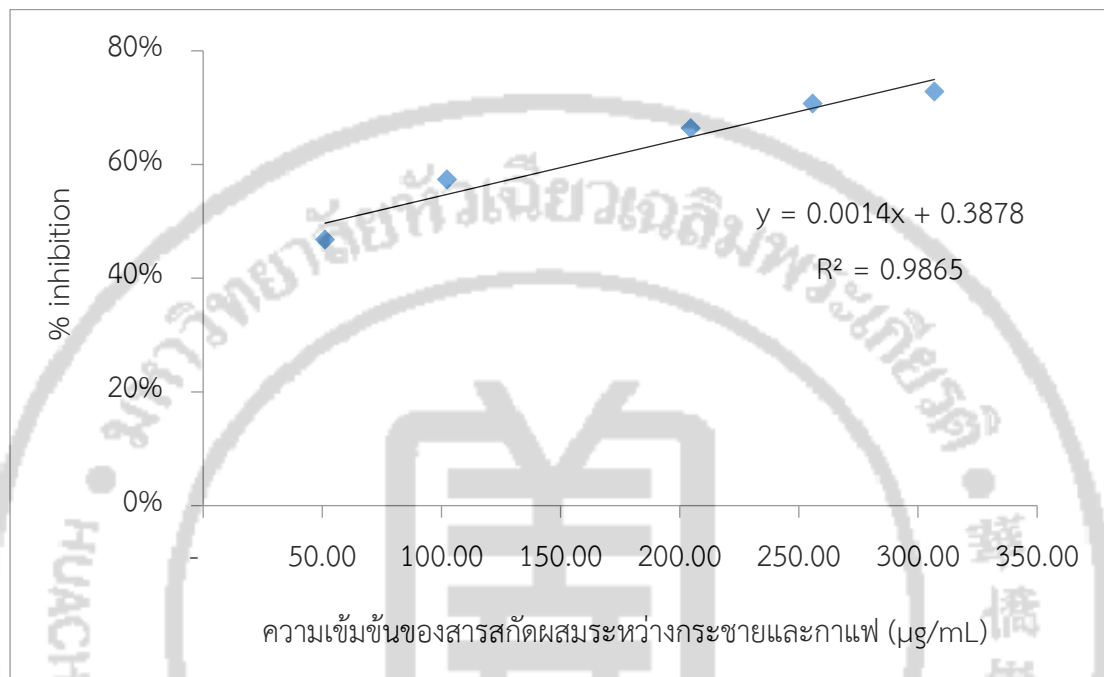
การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Ahmad R และคณะ (35) DPPH assay เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH เป็นอนุภาคอิสระที่เสถียร และสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ

ในการศึกษาได้บันทึกค่าการดูดกลืนของตัวอย่างสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก หรือในอัตราส่วน 0.5:0.5 ที่เจือจางทั้ง 5 ความเข้มข้น นำไปคำนวณหาค่าร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) จากกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) กับตัวอย่างสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid (ดังแสดงในภาพที่ 4.15-4.16 และตารางที่ 4.19)

ภาพที่ 4.15 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay



ภาพที่ 4.16 ตัวอย่างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay



ตารางที่ 4.19 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ ด้วยวิธี DPPH assay (n=5)

สารทดสอบ	IC ₅₀ (µg/mL)					IC ₅₀ เฉลี่ย ± SD
	n1	n2	n3	n4	n5	
สารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ	44.70	45.86	43.99	45.75	43.93	44.85 ± 0.93
L-ascorbic acid	5.43	4.98	6.07	6.16	5.36	5.60 ± 0.50

พบว่าสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมี IC₅₀ เท่ากับ 44.85 ± 0.93 µg/mL

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid

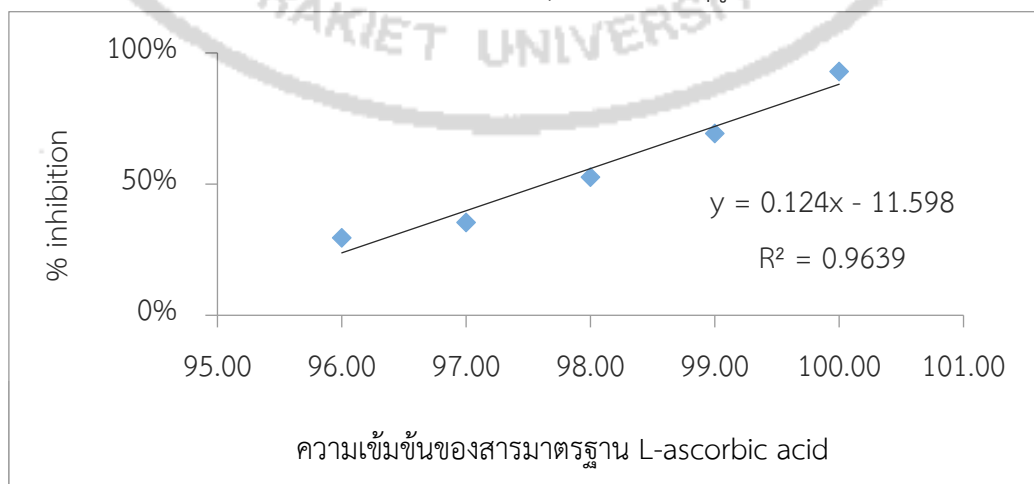
พบว่าสารมาตรฐาน L-ascorbic acid มีฤทธิ์มากกว่าสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ 8.01 เท่า

2. ABTS assay

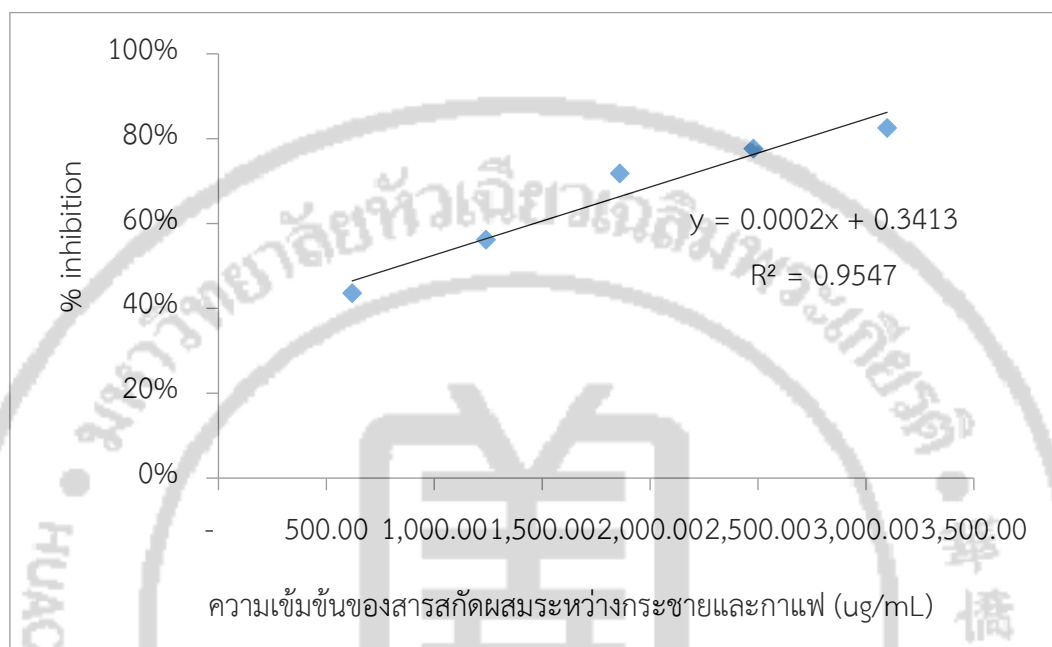
เป็นการวัดความสามารถในด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจากงานวิจัยของพิชญ์ ลักษณะวิลาศ (36) โดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติมโซเดียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร สามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ทำเช่นเดียวกับ DPPH assay

ในการศึกษาได้บันทึกค่าการดูดกลืนของตัวอย่างสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก หรือในอัตราส่วน 0.5:0.5 ที่เจือจางทั้ง 5 ความเข้มข้น นำไปคำนวณหาค่าร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) จากกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) กับตัวอย่างสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ (รูปที่ 4.17-4.18) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid (ดังแสดงในภาพที่ 4.17-4.18 และตารางที่ 4.20)

ภาพที่ 4.17 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay



ภาพที่ 4.18 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ กับ % inhibition ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay



ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ดังตารางที่ 4.20 พบว่าสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมี IC_{50} เท่ากับ $725.72 \pm 0.52 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดกับสารมาตรฐานของ L-ascorbic acid พบว่า L-ascorbic acid มีฤทธิ์มากกว่าสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ 7.52 เท่า

ตารางที่ 4.20 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ ด้วยวิธี ABTS assay (n=5)

สารทดสอบ	IC ₅₀ (µg/mL)					IC ₅₀ เฉลี่ย ± SD
	n1	n2	n3	n4	n5	
สารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ	725.25	726.27	725.38	726.29	725.40	725.72 ± 0.52
L-ascorbic acid	96.86	95.89	97.42	95.78	96.36	96.46 ± 0.69

การคัดเลือกสารสกัดกระชายและสารสกัดกาแพรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่มีปริมาณสารสำคัญสูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาความคงตัว จากตารางที่ 4.21 พบว่าสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay จึงเลือกสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพไปทดสอบความคงตัว

ตารางที่ 4.21 ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชาย และสารสกัดกาแพรวมทั้งสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ

สารทดสอบ	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	IC ₅₀	
		DPPH (µg/mL)	ABTS (µg/mL)
สารสกัดกระชาย	81.62 ± 2.61	50.18 ± 3.74	848.17 ± 66.79
สารสกัดกาแพ	75.24 ± 1.53	56.18 ± 1.28	920.81 ± 0.41
สารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ	333.26 ± 0.88	44.85 ± 0.93	725.72 ± 0.52

4.4 การพัฒนาสูตรตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน

จากการเตรียมนาโนอิมัลชันด้วยเทคนิค spontaneous emulsification โดยมีส่วนประกอบหลักดังนี้ coconut oil, Cremophor® RH40 (สารลดแรงตึงผิว), ethanol (สารลดแรงตึงผิวร่วม) และวัฏภาคน้ำ ทำให้ได้นาโนอิมัลชันที่มีลักษณะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสัดส่วนที่ใช้ในแต่ละสูตร โดยรวมพบว่ามีลักษณะโปร่งแสงเหลืองฟ้าและสีขาวขุ่น ในการวิจัยครั้งนี้จะเน้นศึกษาส่วนที่เกี่ยวข้องกับส่วนประกอบของตำรับนาโนอิมัลชันมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพอย่างชัดเจน เช่น ปริมาณ coconut oil, ปริมาณ Cremophor® RH40 (สารลดแรงตึงผิว) และปริมาณ ethanol (สารลดแรงตึงผิวร่วม) เป็นต้น ซึ่งจะแสดงรายละเอียดในลำดับต่อไป

งานวิจัยนี้เลือกใช้ Cremophor® RH40 เนื่องจากเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุจึงมีความปลอดภัย ไม่ระคายเคือง เป็นสารช่วยผสมน้ำกับน้ำมันให้เข้ากัน และเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ ซึ่งจะช่วยป้องกันการรวมตัวกันของหยดอนุภาคได้ จึงนิยมนำมาใช้ในตำรับยาและเครื่องสำอางประเภทนาโนอิมัลชัน และยังเป็นสารลดแรงตึงผิวที่เป็นของเหลว ไม่จำเป็นต้องผ่านความร้อนในกระบวนการทำอิมัลชัน สารลดแรงตึงผิวร่วมที่เลือกใช้ในการตั้งตำรับนาโนอิมัลชัน ควรพิจารณาจากความเป็นพิษของตัวทำละลายที่ใช้โดยตัวทำละลายนั้นๆ ควรเป็นตัวทำละลายที่ถูกใช้ในกระบวนการเภสัชกรรม โดยเลือกจากเภสัชตำรับยุโรป (38) ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ ethanol เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูง ระเหยได้ง่าย สามารถละลายน้ำ น้ำมันและองค์ประกอบต่างๆในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟได้ดี มีความเป็นพิษต่ำ และระคายเคืองน้อย

4.4.1 การศึกษาปริมาณของ coconut oil ในตำรับโดยใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวคงที่

จากการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ coconut oil ในตำรับโดยใช้สารลดแรงตึงผิวคงที่ร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก ปรากฏว่าขนาดของอนุภาคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามปริมาณของน้ำมันที่เพิ่มขึ้น และส่งผลให้ตำรับที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ ไม่คงตัว เกิดการแยกชั้น แสดงผลดังตารางที่ 4.22 ตำรับที่เหมาะสมที่สุดมีปริมาณ coconut oil ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก มีขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร มีความคงตัวดี ไม่เกิดการแยกชั้น

ตารางที่ 4.22 การศึกษาปริมาณของ coconut oil ในตำรับโดยใช้ปริมาณ Cremophor® RH40 คงที่

สูตร	ปริมาณ coconut oil (ร้อยละ/โดยน้ำหนัก)	ปริมาณ Cremophor® RH40 (ร้อยละ/โดยน้ำหนัก)	ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้าโพเทนเชียลเฉลี่ย (mV)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
A1	1	6	184.12±3.32	0.11±0.02	-8.54±0.32	โปร่งแสง เหลือบฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
A2	5	6	248.22±5.83	0.17±0.07	-7.58±0.28	สีขาวขุ่น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
A3	10	6	788.87±11.63	0.18±0.11	-5.44±0.34	สีขาวขุ่น กระจายตัวดี แยกชั้น ภายหลัง 1 วัน
A4	15	6	843.33±24.15	0.33±0.20	-4.51±0.32	สีขาวขุ่น กระจายตัวดี แยกชั้น ภายหลัง 1 วัน

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

4.4.2 การศึกษาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวในตำรับโดยใช้ปริมาณ coconut oil คงที่

จากตารางที่ 4.23 แสดงผลการศึกษาปริมาณสารลดแรงตึงผิวในตำรับโดยใช้ปริมาณ coconut oil คงที่ ทำการเปรียบเทียบการใช้สารลดแรงตึงผิว (Cremophor® RH40) ปริมาณต่างๆ ได้แก่ ร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 โดยน้ำหนัก พบว่าโดยรวมทุกตำรับมีความคงตัวดี ไม่เกิดการแยกชั้น

ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด คือ ไม่เกิน 500 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามปริมาณของสารลดแรงตึงผิวที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Baret, J.C., et al. (2009) (39) ที่กล่าวว่า โดยทั่วไปแล้วสารลดแรงตึงผิวนั้นมีส่วนช่วยในการเกิดอิมัลชันโดยจะแทรกตัวอยู่ที่บริเวณผิวประจัน (interface) ระหว่างชั้นของน้ำและน้ำมัน (39) สารลดแรงตึงผิวที่มากพอจะสามารถห่อหุ้มหยดน้ำมันไว้ได้อย่างสมบูรณ์ ช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างเมทริกซ์ของวัฏภาคน้ำและน้ำมัน ทำให้หยดอนุภาคไม่รวมตัวกันจึงส่งผลให้อนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กลง

ตารางที่ 4.23 การศึกษาปริมาณของ Cremophor® RH40 ในตำรับโดยใช้ปริมาณ coconut oil คงที่

สูตร	ปริมาณ Cremophor® RH40 (ร้อยละ/โดยน้ำหนัก)	ปริมาณ coconut oil (ร้อยละ/โดยน้ำหนัก)	ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้าโพเทนเชียลเฉลี่ย (mV)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
B1	2	1	286.55±4.05	0.17±0.01	-7.46±0.38	สีขาวขุ่น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
B2	4	1	215.57±3.51	0.13±0.01	-8.62±0.32	โปร่งแสง เหวี่ยงฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
B3	6	1	449.13±7.25	0.24±0.02	-5.45±0.36	โปร่งแสง เหวี่ยงฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
B4	8	1	550.20±13.01	0.36±0.02	-4.67±0.36	โปร่งแสง เหวี่ยงฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัตซ์ 6 ซ้ำ

จากตารางที่ 4.23 พบว่าสูตรตำรับ B2 ที่ประกอบด้วย coconut oil ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก และสารลดแรงตึงผิว (Cremophor® RH40) ร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก เป็นตำรับที่เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาหัวข้อต่อไป เนื่องจากขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยของตำรับ B2 มีขนาดเล็กกว่าสูตร B1 แสดงให้เห็นว่าการใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมในตำรับนั้นจะช่วยส่งเสริมการเกิดหยดอนุภาคขนาดเล็กได้ดีกว่าตำรับที่ใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นต่ำ และเนื่องจากสูตร B2 ใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรตำรับอื่นที่มีขนาดหยดอนุภาคใกล้เคียงกัน จึงมีแนวโน้มในการก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังต่ำ และประหยัดต้นทุนในการผลิตมากกว่าสูตรอื่น สูตร B2 จึงถูกเลือกเป็นตำรับตัวแทนเพื่อไปศึกษาในขั้นตอนอื่นต่อไป

4.4.3 การศึกษาปริมาณสารลดแรงตึงผิวร่วมในตำรับ

ปรับเปลี่ยนปริมาณสารลดแรงตึงผิวดังแต่ร้อยละ 20 ถึง 50 โดยน้ำหนัก พบว่าหากปริมาณสารลดแรงตึงผิวร่วมมากขึ้นส่งผลให้ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยของนาโนอิมัลชันเพิ่มขึ้นตามลำดับ สูตรตำรับ C1 ที่มีสารลดแรงตึงผิวร่วม (ethanol) ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตั้งตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน (ตารางที่ 4.24) เนื่องจากได้ตำรับที่มีขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยเล็กกว่าเมื่อเทียบกับสูตร C2 และ C3 เมื่อทดลองใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวร่วม ร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก พบว่าขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยที่ได้ใกล้เคียงกับสูตร C3 ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยในการนำตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานไปใช้จึงเลือกตำรับที่ใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ไม่สูงจนเกินไป

ตารางที่ 4.24 การศึกษาปริมาณของ ethanol ในตำรับ

สูตร	ปริมาณ ethanol (ร้อยละ/โดยน้ำหนัก)	ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โฟเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
C1	20	62.05±0.85	0.14±0.01	-8.65±0.25	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
C2	30	86.42±1.11	0.15±0.01	-7.52±0.30	สีขาวขุ่น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
C3	40	279.82±3.90	0.27±0.03	-5.44±0.35	สีขาวขุ่น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
C4	50	329.07±5.00	0.38±0.04	-4.66±0.43	สีขาวขุ่น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.25 สูตรตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน

สารที่ใช้	ปริมาณสาร (ร้อยละ/โดยน้ำหนัก)
Coconut oil	1
Cremophor® RH40	4
Ethanol	20
DI water	75

จากตารางที่ 4.25 แสดงผลปริมาณสารที่ใช้ในสูตรตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน โดยสารที่ใช้ มีดังนี้ coconut oil ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก, Cremophor® RH40 ร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก, ethanol ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และ DI water ร้อยละ 75 โดยน้ำหนัก พบว่าลักษณะทางกายภาพ คือ โปร่งแสงเหลืองฟ้า มีความคงตัวดี ไม่เกิดการแยกชั้น และมีขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด คือ ไม่เกิน 500 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.26 สูตรตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี

สารที่ใช้	ปริมาณสาร (ร้อยละ/โดยน้ำหนัก)
Coconut oil	1
Cremophor® RH40	4
Ethanol	20
L-ascorbic acid	1
DI water	74

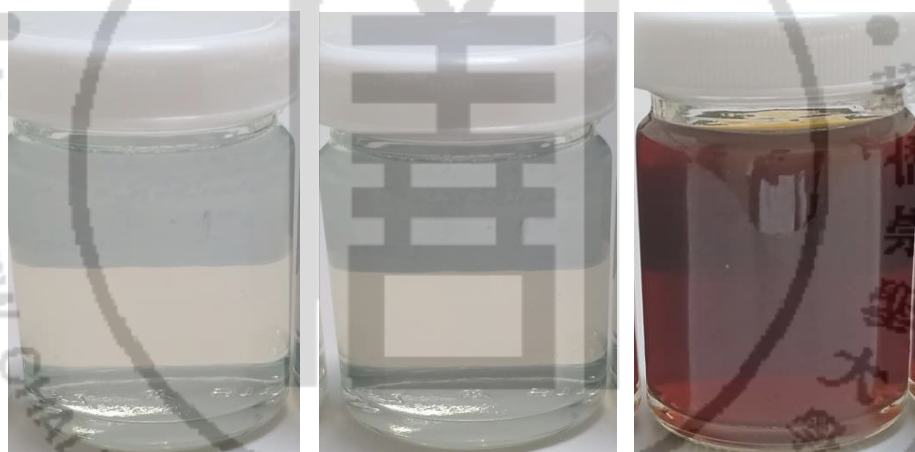
จากตารางที่ 4.26 แสดงผลปริมาณสารที่ใช้ในสูตรตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี โดยสารที่ใช้ มีดังนี้ coconut oil ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก, Cremophor® RH40 ร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก, ethanol ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก, DI water ร้อยละ 74 โดยน้ำหนัก และ L-ascorbic acid ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก (Positive control) พบว่าลักษณะทางกายภาพ คือ โปร่งแสงเหลืองฟ้า มีความคงตัวดี ไม่เกิดการแยกชั้น และมีขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด คือ ไม่เกิน 500 นาโนเมตร

4.5 การเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

4.5.1 การศึกษาตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

คัดเลือกสูตรตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานจากข้อ 4.4 ที่มีความคงตัวมาศึกษาต่อโดยการเติมสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก หรือในอัตราส่วน 0.5:0.5 เตรียมด้วยเทคนิค spontaneous emulsification ลักษณะปรากฏทางกายภาพของนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นสารละลายใส สีน้ำตาลดำของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ ไม่แยกชั้น ดังภาพที่ 4.19 ไม่รู้สึกเหนอะหนะหลังจากทาบนผิวหนัง และกระจายตัวดีเวลาทาบนผิวหนัง

ภาพที่ 4.19 ตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน (ซ้าย) ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (กลาง) และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ (ขวา)



โดยขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย ค่าการกระจาย (PI) และค่าซีต้าโพเทนเชียล แสดงดังตารางที่ 4.27 ซึ่งขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 60.57-78.77 นาโนเมตร ซึ่งขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยทุกตำรับอยู่ในเกณฑ์การคัดเลือก คือไม่เกิน 500 นาโนเมตร ค่า PI เป็นค่าที่บอกการกระจายขนาดหยดอนุภาค ผลการทดลองพบว่า ค่า PI อยู่ในช่วง 0.23-0.27 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 1 แสดงว่าอนุภาคนาโนอิมัลชันที่เตรียมได้มีการกระจายที่ดี (40) ค่าซีต้าโพเทนเชียลช่วยในการทำนายความคงตัวของกายภาพของระบบคอลลอยด์ (41), (42) ค่าซีต้าโพเทนเชียลที่ได้อยู่ในช่วง -10.99 ถึง -33.43 mV แสดงว่าอนุภาคนาโนอิมัลชันของทุกตำรับมีประจุลบ

ตารางที่ 4.27 การประเมินขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย ค่าการกระจายเฉลี่ย (PI) ค่าซีต้าโพเทนเชียลเฉลี่ย ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่า IC₅₀ เฉลี่ย (DPPH) ของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

สูตร	สารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ (ร้อยละ/โดยน้ำหนัก)	ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้าโพเทนเชียลเฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)±SD	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml) ±SD
F1	0.5	67.87±0.67	0.26±0.01	-11.66±0.52	4.55±0.01	52.07±0.01
F2	1	60.57±0.12	0.27±0.03	-33.43±0.64	6.12±0.01	7.13±0.01
F3	2	78.77±0.58	0.23±0.01	-10.99±0.47	5.51±0.01	16.27±0.01

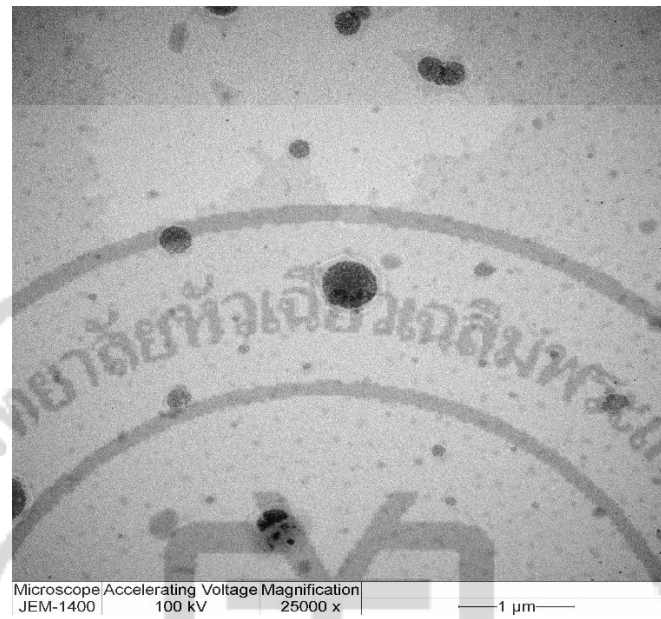
หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.28 สูตรตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

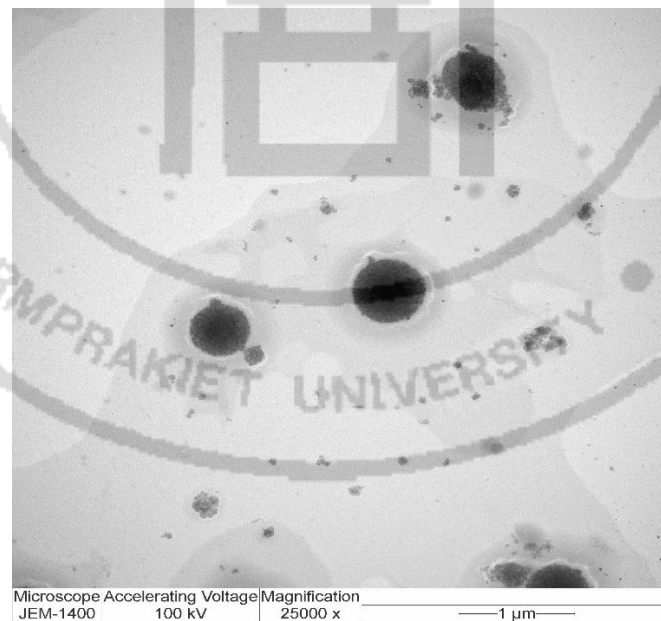
สารที่ใช้	ปริมาณสาร (ร้อยละ/โดยน้ำหนัก)
Coconut oil	1
Cremophor® RH40	4
Ethanol	20
สารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ	1
DI water	74

จากตารางที่ 4.28 แสดงผลปริมาณสารที่ใช้ในสูตรตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟโดยสารที่ใช้ มีดังนี้ coconut oil ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก, Cremophor® RH40 ร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก, ethanol ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก, DI water ร้อยละ 74 โดยน้ำหนัก และสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก พบว่าลักษณะทางกายภาพ คือ เป็นสารละลายใส สีนํ้าตาลดำของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ มีความคงตัวดี ไม่เกิดการแยกชั้น ไม่รู้สึกเหนอะหนะหลังจากทาบนผิวหนัง และกระจายตัวดีเวลาทาบนผิวหนัง และมีขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด คือ ไม่เกิน 500 นาโนเมตร

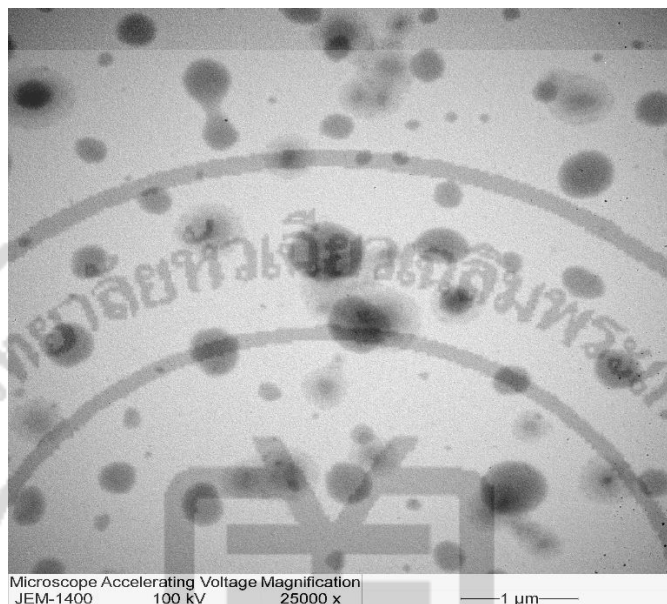
ภาพที่ 4.20 ลักษณะนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



ภาพที่ 4.21 ลักษณะนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



ภาพที่ 4.22 ลักษณะนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



จากภาพที่ 4.20-4.22 แสดงลักษณะโครงสร้างนาโนอิมัลชันที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าทั้ง 3 ตำรับ ได้แก่ ตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ มีลักษณะคล้ายกันคือ เป็นหยดของเหลวทรงกลมมีขนาดเล็กกว่า 500 นาโนเมตร ถูกล้อมรอบด้วยชั้นของสารลดแรงตึงผิวที่เกิดจากการใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในปริมาณสูง ดังภาพที่ 4.20 และ 4.21 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ciotti, S., et al. (2009) (43) ที่ได้เตรียมนาโนอิมัลชันผสม Benzyl Peroxide

4.6 การทดสอบความคงตัว

4.6.1 การประเมินความคงตัวทางกายภาพ

ในการทดสอบความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ ผู้วิจัยจึงเลือกตำรับที่มี coconut oil ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก, Cremophor® RH40 (สารลดแรงตึงผิว) ร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก, ethanol (สารลดแรงตึงผิวร่วม) ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก, L-ascorbic acid ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก สารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก หรือในอัตราส่วน 0.5:0.5 และน้ำ มาศึกษาที่อุณหภูมิห้อง (room temperature), อุณหภูมิ 45 °C และ

อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน เพื่อเป็นการยืนยันผลการคัดเลือกตัวรับที่สามารถจะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ตารางที่ 4.29 การประเมินความคงตัวของทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ลำดับที่	ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้าโพเทนเชียลเฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
2	61.45±0.32	0.15±0.01	-8.51±0.27	6.50±0.34	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
4	64.49±0.27	0.16±0.01	-8.24±0.20	6.32±0.14	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
6	62.31±0.19	0.17±0.02	-8.47±0.32	6.60±0.21	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
8	62.54±0.21	0.18±0.01	-8.81±0.15	6.48±0.43	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
10	64.46±0.31	0.19±0.01	-8.53±0.39	6.53±0.15	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
18	69.39±0.20	0.21±0.06	-8.31±0.10	6.62±0.31	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
20	72.28±0.17	0.22±0.01	-6.52±0.29	6.28±0.17	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
22	86.23±0.13	0.23±0.02	-6.27±0.21	6.23±0.13	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
24	94.31±0.32	0.27±0.01	-6.60±0.24	6.31±0.32	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.30 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
2	62.54±0.21	0.15±0.01	-8.81±0.15	2.82±0.06	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
4	65.43±0.94	0.16±0.02	-8.51±0.27	2.71±0.11	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
6	65.80±0.54	0.17±0.02	-8.47±0.32	2.64±0.13	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
8	68.82±0.55	0.17±0.02	-8.41±0.34	2.53±0.15	โปร่งแสง เหลืองเหลืองอ่อน มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
10	69.05±0.84	0.18±0.02	-6.52±0.29	2.48±0.43	โปร่งแสง เหลืองเหลืองอ่อน มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
18	96.73±0.90	0.22±0.01	-4.79±0.51	2.47±0.21	โปร่งแสง เหลืองเหลืองเข้ม มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
20	100.27±0.89	0.24±0.01	-2.41±0.15	2.32±0.14	โปร่งแสง เหลืองเหลืองเข้ม มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

สัปดาห์	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
22	109.02±0.85	0.25±0.02	-1.96±0.54	2.28±0.17	โปร่งแสง เหวี่ยงเหวี่ยงเข็ม มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
24	198.20±0.81	0.26±0.03	-1.69±0.24	2.23±0.18	โปร่งแสง เหวี่ยงเหวี่ยงเข็ม มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.31 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่าง
กระชายและกาแพที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH) ±SD	ลักษณะทางกายภาพ
2	62.31±0.19	0.16±0.03	-30.63±0.25	5.73±0.22	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ ของสารสกัดผสมระหว่าง กระชายและกาแพ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
4	62.93±0.19	0.16±0.01	-30.57±0.32	5.54±0.37	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ ของสารสกัดผสมระหว่าง กระชายและกาแพ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

สปีดาร์ท	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
6	64.46±0.31	0.19±0.01	-30.41±0.34	5.32±0.14	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ ของสารสกัดผสมระหว่าง กระชายและกาแพ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
8	67.70±0.59	0.21±0.01	-20.81±0.15	5.28±0.33	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ ของสารสกัดผสมระหว่าง กระชายและกาแพ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
10	68.03±0.69	0.22±0.01	-20.52±0.22	5.19±0.25	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ ของสารสกัดผสมระหว่าง กระชายและกาแพ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
18	71.12±0.59	0.22±0.01	-20.41±0.15	5.18±0.12	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ ของสารสกัดผสมระหว่าง กระชายและกาแพ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
20	98.85±0.76	0.22±0.01	-10.63±0.22	5.16±0.20	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ ของสารสกัดผสมระหว่าง กระชายและกาแพ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
22	108.33±0.76	0.24±0.01	-10.48±0.31	4.48±0.43	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ ของสารสกัดผสมระหว่าง กระชายและกาแพ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

สัปดาห์	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ต่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
24	112.00±0.95	0.27±0.02	-10.39±0.33	4.31±0.21	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ ของสารสกัดผสมระหว่าง กระชายและกาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.32 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ต่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
2	81.49±0.27	0.16±0.01	-6.51±0.27	5.72±0.23	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
4	86.43±0.70	0.17±0.01	-6.47±0.32	5.64±0.13	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
6	87.17±0.85	0.17±0.02	-6.41±0.34	5.48±0.43	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
8	90.39±0.20	0.18±0.01	-4.81±0.15	5.32±0.14	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
10	90.50±0.75	0.19±0.01	-4.21±0.14	5.09±0.09	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
18	91.58±0.95	0.22±0.01	-4.11±0.10	4.63±0.34	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
20	117.55±0.92	0.27±0.02	-2.63±0.22	4.57±0.26	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

ลำดับ	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
22	121.28±0.85	0.28±0.01	-2.52±0.29	4.47±0.21	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
24	123.62±0.94	0.28±0.01	-2.45±0.33	4.28±0.17	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.33 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ลำดับ	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
2	62.54±0.21	0.14±0.02	-4.63±0.22	2.75±0.03	โปร่งแสง เหลืองเหลืองอ่อน กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
4	63.55±0.78	0.15±0.02	-4.57±0.32	2.65±0.08	โปร่งแสง เหลืองเหลืองอ่อน กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
6	65.43±0.94	0.16±0.02	-4.41±0.34	2.64±0.13	โปร่งแสงเหลืองส้มอ่อน มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
8	70.95±0.89	0.17±0.02	-2.81±0.15	2.48±0.43	โปร่งแสงเหลืองส้มอ่อน มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

ลำดับที่	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
10	89.45±0.65	0.20±0.02	-2.51±0.37	2.47±0.26	โปร่งแสง เหลืองเข้ม มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
18	90.03±0.88	0.22±0.01	-2.41±0.15	2.42±0.29	โปร่งแสงเหลืองส้มเข้ม มีตะกอน กระจายตัวดี มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น
20	104.53±0.95	0.24±0.01	-1.48±0.31	2.28±0.17	โปร่งแสงเหลืองส้มเข้ม มีตะกอน กระจายตัวดี มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น
22	108.13±0.37	0.25±0.01	-1.40±0.25	2.23±0.18	โปร่งแสงเหลืองส้มเข้ม มีตะกอน กระจายตัวดี มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น
24	109.02±0.85	0.25±0.02	-1.05±0.02	2.15±0.04	โปร่งแสงเหลืองส้มเข้ม มีตะกอน กระจายตัวดี มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.34 การประเมินความคงตัวของตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่าง
กระชายและกาแฟที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
2	60.93±0.97	0.12±0.01	-20.51±0.27	4.64±0.13	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
4	65.49±0.27	0.17±0.01	-20.47±0.32	4.58±0.25	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
6	70.28±0.19	0.18±0.01	-20.41±0.34	4.48±0.43	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
8	81.53±0.83	0.22±0.01	-10.81±0.15	4.32±0.14	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
10	82.10±0.97	0.22±0.01	-10.36±0.38	3.76±0.23	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
18	90.50±0.75	0.23±0.01	-10.21±0.14	3.69±0.16	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
20	95.48±0.34	0.23±0.01	-5.67±0.35	3.63±0.34	สารละลายใส สีน้ำตาลดำเข้มข้นของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
22	104.38±0.57	0.25±0.01	-5.63±0.22	3.47±0.21	สารละลายใส สีน้ำตาลดำเข้มข้นของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

สัปดาห์	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
24	107.55±0.92	0.27±0.02	-5.52±0.29	3.28±0.17	สารละลายใส สีน้ำตาลดำเข้มข้นของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.35 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
2	62.12±0.42	0.16±0.01	-8.81±0.15	6.62±0.31	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
4	64.95±0.65	0.17±0.01	-8.66±0.21	6.60±0.21	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
6	69.39±0.20	0.17±0.02	-8.57±0.31	6.53±0.38	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
8	72.28±0.17	0.18±0.01	-8.51±0.37	6.38±0.17	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
10	75.50±0.34	0.18±0.01	-8.47±0.32	6.37±0.12	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
18	84.10±0.79	0.19±0.01	-8.45±0.33	6.36±0.22	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
20	86.23±0.13	0.22±0.01	-8.41±0.34	6.32±0.14	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

ลำดับ	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
22	91.42±0.90	0.23±0.02	-7.63±0.22	6.28±0.17	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
24	96.31±0.32	0.26±0.02	-7.41±0.15	6.13±0.23	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.36 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ลำดับ	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
2	68.82±0.55	0.14±0.02	-8.51±0.27	2.71±0.11	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
4	69.05±0.84	0.15±0.01	-8.41±0.34	2.64±0.26	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
6	71.00±0.95	0.16±0.01	-7.81±0.15	2.64±0.13	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
8	71.20±0.88	0.16±0.01	-6.52±0.29	2.56±0.19	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
10	72.15±0.35	0.16±0.03	-6.39±0.34	2.52±0.23	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
18	72.18±0.75	0.17±0.02	-5.43±0.39	2.48±0.43	โปร่งแสงเหลืองฟ้า มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

สัปดาห์	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
20	73.30±0.93	0.18±0.02	-4.56±0.27	2.47±0.21	โปร่งแสงเหลืองฟ้า มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
22	96.73±0.90	0.22±0.03	-3.47±0.32	2.32±0.14	โปร่งแสงเหลืองฟ้า มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
24	104.57±0.90	0.26±0.01	-3.40±0.24	2.28±0.17	โปร่งแสงเหลืองฟ้า มีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.37 การประเมินความคงตัวของตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่าง
กระชายและกาแฟที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
2	70.12±0.99	0.19±0.01	-30.57±0.32	5.73±0.22	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
4	70.70±0.82	0.22±0.01	-30.41±0.34	5.63±0.33	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
6	82.03±0.94	0.23±0.01	-30.29±0.22	5.49±0.31	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

สัปดาห์	ขนาดหยด อนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้า โพเทนเชียล เฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
8	98.85±0.76	0.23±0.04	-28.81±0.15	5.48±0.43	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
10	108.33±0.76	0.23±0.05	-25.67±0.31	5.44±0.19	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
18	109.63±0.89	0.24±0.01	-25.48±0.31	5.32±0.14	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
20	112.00±0.95	0.25±0.04	-25.44±0.31	5.28±0.33	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
22	112.65±0.77	0.26±0.01	-20.63±0.22	5.18±0.12	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
24	128.47±0.81	0.27±0.02	-20.59±0.28	5.16±0.20	สารละลายใส สีน้ำตาลดำของ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแฟ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.29-4.37 พบว่าที่อุณหภูมิ 4 °C ตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟมีความคงตัวดี ไม่เกิดการแยกชั้น แต่ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) จะมีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น เมื่อตรวจวัดขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์พบว่าขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนอุณหภูมิห้อง (room temperature) ตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) และ

ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟมีความคงตัวดี ไม่เกิดการแยกชั้น แต่ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) จะมีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น และสีเปลี่ยนแปลงจากโปร่งแสงเหลืองฟ้า เป็นโปร่งแสงเหลืองเหลืองเข้ม เมื่อตรวจวัดขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์พบว่า ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) และอุณหภูมิ 45 °C ตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟมีความคงตัวดี ไม่เกิดการแยกชั้น แต่ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟมีสีน้ำตาลดำของสารสกัดที่เข้มข้น ส่วนตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) จะมีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น เกิดการตกตะกอน และสีเปลี่ยนแปลงจากโปร่งแสงเหลืองฟ้า เป็นโปร่งแสงเหลืองส้มเข้ม เมื่อตรวจวัดขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์พบว่า ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟไม่คงสภาพในอุณหภูมิ 45 °C ดังนั้นการเก็บรักษาจึงควรเก็บผลิตภัณฑ์นาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟในอุณหภูมิต่ำๆ เพื่อรักษาความคงตัวของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ

ตารางที่ 4.38 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ

รอบ	ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้าโพเทนเชียลเฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
1	64.22±0.89	0.17±0.01	-7.31±0.37	5.59±0.33	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
6	71.75±0.96	0.21±0.01	-5.66±0.06	4.69±0.26	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.39 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ

รอบ	ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้าโพเทนเชียลเฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
1	68.87±0.60	0.14±0.01	-3.30±0.24	2.46±0.24	โปร่งแสงเหลืองฟ้า กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
6	114.48±0.74	0.23±0.02	-1.21±0.28	4.69±0.26	โปร่งแสง เหลืองเหลืองอ่อน กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.40 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ

รอบ	ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย (nm)±SD	PI เฉลี่ย ±SD	ค่าซีต้าโพเทนเชียลเฉลี่ย (mV)±SD	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)±SD	ลักษณะทางกายภาพ
1	73.73±0.75	0.14±0.03	-30.62±0.16	5.39±0.07	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ ของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น
6	108.23±0.98	0.26±0.02	-25.44±0.30	4.86±0.18	สารละลายใส สีน้ำตาลดำ เข้มขึ้นของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ กระจายตัวดี ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

การทดสอบความคงสภาพโดยวิธีเร่งเป็นการทดสอบในสภาวะร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) จำนวน 6 รอบ โดยนำตัวอย่างมาบรรจุลงในขวดแก้วสีชาปิดฝาให้สนิท นำขวดนาโนอิมัลชันใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คิดเป็น 1 รอบ ทำสลับกันจนครบ 6 รอบ พบว่าตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟมีความคงตัวดี ไม่เกิดการแยกชั้น แต่ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟมีสีน้ำตาลดำของสารสกัดที่เข้มข้น ส่วนตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) จะมีกลิ่นของสารที่แรงขึ้น และสีเปลี่ยนแปลงจากโปร่งแสงเหลืองป้า เป็นโปร่งแสงเหลืองอ่อน เมื่อตรวจวัดขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยพบว่า ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้อ 4.6.1 ที่พบว่าเมื่อตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C ตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนสี แสดงว่าเมื่อตัวอย่างถูกย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ 45 °C สารสำคัญในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟที่ไม่ทนความร้อนจึงเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็นชนิดอื่นได้ ทำให้ตำรับที่ได้มีสีน้ำตาลดำของสารสกัดที่เข้มข้น ดังนั้นอุณหภูมิจึงมีผลต่อความคงสภาพของตำรับนาโนอิมัลชัน แสดงดังตารางที่ 4.38-4.40

4.6.2 การประเมินความคงตัวทางเคมี

ทดสอบความคงตัวทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟโดยศึกษาที่อุณหภูมิห้อง (room temperature), อุณหภูมิ 45 °C และอุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน และวิธีเร่งเป็นการทดสอบในสภาวะร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) จำนวน 6 รอบ โดยทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ตารางที่ 4.41 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
2	108.01±0.01
4	110.22±0.01
6	112.43±0.01
8	114.77±0.01
10	116.56±0.01
18	132.24±0.01
20	134.15±0.01
22	138.98±0.01
24	140.82±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.42 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
2	5.46±0.01
4	7.23±0.01
6	10.84±0.01
8	12.56±0.01
10	16.29±0.01
18	25.43±0.01
20	27.38±0.01
22	30.14±0.01
24	35.42±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.43 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่าง กระชายและกาเพที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
2	6.96±0.01
4	7.09±0.01
6	9.44±0.01
8	11.85±0.01
10	13.92±0.01
18	31.36±0.01
20	35.06±0.01
22	39.12±0.01
24	45.83±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.44 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
2	115.21±0.01
4	119.48±0.01
6	123.81±0.01
8	127.77±0.01
10	135.60±0.01
18	180.49±0.01
20	185.66±0.01
22	192.68±0.01
24	200.51±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.45 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
2	8.72±0.01
4	16.01±0.01
6	24.51±0.01
8	28.45±0.01
10	33.49±0.01
18	42.71±0.01
20	48.58±0.01
22	52.14±0.01
24	60.17±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.46 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันมีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
2	14.22±0.01
4	20.36±0.01
6	26.03±0.01
8	34.42±0.01
10	39.25±0.01
18	45.30±0.01
20	49.22±0.01
22	55.84±0.01
24	60.17±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.47 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
2	102.14±0.01
4	106.57±0.01
6	108.63±0.01
8	112.44±0.01
10	116.80±0.01
18	122.95±0.01
20	127.09±0.01
22	130.52±0.01
24	136.75±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.48 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
2	4.27±0.01
4	6.54±0.01
6	9.19±0.01
8	13.37±0.01
10	15.48±0.01
18	20.39±0.01
20	24.80±0.01
22	27.51±0.01
24	32.65±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.49 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันมีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน

สัปดาห์	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
2	7.13±0.01
4	10.19±0.01
6	13.44±0.01
8	15.72±0.01
10	17.36±0.01
18	21.66±0.01
20	26.28±0.01
22	34.23±0.01
24	40.67±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

โดยผลดังตารางที่ 4.41-4.49 พบว่าที่อุณหภูมิ 4 °C และอุณหภูมิห้อง (room temperature) ตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเล็กน้อย ส่วนอุณหภูมิ 45 °C ตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงมาก จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพไม่คงสภาพในอุณหภูมิ 45 °C ดังนั้นการเก็บรักษาจึงควรเก็บผลิตภัณฑ์นาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพในอุณหภูมิต่ำๆ เพื่อรักษาความคงตัวของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ

ตารางที่ 4.50 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ

รอบ	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
1	114.73±0.01
6	180.39±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.51 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซีที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ

รอบ	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
1	9.62±0.01
6	59.83±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

ตารางที่ 4.52 การประเมินความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันมีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) 6 รอบ

รอบ	IC ₅₀ เฉลี่ย (µg/ml)
1	15.56±0.01
6	65.28±0.01

หมายเหตุ : วัดซ้ำ 6 ซ้ำ

การทดสอบความคงสภาพโดยวิธีเร่งเป็นการทดสอบในสภาวะร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) จำนวน 6 รอบ โดยนำตัวอย่างมาบรรจุลงในขวดแก้วสีชาปิดฝาให้สนิท นำขวดนาโนอิมัลชันใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คิดเป็น 1 รอบ ทำสลับกันจนครบ 6 รอบ พบว่าตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) และตำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้อ 4.6.1 ที่พบว่าเมื่อตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C ตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนสี แสดงว่าเมื่อตัวอย่างถูกย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ 45 °C สารสำคัญในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่ไม่ทนความร้อนจึงเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็นชนิดอื่นได้ ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงมาก ดังนั้นอุณหภูมิจึงมีผลต่อความคงตัวของสารสำคัญในตำรับนาโนอิมัลชันแสดงดังตารางที่ 4.50-4.52

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกระชายที่เตรียมโดยวิธี ultrasonic extraction และ maceration และแต่ละวิธีใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ 50% ethanol, 80% ethanol, absolute ethanol และ acetone โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรืออาหารเสริมสุขภาพนั้นพบว่า 80% ethanol เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมเนื่องจากให้ร้อยละของน้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักผงกระชาย (%yield) สูงทั้งวิธี ultrasonic extraction และ maceration โดยสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol วิธี ultrasonic extraction ให้ %yield มากที่สุดเท่ากับ 16.08% ตามด้วยสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol วิธี maceration ให้ % yield เท่ากับ 15.76% ในขณะที่ absolute ethanol จัดเป็นตัวทำละลายที่ให้ %yield ต่ำสุดทั้งวิธี ultrasonic extraction และ maceration และให้ %yield เท่ากับ 1.79 และ 4.73 ตามลำดับ

ผลการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกระชายซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันพบว่า 80% ethanol เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดฟีนอลิกรวมได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นๆ และใช้วิธีสกัดเดียวกัน โดยผงกระชายที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด คือ 81.62 ± 2.61 mg GAE/g extract รองลงมาเป็นสารที่สกัดด้วยวิธี maceration ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 79.52 ± 3.29 mg GAE/g extract ส่วนสารสกัดกระชายที่ใช้ตัวทำละลาย acetone และสกัดด้วยวิธี maceration ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมต่ำสุดเท่ากับ 38.47 ± 0.92 mg GAE/g extract

เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายแบบต่างๆ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน คือ สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic extraction และใช้ 80% ethanol เป็นตัวทำละลาย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยมีค่า IC_{50} จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay น้อยที่สุดเท่ากับ 50.18 และ 848.17 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

จากผลการวิจัยข้างต้นจึงคัดเลือกสารสกัดกระชายที่สกัดด้วย 80% ethanol และใช้วิธี ultrasonic extraction มาใช้ในการศึกษาความคงตัวต่อไป เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด แม้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจะมีปริมาณไม่มากนัก เพราะองค์ประกอบฟลาโวนอยด์หลายชนิดในสารสกัดกระชายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน และฟลาโวนอยด์บางชนิดไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเลย (2,32)

ในการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกาแฟที่เตรียมโดยวิธี ultrasonic extraction และ maceration และแต่ละวิธีใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ 50% ethanol, 80% ethanol, absolute ethanol และ acetone โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง หรืออาหารเสริมสุขภาพนั้นพบว่า 50% ethanol เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมเนื่องจากให้ร้อยละของน้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักผงกาแฟ (% yield) สูงทั้งวิธี ultrasonic extraction และ maceration โดยสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol วิธี ultrasonic extraction ให้ %yield มากที่สุดเท่ากับ 38.63% ตามด้วยสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol วิธี maceration ให้ %yield เท่ากับ 36.79% ในขณะที่ acetone จัดเป็นตัวทำละลายที่ให้ %yield ต่ำสุดทั้งวิธี ultrasonic extraction และ maceration และให้ %yield ที่เท่ากัน คือ 10.37

ผลการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกาแฟซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันพบว่า 50% ethanol เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดฟีนอลิกรวมได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นๆ และใช้วิธีสกัดเดียวกัน โดยผงกาแฟที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด คือ 75.24 ± 1.53 mg GAE/g extract รองลงมาเป็นสารที่สกัดด้วยวิธี maceration ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 73.17 ± 1.62 mg GAE/g extract ส่วนสารสกัดกาแฟที่ใช้ตัวทำละลาย acetone และสกัดด้วยวิธี maceration ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมต่ำสุดเท่ากับ 53.65 ± 1.52 mg GAE/g extract

เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาแฟแบบต่างๆ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน คือ สารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic extraction และใช้ 50% ethanol เป็นตัวทำละลาย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยมีค่า IC_{50} จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay น้อยที่สุดเท่ากับ 56.18 และ 920.81 μ g/mL ตามลำดับ

จากผลการวิจัยข้างต้นจึงคัดเลือกสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วย 50% ethanol และใช้วิธี ultrasonic extraction มาใช้ในการศึกษาความคงตัวต่อไป เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

ผู้วิจัยจึงสนใจเลือกสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic โดยใช้ 80% ethanol เป็นตัวทำละลาย และสารสกัดกาแฟที่สกัดด้วยวิธี ultrasonic โดยใช้ 50% ethanol เป็นตัวทำละลาย มาศึกษาโดยเตรียมเป็นสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟ โดยเตรียมสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก หรือในอัตราส่วน 0.5:0.5 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแฟมีลักษณะเป็นสารละลายใส สีน้ำตาลดำ มีกลิ่นหอมผสมกระชายและกาแฟ

ผลการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด คือ 333.26 ± 0.88 mg GAE/g extract

เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน คือ สารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยมีค่า IC_{50} จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay น้อยที่สุด เท่ากับ 44.85 และ 725.72 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

จากผลการวิจัยข้างต้นจึงคัดเลือกสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพมาใช้ในการศึกษา ความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันต่อไป เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

ในการวิจัยครั้งนี้จะเน้นศึกษาส่วนที่เกี่ยวข้องกับส่วนประกอบของตำรับนาโนอิมัลชันที่มีผล ต่อคุณสมบัติทางกายภาพอย่างชัดเจน ได้แก่ coconut oil, Cremophor® RH40 (สารลดแรงตึงผิว), ethanol (สารลดแรงตึงผิวร่วม) จากการศึกษาพบว่า สัดส่วนที่ใช้ทำให้ได้นาโนอิมัลชันที่มีลักษณะ แตกต่างกันดังนี้ ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย, ค่า PI เฉลี่ย, ค่าซีต้าโพเทนเชียลเฉลี่ย และลักษณะทาง กายภาพ จากการทดลองพบว่าการพัฒนาดำรับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแพสามารถเตรียมได้ด้วยวิธี spontaneous emulsification ซึ่งตำรับที่ดีที่สุดประกอบด้วย coconut oil ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก, Cremophor® RH40 (สารลดแรงตึงผิว) ร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก, ethanol (สารลดแรงตึงผิวร่วม) ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก, L-ascorbic acid ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก สารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก หรือในอัตราส่วน 0.5:0.5 และน้ำ โดยมีขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ย 60.57 ± 0.12 นาโนเมตร, PI เฉลี่ย 0.27 ± 0.03 และค่าซีต้าโพเทนเชียล เฉลี่ย -33.43 ± 0.64 mV นอกจากนี้นาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่ เตรียมได้เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) มีลักษณะรูปร่างเป็นทรง กลม โดยตำรับมีความคงตัวดี ไม่เกิดการแยกชั้น ตำรับเป็นสารละลายใส สีน้ำตาลดำของสารสกัด ผสมระหว่างกระชายและกาแพตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือนที่อุณหภูมิ 4 °C และ อุณหภูมิห้อง (room temperature) ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนการเก็บ ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 45 °C ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน และผลการทดสอบความคงสภาพ โดยวิธีเร่งเป็นการทดสอบในสภาวะร้อนสลับเย็น (45 °C และ 4 °C) จำนวน 6 รอบ พบว่าตำรับ มีความไม่คงตัวเกิดขึ้นทำให้สีของตำรับมีสีน้ำตาลดำของสารสกัดที่เข้มข้น แต่ไม่เกิดการแยกชั้น ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย และได้มีการทดลองนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและ กาแพพบว่า ความคงตัวทางกายภาพของนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ มีความคงตัวมากกว่านาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) ในทุกอุณหภูมิ ดังนั้นการเก็บ

รักษาจึงควรเก็บผลิตภัณฑ์นาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพในอุณหภูมิต่างๆ เพื่อรักษาความคงตัวของสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพ จึงกล่าวได้ว่าอุณหภูมิมีผลต่อความคงสภาพของตำรับนาโนอิมัลชัน

การศึกษาความคงตัวทางเคมีโดยทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่านาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่อุณหภูมิ 4 °C และอุณหภูมิห้อง (room temperature) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเล็กน้อย ส่วนการเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 45 °C ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน และผลการทดสอบความคงสภาพโดยวิธีเร่งเป็นการทดสอบในสภาวะร้อนสลับเย็น (45 °C และ 4 °C) จำนวน 6 รอบ พบว่านาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงมาก และได้มีการทดลองนาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับนาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพพบว่า นาโนอิมัลชันที่มีวิตามินซี (Positive control) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่านาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพในทุกอุณหภูมิ แต่ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไม่ต่างกันมาก แสดงว่าเมื่อตัวอย่างถูกย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ 45 °C สารสำคัญในสารสกัดผสมระหว่างกระชายและกาแพที่ไม่ทนความร้อนจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็นชนิดอื่นได้ ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงมาก ดังนั้นอุณหภูมิจึงมีผลต่อความคงตัวทางเคมีของสารสำคัญในตำรับนาโนอิมัลชัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC)
2. ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบการซึมผ่านผิวหนังภายนอก (Franz Diffusion cell) ระหว่างตำรับนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดกระชายและกาแพ เพื่อนำผลการทดลองมาสนับสนุนผลการประเมินประสิทธิภาพในอาสาสมัคร ทำให้งานวิจัยมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น
3. ควรเติมสารเพิ่มความหนืดในวัฏภาคภายนอกให้อยู่ในรูปแบบนาโนอิมัลชันเจล เพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้จริงในอนาคต

บรรณานุกรม

1. รัตนา อินทรานุปกรณ์. สารสกัดจากสมุนไพร การเตรียมและการแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี. พิมพ์ครั้งที่ 1. สมุทรปราการ: โครงการสำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ; 2560.
2. Chahyadi A, Hartati R, Wirasutisna KR, Elfahmia. *Boesenbergia pandurata* Roxb, An Indonesian medicinal plant: phytochemistry, biological activity, plant biotechnology. *ProcediaChem* 2014; 13: 13-37.
3. สุคันธรส ธาดากิตติสาร. การผลิตสารออกฤทธิ์จากกระชายเหลืองสำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อผิวขาว. ห้องสมุดงานวิจัยสำหรับสาธารณะ [อินเทอร์เน็ต]. 2017. [เข้าถึงเมื่อ 16 กันยายน 2561]; เข้าถึงได้จาก: http://www.thai-explore.net/search_detail/result/3367.
4. สมศักดิ์ วรรณศิริ. การปลูกกาแฟ. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร. มิตรสยาม; 2545.
5. Rafael C.E. Dias and Marta de T. Benassi. Discrimination between Arabica and Robusta Coffees Using Hydrosoluble Compounds: Is the Efficiency of the Parameters Dependent on the Roast Degree?. *Beverages Journal*. ISSN 2306-5710. 1; 2015. 127-139.
6. Worranan Rangsimawong and Tanasit Ngawhirunpat. Nanoemulsions In Transdermal Drug Delivery System: Pharmaceutical Development of Green Innovations Group (PDGIG), Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University. *TBPS J*. 9 (2); 2014: 46-61.
7. Al-Edresi, S., Adna, A., Mohammad, R., Farhan J., Zeenat, I., Roop, K., Khar, M., Talegaonkar, S. and Baie, S. Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. *AAPS Pharm Sci Tech*. Mar: 10(1); 2009. 69–76.
8. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. กระชาย. [เข้าถึงเมื่อ 25 กรกฎาคม 2562]; เข้าถึงได้จาก: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=3>.
9. ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กาแฟ. [เข้าถึงเมื่อ 13 มกราคม 2564]; เข้าถึงได้จาก: [www.http://www.anatomy.dent.chula.ac.th/coffee.html](http://www.anatomy.dent.chula.ac.th/coffee.html).

บรรณานุกรม (ต่อ)

10. Joseph, S.G. ประโยชน์ของกาแฟ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ดวงกมลพับลิชชิ่ง; 2554. 17-20.
11. Shindo K, Kato M, Kinoshita A, Kobayashi A, Koike A. Analysis of antioxidant activities contained in the *Boesenbergia pandurata* Schult. Rhizome. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006;70: 2281-2284.
12. Panthong A, Tassaneeyakul W, Kanjanapothi D, Tantiwachwuttikul P and Reutrakul V. Anti-inflammatory activity of 5,7-dimethoxyflavone. Planta Med. 1989;55 (2):133-136.
13. Thongsorn C, Davidson PM, Mahakarnchanakul W, Vibulsreth P. Antimicrobial Effect of Thai spice against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* DT104. J Food Prot. 2005;68(10): 2054-2058.
14. Cheenpracha S, Karalai C, Ponglimanont C, Subhadhirasakul S, Tewtrakul S. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. Bioorg Med Chem. 2006;14 (6):1710-1714.
15. Food Network Solution. โครงสร้างคาเฟอีน. [เข้าถึงเมื่อ 30 ตุลาคม 2561]; เข้าถึงได้จาก: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/4088/caffeine%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B9%81%E0%B8%9F%E0%B8%AD%E0%B8%B5%E0%B8%99>
16. จารนัย พนิชชกุล, วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, เพ็ญพร พงษ์พรรณเจริญ, รัตนนันท์ พรรณนารุโณทัย, นฤมล วิมลเกษม และวิมลรัตน์ สุภกิจกาญจนา. สารพันความรู้เกี่ยวกับอาหารเพื่อสุขภาพและความงาม ตอนที่ 1 โพลีฟีนอล: สารต่อต้านออกซิเดชัน. วารสารจาร์พา : Food & Health; 2007.
17. ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง. ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี; 2549.
18. อัญชานา เจนวิถีสุข. แอนติออกซิเดนท์สารต้านมะเร็งในผักสมุนไพรไทย. เชียงใหม่. นพบุรีการพิมพ์; 2545.
19. Capek, I. Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. Adv Colloid Interface Sci. Jun 30: 110 (1-2); 2004. 49-74.

บรรณานุกรม (ต่อ)

20. Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E. and Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm.* Aug 6: 280 (1-2); 2004. 41-51.
21. Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. and Solans, C. Formation and Stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*; 2004. 108-109, 303-318.
22. Thierry, F.V., Klymchenko, A.S., Roger, E., Shulov, I., Vermot, J., Mely, Y. and Anton, N. Highly lipophilic fluorescent dyes in nano-emulsions: towards bright non-leaking nano-droplets. *RSC Adv.* Oct 29: 2(31); 2010 876-886.
23. Suwimon Ariyaprakai. Nanoemulsion Production by Simple and Low Energy Method *Food and Applied Bioscience Journal*; 2017, 5(3): 155-164.
24. Liu Y, Zou L, Ma L, Chen WH, Wang B and Xu ZL. Synthesis and pharmacological activities of xanthone derivatives as alpha-glucosidase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 14 (16): 56; 2006. 83-90.
25. เกษร จันท์ศิริ. อิมัลชันทางเภสัชกรรม. นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2549.
26. Gasco, M.R, Trotta M, Morel S, Dasco R. Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine from o/w microemulsion. *Pharmazie*, 1997; 52 (1): 50-53.
27. ดวงมล เรืองงาม. การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ: เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าทหารลาดกระบัง; 2557. 122-125
28. ธนศักดิ์ แซ่เลี้ยว, ศศิธร จันทนวรารังกูร และวรรณิ จิรภาคย์กุล. ผลของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันของกระชายเหลือง (*Boesenbergia pandurata*). การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 46; 2551; มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
29. พิชญา ฤทธิ์เจริญ. การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายเหลือง กระชายแดง และกระชายดำ. [วิทยานิพนธ์]. เชียงราย: มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง; 2560.

บรรณานุกรม (ต่อ)

30. จิรัชญา ศิริรัตน์ และวลัยพร ปัญญาแจ้งสกุล. การศึกษาปริมาณแคฟเฟอีนในเครื่องดื่มชากาแฟสำเร็จรูปพร้อมดื่ม โดยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมตรี และวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา; 2543. 47-51.
31. Belay, A., Ture, K., Redi, M. & Asfaw, A. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/visible spectrometer. Food Chemistry; 2008. 310-315.
32. Ploypradub, C., Cheamsuphakit, B. & Punbusayakul, N. Antioxidant properties of different parts of arabica coffee berry and spent coffee ground. Agricultural Science Journal; 2010. 577-580.
33. ณพัชรอร บัวฉุน และเยาวนารถ งามนนท์. ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 (พฤษภาคม-สิงหาคม). วารสารวิจัยและพัฒนาวิจัยลดผลกระทบ ในพระบรมราชูปถัมภ์. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2561; 74-85.
34. Siddiqui N, Rauf A, Latif A, Mahmood Z. Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). J Taibah Univ Sci 2017; 12(4): 360-363.
35. Ahmad R, Ali AM, Israf DA, Ismail NH, Shaari K, Lajis NH. Antioxidant, radical scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extract of some *Hedyotis* species. Life Science. 2005; 76: 1953-1964.
36. พิษญา ลักษณะวิลาศ. ชนิดและปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลือง และกระชายดำที่ศึกษาเทคนิค Label-free LC-MS/MS. [วิทยานิพนธ์]. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2558.
37. Porras, M., Solans, C., Gonza'lez, C., Mart'inez, A., Guinart, A., Gutierrez, J.M. Studies of formation of W/O nanoemulsions. Colloid Surf. A 249; 2004. 115-118.
38. European Pharmacopoeia 7.0. fourth edition. Volume 1; 2002. 1964-1966.
39. Baret, J.C., Kleinschmid, F., El Harrak, A. and Griffiths, A.D. "Kinetic aspects of emulsion stabilization by surfactants : a microfluidic analysis" Lagmuir. 11; 2009. 6088-6093.
40. Al-Edresi, S. and Baie, S. "Formulation and stability of whitening VCO-in-water nano-cream" International Journal of Pharmaceutics. 373; 2009. 174-178.

บรรณานุกรม (ต่อ)

41. Müller, R.H., Mäder, K. and Gohla, S. “solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art” European Journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics. 50 (10); 2000. 161-177.
42. Mehnert, W. and Mäder, K. “Solid lipid nanoparticles : production, characterization and applications” Advanced Drug Delivery Reviews. 47 (2-3); 2001. 165-196.
43. Ciotti, S., Eisma, R., Pannu, J., McCarthy, A. and Baker, J.R. “Novel Follicular-Targeted Nanoemulsions for Acne” Nanobio corporation support present at summer academy meeting. Boston : Hynes Convention Center-Boston Massachusetts; 2009.





เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

หนังสือยินยอมการเผยแพร่ผลงานวิจัย

Letter of Consent for Publication of Research

论文发表同意书

เขียนที่ At 写于 มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

วันที่ Date 日期 19 กรกฎาคม 2565

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว Mr./Mrs./Miss 学生姓名 ไชติรส กิจสมชีพ

รหัสนักศึกษา Student ID 学号 606027

ระดับ level 学位 ปริญญาโท Master's degree 硕士 ปริญญาเอก Ph.D. 博士

หลักสูตร Courses 课程 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา field of study 专业 วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะ Faculty 学院 เกษศาาสตร์

Email 电子邮件 : มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ชื่อเรื่อง (ดุษฎีนิพนธ์/วิทยานิพนธ์/การศึกษาคอิสระ Title (dissertation/Thesis/Independent study
(申请检查学位论文/毕业论文/选修)

(ชื่อภาษาไทย) (Thai Title) (泰文名称) การเตรียมนานอิมัลชันที่มีสารสกัดกระชายและกาแฟ

สำหรับผลิตภัณฑ์ชะลอวัย

(ชื่อภาษาอังกฤษ) (English Title) (英文名称) Preparation of Nanoemulsion Containing Finger
Root and Robusta Coffee for Anti-Aging Products

- อนุญาต ให้ศูนย์บรรณสารสนเทศ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เผยแพร่งานวิจัยของ
ข้าพเจ้าสู่สาธารณะ เพื่อเป็นผลงานทางวิชาการ ผ่านระบบฐานข้อมูลงานวิจัย ThaiLIS
- Permit the Information Center at Huachiew Chalermprakiet University to publish
my research to the public as an academic achievement through the ThaiLIS
research database system
- 同意 同意华侨崇圣大学信息中心通过泰国文献数据库 ThaiLIS 面向
社会公开发表本人论文
- ไม่อนุญาต Not permitted 不同意

ไชติรส กิจสมชีพ

ลงชื่อ Sign ไชติรส กิจสมชีพ ผู้วิจัย Researcher 作者签名

(นางสาวไชติรส กิจสมชีพ)