



เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน เพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสกัด  
จากชาเขียว (*Camellia sinensis*)

DEVELOPMENT OF MICROEMULSION FOR ENHANCING THE STABILITY  
OF GREEN TEA (*Camellia sinensis*) EXTRACT

อัจฉราภรณ์ สิงห์หาญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

พ.ศ. 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน เพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสกัด

จากชาเขียว (*Camellia sinensis*)

DEVELOPMENT OF MICROEMULSION FOR ENHANCING THE STABILITY  
OF GREEN TEA (*Camellia sinensis*) EXTRACT

อัจฉราภรณ์ สิงห์หาญ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ตรวจสอบและอนุมัติให้

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

เมื่อวันที่ 1 ธันวาคม พ.ศ. 2558



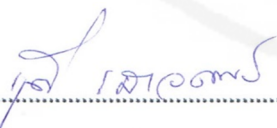
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐพล อาษาสุจริต  
ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ



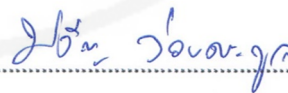
รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุปกรณ์  
อาจารย์ที่ปรึกษา




รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุปกรณ์  
กรรมการ



รองศาสตราจารย์ฤดี เสาวคนธ์  
กรรมการ



อาจารย์ ดร.ปิวิณา ว่องตระกูล  
ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
(วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)



รองศาสตราจารย์อิสยา จันทรวิธานุชิต  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย



รองศาสตราจารย์ ดร.จันทรา ชัยพานิช  
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

การพัฒนาสูตรไมโครอิมัลชัน เพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสกัด  
จากชาเขียว (*Camellia sinensis*)

อัจฉราภรณ์ สิงห์หาญ 554101

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รัตนา อินทรานุปกรณ์, Ph.D.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความคงตัวของสารคาเทชิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในสารสกัดชาเขียว (*Camellia sinensis*) โดยพัฒนาในรูปแบบตำรับไมโครอิมัลชัน โดยศึกษาผลของอุณหภูมิ (80 และ 100°C) เวลา (15 และ 30 นาที) และตัวทำละลาย (น้ำ, 40% ethanol และ 70% ethanol) ในการสกัดชาเขียว 3 ชนิดได้แก่ ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเซนฉะ และชาเขียวบั้นฉะ พบว่าการสกัดชาเขียวมัทฉะด้วย 40% ethanol ที่ 80°C เป็นเวลา 30 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolics สูงที่สุด ดังนั้นจึงนำเอาสารสกัดชาเขียวมัทฉะมาตั้งตำรับไมโครอิมัลชันด้วยการสร้างแผนภาพไตรภาคเทียม โดยศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวผสม (span80: cremophor RH40; span80: kolliphor EL และ span80: kolliphor HS15 อัตราส่วน 1:1) ร่วมกับการใช้สารลดแรงตึงผิวร่วม (isopropanol) วัฏภาคน้ำมัน (jojoba oil) และวัฏภาคน้ำ และประเมินคุณลักษณะของตำรับดังนี้ ความใส ขนาดและการกระจายอนุภาค การนำไฟฟ้า ความเป็นกรด-ด่าง และความหนืด พบว่าตำรับที่ประกอบด้วยสารสกัดชาเขียว 0.5% สารลดแรงตึงผิวผสม (span: cremophor RH40 อัตราส่วน 1:1) 49.90%, jojoba oil 24.31% และน้ำ: IPA (1:1) 25.29% มีความคงตัว ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงของไมโครอิมัลชัน ความหนืดต่ำ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และศึกษาสัณฐานวิทยา และโครงสร้างของหยดวัฏภาคภายในด้วย Transmission electron microscope (TEM) พบว่ามีลักษณะทรงกลม รวมถึงหาเปอร์เซ็นต์คงเหลือของสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตำรับไมโครอิมัลชันโดยเปรียบเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว พบว่าตำรับไมโครอิมัลชันมีเปอร์เซ็นต์สารสำคัญดังกล่าวคงเหลือมากกว่าตำรับเจล หลังเก็บทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้องและที่สภาวะเร่งสลับอุณหภูมิ จึงสรุปได้ว่าระบบไมโครอิมัลชันสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญจากสารสกัดชาเขียวได้

**คำสำคัญ:** ชาเขียว ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ไมโครอิมัลชัน แผนภาพไตรภาคเทียม

DEVELOPMENT OF MICROEMULSION FOR ENHANCING THE STABILITY OF GREEN TEA  
(*Camellia sinensis*) EXTRACT

AUJSHARAPORN SINGHAN 554101

MASTER OF SCIENCE (COSMETIC SCIENCES)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: RATANA INDRANUPAKORN, Ph.D.

ABSTRACT

The objective of the study was to develop microemulsion formulation for enhancing the stability of catechins, the major bioactive compounds in green tea (*Camellia sinensis*) extract. First, the effects of different extraction temperature (80 and 100°C), time (15 and 30 min) and solvents (water, 40% ethanol and 70% ethanol) on the total phenolic contents in three green teas (Matcha, Sencha and Bancha) were investigated. The results showed the Matcha green tea extract prepared by using 40% ethanol at 80°C for 30 min gave the highest antioxidant activity and total phenolic contents. Thus, Matcha green tea extract was used in the microemulsion. Based on the single isotropic region produced in pseudoternary phase diagram, the effects of surfactant mixtures (span80: cremophor RH40; span80: kolliphor EL and span80: kolliphor HS15 [1:1]) on the phase behavior, cosurfactant (isopropanol, IPA), oil phase (jojoba oil) and water in the systems were evaluated. The selected microemulsion were investigated of characteristics, such as clarity, droplet size, polydispersity index (PI), conductivity, pH and viscosity. The results indicated that the clear w/o microemulsion containing 0.5% green tea extract, 49.90% surfactant mixtures consisting of span80 and cremophor RH40 at the ratio of 1:1, 24.31% jojoba oil, 25.29% water to IPA (1:1) remained stable and exhibited the droplet size in microemulsion range, low viscosity, acceptable pH and conductivity. Transmission electron microscope (TEM) was used to image the droplets and revealed the spherical particles. Furthermore, the percentages of the remaining of caffeine, epicatechin and epigallocatechin gallate contents in the microemulsions after stability test were analysed by comparison with the prepared green tea extract gel. It was found that the microemulsions contained the three active compounds higher than the gel after storage at room temperature and heating/cooling cycles. It could be concluded that the developed microemulsion system enhances the stability of green tea extract.

**Keywords:** Green tea, Antioxidant activities, Microemulsion, Pseudoternary phase diagram

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุกุล อธิการบดีที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งประสิทธิ์ประสาทความรู้ ให้คำปรึกษาแนะนำ ชี้แนะแนวทางอัน เป็นประโยชน์ในการแก้ไขปัญหาให้สำเร็จลุล่วง และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จ สมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐพล อาษาสุจริต ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ และรองศาสตราจารย์ฤดี เสาวคนธ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ เพื่อนำไปปรับปรุงวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความสมบูรณ์ และสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล และอาจารย์हरรรษา มหามงคล ที่ได้แนะ แนวทาง และให้คำปรึกษาในการแก้ปัญหาในส่วนของการตั้งตำรับไมโครอิมัลชันแก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ธนิษฐ์ รัตนโอฬาร อาจารย์ประจำภาควิชาครุศาสตร์ อุตสาหกรรม คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ ได้แนะแนวทาง และให้คำปรึกษาในการแก้ปัญหาในส่วนการวิเคราะห์ผลทางสถิติแก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรวิทยาศาสตรเครื่องสำอางที่ได้ประสิทธิ์ประสาท ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาในการศึกษาในมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรตินี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเภสัชเวชและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติทุกท่านที่เอื้ออำนวยประสานงานสั่งซื้อ เบิกจ่ายสารเคมีและ วัสดุอุปกรณ์ อีกทั้งยังให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้งานที่ถูกต้อง

ขอขอบคุณพี่น้อง และเพื่อน ๆ ทุกคนที่อยู่เคียงข้างคอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา รับฟังปัญหา และให้กำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ผู้ซึ่งอยู่เบื้องหลังความสำเร็จในครั้งนี้ เป็นแบบอย่างที่ดีในทุก ๆ ด้าน คอยให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน ให้กำลังใจ และเป็นแรงผลักดันที่ สำคัญให้ข้าพเจ้าก้าวข้ามทุกปัญหามาได้ จนสามารถสำเร็จการศึกษาได้ตามเป้าหมายที่วางไว้

อัจฉราภรณ์ สิงห์หาญ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญแผนภูมิ	ช
สารบัญภาพ	ฌ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
1.5 คำย่อหรือสัญลักษณ์	5
<b>บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 ชาเขียว และประโยชน์จากชาเขียว	7
2.2 องค์ประกอบในชาเขียว และวิธีการสกัดสารสำคัญ	12
2.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)	15
2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)	16
2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)	18
2.6 ไมโครอิมัลชัน (microemulsion)	20
<b>บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย</b>	
3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	32
3.2 วัตถุดิบ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	33
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	34
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัย และอภิปรายผล</b>	
4.1 การเตรียมสารสกัดชาเขียว และหาปริมาณสาร total phenolics	45
4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาเขียว	45

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)	46
4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะด้วยเครื่อง HPLC	51
4.5 การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน	53
4.5.1 การเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันพื้น (microemulsion base) และไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดจากชาเขียว โดยการสร้างแผนภาพไตรภาคเทียม	53
4.5.2 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ	57
4.5.3 การเปรียบเทียบความคงตัวทางกายภาพ และทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ	63
4.5.4 การเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ	66
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ</b>	
5.1 สรุปผลการวิจัย	70
5.2 ข้อเสนอแนะ	72
บรรณานุกรม	73
ภาคผนวก	78
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางสถิติ	79
ภาคผนวก ข สเปกตรัมของสารมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate	88
ประวัติผู้เขียน	91

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชาเขียวแต่ละชนิด	10
2 ส่วนประกอบของตำรับไมโครอิมัลชันที่คัดเลือกมาผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ	40
3 ส่วนประกอบของตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ	42
4 รีเทนชันไทม์ และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน caffeine ที่ความเข้มข้นต่างๆ	46
5 รีเทนชันไทม์ และพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน epicatechin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	47
6 รีเทนชันไทม์ และพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน epigallocatechin gallate	48
7 ร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะ	49
8 ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงในวันเดียวกัน	50
9 ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงต่างวันกัน	51
10 ปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ที่พบในสารสกัดชาเขียวมัทฉะความเข้มข้น 2 mg/ml	52
11 ขนาดอนุภาคของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว	59
12 การกระจายอนุภาคของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว	60
13 ค่าการนำไฟฟ้าของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว	61
14 ความเป็นกรด-ด่างของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว	62
15 ความหนืดของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว	63
16 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ GLM4 เปรียบเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ หลังเก็บทดสอบความคงตัว	64



สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่	หน้า
1 องค์ประกอบที่พบในใบชาเขียวสด	12
2 กรอบแนวคิดที่ใช้ในงานวิจัย	31
3 แผนผังการสกัดชาเขียว	35
4 ระยะเวลาและแผนการดำเนินงาน	44
5 ความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารมาตรฐาน caffeine	47
6 ความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารมาตรฐาน epicatechin	48
7 ความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารมาตรฐาน epigallocatechin gallate	49
8 โครมาโทแกรมของสาร caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะ	52
9 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate	52
10 ขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่ประกอบด้วย jojoba oil, สารลดแรงตึงผิวผสม (span80: cremophor RH40 อัตราส่วน 1:1) และน้ำ	55
11 ขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่ประกอบด้วย jojoba oil, สารลดแรงตึงผิวผสม (span80: kolliphor EL อัตราส่วน 1:1) และน้ำ	55
12 ขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่ประกอบด้วย jojoba oil, สารลดแรงตึงผิวผสม (span80: kolliphor HS15 อัตราส่วน 1:1) และน้ำ	56
13 ขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่ประกอบด้วย jojoba oil, สารลดแรงตึงผิวผสม (span80: cremophor RH40 อัตราส่วน 1:1) และน้ำ: IPA (อัตราส่วน 1:1)	56
14 เปรียบเทียบขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่ประกอบด้วย jojoba oil, สารลดแรงตึงผิวผสม [span80: cremophor RH40 อัตราส่วน 1:1 และ 2:1] และน้ำ: IPA (อัตราส่วน 1:1)	57
15 โครมาโทแกรมของสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตัวอย่างตำรับไมโครอิมัลชัน GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว	67

## สารบัญแผนภูมิ (ต่อ)

แผนภูมิที่	หน้า	
16	เปอร์เซ็นต์สารสำคัญ caffeine (CAF), epicatechin EG) และ epigallocatechin gallate (EGCG) คงเหลือในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ หลังเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน และตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ หลังเก็บที่สภาวะ heating-cooling จำนวน 6 รอบ	69



## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1	ไร่ชาเขียว และลักษณะยอดใบชาเขียว	7
2	ชาเขียวมัทฉะ	9
3	ชาเขียวเซนฉะ	9
4	ชาเขียวบันฉะ	10
5	โครงสร้างของ catechins	14
6	ส่วนประกอบ และการทำงานของ HPLC	17
7	ชนิดของไมโครอิมัลชัน	22
8	ลักษณะจำลองของฟิล์มที่ผิวประจันระหว่างวฏุภาคน้ำและวฏุภาคน้ำมัน เมื่อในระบบมีสารลดแรงตึงผิวชนิดเดียว	24
9	ลักษณะจำลองของฟิล์มที่ผิวประจันระหว่างวฏุภาคน้ำและวฏุภาคน้ำมัน เมื่อในระบบสารลดแรงตึงผิวสองชนิดร่วมกัน	25
10	ตัวอย่างแผนภาพไตรภาคเทียมแสดงขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชัน	26
11	ทดสอบประเภทของไมโครอิมัลชันกักเก็บสารสกัดจากชาเขียวโดยการหยดสีละลายน้ำ และสีละลายน้ำมัน	58
12	สัณฐานวิทยาและโครงสร้างของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว (GLM4) ที่ initial day, หลังเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน และ หลังเก็บที่ heating/cooling จำนวน 6 รอบ	65
13	สัณฐานวิทยาและโครงสร้างของตำรับไมโครอิมัลชันพื้นฐานที่ initial day, หลังเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน และหลังเก็บที่ heating/cooling จำนวน 6 รอบ	66

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันการดูแลสุขภาพจากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติกำลังได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาตินั้นมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารออกฤทธิ์ทางเคมีอื่น ๆ อีกทั้งยังมีความปลอดภัยจากความเป็นพิษ หรือผลข้างเคียงจากสารเคมีอีกด้วย และในปัจจุบันที่เทคโนโลยีมีความรวดเร็วไปอย่างรวดเร็ว ทำให้มีงานวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพรมารองรับอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติอื่น ๆ จึงส่งผลให้ผู้บริโภคหันมาใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสมุนไพรมากยิ่งขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยต่าง ๆ พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรล้วนแล้วแต่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ที่มีประโยชน์มากมาย ทั้งทางการแพทย์ สุขภาพและความงาม ยกตัวอย่างเช่น ชาเขียว ซึ่งเป็นเครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ที่กำลังได้รับความนิยมทั่วโลก และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ผลิตภัณฑ์จากชาเขียวจึงได้รับการตอบรับจากผู้บริโภคเป็นอย่างดี<sup>(1)</sup>

ชา (*Camelia sinensis*) ถูกค้นพบมากกว่า 1,000 ปีก่อนในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แรกเริ่มใบชาถูกใช้เป็นยา หลังจากนั้นก็กลายเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมทั่วโลก เนื่องจากมีกลิ่นที่น่าดึงดูดใจ รสชาติดี และมีประโยชน์ต่อร่างกาย<sup>(2)</sup> จำแนกชาออกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่ ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ<sup>(3)</sup> ชาเขียวเป็นชาที่ไม่ผ่านการหมัก จึงมีองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่คล้ายกับใบชาสด โดยมีสารโพลีฟีนอล (polyphenols) ในกลุ่มคาเทชิน (catechins) อยู่มากที่สุด ชาอู่หลงเป็นชาที่ผ่านการหมักบางส่วน ขณะที่ชาดำเป็นชาที่ผ่านการหมักอย่างสมบูรณ์<sup>(4)</sup> ซึ่งระดับการหมักนั้นก็ทำให้ชาที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เพราะการหมักจะไปเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) เกิดการเปลี่ยนสาร catechins เป็นสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มที่เอฟลาเวิน (theaflavins) สารสีส้ม หรือส้ม-แดง และสารกลุ่มทีอะรูบิจิน (thearubigins) สารสีน้ำตาล-แดง หรือน้ำตาลเข้ม ทำให้ชาดำมีสีเข้ม และรสฝาดกว่าชาเขียว และชาอู่หลง<sup>(2, 5)</sup> กระบวนการผลิตชาเขียวทำโดยเลือกใบชาสดมาให้คว่ำในกระเพาะเป็นเวลาสั้น ๆ หรืออบด้วยไอน้ำ ซึ่งการใช้ความร้อนก็เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase ไม่ให้เกิดการหมัก ทำให้ชาเขียวมีคุณภาพที่ดีกว่าชาอู่หลง และชาดำ<sup>(6)</sup> สารประกอบฟีนอลิกหลัก ๆ ที่พบในชาเขียว คือ catechins ได้แก่ epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin และ epigallocatechin gallate โดยเฉพาะอย่างยิ่ง epigallocatechin gallate ที่ทำให้ชาเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ดีที่สุด เพราะมีจำนวนหมู่ OH อยู่ในโครงสร้างมากที่สุด<sup>(7)</sup> อีกทั้งชาเขียวยังอุดมไปด้วยสารคาเฟอีน (caffeine) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ส่งเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาเขียวได้ดี<sup>(5, 8)</sup> จากรายงานขององค์การอาหารและการเกษตรแห่ง

สหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) ปี 2015 พบว่าการผลิต ชาทั่วโลก (ชาดำ ชาเขียว และอื่น ๆ) ในปี 2013 มีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้น 5.07 ล้านตันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับปี 2012 โดยที่การผลิตชาเขียวเพิ่มขึ้นคิดเป็น 5.1% และคาดว่า จะมีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นเร็วกว่าชาดำถึง 2.97 ล้านตันในปี 2023 <sup>(9)</sup> แสดงให้เห็นว่าชาเขียวกำลังได้รับความนิยมในด้านการบริโภคอย่างแพร่หลาย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำเอาสารสกัดชาเขียวมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านอื่น ๆ เช่น ด้านเครื่องสำอาง เพื่อเป็นแนวทางเพิ่มเติมในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของชาเขียวที่แตกต่างจากท้องตลาดทั่ว ๆ ไป

มีรายงานเกี่ยวกับประโยชน์ของชาเขียวต่อสุขภาพของมนุษย์มากมาย เช่น ชาเขียวอุดมไปด้วยสาร polyphenols ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถชะลอการแก่ของเซลล์ และยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง (anticarcinogenic activity) โดยไม่ส่งผลต่อเซลล์ปกติอื่น ๆ ในร่างกายมนุษย์ <sup>(10)</sup> สาร catechins จากชาเขียวสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งผิวหนัง มะเร็งปอด มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้เล็ก มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งเต้านมในสัตว์ เป็นต้น โดยเฉพาะสาร epigallocatechin gallate ที่มีความสามารถในการต่อต้านสารก่อมะเร็งได้ดีมาก สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และเชื้อรา (antibacterial and antifungi activity) หรือแม้แต่มียูทรีป้องกันการอักเสบได้ (anti-inflammatory effect) อีกทั้งมีความสามารถในการควบคุมน้ำหนัก ตลอดจนการทดลองทั้ง in vitro และ in vivo ในสัตว์และในคน พบว่าสาร polyphenols ในชาเขียวสามารถป้องกันแสง UVB ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของผิวหนัง เช่น ความชราภาพของผิวหนังเนื่องจากแสงแดด (photoaging) ได้ <sup>(6, 11)</sup>

จากฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของชาเขียวนั้น ทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจในการนำสารสกัดจากชาเขียวมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ทางเครื่องสำอางโดยคำนึงถึงว่าผลิตภัณฑ์นั้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของสารสำคัญที่ได้จากชาเขียวเป็นอย่างดี เช่น สามารถป้องกันสารสำคัญที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ให้คงอยู่ได้ตลอด ไม่ถูกทำลายไปจนหมดในระหว่างการใช้งาน หรือการเก็บรักษา และนำส่งสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนังได้ จึงต้องมีการพัฒนาสูตรของผลิตภัณฑ์นั้นให้มีระบบนำส่ง (topical delivery system) ที่มีอนุภาคขนาดเล็กมากถึงระดับนาโนเมตรเพื่อเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนังได้ดี ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน (microemulsion) ซึ่งเป็นระบบที่ประกอบไปด้วยน้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว ที่ละลายอยู่ด้วยกันมีคุณสมบัติเหมือนกันทุกทิศทาง (isotropic property) ขนาดหยดวิญภาคภายในอยู่ในช่วง 10-140 นาโนเมตร มีลักษณะโปร่งใส (transparent) หรือโปร่งแสง (translucent) เนื่องจากขนาดของหยดวิญภาคภายในเล็กกว่าหนึ่งในสี่ของความยาวคลื่นแสง จึงไม่กระจายแสง ทำให้มองเห็นเป็นอิมัลชันใสเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า <sup>(12)</sup> มีเสถียรภาพดีทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamically stable) และ

ความหนืดต่ำ เตรียมได้ง่ายสามารถเกิดขึ้นได้เองโดยไม่จำเป็นต้องใช้พลังงานจากภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้อง<sup>(13)</sup>

สำหรับงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาการสกัดชาเขียว 3 ชนิด ได้แก่ ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเซนฉะ ชาเขียวบันฉะ ที่อุณหภูมิ และเวลาในการสกัดแตกต่างกัน เพื่อศึกษาว่าวิธีใดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารสำคัญจากชาเขียวได้มากที่สุด รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชาเขียว และเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันเพื่อกักเก็บสารสกัดชาเขียวมัทฉะ และศึกษาความคงตัวของสารสำคัญในตำรับไมโครอิมัลชันเปรียบเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ เนื่องจากเป็นตำรับที่พบบ่อย ๆ และมีความคงตัวโดยการเกิดเจลนั้นเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ และระหว่างพอลิเมอร์กับตัวกลาง ทำให้ระยะห่างระหว่างโมเลกุลลดลง โดยเกิดการพันกัน (crosslink) และมีการเชื่อมข้ามของสายโซ่พอลิเมอร์ เมื่อเกิดการเชื่อมข้ามมากขึ้นสายโซ่ พอลิเมอร์เหล่านั้นจะถูกตรึงไว้พร้อมกับการเคลื่อนที่ของสารละลายลดลง สารสำคัญที่ละลายอยู่ในวัฏภาคน้ำไม่เกิดการเคลื่อนที่ จึงลดการสัมผัสของสารสำคัญกับสิ่งกระตุ้นโดยตรงจากภายนอกได้<sup>(14)</sup> นอกจากนี้ส่วนประกอบของตำรับเจลไม่มีวัฏภาคน้ำมัน จึงสามารถสกัดเอาสารสำคัญที่ละลายอยู่ในวัฏภาคน้ำออกมาได้ดี

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสถานะที่สามารถสกัดสารสำคัญจากชาเขียวได้มากที่สุด
2. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำ และหาปริมาณ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียว
3. เพื่อหาสถานะ และอัตราส่วนที่เหมาะสมในการตั้งตำรับไมโครอิมัลชัน
4. เพื่อเตรียมตำรับไมโครอิมัลชัน และตำรับเจลผสมสารสกัดจากชาเขียวมัทฉะ
5. เพื่อประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ
6. เพื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์สาร caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะเปรียบเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ หลังเก็บทดสอบความคงตัว

### 1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. เปรียบเทียบสถานะในการสกัดสารสำคัญจากชาเขียว 3 ชนิด ได้แก่ ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเซนฉะ และชาเขียวบันฉะ โดยที่ทำการสกัดชาเขียวในสถานะต่าง ๆ แตกต่างกัน เพื่อหาสถานะที่ได้สารสำคัญจากสารสกัดชาเขียวมากที่สุด ดังนี้

- ใช้อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกันที่ 80°C และ 100°C
- ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน คือ น้ำ, 40% ethanol และ 70% ethanol
- ใช้เวลาในการสกัดแตกต่างกันที่ 15 และ 30 นาที

2. หาปริมาณ total phenolic ของสารสกัดชาเขียวชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี Folin's ciocalteu

3. ศึกษาความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดชาเขียวชนิดต่าง ๆ ด้วยเทคนิค DPPH และ ABTS assay

4. วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในชาเขียวมัทฉะ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

5. ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

6. หาขอบเขตของการเกิดไมโครอิมัลชันจากแผนภาพไตรภาคเทียม (pseudoternary phase diagram) เตรียมตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ และเตรียมตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

7. ประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

8. วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์สารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวเปรียบเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว หลังเก็บทดสอบความคงตัว

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสกัดสารสำคัญ และพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญจากชาเขียวได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และตั้งสูตรไมโครอิมัลชันเพื่อกักเก็บสารสำคัญจากชาเขียวได้

2. เป็นแนวทางในการนำองค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีการผลิตเครื่องสำอางมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดจากชาเขียวให้เกิดประโยชน์มากยิ่งขึ้นได้

3. สามารถเผยแพร่องค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีการผลิตเครื่องสำอาง และการสกัดสารจากธรรมชาติในงานวิจัยนี้ออกสู่สังคม หรือภาคอุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้

4. สามารถใช้งานวิจัยนี้ต่อยอด หรือพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และการสกัดสารจากธรรมชาติให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ ๆ ที่มีประโยชน์ในอนาคตได้

### 1.5 คำย่อหรือสัญลักษณ์

°C	องศาเซลเซียส
%	ร้อยละ
IPA	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ Isopropyl alcohol
TEM	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope)
nm	นาโนเมตร
n	จำนวนซ้ำ
mean	ค่าเฉลี่ย
$r^2$	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient)
SD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)
% RSD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (relative standard deviation)
rpm	อัตราเร็วรอบต่อนาที
g	กรัม
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
% v/v	ร้อยละปริมาตรต่อปริมาตร
% w/v	ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร
% w/w	ร้อยละน้ำหนักโดยน้ำหนัก
mg/ml	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
mM	มิลลิโมล
ml/min	มิลลิลิตรต่อนาที
mg/g dry weight	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
IC <sub>50</sub>	ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระ ลดลงครึ่งหนึ่งของปริมาณอนุมูลอิสระทั้งหมด
% inhibition	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
kV	กิโลโวลต์
P	ระดับนัยสำคัญทางสถิติ (critical p-value)
$\mu\text{S}/\text{cm}^2$	ไมโครซีเมนต์ต่อตารางเซนติเมตร
CP	เซนติพอยส์ (Centipoise)
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance



HPLC	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography)
Peak area	พื้นที่ใต้พีค
มก./กรัม	มิลลิกรัมต่อกรัม
ซม.	เซนติเมตร
มม.	มิลลิเมตร



บทที่ 2  
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชาเขียว และประโยชน์จากชาเขียว

1. ชาเขียว (*Camellia sinensis*)

ภาพที่ 1 (a) ไร่ชาเขียว (b) ลักษณะยอดใบชาเขียว



(a)



(b)

ที่มา: (a) ไทยวิกิพีเดีย. 2015 : ออนไลน์<sup>(15)</sup> (b) ประโยชน์ดอทคอม. 2015 : ออนไลน์<sup>(16)</sup>

ชา มีลักษณะเป็นพุ่มไม้เตี้ย ๆ ใบสีเขียวเข้ม และมันเงา ลักษณะค่อนข้างกลม ดอกสีขาว ชมพู หรือแดงขนาดใหญ่ ผลสีน้ำตาลเล็ก ๆ สภาพการเพาะปลูกที่เหมาะสม คือ ช่วงอุณหภูมิที่พอเหมาะ (15-20 °C) ความชื้นสัมพัทธ์สูง และมีฝนตกตลอดปี<sup>(3)</sup> เป็นพืชที่สามารถเก็บเกี่ยวได้ตลอดทั้งปีขึ้นอยู่กับคุณภาพของใบชา นั้น ๆ ด้วย ชาที่เก็บได้จากช่วงฤดูใบไม้ผลิ จะมีกลิ่นหอม จัดเป็นชาเกรดดีที่สุด ชาถูกค้นพบมากกว่า 1000 ปีก่อนในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แรกเริ่มถูกใช้เป็นยา หลังจากนั้นก็

กลายเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมทั่วโลก<sup>(2)</sup> เนื่องจากมีกลิ่น และรสชาติที่น่าดึงดูดใจ อีกทั้งยังมีประโยชน์ต่อร่างกาย<sup>(3)</sup> สามารถจำแนกชาออกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่ ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ<sup>(2)</sup> อย่างไรก็ตาม ชาที่มีการผลิต และมีคนดื่มมากที่สุดในโลกคือ ชาดำ (คิดเป็น 78% ของชาทั้งหมด) ได้รับความนิยมประเทศแถบยุโรป อเมริกา ศรีลังกา อินเดีย แอฟริกา และอินโดนีเซีย ส่วนชาเขียวมีการผลิตคิดเป็น 20% ของชาทั้งหมด ได้รับความนิยมบริโภคกันมากในประเทศจีน และญี่ปุ่น ขณะที่อู่หลงมีการผลิตคิดเป็นเพียง 2% เท่านั้น นิยมบริโภคกันมากในประเทศจีนตอนใต้ ไต้หวัน และเกาหลี<sup>(5, 7)</sup>

ชาเขียวเป็นชาที่ไม่ผ่านการหมัก องค์ประกอบส่วนใหญ่คล้ายใบชาสด โดยมีสาร polyphenols กลุ่ม catechins อยู่มากที่สุด ชาอู่หลงเป็นชาที่ผ่านการหมักบางส่วนโดยจะใช้เวลาในการหมักน้อยกว่าชาดำ ขณะที่ชาดำเป็นชาที่ผ่านการหมักอย่างสมบูรณ์<sup>(4)</sup> ซึ่งระดับการหมักนั้นก็จะทำให้ชามีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เพราะการหมักจะไปเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์ polyphenol oxidase เกิดการเปลี่ยนสาร catechins เป็นสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่ม theaflavins สารสีส้ม หรือส้ม-แดง และสารกลุ่ม thearubigins สารสีน้ำตาล-แดง หรือน้ำตาลเข้ม ทำให้ชาดำมีสีเข้ม และรสฝาดกว่าชาเขียว และชาอู่หลง<sup>(2, 5)</sup> กระบวนการผลิตชาเขียวทำโดยเลือกใบชาสดมาให้คั่วในกระทะเป็นเวลาสั้น ๆ หรืออบด้วยไอน้ำ ซึ่งการใช้ความร้อนก็เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase ไม่ให้เกิดการหมัก ทำให้ชาเขียวมีคุณภาพที่ดีกว่าชาอู่หลง และชาดำ<sup>(6)</sup> การผลิตชาเขียว เริ่มจากการเก็บยอดใบชาสดมา และต้องผ่านการคั่วไฟ หรืออบไอน้ำ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดกระบวนการหมัก องค์ประกอบทางเคมีไม่เปลี่ยนแปลงไป สามารถคงคุณค่าของปริมาณสาร catechins ไว้ได้ใกล้เคียงกับใบชาสด ทำให้ชาเขียวมีสี กลิ่น และรสชาติที่อ่อนนุ่มกว่าชาดำ และชาอู่หลง<sup>(4)</sup> มีรายงานขององค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) ปี 2015 พบว่า การผลิตชาทั่วโลก (ชาดำ ชาเขียว และชาอื่น ๆ) ในปี 2013 มีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้น 5.07 ล้านตันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับปี 2012 โดยที่การผลิตชาเขียวเพิ่มขึ้นคิดเป็น 5.1% และคาดว่าจะมีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นเร็วกว่าชาดำถึง 2.97 ล้านตันในปี 2023<sup>(9)</sup> ชาเขียวโดยทั่วไปจะแบ่งตามภูมิภาค การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว และกระบวนการผลิต ยกตัวอย่างเช่น<sup>(3, 17)</sup>

- ชาเขียวมัทฉะ (Matcha) ชาแรกของปี เป็นชาที่ปลูกโดยได้รับการดูแลเป็นอย่างดีในที่ร่มไม่ให้โดนแดดก่อนเก็บเกี่ยวประมาณ 3 สัปดาห์ ส่วนใหญ่จะเป็นใบชาที่เหลือจากการแยกออกไปผลิตเป็นชาคุณภาพดีที่สุด นั่นคือ Gyokuro แล้ว แต่ก็ยังถือว่าเป็นชาที่มีคุณภาพดี ราคาแพง แต่ผลิตอยู่ในรูปผงละเอียด มีหลากหลายเกรด มักใช้ในพิธีชงชาสไตล์ญี่ปุ่น หรือนิยมนำไปผสมกับอาหารและเครื่องดื่ม เพื่อเพิ่มสีสรรรสชาติ เช่น ทำขนมโมจิ ขนมเค้ก ขนมวาฟเฟิล ไอศกรีมชาเขียว น้ำปั่น เป็นต้น เป็นประเภทของชาเขียวญี่ปุ่นในรูปแบบผงละเอียด (powdered) ขณะที่ชาเขียวเซนฉะ และ

ชาเขียวบั่นฉะ อยู่ในรูปแบบใบชาบดหยาบ หรือไม่บด (loose leaf) สามารถจำแนกชาเขียวญี่ปุ่น ออกได้ดังนี้

### ภาพที่ 2 ชาเขียวมัทฉะ



ที่มา: beta.soccersuck. 2015 : ออนไลน์<sup>(18)</sup>

- ชาเขียวเซนฉะ (Sencha) เป็นชาที่มีคุณภาพรองลงมาจากชาเกียวคุโระ และชาเขียวมัทฉะ แต่เป็นชาที่มีการผลิตมากที่สุดในญี่ปุ่น มักนิยมนำมาผลิตเป็นชาเขียวให้คนญี่ปุ่นดื่มในชีวิตประจำวัน ชาชนิดนี้จะถูกเก็บเกี่ยวเกี่ยวช่วงต้นฤดูร้อน การเพาะปลูกจะให้ชาโดนแสงแดดได้อย่างเต็มที่จนถึงเวลาที่จะเก็บเกี่ยว เมื่อเก็บเกี่ยวใบชาสดจะนำไปอบไอน้ำอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์ จึงทำให้สีและกลิ่นของชาถูกรักษาไว้ได้

### ภาพที่ 3 ชาเขียวเซนฉะ



ที่มา: j-everyday. 2015 : ออนไลน์<sup>(19)</sup>

- ชาเขียวบันฉะ (Bancha) เป็นชาที่เก็บหลังจากชาเขียวเซนฉะ คุณภาพจะรองลงมาจากชาเขียวเซนฉะ เป็นชาที่เหลืออยู่ที่ยอดชา ใบมีขนาดใหญ่กว่าที่นำไปผลิตเป็นชาเขียวเซนฉะ หลังจากนั้น จะนำมาผ่านการนวดใบชาเล็กน้อย จะได้รสชาติอ่อน ๆ เก็บเกี่ยวในช่วงต้นฤดูใบไม้ร่วง

ภาพที่ 4 ชาเขียวบันฉะ



ที่มา: j-everyday. 2015 : ออนไลน์<sup>(20)</sup>

มีรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีในชาเขียวญี่ปุ่นแต่ละชนิด พบว่า ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเกียวคุโระ และชาเขียวเซนฉะ อุดมไปด้วยไนโตรเจน ขณะที่พบปริมาณเพียงเล็กน้อยในชาเขียวบันฉะ และโฮจิฉะ ส่วนสารแทนนิน (tannins) พบมากในชาเขียวคะมะอิริฉะ แต่พบในชาเขียวมัทฉะ เกียวคุโระ และโฮจิฉะปริมาณเล็กน้อย และองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ละลายน้ำได้พบมากในชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเกียวคุโระ ชาเขียวเซนฉะ ชาเขียวบันฉะ ชาเขียวคะมะอิริฉะ และชาเขียวโฮจิฉะ ตามลำดับ และแอสคอร์บิกแอซิดพบในชาเขียวเซนฉะ และชาเขียวบันฉะ แต่พบเล็กน้อยในชาเขียวเกียวคุโระ และชาเขียวโฮจิฉะ<sup>(21)</sup> ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชาเขียวแต่ละชนิด

Chemical composition of various green teas						
Green tea	Total nitrogen (%)	Caffeine (%)	Tannin (%)	Free sugars (%)	Soluble matter (%)	Ascorbic acid (mg%)
Matcha	6.11	3.62	9.55	0.85	42.11	174
Gyokuro	5.98	3.95	10.56	0.90	38.64	100
Sencha	5.49	2.93	13.60	1.47	40.10	393
Bancha	3.74	2.44	14.14	2.08	36.83	273
Kamairicha	4.65	3.06	14.57	1.89	39.89	270
Hojicha	3.53	1.88	10.13	0.95	31.41	90

S. Maeda et al., Tea Res. J., No.45, 85 (1977)  
K. Ikegaya et al. Tea Res. J., No.60, 79 (1984)

ที่มา: World Green Tea Association. 2015 : ออนไลน์<sup>(21)</sup>

## 2. ประโยชน์จากชาเขียว

จากการศึกษาพบว่าชาเขียวมีประโยชน์มากมาย ยกตัวอย่างเช่น

- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีรายงานการวิจัย พบว่าชาเขียวประกอบไปด้วยสารที่มีขี้ เช่น catechins ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ฟีนอลิกแอซิด (phenolic acid) ไกลโคไซด์ (glycosides) และอะไกลโคน (aglyclone) ที่ถือว่าเป็นสารประกอบที่ล้วนแล้วแต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก อีกทั้งพบว่าชาเขียวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าในชาขาว ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า<sup>(22, 23)</sup>

- ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase และ elastase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ล้วนแล้วแต่ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำ และริ้วรอยของผิวหนังได้ มีงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากชาเขียวที่มีส่วนประกอบเป็นสาร catechins โดยเฉพาะ epigallocatechin gallate นั้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase และ elastase ได้ ในสารสกัดชาเขียวที่ใช้เอนไซม์ tannase สามารถเปลี่ยนโครงสร้างสารกลุ่ม minor catechins ไปเป็น major catechins ได้มากขึ้น ทำให้สารสกัดจากชาเขียวที่ treat ด้วยเอนไซม์ tannase นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ elastase ได้มากกว่าเอนไซม์ collagenase จึงสามารถบอกได้ว่าสารสำคัญในชาเขียวมีประโยชน์ช่วยป้องกันการเกิดความชราภาพของผิวหนังได้<sup>(24)</sup>

- ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial activity) มีรายงานวิจัยที่ศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวที่กักเก็บไว้ในตำรับไมโครอิมัลชัน เพื่อใช้ป้องกันการติดเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และเชื้อ *Escherichia Coli* ในช่องคลอด โดยใช้เทคนิค disc diffusion พบว่า ตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารสกัดชาเขียวสามารถยับยั้งเชื้อ 2 ชนิดนี้ได้ดีกว่าสารสกัดชาเขียวที่สกัดด้วยน้ำ และสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาสารสกัดชาเขียวกักเก็บใน solid lipid nanoparticles โดยพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia Coli* ได้ดี<sup>(25, 26)</sup>

- ป้องกันความชราของผิวหนังจากแสงแดดได้ (antiphotaging) สามารถป้องกันรังสี UVA และ UVB โดยมีรายงานว่าเมื่อทาสาร epigallocatechin gallate 3 mg/2.5 cm<sup>2</sup> ก่อนออกไปเจอแสงแดดสามารถลดการเกิดผื่นแดง และการซึมผ่านผิวหนังเข้าไปกระตุ้น leukocytes จาก UVB ลดลง ดังนั้น สาร polyphenols ที่พบในชาเขียวสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนังจากการถูกแสงแดดได้ และการทาสารสกัด 0.2 mg/cm<sup>2</sup> ก่อนออกแดด 30 นาที พบว่า สามารถยับยั้งการเหนี่ยวนำให้เกิดผื่นแดงได้อย่างสมบูรณ์ และป้องกันไม่ให้ DNA ถูกทำลาย และยังมีข้อเสนอแนะอีกว่าสาร polyphenols ที่พบในชาเขียวนั้นสามารถป้องกันไม่ให้เซลล์ keratinocytes ที่ชั้น epidermis เกิดเป็นเซลล์มะเร็งโดยการรักษาด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต เอ (PUVA)<sup>(6)</sup>

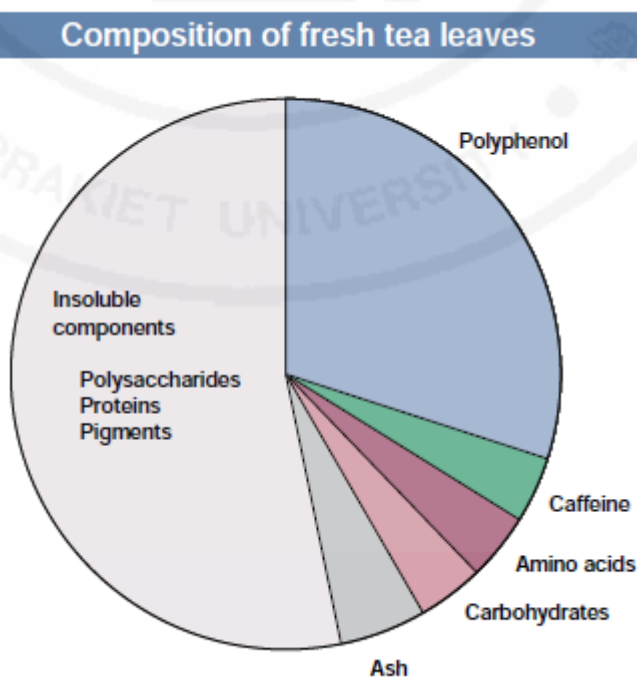
- ควบคุมน้ำหนัก (body weight control) มีรายงานการวิจัยพบว่า สารคาเฟอีนและธีอะนีน ที่พบในชาเขียวมีผลต่อการควบคุมน้ำหนักอย่างมาก และป้องกันการสะสมไขมันในหนู และมีรายงานอื่น ๆ อีกว่าชาเขียวสามารถยับยั้งปฏิกิริยาการสร้าง fatty acid ได้อีกด้วย เป็นต้น<sup>(10)</sup>

## 2.2 องค์ประกอบในชาเขียว และวิธีการสกัดสารสำคัญ

### 1. องค์ประกอบในชาเขียว

ชาเขียวมีส่วนประกอบทางเคมีดังต่อไปนี้ โปรตีน 15-20% โดยน้ำหนักแห้ง กรดอะมิโน 1-4% โดยน้ำหนักแห้ง เช่น teanine หรือ 5-N-ethylglutamine, glutamic acid, tryptophane, glycine, serine, aspartic acid, tyrosine, valine, leucine, threonine, arginine และ lysine คาร์โบไฮเดรต 5-7% โดยน้ำหนักแห้ง เช่น cellulose, pectins, glucose, fructose และ sucrose ไขมัน เช่น linoleic และ  $\alpha$ -linoleic acids วิตามิน เช่น วิตามิน B, C และ E ส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น caffeine, theophylline, chlorophyll, carotenoids และ trace elements 5% โดยน้ำหนักแห้ง เช่น Calcium, Magnesium, Chromium, Manganese, Iron, Copper, Zinc, Molybdenum, Selenium, Sodium, Phosphorus, Cobalt, Strontium, Nickel, Potassium, Fluorine และ Aluminium<sup>(10)</sup> ดังแผนภูมิที่ 1

แผนภูมิที่ 1 องค์ประกอบที่พบในใบชาเขียวสด



ที่มา: World Green Tea Association. 2015 : ออนไลน์<sup>(21)</sup>

สารฟีนอลิกเป็นสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางสรีรวิทยาของพืชนั้น ๆ ซึ่งจะมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต พัฒนาการ และกลไกการป้องกันตัวเอง ยอดใบชาประกอบด้วยสารฟลักซ์เคมีในกลุ่ม polyphenols ประมาณ 10-30% โดยน้ำหนักแห้ง สาร polyphenols นี้ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม flavonoids โครงสร้างของ flavonoids จะแตกต่างกันไปตามรูปแบบของพันธะคู่ และหมู่แทนที่ ทำให้ได้ flavonoids หลากหลายชนิด โดยทั่วไปในผักและผลไม้จะมี flavonoids 6 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาวานอล หรือ ฟลาวาน-3-ออล (flavanol หรือ flavan-3-ols) ฟลาวานอน (flavanones) แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) ฟลาโวน (flavones) และไอโซฟลาโวน (isoflavones)

catechins เป็นชื่อเรียกเฉพาะของสารกลุ่ม flavanol หรือ flavan-3-ols ที่พบมากที่สุด ในชาเขียว ซึ่งมีประมาณ 60-70% ของ polyphenols ทั้งหมด catechins เป็นสารไม่มีสี ละลายน้ำได้ดี มีรสขาคัดฝาด สาร catechins หลัก ๆ ที่พบในชาเขียว ได้แก่ epicatechin, gallocatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin และ epigallocatechin gallate โดย catechins เหล่านี้มีอยู่ประมาณ 90% ของ catechins ทั้งหมด ส่วน catechins ที่พบรองมา ได้แก่ gallocatechin, catechin, gallocatechin gallate และ catechin gallate โครงสร้างของ catechins <sup>(4, 27)</sup> (ภาพที่ 5)

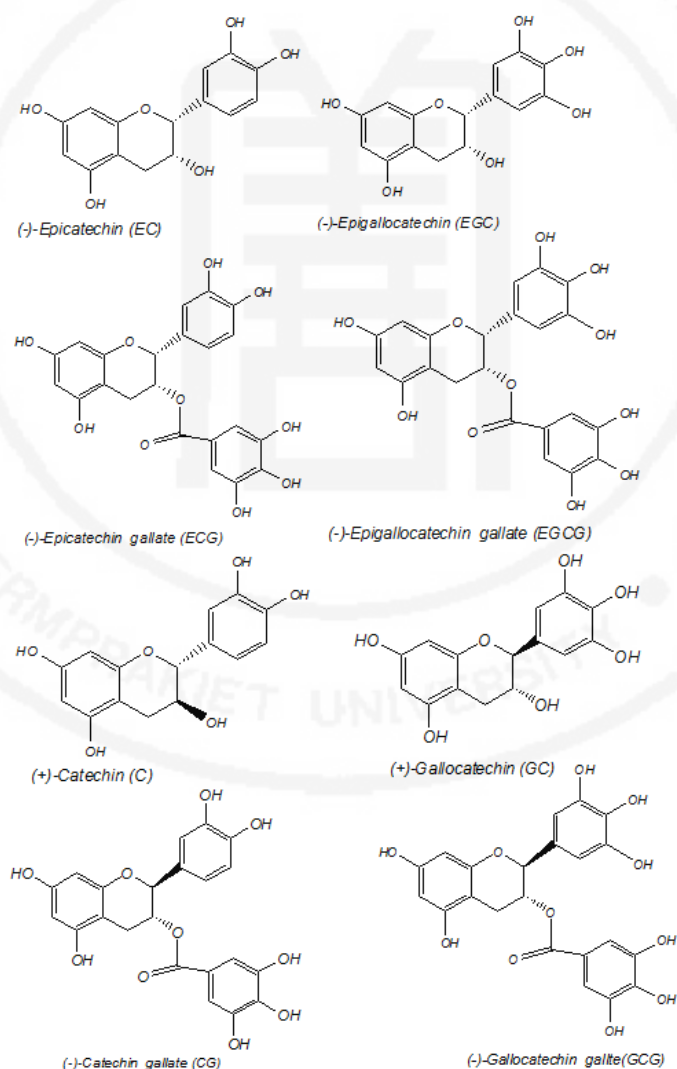
## 2. การสกัดสารสำคัญจากชาเขียว

กระบวนการสกัดจะเกี่ยวข้องกับการแยกสารกลุ่ม polyphenols ออกจากเนื้อเยื่อของพืชโดยการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ในระหว่างการสกัดตัวทำละลายจะแพร่เข้าไปยังวัตถุดิบพืชที่เป็นของแข็ง และละลายเอาสารที่มีขั้วคล้ายกันออกมา เนื่องจาก catechins เป็นสารที่มีขั้ว จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ methanol ethanol และ acetone ในระหว่างการสกัดด้วยตัวทำละลายมีขั้ว ส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น caffeine หรือ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) มักจะถูกสกัดออกมาด้วย ในกรณีของชาเขียว theanine และ caffeine มีความสามารถในการละลายมากกว่า catechins เพราะมีน้ำหนักโมเลกุลเล็กกว่า catechins ดังนั้นจึงมักถูกสกัดออกมาก่อน <sup>(11)</sup> ในงานวิจัยของ Rusak et al. <sup>(23)</sup> พบว่าปริมาณสาร polyphenols และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาเขียว และชาขาวขึ้นอยู่กับสภาวะ และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด โดยในงานวิจัยนั้นได้ทดลองเปรียบเทียบชาในรูปแบบใบชาแห้ง และถุงชาที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ (a) น้ำที่ 80°C, (b) น้ำที่ 80°C ผสมกับน้ำมะนาวคั้นสด 5 ml, (c) เอทานอล (10%, 40% และ 70%) โดยที่ใช้เวลาในการสกัดแตกต่างกันที่ 5, 15 และ 30 นาที ผลการทดลองพบว่า ชาเขียวที่อยู่ในรูปแบบใบชาแห้งมีปริมาณสาร polyphenols มากกว่าในชาขาว และในรูปแบบชาถุง อีกทั้งการสกัดด้วย 40% เอทานอล เป็นเวลา 30 นาที ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด และยังมีงานวิจัยของ Jun et al. <sup>(22)</sup> ได้เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง และสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติที่สกัดจาก



ชาเขียวด้วยวิธีการสกัดแตกต่างกัน 5 วิธี คือ ultrahigh pressure extraction, microwave extraction, ultrasonic extraction, soxhlet extraction, heat reflux extraction ผลที่ได้พบว่าการสกัดชาเขียวด้วยวิธี ultrahigh pressure นั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) เท่ากับ 80.4% ที่เวลาการสกัด 15 นาที และ 82.2% ที่เวลาการสกัด 30 นาที และปริมาณสาร polyphenols ที่สกัดด้วยวิธีนี้มีปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ

ภาพที่ 5 โครงสร้างของ catechins



ที่มา: สถาบันมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. 2015 : ออนไลน์<sup>(27)</sup>

## 2.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) <sup>(28)</sup>

การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) นั้นควรจะมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (validation method) ซึ่งหมายถึง กระบวนการของการประเมินวิธีวิเคราะห์หรือผลผลิต เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานั้นเป็นวิธีที่ให้ผลถูกต้อง มีประสิทธิภาพ และเชื่อถือได้ ในงานวิจัยนี้มีพารามิเตอร์ที่กำหนดในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

### 1. ความเป็นเส้นตรง หรือความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity)

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเป็นพารามิเตอร์ที่แสดงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารในตัวอย่างกับค่าที่วัดได้ ให้ค่าที่วัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง ทำโดยการสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลที่วิเคราะห์ได้กับปริมาณของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น รายงานค่าเป็นสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient :  $r^2$ ) และสมการซึ่งแสดงถึงจุดตัดแกน Y (y-intercept) เกณฑ์การยอมรับค่า  $r^2$  ต้องมากกว่า 0.995 <sup>(29)</sup>

### 2. ความแม่นยำ (accuracy)

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์เป็นการวัดความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ หรือหาความผิดพลาดของวิธีการโดยการตรวจสอบว่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริง (true value) เพียงใด ซึ่งจะพิจารณาจาก ค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (relation standard deviation: RSD) ส่วนใหญ่จะใช้วิธี standard addition (spiked sample หรือ spiked recovery) โดยการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนอย่างน้อย 3 ระดับลงในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ แต่ละระดับทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในการทดลองนี้ทำที่ระดับ 80, 100 และ 120% จากนั้นคำนวณหา % recovery จากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ recovery} = (C_a - C_b / C_c) \times 100$$

$C_a$  = ปริมาณสารสำคัญที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

$C_b$  = ปริมาณสารสำคัญที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่ไม่เติมสารมาตรฐาน

$C_c$  = ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

เกณฑ์การยอมรับค่า % recovery ต้องอยู่ในช่วง 80-120% <sup>(29)</sup>

### 3. ความเที่ยง (precision)

เป็นพารามิเตอร์ที่ใช้แสดงถึงความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์เมื่อทำการทดลองซ้ำ หรือการกระจายผลของการวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ยเมื่อทำซ้ำ ความแปรปรวนและการกระจายของผลการวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ยจัดเป็น random error อันเนื่องมาจากผู้วิเคราะห์ เครื่องมือ สารเคมี และสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ซึ่งยากต่อการควบคุมให้เหมือนเดิมทุกครั้ง ค่าที่ใช้แสดงถึงความเที่ยงคือ

ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (percentage relative standard deviation: %RSD) ส่วนใหญ่นิยมทำการวิเคราะห์สารซ้ำ 6 ครั้ง ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ไม่เกิน 2 โดยในการทดลองนี้ จะทำการทดสอบดังนี้

- ทดสอบความเที่ยงในวันเดียวกัน (intra day หรือ repeatability) ทำการวิเคราะห์สารซ้ำ 6 ครั้งในวันเดียวกัน

- ทดสอบความเที่ยงต่างวัน (inter day หรือ reproducibility) นำสารที่ต้องการทดสอบตัวเดียวกับที่ทดสอบ intra day มาทดสอบซ้ำ 6 ครั้ง ในวันที่ 4 ถัดจากวันที่ทำการทดสอบ intra day

เกณฑ์การยอมรับต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 2% <sup>(29)</sup>

#### 2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC)

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง คือ เทคนิคการแยกสารภายใต้ความดัน เป็นเทคนิคการแยก และวิเคราะห์สารที่ประยุกต์มาจากเทคนิค column chromatography โดยรวมเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quantitative analysis) ไว้ด้วยกัน ทำให้การวิเคราะห์ทำได้รวดเร็ว หลักการทำงานคือ เป็นเทคนิคในการแยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบล้างดันสูง (high pressure pump) สูบล้างละลายที่ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และถูกแยกออกมาผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ที่เวลาแตกต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลา และปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณก็จะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ และแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) <sup>(30)</sup> ดังแสดงในภาพที่ 6

ภาพที่ 6 ส่วนประกอบ และการทำงานของ HPLC



จากหลักการที่กล่าวมานั้น เทคนิค HPLC จะใช้ mobile phase เป็นของเหลว และถูก pump ผ่านคอลัมน์ภายใต้ความดันสูง เนื่องจากใช้ตัวดูดซับที่มีขนาดอนุภาคเล็กลงมาก จึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ column ได้ ดังนั้นจึงทำให้มีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายและตัวถูกละลาย เกิดการแยกได้เร็วขึ้น เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ก็ลดลงด้วย<sup>(31)</sup>

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC สามารถแบ่งตามสภาพความมีขั้วของ mobile phase และ stationary phase ได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. normal phase chromatography เป็นเทคนิคที่ mobile phase ไม่มีขั้ว ส่วน stationary phase มีขั้ว
2. reversed phase chromatography เป็นเทคนิคที่ mobile phase มีขั้ว ส่วน stationary phase ไม่มีขั้ว

การจะเลือกรูปแบบ HPLC ไตมาใช้วิเคราะห์ขึ้นอยู่กับสภาพขั้วของสารตัวอย่าง แต่ในปัจจุบันรูปแบบ reverse phase chromatography นิยมใช้กันมาก เนื่องจากมีข้อดี ดังต่อไปนี้

- เป็น column ที่ค่อนข้างเสถียร
- สามารถใช้ mobile phase ที่มีราคาถูก เช่น น้ำ หรือเมทานอล
- สมดุล column เกิดขึ้นได้เร็ว เหมาะแก่การทำ gradient elution
- ใช้แยก nonionic ion และสารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้
- สามารถทำนายลำดับของสารที่ถูกชะออกออกจาก column ได้เพราะ retention time เพิ่มขึ้น ถ้าสภาพความมีขั้วของสารตัวอย่างลดลง

การวิเคราะห์หาปริมาณของ catechins โดยการใช้เทคนิค HPLC รูปแบบ reversed phase chromatography ได้ ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Saito et al.<sup>(32)</sup> ได้พัฒนาเทคนิค HPLC เพื่อความรวดเร็วในการวิเคราะห์สาร epigallocatechin gallate, epicatechin, catechin และ

caffeine รวมถึงเปรียบเทียบปริมาณ catechins ที่วิเคราะห์ได้จากชาเขียวที่ปลูกในประเทศบราซิล แต่เก็บเกี่ยวที่ช่วงเวลาแตกต่างกัน คือ เก็บเกี่ยวช่วงฤดูใบไม้ผลิ ฤดูร้อน และฤดูใบไม้ร่วง เปรียบเทียบกับตัวอย่างชาเขียวจากประเทศญี่ปุ่น จีน และชาดำในประเทศบราซิล โดยใช้ RP-18 column และ mobile phase เป็นส่วนผสมระหว่าง water: acetonitrile: methanol: ethyl acetate: glacial acetic acid อัตราส่วน 89: 6: 1: 3: 1 (โดยปริมาตร) จากงานวิจัยพบว่า ชาเขียวจากประเทศจีนมีปริมาณสาร catechins มากที่สุด

## 2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)<sup>(3, 33)</sup>

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระนั้นหมดฤทธิ์ไป กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระมีด้วยกันหลายกลไก ได้แก่ ป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ การเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้โดยตรง ความสามารถจับกับโลหะหนัก (metal chelating) การป้องกันการเริ่มต้นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ของลิพิดเปอร์ออกซิเดชันไม่ให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป และวิธีศึกษาฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี ยกตัวอย่างเช่น

### 1. DPPH assay

เป็นวิธีการที่ง่าย และได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง สารที่ใช้คือ อนุมูลอิสระ DPPH หรือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515 nm หลักการคือ สารอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสารสีม่วงอมน้ำเงิน เมื่อถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง ซึ่งการเปลี่ยนสีนั้นจะสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนของอิเล็กตรอนที่เกิดพันธะกับไฮโดรเจนที่ได้จากสารต้านอนุมูลอิสระ

จากรายงานการวิจัยของ Komes et al.<sup>(3)</sup> ได้ศึกษาการสกัดชาเขียว 11 ชนิด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ชาเขียว *Twining* ในรูปแบบชาถุง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยใช้อุณหภูมิในการสกัด 80°C ที่ 15 นาที การคำนวณการต้านอนุมูลอิสระจะรายงานเป็นค่า % scavenging capacity โดยคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

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

$$A_{\text{control}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH + ตัวทำละลายในตัวอย่าง}$$

$$A_{\text{sample}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ DPPH}$$

### 2. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

เป็นวิธีที่มีสารอนุมูลอิสระสังเคราะห์ และสารเรืองแสง เมื่อสารอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยากับสารเรืองแสงจะกลายเป็นสารที่ไม่เรืองแสง ดังนั้น เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระเข้าไปจะไปทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระ ทำให้ยังคงมีสารเรืองแสงอยู่ ไม่จางหายไป จึงวัดค่าความเข้มข้น

ของแสงได้เพิ่มขึ้นตามความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ สารเรืองแสงที่ใช้ คือ fluorescein หรือ อาจใช้ beta-phycoerythrin แทนได้ ส่วนสารอนุมูลอิสระที่ใช้ คือ อนุมูลอิสระ peroxy ซึ่งได้มาจากการให้ความร้อนแก่สารตั้งต้น 2'-azo-bis(2-amidinopropane)-dihydrochloride (ABAP) ซึ่งวิธีการนี้ใช้วัดได้เฉพาะสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ peroxy เท่านั้น ถ้าในสารสกัด มีสารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกอื่น ๆ ร่วมด้วย จะไม่ถูกตรวจพบ อาจทำให้ได้ค่าที่ต่ำกว่าความเป็นจริง

### 3. Total antioxidant scavenging capacity (TOSC)

วิธีนี้จะคล้ายกับวิธี ORAC คือจะดูปฏิกิริยาการยับยั้งอนุมูลอิสระ peroxy เหมือนกัน หลักการคือให้สารต้านอนุมูลอิสระเข้าแข่งจับกับอนุมูลอิสระ ทำให้ผลผลิตทางปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ใช้สารอนุมูลอิสระเป็นสารตั้งต้นปริมาณลดลง สารตั้งต้นที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ คือ alpha-keto-gamma-methylbutyric acid (KMBA) มาทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ peroxy ได้ก๊าซเอทิลีน (ethylene) ออกมา เมื่อเติมตัวอย่างสารตัวอย่างที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ก็จะเข้าแข่งจับกับอนุมูลอิสระ ทำให้ไปยับยั้งการผลิตการ ethylene ออกมา ผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงตามปริมาณอนุมูลอิสระที่เหลืออยู่ จากนั้นนำไปวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยใช้ gas chromatography เพื่อวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น การรายงานผลจะรายงานเป็นค่า TOSC value โดยคำนวณจากสมการต่อไปนี้

$$\text{TOSC value} = 100 - (\text{AUC}_{\text{sample}} / \text{AUC}_{\text{control}} \times 100)$$

โดยที่  $\text{AUC}_{\text{sample}}$  = พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง

$\text{AUC}_{\text{control}}$  = พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน

ดังนั้น ถ้า TOSC value = 0 แสดงว่าตัวอย่างนั้นไม่มีฤทธิ์ antioxidant activity แต่ถ้า TOSC value = 100 แสดงว่าตัวอย่างนั้นสามารถยับยั้งการผลิตก๊าซ ethylene ได้อย่างสมบูรณ์ ควรรายงานผลการศึกษาเป็น TOSC value ต่อหน่วยของสารที่จะศึกษา เช่น TOSC value/mg extract หรือ TOSC value/ml extract

### 4. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

วิธีนี้จะหลักการคล้ายกับ ORAC แต่จะวัดสีของอนุมูลอิสระที่หายไปจากการเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารต้านอนุมูลอิสระ วัดโดยใช้ diode-array spectrophotometer สารอนุมูลอิสระที่ใช้ คือ cat-ion radical ABTS ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่คงตัว สีเขียวแกมน้ำเงิน ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ถ้านำมาใช้ในปฏิกิริยาจะถูกสารต้านอนุมูลอิสระรีดิวซ์ให้เป็นสารไม่มีสี คือ ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonic acid) ประสิทธิภาพ หรือฤทธิ์ antioxidant activity คัดเทียบกับค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

### 5. ABTS assay

วิธีนี้พัฒนามาจากวิธี TEAC assay โดยให้สารต้านอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ที่เตรียมขึ้นใหม่ (freshly prepared) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร คำนวณหาค่า % inhibition จากสมการต่อไปนี้

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

$A_{\text{control}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS + ตัวทำละลายในตัวอย่าง

$A_{\text{sample}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ ABTS

### 6. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

วิธีนี้เป็นวิธีที่วัดประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระจากความสามารถรีดิวซ์สาร ferric ion ให้เป็นสาร ferrous โดย โดยใช้สารตั้งต้นคือ FRAP reagent ประกอบด้วย 2,3,5-triphenyl-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-diene chloride (TPTZ) ทำปฏิกิริยากับ FeCl<sub>3</sub> เกิดเป็นสารเชิงซ้อน Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (สารไม่มีสี) เมื่อสารเชิงซ้อนนี้ถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระ จะได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน Fe<sup>2+</sup>-TPTZ (สีน้ำเงิน) เกิดขึ้น ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร รายงานผลเป็นค่า FRAP value มีหน่วยเป็นมิลลิโมล/ลิตรของ FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่เตรียมเป็น calibration curve เพื่อใช้เทียบปริมาณของ Fe<sup>2+</sup>-TPTZ ที่เกิดขึ้น

## 2.6 ไมโครอิมัลชัน (microemulsion)

ไมโครอิมัลชัน หมายถึง อิมัลชันที่มีขนาดของหยดวิญภาคภายในเล็กประมาณ 10-140 นาโนเมตร มีลักษณะโปร่งใส (transparent) หรือโปร่งแสง (translucent) เนื่องจากขนาดของหยดวิญภาคภายในเล็กกว่าหนึ่งในสี่ของความยาวคลื่นแสง จึงไม่กระจายแสง ทำให้มองเห็นเป็นอิมัลชันใสเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า<sup>(12)</sup> แนวคิดเกี่ยวกับไมโครอิมัลชันถูกเสนอเป็นครั้งแรกเมื่อต้นปี 1940 โดย Hoar และ Schulman ได้ค้นพบสารละลายใสระบบวิญภาคเดี่ยวด้วยการไทเทรตอิมัลชันที่มีลักษณะขุ่นขึ้นด้วย hexanol ซึ่งภายหลัง Schulman และคณะ ได้เรียกว่า “ไมโครอิมัลชัน” และให้คำนิยามว่า ไมโครอิมัลชันคือระบบที่ประกอบด้วย น้ำ น้ำมัน และ amphiphile ซึ่งเป็น isotropic นั่นคือคุณสมบัติเหมือนกันทุกทิศทาง (isotropic character) และเป็นระบบที่มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamically stable) อีกทั้งยังเป็นระบบที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง เมื่อส่วนประกอบในตำรับมีความเหมาะสม โดยที่ไม่ต้องอาศัยพลังงานจากภายนอกเพื่อช่วยในการลดขนาดของหยดวิญภาคภายใน ไมโครอิมัลชันโดยปกติจะประกอบด้วยส่วนประกอบ 3-4 ชนิด เช่น น้ำมัน น้ำ สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม หรืออาจมีการเติมแอลกอฮอล์ ซึ่งมีความยาวโมเลกุลปานกลาง ไมโครอิมัลชันมีทั้งชนิดน้ำในน้ำมัน และชนิดน้ำมันในน้ำ โดยขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว อัตราส่วนของน้ำต่อน้ำมัน และอุณหภูมิ<sup>(13)</sup>

นอกจากนี้ก็ยังมียานวิจัยเกี่ยวกับไมโครอิมัลชันเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามมีนักวิจัยหลาย ๆ ท่านที่ยังมีข้อคิดเห็นแตกต่างกันเกี่ยวกับธรรมชาติที่แท้จริงของไมโครอิมัลชัน และความเหมาะสมของการกำหนดชื่อของสารผสมข้างต้นว่า “ไมโครอิมัลชัน” ในบางกรณีก็อาจถูกเรียกว่า transparent microemulsion หรือ micellar emulsion ซึ่งการเลือกใช้คำที่แตกต่างกันนี้ เนื่องจากแนวคิดหรือมุมมองที่แตกต่างกันของนักวิจัย แต่อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติแล้วถือว่าหมายถึงระบบเดียวกัน

โครงสร้างภายในของไมโครอิมัลชันประกอบด้วย ไมเซลล์ขนาดใหญ่ หรือไมเซลล์ขยาย (swollen micelle) กระจายตัวอยู่ในวัฏภาคภายนอก โดยองค์ประกอบที่จัดเป็นวัฏภาคภายในจะรวมตัวอยู่ภายในไมเซลล์นั้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวคล้ายคลึงกับระบบสารละลายที่เกิดขึ้นโดยกลไกการเพิ่มการละลายด้วยไมเซลล์ (micellar solubilization) จึงทำให้ไมโครอิมัลชันมักถูกเรียกว่า micellar solution หรือ solubilized system หรือ swollen micelle หรือ micellar emulsion อย่างไรก็ตาม ไมโครอิมัลชันจะแตกต่างจาก micellar solubilization system เล็กน้อยในแง่ขนาดของไมเซลล์ โดยไมเซลล์ใน micellar solubilization จะมีขนาดเล็กกว่าคือ ประมาณ 5-20 นาโนเมตร ในขณะที่ไมเซลล์ในไมโครอิมัลชันจะมีขนาดประมาณ 10-140 นาโนเมตร ไม่ว่าจะไมโครอิมัลชันจะเป็นชนิดพิเศษ หรือเป็น micellar solubilization system ก็ตาม โดยภาพรวมแล้วไมโครอิมัลชัน หมายถึง ระบบกระจายตัวของของเหลวสองชนิดที่ไม่เข้ากัน โดยของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวเป็นหยดเล็กประมาณ 10-140 นาโนเมตร อยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง เห็นเป็นของเหลวเนื้อเดียว และมีลักษณะโปร่งแสงหรือโปร่งใสเมื่อมองด้วยตาเปล่า<sup>(12)</sup>

### 2.6.1 ชนิดของไมโครอิมัลชัน<sup>(12)</sup>

ไมโครอิมัลชันเป็นระบบจตุภาค (quaternary system) ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำ น้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม โดยแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันกระจายในน้ำ (oil in water microemulsion) จะมีน้ำมันละลายอยู่ภายในไมเซลล์ขยายของสารลดแรงตึงผิว ดังภาพที่ 7 (ก)
2. ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำกระจายในน้ำมัน (water in oil microemulsion) จะมีน้ำละลายอยู่ภายในไมเซลล์ขยายของสารลดแรงตึงผิว โดยสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุจะเกิดไมเซลล์แบบผกผันในน้ำมัน ดังภาพที่ 7 (ข)
3. bicontinuous structure มีโครงตาข่ายของน้ำในเมทริกซ์ของน้ำมัน และฟิล์มของสารลดแรงตึงผิวมีลักษณะเป็นแผ่นต่อเนื่อง (continuous sheet) จนมองไม่ออกว่าวัฏภาคน้ำหรือน้ำมันเป็นวัฏภาคภายในดังภาพที่ 7 (ค)



ภาพที่ 7 ชนิดของไมโครอิมัลชัน



(ก) ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (ข) ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (ค) bicontinuous structure  
ที่มา: ประภาพร บุญมี. 2552<sup>(34)</sup>

ความแตกต่างระหว่างแมโครอิมัลชัน (macroemulsions) และไมโครอิมัลชัน (microemulsion)<sup>(12)</sup>

ไมโครอิมัลชันมีคุณสมบัติที่แสงสามารถผ่านได้ ลักษณะโปร่งใส (transparent) หรือโปร่งแสง (translucent) ขณะที่แมโครอิมัลชันจะทึบแสง แมโครอิมัลชันแม้จะมีลักษณะกายภาพคงตัว แต่ในที่สุดก็จะเกิดการรวมตัวกันของหยดอนุภาคภายในใหญ่ขึ้น และเสถียรภาพ แต่ไมโครอิมัลชันจะตรงข้าม เพราะมีความคงตัวทาง thermodynamics แมโครอิมัลชันต้องอาศัยแรงหรือพลังงานจากภายนอกในการลดขนาดอนุภาคภายใน แต่ไมโครอิมัลชันสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นได้เองนี้สารลดแรงดึงผิวจะเป็นตัวกำหนดว่าจะจะเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน หรือน้ำมันในน้ำ ยิ่งกว่านั้นไมโครอิมัลชันสามารถเพิ่มสัดส่วนของวัฏภาคภายในได้ถึง 20-40% โดยที่ไม่ทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้น ดังนั้นไมโครอิมัลชันก็เป็นอีกหนึ่งตัวเลือกที่ดีที่สามารถนำไปใช้ได้ทั้งทางเครื่องสำอาง และเภสัชกรรม

ในปัจจุบันไมโครอิมัลชันเป็นอีกรูปแบบหนึ่งในการผลิตผลิตภัณฑ์หนึ่งที่ได้รับคามนิยมมากในงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง เนื่องจากเหตุผลดังต่อไปนี้

1. ไมโครอิมัลชันมีลักษณะใสและนำใช้
2. ไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่มีเสถียรภาพทาง thermodynamics จึงมีอายุสินค้า (shelf life) ยาวนานขึ้น
3. ไมโครอิมัลชันสามารถเกิดขึ้นได้เอง (spontaneous formation) เมื่อระบบมีชนิดและความเข้มข้นของวัฏภาคน้ำ น้ำมัน สารลดแรงดึงผิว และสารลดแรงดึงผิวร่วมที่เหมาะสมจึงผลิตได้ง่ายโดยการคนผสมธรรมดา ไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน ซึ่งต่างจากอิมัลชัน (emulsion) และนาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) โดยที่สองรูปแบบหลังนี้ต้องอาศัยพลังงานในกระบวนการผลิตสูง

4. โครงสร้างระดับไมโคร (micro-structure) ทำให้ไมโครอิมัลชันสามารถนำส่งสารสำคัญทางเครื่องสำอางเข้าสู่ผิวหนังได้ดีกว่ารูปแบบอิมัลชันธรรมดา ซึ่งการนำส่งสารสำคัญทางเครื่องสำอางเข้าสู่ผิวหนังในชั้นล่าง ๆ ของหนังกำพร้ามีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของสารสำคัญทางเครื่องสำอางบางชนิดได้แก่ สารปรับผิวขาว (whitening agent) สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น

แต่ก็ยังมีข้อเสียคือ เนื่องจากไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่ต้องใช้สารลดแรงตึงผิวปริมาณมาก เพื่อช่วยให้ค่าแรงตึงผิวมีค่าน้อยที่สุด ดังนั้นอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้

## 2.6.2 สารลดแรงตึงผิว (Surfactant)<sup>(12)</sup>

เป็นสารที่มีโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เมื่อกระจายสารลดแรงตึงผิวลงในน้ำ จะเกิดการเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว โดยหันส่วนหัวที่ชอบน้ำออกหาน้ำ และหันส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากัน เพื่อให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำสัมผัสน้ำน้อยที่สุด สามารถแบ่งสารลดแรงตึงผิวออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

1. สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบอยู่บนส่วนหัวที่ชอบน้ำ ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของหมู่ที่มีประจุลบเช่น carboxylate, sulfate หรือ sulfonate ในโมเลกุล และโดยมากจะอยู่ในรูปเกลือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำมักเป็นสายโซ่ของไฮโดรคาร์บอนตรงที่อิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัว มีจำนวนคาร์บอนอะตอมประมาณ 12-18 อะตอม สารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้นิยมใช้อย่างกว้างขวางมาก เนื่องจากราคาไม่แพง และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองเหมือนสารลดแรงตึงผิวประจุบวก ตัวอย่างเช่น aluminium monostearate, calcium stearate, magnesium stearate, sodium lauryl sulfate เป็นต้น

2. สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (cationic surfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่แตกตัว ให้ประจุบวก สารกลุ่มนี้ถูกดูดซับอยู่บนสารที่มีประจุลบได้ดี เช่น ผิวหนัง เส้นผม รวมทั้งเซลล์ของจุลินทรีย์ มักนิยมนำมาใช้เป็นสารทำลายเชื้อโรค แต่ค่อนข้างระคายเคือง และเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อลูกนัยน์ตา

3. สารลดแรงตึงผิวที่มีหมู่ amphoteric สารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้มีทั้งประจุบวกและประจุลบในโมเลกุล จะแสดงออกประจุบวก ประจุลบ หรือไม่มีประจุขึ้นกับค่า pH ของระบบ ในทางเครื่องสำอางสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้นิยมนำมาใช้กับผลิตภัณฑ์ชำระล้างผิวหนัง เส้นผม เนื่องจากไม่เกิดการระคายเคือง และยังช่วยลดปริมาณการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบในสูตรตำรับ จึงนิยมใช้เตรียมแชมพูสำหรับทารก เช่น lecithin

4. สารลดแรงตึงผิวไม่มีประจุ (nonionic surfactant) สารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้ไม่มีประจุ ในโมเลกุลจึงไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองเหมือนกับสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุ และสารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้สามารถเข้าได้กับสารลดแรงตึงผิวหลายชนิด แต่มีข้อเสียคือ อาจลดประสิทธิภาพของสารกันเสียบางชนิด คุณสมบัติของสารกลุ่มนี้ขึ้นกับคุณสมบัติส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ

โดยส่วนที่ชอบน้ำมักเป็นกลุ่ม polyoxyethylene, polyoxypropylene อนุพันธ์ของ polyol และ หมู่ hydroxyl ส่วนที่ไม่ชอบน้ำมักเป็นกรดไขมัน หรือแอลกอฮอล์ไขมันที่อิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัว ทั้งนี้การปรับเปลี่ยนขนาดของส่วนที่ชอบน้ำ และความยาวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำมีผลต่อค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ในการจำแนกกลุ่มของสารลดแรงตึงผิว นอกจากนี้อาจใช้สารก่ออิมัลชันหลายชนิดร่วมกัน เนื่องจากจะทำให้เกิดฟิล์มเชิงซ้อนที่แข็งแรง โดยนิยมใช้สารลดแรงตึงผิว 2 ชนิดร่วมกัน คือ สารที่มีค่า HLB สูง ร่วมกับสารที่มีค่า HLB ต่ำ เพื่อให้สามารถปรับค่า HLB เกิดเป็นชนิดของอิมัลชันที่ต้องการได้ และมีความคงตัว

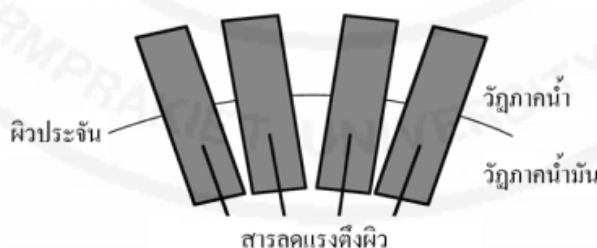
ข้อดีของการเลือกใช้สารก่ออิมัลชันหลายชนิดร่วมกัน

- ทำให้เกิดฟิล์มเชิงซ้อนที่มีความแข็งแรงมาก
- สามารถปรับความหนืดได้ตามต้องการ
- ทำให้อิมัลชันแผ่กระจายบนผิวหนังได้ดี
- สามารถปรับให้ได้ค่า HLB ที่เหมาะสมได้

#### บทบาทของสารลดแรงตึงผิวในการเกิดไมโครอิมัลชัน <sup>(35)</sup>

สารลดแรงตึงผิวเมื่ออยู่ในระบบที่มีน้ำและน้ำมัน จะจัดเรียงตัวเป็นฟิล์มที่แข็งแรงอยู่ที่บริเวณผิวประจันระหว่างวัฏภาคน้ำมันกับวัฏภาคน้ำ ดังภาพที่ 8

**ภาพที่ 8** ลักษณะจำลองของฟิล์มที่ผิวประจันระหว่างวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน เมื่อในระบบมีสารลดแรงตึงผิวชนิดเดียว



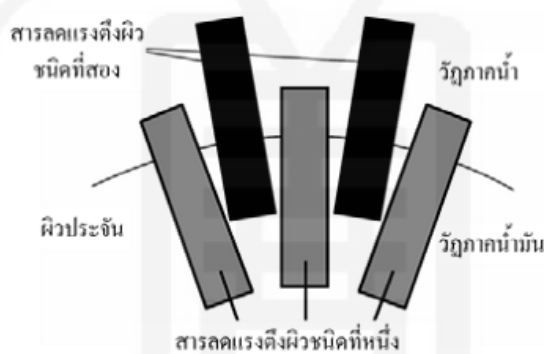
ที่มา: Pakpayat et al. 2011 <sup>(35)</sup>

การใช้สารลดแรงตึงผิว 2 ชนิดร่วมกัน เช่น ของผสมระหว่าง decyl glucoside กับ sorbitan monolaurate ของผสมระหว่าง polyoxyethylene-20-sorbitan monooleate กับ sorbitan monooleate ของผสมระหว่าง polyoxyethylene-20-sorbitan monooleate กับ sorbitan monolaurate เป็นต้น สามารถทำให้ได้ฟิล์มที่แข็งแรงมากขึ้น รวมถึงทำให้ฟิล์มมีความโค้ง (curvature) เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 9 ฟิล์มที่ผิวประจันระหว่างวัฏภาคน้ำมันกับวัฏภาคน้ำนี้ทำให้ระบบมี

เสถียรภาพ โดยทำให้วัฏภาคน้ำมันกับวัฏภาคน้ำซึ่งเป็นของเหลวที่ไม่สามารถผสมเข้าด้วยกัน (immiscible liquids) สามารถกระจายรวมอยู่ด้วยกันได้

นอกจากการใช้สารลดแรงตึงผิวสองชนิดร่วมกันแล้ว อาจใช้สารในกลุ่มแอลกอฮอล์สายโมเลกุลขนาดสั้นหรือปานกลาง เช่น ethanol, isopropanol และ butanol เป็นต้น และสารในกลุ่ม polyhydroxy compound เช่น glycerin, propylene glycol และ 1,3-butylene glycol เป็นต้น เพื่อทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมในระบบไมโครอิมัลชันได้ด้วย

**ภาพที่ 9** ลักษณะจำลองของฟิล์มที่ผิวประจันระหว่างวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน เมื่อในระบบสารลดแรงตึงผิวสองชนิดร่วมกัน



ที่มา: Pakpayat et al. 2011 <sup>(35)</sup>

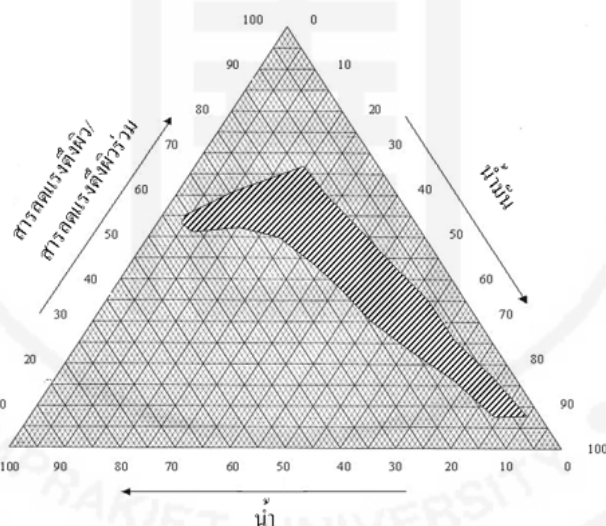
การหาส่วนประกอบที่เหมาะสมในการเกิดไมโครอิมัลชัน สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีเปลี่ยนอุณหภูมิเพื่อให้กลับวัฏภาค (phase inversion temperature method) วิธีไทเทรต (titration method) วิธีหาความเบี่ยงเบนในการชอบน้ำและชอบน้ำมัน (hydrophilic-lipophilic deviation method) และวิธีผสมตัวอย่างที่ละหลอด (preparing samples of different ratios of components in individual tubes) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจวิธีไทเทรต จึงจะขอกล่าวถึงหลักการทำวิธีไทเทรตดังนี้

### 2.6.3 วิธีไทเทรต (titration method) <sup>(35)</sup>

วิธีนี้เป็นการหาสัดส่วนของส่วนประกอบที่เหมาะสมในการเกิดไมโครอิมัลชัน โดยการผสมวัฏภาคน้ำมันกับของผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมเข้าด้วยกัน แล้วจึงทำการไทเทรตด้วยน้ำโดยคนตลอดเวลา โดยหลังจากการเติมน้ำในระบบทุกครั้งนั้นต้องคนให้สารเข้ากันดี และคอยจนกระทั่งระบบเข้าสู่สมดุล (equilibrium) จึงทำการไทเทรตต่อ จนกระทั่งถึงจุดที่ระบบมีลักษณะใส จุดนี้คือจุดที่เริ่มเกิดไมโครอิมัลชัน จากนั้นจึงทำการไทเทรตต่อจนถึงจุดที่ระบบ

มีลักษณะขุ่นหรือเริ่มเกิดการแยกชั้น จุดนี้คือจุดสิ้นสุดการเกิดไมโครอิมัลชัน ให้ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้กับส่วนผสมของวัฏภาคน้ำมันกับสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมในสัดส่วนอื่นจนครอบคลุมทุกสัดส่วน หลังจากนั้นจึงนำปริมาณของวัฏภาคต่าง ๆ ที่ทดลองได้ระบบไมโครอิมัลชันไปทำการเขียนกราฟในแผนภาพไตรภาคเทียม (pseudoternary phase diagram) ก็จะทำให้ทราบขอบเขตของการเกิดไมโครอิมัลชัน (microemulsion zone) ดังภาพที่ 10 แสดงตัวอย่างของผลลัพธ์หรือขอบเขตของการเกิดไมโครอิมัลชันที่ได้จากการไทเทรตของผสมระหว่าง dioctylcyclohexane (วัฏภาคน้ำมัน) กับสารผสมระหว่าง decyl glucoside: sorbitan monolaurate (สารลดแรงตึงผิว: สารลดแรงตึงผิวร่วม) และน้ำ

**ภาพที่ 10** ตัวอย่างแผนภาพไตรภาคเทียมแสดงขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชัน (บริเวณที่ระบายด้วยลายเส้นเฉียง)



ที่มา: Pakpayat et al. 2011 <sup>(35)</sup>

มีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิต และพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันมากมาย ยกตัวอย่างเช่น

ประภาพร บุญมี <sup>(34)</sup> ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของโครงสร้างระดับไมโครของไมโครอิมัลชัน และชนิดของสารลดแรงตึงผิวต่อประสิทธิภาพในการซึมผ่านผิวหนังของยาที่ไม่ชอบน้ำและยาที่ชอบน้ำ ซึ่งลักษณะของไมโครอิมัลชันในระบบที่ประกอบด้วย isopropyl palmitate (IPP): น้ำ: (brij 97: 1-butanol; 2:1) และ IPP: น้ำ: (aerosol OT (AOT): 1-butanol; 2:1) จากเทคนิคการทดลองหลายวิธี และศึกษาอิทธิพลของชนิดของไมโครอิมัลชันและระบบสารลดแรงตึงผิวต่อการซึมผ่าน

ผิวหนังของยาที่มีความชอบน้ำแตกต่างกัน โดยใช้ยาชาเฉพาะที่ 3 ชนิด คือ ลิโดเคน (lidocaine) เตตราเคน (tetracaine) ไดบูเคน (dibucaine) และเกลือไฮโดรคลอไรด์ (hydrochloride salts) เป็นตัวแทนของยาที่ไม่ชอบน้ำและยาที่ชอบน้ำ ตามลำดับ จากการทดลองวัดการนำไฟฟ้า ความหนืด cryo-field emission scanning electron microscopy (DSC cryo-FESEM) และ nuclear magnetic resonance (NMR) พบว่าทั้งระบบ IPP: น้ำ: (brij 97: 1-butanol; 2:1) และ IPP: น้ำ: (AOT: 1-butanol; 2:1) ให้ขอบเขตของไมโครอิมัลชันในเฟสไดอะแกรมไตรภาคเทียบคล้อยกัน และมีจุดเปลี่ยนจากไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและเป็นชนิดน้ำมันในน้ำที่มีความเข้มข้นน้ำใกล้เคียงกัน โดยที่มีปริมาณน้ำ 30%-35% โดยน้ำหนัก สำหรับระบบที่มีสารผสมของสารลดแรงตึงผิว 45% โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ผลของการศึกษาลักษณะชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) เป็นเทคนิคทางเลือกในการศึกษาลักษณะไมโครอิมัลชันที่เตรียมด้วย AOT ได้ การผสมยา 1% โดยน้ำหนัก ลงในไมโครอิมัลชันทั้งชนิดน้ำในน้ำมันและน้ำมันในน้ำซึ่งประกอบด้วยสารผสมของสารลดแรงตึงผิว 45% โดยน้ำหนัก และอัตราส่วนวัฏภาคภายในต่อวัฏภาคนอกเป็น 15%: 39% โดยน้ำหนัก ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงชนิดของไมโครอิมัลชัน ผลจากการศึกษาการซึมผ่านของยาเข้าสู่หนังกำพร้าของมนุษย์ที่เตรียมด้วยการแยกด้วยความร้อน โดยใช้ franz diffusion cell แสดงให้เห็นว่าธรรมชาติของไมโครอิมัลชันเป็นปัจจัยสำคัญในการนำส่งยาทางผิวหนัง สำหรับไมโครอิมัลชันทุกระบบ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำซึ่งมียาที่ไม่ชอบน้ำให้ผลการซึมผ่านผิวหนังสูงสุด การซึมผ่านของยาที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีค่ามากกว่าการซึมผ่านของยาที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ไมโครอิมัลชันที่เตรียมด้วย AOT ให้ผลการซึมผ่านของยากลุ่มลิโดเคนที่สูงกว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมด้วย brij 97 ในขณะที่การซึมผ่านของยากลุ่มเตตราเคนจากไมโครอิมัลชันที่เตรียมด้วย brij 97 มีค่าสูงกว่าสำหรับยากลุ่ม dibucaine ประสิทธิภาพการซึมผ่านจากไมโครอิมัลชันทั้ง 2 ระบบมีค่าใกล้เคียงกัน ความแตกต่างของประสิทธิภาพการซึมผ่านของยาจากไมโครอิมัลชัน 2 ระบบของสารลดแรงตึงผิวนี้อาจเกิดจากผลของความแตกต่างในการเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านของสารลดแรงตึงผิว และอันตรกิริยาระหว่างยากับสารลดแรงตึงผิว

Huang et al. <sup>(36)</sup> ได้ศึกษาการนำส่งสาร sodium nonivamide acetate (SNA) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ capsaicin ด้วยไมโครอิมัลชัน โดยวัตถุประสงค์ในการศึกษานี้คือ เพื่อเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันที่นำส่งสาร SNA โดยที่ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิวผสมระหว่าง tween80: span20 และใช้ ethanol เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม วัฏภาคน้ำมันใช้ isopropyl myristate และน้ำเป็นวัฏภาคภายนอก ศึกษาผลขององค์ประกอบของไมโครอิมัลชันที่มีส่วนผสมของอัตราส่วนน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และน้ำ โดยที่ทำการปรับเปลี่ยนสารลดแรงตึงผิวร่วม คุณสมบัติของ polymer ต่อการนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนัง ขนาดอนุภาคเฉลี่ยที่ได้ประมาณ 64-208 nm ไมโครอิมัลชันแสดงประสิทธิภาพในการนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนัง โดยเพิ่มขึ้น 3.7-7.1 fold เมื่อเทียบกับ

ตัวควบคุม ระบบไมโครอิมัลชันที่มีเอทานอลเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมมีประสิทธิภาพในการนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังสูงสุด ผลของการใส่ polymer ลงในตำรับไมโครอิมัลชันทำให้มีความหนืดเพิ่มขึ้น ทำให้การนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังลดลง อย่างไรก็ตาม จากรายงานผลการทดลองก่อนหน้านี้ ทำให้ทราบว่า การนำส่งสาร SNA เข้าสู่ผิวหนังอิมัลชันก็ยิ่งสูงกว่า SNA ที่อยู่ในตำรับทั่วไปที่เกิดระเหยได้ (buffer pH 4.2 และมีเอทานอล 25%) ดังนั้นไมโครอิมัลชันจึงมีประสิทธิภาพในการนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังดีกว่า SNA ในตำรับทั่วไป

Shakeel et al.<sup>(37)</sup> ได้ศึกษาการนำส่งสาร caffeine ซึ่งถือว่าเป็นยาต้านมะเร็งเข้าสู่ผิวหนังด้วยนาโนอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน โดยเตรียมนาโนอิมัลชันได้จากแผนภาพไตรภาคเทียม ในปัจจุบันนี้ คาเฟอีนได้รับความสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับการรักษามะเร็งหลายชนิด ซึ่งมีการพิสูจน์ว่าการใช้คาเฟอีนสามารถป้องกันมะเร็งผิวหนังจากการสัมผัสของแสงแดดได้ ดังนั้นจึงได้พัฒนาตำรับนาโนอิมัลชันที่สามารถนำส่งคาเฟอีนเข้าสู่ผิวหนัง และประเมินผลตรวจสอบสิ่งที่สนใจ โดยเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันด้วยวิธีไทเทรตด้วยเฟสน้ำมัน ศึกษาความคงตัวของนาโนอิมัลชันโดยดูลักษณะทางกายภาพ ขนาดอนุภาค ความหนืด และดัชนีหักเหแสง (refractive index) ส่วนการนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังศึกษาใน in vitro โดยใช้เครื่องมือ Franz diffusion cell และใช้หนังของหนูเป็น membrane โดยศึกษาการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนังเปรียบเทียบกับตำรับสารละลายสารคาเฟอีนธรรมดา พบว่าการนำส่งคาเฟอีนเพิ่มขึ้นในตำรับนาโนอิมัลชันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับตำรับสารละลายคาเฟอีนธรรมดา ค่า steady-state flux ( $J_{ss}$ ) เท่ากับ  $147.55 \pm 8.21 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  และค่า permeability coefficient ( $K_p$ ) ที่วัดได้จากตำรับนาโนอิมัลชัน (C12) เท่ากับ  $1.475 \times 10^{-2} \pm 0.031 \times 10^{-2} \text{ cm}/\text{h}$  ค่า enhancement ratio ( $E_r$ ) เท่ากับ 17.37 ในสูตรที่ C12 ซึ่งมีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรอื่นๆ ทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่านาโนอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันเป็นตัวนำส่งคาเฟอีนเข้าสู่ผิวหนังที่ดีมาก ซึ่งในการทดลองนี้ได้เตรียมนาโนอิมัลชันจากแผนภาพไตรภาคเทียมที่ประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิว (transcutol-HP) ผสมกับสารลดแรงตึงผิวร่วม (IPA) จากนั้นซึ่งส่วนผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมกับน้ำ และทำการไทเทรตด้วยเฟสน้ำมัน

Constantinides et al.<sup>(38)</sup> ทำการเตรียมสูตรตำรับ และการศึกษาลักษณะทางกายภาพของไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่ประกอบด้วย กลีเซอไรด์ (glycerides) สายกลางหรือสายยาว การทำให้เกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่มีขนาดวัฏภาคภายในเล็กที่สุดประมาณ 5-30 nm นั้นประกอบด้วย น้ำมัน สารผสมของสารลดแรงตึงผิว HLB ต่ำและสูงผสมกัน และน้ำ ตรวจสอบการเกิดไมโครอิมัลชันโดยการทำ pseudoternary phase diagram วัฏภาคน้ำมันประกอบด้วยกลีเซอไรด์ สายกลาง หรือสายยาว และใช้ mono-/diglycerides หรือ sorbitan ester (สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ต่ำ) ใช้ tween80 เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB สูง การเตรียมไมโคร

อิมัลชันทำได้โดยง่ายเพียงแค่เติมส่วนประกอบที่เหมาะสมจากนั้นคนด้วยมือให้เข้ากันดี ในกรณีนี้ ไมโครอิมัลชันประกอบไปด้วยกลีเซอไรด์สายยาวและ sorbitan ester และใช้อุณหภูมิสูง (40-60°C) เพื่อช่วยลดความหนืด อีกทั้งละลายส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันในระหว่างการเตรียมเป็น ไมโครอิมัลชัน จำกัดอัตราส่วนของน้ำ (< 10% w/w) ซึ่งสามารถละลายในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำ ในน้ำมันที่ประกอบด้วยกลีเซอไรด์สายยาวและ sorbitan ester ส่วนไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย กลีเซอรไรด์สายกลาง (mono-/ di-/ triglycerides) สามารถเตรียมที่อุณหภูมิห้องได้เลย และสามารถเพิ่มปริมาณของน้ำได้สูงถึง 40% (w/w) ได้ไมโครอิมัลชันที่มีส่วนประกอบดังนี้ captex 355: capmul MCM: tween80: saline (65: 22: 10: 3 w/w) โดยมีค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 0.54  $\mu\text{mhos/cm}$  ความหนืด 56.7 cP ดัชนีหักเหแสงเท่ากับ 1.449 ความหนาแน่นเท่ากับ 0.9677 และขนาดหยดวิภาคภายในเฉลี่ยเท่ากับ  $15.2 \pm 4.1$  nm (การกระจายอนุภาค 0.153) ส่วนไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วยกลีเซอไรด์สายยาวมีส่วนประกอบดังนี้ monoglycerides (soybean oil): arlacel 186: tween80: saline (65: 22: 10: 3 w/w) ซึ่งมีค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 0.177  $\mu\text{mhos/cm}$  ความหนืด 125.1 cP ดัชนีหักเหแสงเท่ากับ 1.471 ความหนาแน่นเท่ากับ 0.901 และขนาดหยดวิภาคภายในเฉลี่ยเท่ากับ  $10.3 \pm 2.5$  nm (การกระจายอนุภาค 0.114)

นิภาพร ประเสริฐวิทย์ และคณะ<sup>(39)</sup> ได้ศึกษาการพัฒนาตำรับยาทาต้านเชื้อราในระบบไมโครอิมัลชันที่มีน้ำมันเป็นส่วนประกอบ ระบบไมโครอิมัลชันซึ่งใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นวิภาคน้ำมันได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้ cremophor RH 40 ร่วมกับ span 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว และใช้ absolute ethanol เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม โดยทำการศึกษาที่สัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อ absolute ethanol เท่ากับ 2:1 พบว่าเมื่อเพิ่มสัดส่วนของ cremophor RH 40: span 80 จาก 1:5 เป็น 1:3 และ 1:2 ตามลำดับ บริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันบน ternary phase diagram เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อสัดส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 2:3 ปรากฏว่าบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันกลับลดลง นั่นคือ cremophor RH 40: span 80 (1:2) เป็นสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวที่ทำให้เกิดขอบเขตไมโครอิมัลชันมากที่สุด ซึ่งอิมัลชันที่เกิดขึ้นเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ เมื่อเพิ่มสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อ absolute ethanol จาก 2:1 เป็น 3:1 และ 4:1 พบว่าบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันไม่ได้เพิ่มมากขึ้น และไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้นมีทั้งชนิดน้ำมันในน้ำและน้ำในน้ำมัน นอกจากนี้ยังพบผลึกเหลวในวิภาคน้ำอีกด้วย เมื่อใส่ ketoconazole สัดส่วน 2% w/w พบว่าระบบไมโครอิมัลชัน และผลึกเหลวสามารถละลายยาได้ดี มีบางสัดส่วนที่ยาอาจมีผลช่วยทำให้เกิดระบบผลึกเหลว เนื่องจากพบ ketoconazole ในผลึกเหลวซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวในวิภาคภายนอก และ ketoconazole สามารถละลายได้ใน absolute ethanol ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ดังนั้น ketonazole อาจส่งผลต่อการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมในระบบไมโครอิมัลชันและผลึกเหลว



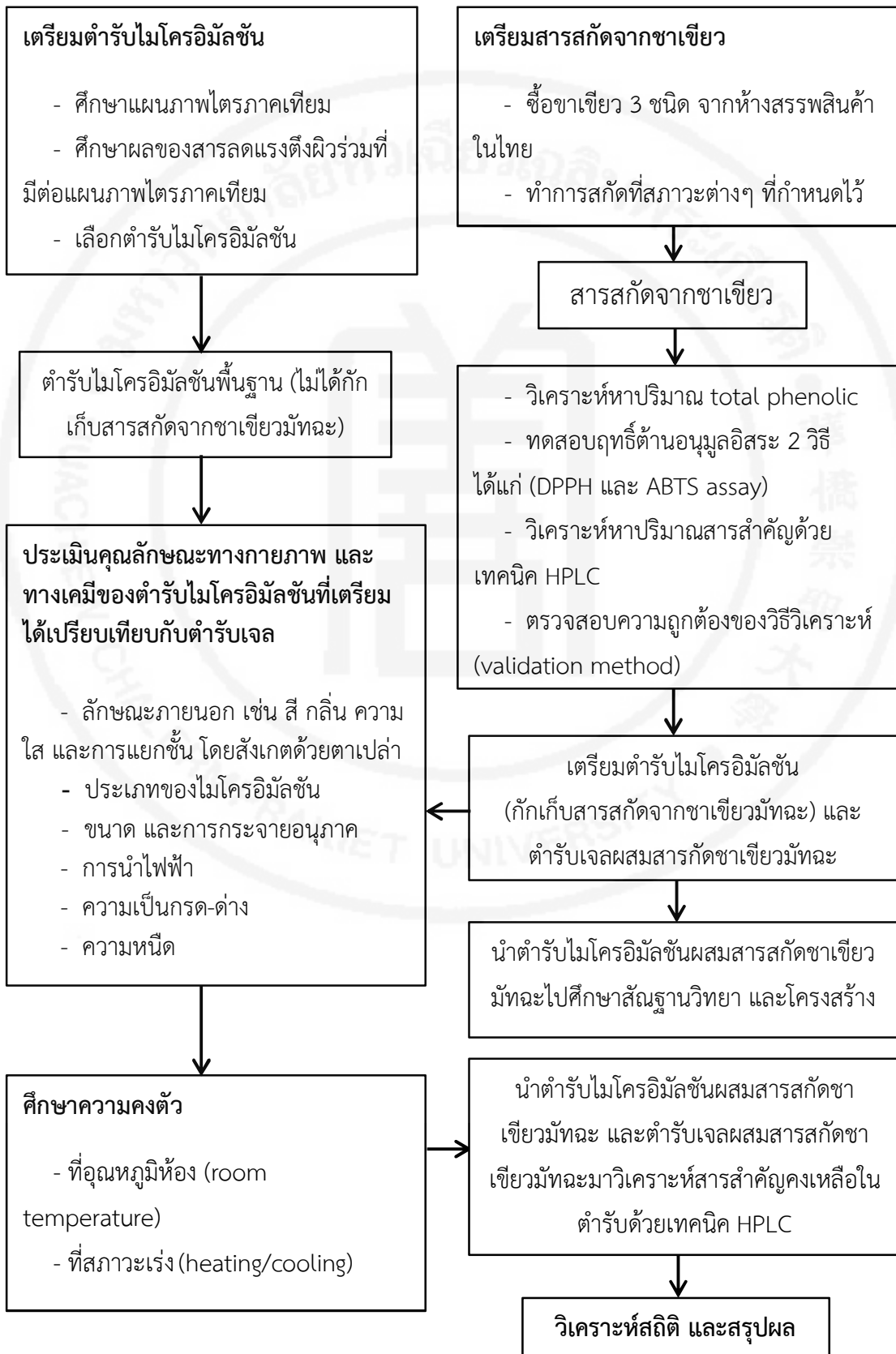
นอกจากนี้ หากบริเวณใดมีปริมาณสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมน้อยจะพบการตกตะกอนของยาได้

Trotta et al.<sup>(40)</sup> ได้ศึกษาพฤติกรรมวัฏภาคของระบบไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย lecithin และ lysolecithin เป็นสารลดแรงตึงผิว โดยศึกษาจาก phase diagram ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 25°C และศึกษาแผนภาพไตรภาคเทียบจากระบบที่ประกอบด้วยน้ำ isopropyl myristate สารลดแรงตึงผิวผสมระหว่าง lecithin: lysolecithin ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน และสารลดแรงตึงผิวร่วมคือ ethanol ซึ่ง lysolecithin ได้มาจากระบวนการ hydrolysis ด้วยเอนไซม์ของ soybean lecithin โดยที่อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมระหว่าง lysolecithin: lecithin เป็นไปตามสัดส่วนต่อไปนี้ 0.7:1, 1.4:1, 2.1:1 สำหรับระบบที่มี 1-butanol ส่วนระบบที่มี 1-propanol หรือ ethanol ให้สัดส่วนเท่ากับ 1.4:1 และให้อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมนี้นี้ 1:2, 1:1 และ 2:1 สำหรับระบบที่มี 1-butanol ส่วนอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 สำหรับระบบที่มี 1-propanol และ ethanol ระบบที่พฤติกรรมวัฏภาคเกิด liquid crystalline พบเฉพาะที่มีส่วนประกอบของ 1-butanol อัตราส่วน 2:1 ขอบเขตวัฏภาคการเกิดไมโครอิมัลชันขึ้นอยู่กับสารลดแรงตึงผิวร่วมนี้อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสม (lysolecithin: lecithin) และอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิวร่วม

Li et al.<sup>(41)</sup> ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของการผสมสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุต่อการเตรียมไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ โดยศึกษา phase diagram ของส่วนประกอบดังนี้ capmul PG8 (propylene glycol monocaprylate) เป็นเฟสน้ำมัน และใช้ tween 20 และ cremophor EL (polyoxly 35 castor oil) เป็นสารลดแรงตึงผิว ปริมาณที่เลือกได้จาก phase diagram มีดังนี้ O<sub>20</sub>T<sub>80</sub> (capmul PG8 20%, tween20 80%), O<sub>20</sub>C<sub>80</sub> (capmul PG8 20%, cremophor EL 80%), O<sub>20</sub>T<sub>40</sub>C<sub>40</sub> (capmul PG8 20%, tween20 40% และ cremophor EL 40%) ซึ่งทำการโหลดยา plurbiprofen ที่ 0%, 1%, 2.5% และ 5% (w/w) โดยใช้วิธีการไทเทรต สำหรับการใส่สารลดแรงตึงผิวเพียงตัวเดียว เช่น O<sub>20</sub>T<sub>80</sub> หรือ O<sub>20</sub>C<sub>80</sub> ทำให้ได้อิมัลชันลักษณะขุ่น ขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นตามปริมาณการโหลดยาที่เพิ่มขึ้น สำหรับการให้สารลดแรงตึงผิว 2 ชนิดผสมกัน O<sub>20</sub>T<sub>40</sub>C<sub>40</sub> ได้ไมโครอิมัลชันที่มีลักษณะใส ขนาดอนุภาคภายในเล็ก (10-11 nm) ไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย O<sub>20</sub>T<sub>40</sub>C<sub>40</sub> พบว่ามีความคงตัวที่อุณหภูมิห้องเมื่อเก็บที่ 20 วัน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของหยดวัฏภาคภายในจากการโหลดยาที่ความเข้มข้นต่างๆ การเจือจางปริมาณน้ำ simulate gastic fluid หรือ simulate intestinal fluid ล้วนไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของขนาดหยดวัฏภาคภายในของไมโครอิมัลชัน

## 2.7 กรอบแนวคิดที่ใช้ในงานวิจัย

### แผนภูมิที่ 2 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย



### บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง Mettler Toledo™ รุ่น ML 3002E/01 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
2. เครื่องชั่งวิเคราะห์ ความละเอียดทศนิยม4 ตำแหน่ง Mettler toledo รุ่น ML 204/01 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
3. เครื่องวัดความหนืด Brookfield Model DV-II+ Pro viscometer with small sample adapter (spindle เบอร์ S18) ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) Schott Instrument รุ่น Lab 850
5. เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity meter) Mettler Toledo™ บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd. ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
6. เครื่องวัดขนาดอนุภาค รุ่น Delsa™ Nano C บริษัท BECKMAN COULTER® ประเทศญี่ปุ่น
7. เครื่องแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) บริษัท Thermo Electron Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. เครื่องทำระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) รุ่น LABOROTA 4011, Heidolph® ประเทศเยอรมัน
9. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) รุ่น TECNAI™ 20 TWIN บริษัท FEI Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. คอลัมน์ ACE 10 C18 reversed phase (250 x 4.6 mm, 5 µm) จากบริษัท Advanced Chromatography technologies Co., Ltd.
11. ตู้เย็น Mitsubishi® รุ่น MR-F50C/ST
12. ตู้อบลมร้อน Memmert® รุ่น D06062 modell600 ประเทศเยอรมัน
13. เครื่องเขย่าสารด้วยความถี่สูง (sonicator) Bransonic Ultrasonic Cleaner รุ่น 2510 E-MT ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) GAST รุ่น DOA-V505-BN ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมขาตั้งและที่จับยึด
16. ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 25, 50, 100, 250, 600, 1000, 2000 มิลลิลิตร
17. หลอดทดลอง (test tube) พร้อมฝาปิดขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 50 หลอด
18. หลอดหยดสาร (dropper)

19. แท่งแก้วคน (stirring rod)
20. ที่วางตระแกรง (rank)
21. เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer)
22. ขวดรองรับสาร (receiving flask)
23. ขวดกรองสาร (suction flask)
24. ถูชิปลือก
25. ฟอล์ย (foil)
26. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
27. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 10, 100 และ 2000 มิลลิลิตร
28. กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman™ No.1)
29. กรวยกรอง (funnel)
30. ขวดก้นกลม (round bottom flask)
31. ไมโครปิเปต (micropipettes) ขนาด 10, 100 และ 1000 ไมโครลิตร Eppendorf Research plus ประเทศเยอรมัน
32. ทิป (tips) Eppendorf Research plus ประเทศเยอรมัน
33. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10, 25, 50, 100, 200, 250 และ 500 มิลลิลิตร
34. ขวดเก็บตัวอย่างไมโครอิมัลชัน และสารสกัดมีฝาปิด ขนาด 50 ml
35. การ์ดคอลลัมน์ (guard column) Phenomenex® ประเทศสหรัฐอเมริกา
36. เครื่อง UV spectrophotometer รุ่น Jasco V630 บริษัท Jasco Coporation ประเทศญี่ปุ่น
37. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) รุ่น Christ Alpha 1-2 LD ประเทศสหราชอาณาจักร

### 3.2 วัสดุดิบ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. ชาเขียว 3 ชนิด ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเซนฉะ และชาเขียวบันฉะ จากห้างสรรพสินค้าในประเทศไทย
2. สารมาตรฐาน caffeine, epicatechin, epigallocatechin gallate บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. สารละลาย Folin-Ciocalteu บริษัท LOBA Chemie ประเทศอินเดีย
6. สารมาตรฐาน L-ascorbic acid บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. สารมาตรฐาน gallic acid บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
8. methanol เกรด HPLC บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
9. methanol เกรด AR บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
10. ethanol เกรด AR บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
11. acetonitrile บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
12. glacial acetic acid บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
13. deionized water มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ประเทศไทย
14. jojoba oil บริษัท Hong Huat Co., Ltd. ประเทศไทย
15. span80 (sorbitan monooleate) บริษัท Namsiang Company Limited ประเทศไทย
16. isopropyl alcohol บริษัท QReC™ ประเทศนิวซีแลนด์
17. cremophor RH40 (PEG-40 hydrogenated castor oil) บริษัท Namsiang Company Limited ประเทศไทย
18. kolliphor EL (PEG-35 hydrogenated castor oil) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท BASF
19. kolliphor HS15 (polyethylene glycol (15)-hydroxystearate) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท BASF

### 3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.3.1 การเตรียมสารสกัดชาเขียว

ทำการสกัดชาเขียว 3 ชนิด คือ ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเซนฉะ และชาเขียวบั้นฉะ โดยชั่งตัวอย่างชาเขียวแต่ละชนิดมา 2 g และสกัดที่สภาวะแตกต่างกัน ดังแสดงในแผนภูมิที่ 3

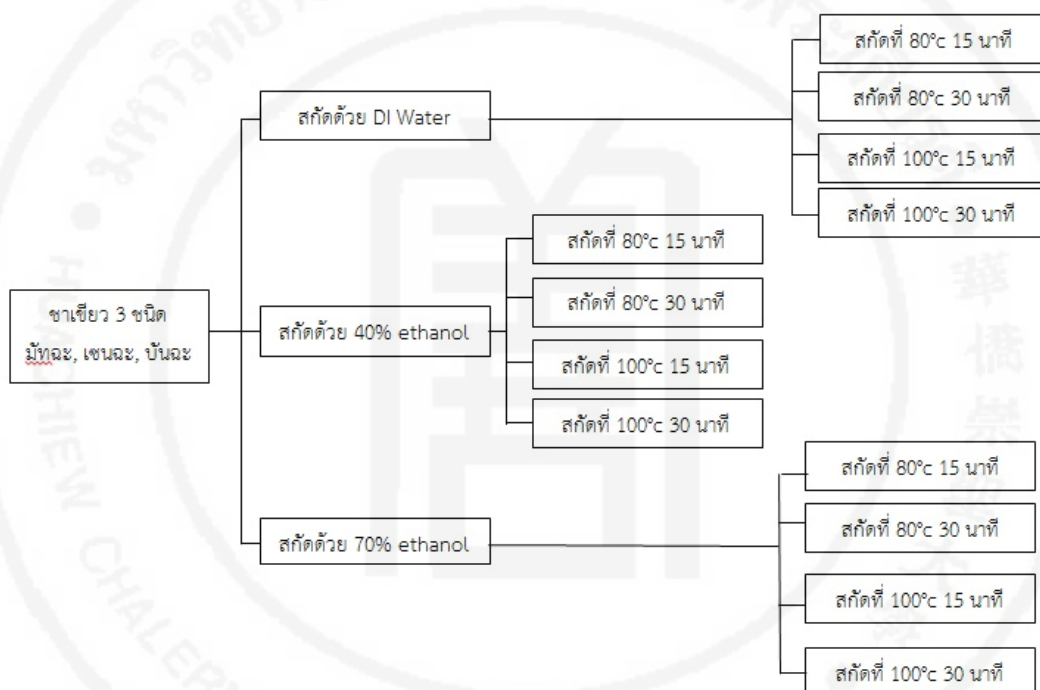
- ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด 3 ชนิด คือ น้ำ 40% ethanol และ 70% ethanol ปริมาตร 50 ml

- อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน ณ ที่ 80°C และ 100°C โดยถ้าเป็นในส่วน 40% ethanol และ 70% ethanol ต้มน้ำให้ได้อุณหภูมิที่ต้องการ ตวงผสมกับเอทานอลให้ได้ตามสัดส่วน จากนั้นคนและตั้งทิ้งไว้ให้ครบตามเวลาที่กำหนด

- เวลาที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน ที่เวลา 15 และ 30 นาที ในการสกัดของแต่ละตัวอย่างชาเขียว

หลังจากสกัดชาเขียวแต่ละชนิดในสภาวะที่แตกต่างกัน จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูเฉพาะส่วนใสมา 10 ml ใส่ภาชนะที่มีฝาปิด จากนั้นนำไปเก็บที่ 0°C เพื่อรอการทดสอบอื่น ๆ ต่อไป

### แผนภูมิที่ 3 แผนผังการสกัดชาเขียว



### 3.3.2 การหาปริมาณ total phenolic contents

หาปริมาณ total phenolics จากสารสกัดชาเขียว 3 ชนิด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ตาม วิธีของ Rusak et al. <sup>(24)</sup> ดังนี้

1) เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu 10% v/v

ดูดสารละลาย Folin-Ciocalteu มาจำนวน 10 ml ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 100 ml

2) เตรียม sodium carbonate 20% w/v

ชั่ง sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) มาจำนวน 100 g ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 500 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 500 ml

3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน

ซึ่งสารมาตรฐาน gallic acid จำนวน 25 mg ใน volumetric flask ขนาด 25 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 25 ml ได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐานเท่ากับ 1 mg/ml จากนั้น dilute ด้วยน้ำให้ได้ 5 ความเข้มข้น ดังนี้ 0.25, 0.1, 0.004, 0.00016 และ 0.0000064 mg/ml

#### 4) เตรียมสารละลายสารสกัดชาเขียว

ทำการ dilute สารสกัดชาเขียวแต่ละชนิด แต่ละสถานะการสกัดให้ได้ 5 ความเข้มข้น ดังนี้ 0.5, 0.2, 0.08, 0.032 และ 0.0128 mg/ml

#### ขั้นตอนการทดลอง

- ปิเปตสารมาตรฐาน หรือสารสกัดที่แต่ละความเข้มข้นมาจำนวน 0.1 ml ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml

- เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 10% v/v จำนวน 0.5 ml,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% w/v จำนวน 1.5 ml และน้ำจำนวน 6 ml ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที

- เมื่อครบเวลาปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 10 ml แล้วจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ยี่ห้อ Jasco รุ่น V-530 ที่ 765 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และความเข้มข้น รายงานผลเป็น mg GAE/g dry weight

### 3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

#### 1. DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ตามวิธีของ Jun et al. <sup>(22)</sup>  
ดังนี้

##### 1) เตรียมสารละลาย DPPH

ซึ่ง DPPH จำนวน 0.004 g ใน volumetric flask 100 ml ปรับปริมาตรด้วย absolute ethanol จนครบ 100 ml ได้สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM

##### 2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid

ซึ่งสารมาตรฐาน L-ascorbic acid มาจำนวน 0.0625 g ใน volumetric flask 25 ml ได้ความเข้มข้น 2.5 mg/ml จากนั้น dilute ให้ได้ 5 ความเข้มข้น ดังนี้ 0.01, 0.005, 0.001, 0.0006 และ 0.00006 mg/ml

##### 3) เตรียมสารละลายสารสกัดชาเขียว

เตรียมสารสกัดชาเขียว โดย dilute สารสกัดชาเขียวให้ได้ 5 ความเข้มข้นดังนี้ 0.2, 0.1, 0.04, 0.016 และ 0.0064 mg/ml

### ขั้นตอนการทดลอง

- ปิเปตสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดที่แต่ละความเข้มข้นมาจำนวน 2 ml ผสมกับสารละลาย DPPH จำนวน 2 ml เปรียบเทียบกับ control
- ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV/VIS spectrophotometer ที่ 515 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- สร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง %inhibition และความเข้มข้น รายงานผลเป็นค่า IC<sub>50</sub>

### 2. ABTS assay

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ตามวิธีของ Ndlovu et al. <sup>(42)</sup>

ดังนี้

- 1) เตรียมสารละลาย potassium persulfate ( $K_2S_2O_8$ )  
ชั่ง potassium persulfate มาจำนวน 3.7845 g ใน volumetric flask 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบ 100 ml ได้สารละลาย potassium persulfate ความเข้มข้น 140 mM
- 2) เตรียมสารละลาย ABTS<sup>•+</sup>  
ชั่งสาร ABTS<sup>•+</sup> มาจำนวน 0.3841 g ใน volumetric flask 100 ml ปรับปริมาตรด้วย absolute ethanol จนครบ 100 ml ได้สารละลาย ABTS<sup>•+</sup> ความเข้มข้น 7 mM
- 3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid  
ชั่งสารมาตรฐาน L-ascorbic acid มาจำนวน 0.0625 g ใน volumetric flask 25 ml ได้ความเข้มข้น 2.5 mg/ml จากนั้น dilute ให้ได้ 5 ความเข้มข้นดังนี้ 0.05, 0.04, 0.03, 0.02 และ 0.01 mg/ml
- 4) เตรียมสารละลายสารสกัดชาเขียว  
เตรียมสารสกัดชาเขียว โดย dilute สารสกัดชาเขียวให้ได้ 5 ความเข้มข้น ดังนี้ 1.0, 0.5, 0.1, 0.02 และ 0.001 mg/ml

### ขั้นตอนการทดลอง

- oxidize สารละลาย ABTS<sup>•+</sup> ด้วย  $K_2S_2O_8$  เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 12-16 ชม.
- นำสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> ที่ได้มาลองวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV/VIS spectrophotometer ที่ 405 นาโนเมตร หรือ dilute สารละลายด้วยน้ำ จนกว่าจะได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง  $0.7 \pm 0.05$
- ดูดสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดที่แต่ละความเข้มข้นมาจำนวน 400  $\mu$ l ผสมกับสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> ที่ถูก oxidized แล้วจำนวน 4 ml ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับ control



- เมื่อครบเวลานำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV/VIS spectrophotometer ที่ 405 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- สร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง %inhibition และความเข้มข้น รายงานผลเป็นค่า IC<sub>50</sub>

### 3.3.4 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ในงานวิจัยนี้ใช้การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

#### 1) ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity)

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน caffeine ในน้ำ ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 0.1, 0.075, 0.05, 0.025 และ 0.005 mg/ml
- เตรียมสารละลายมาตรฐาน epicatechin ในน้ำ ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 0.2, 0.15, 0.10, 0.05 และ 0.01 mg/ml
- เตรียมสารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate ในน้ำ ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 0.4, 0.25, 0.04, 0.025 และ 0.015 mg/ml
- นำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ
- สร้างกราฟเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ (correlation coefficient : r<sup>2</sup>)

#### 2) ความแม่นยำ (accuracy)

- เตรียมสารละลายสารสกัดชาเขียวมัทฉะความเข้มข้น 1 mg/ml
- เติมสารละลายมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงในสารสกัดชาเขียวมัทฉะ โดยให้ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของปริมาณสาร caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะ ที่ 3 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 80, 100 และ 120
- ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณผลเป็นค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery)

3) ความเที่ยง (precision) ทำการตรวจสอบความเที่ยงในวันเดียวกัน (intra day) และ ความเที่ยงต่างวัน (inter day) ดังนี้

- ความเที่ยงในวันเดียวกัน โดยการฉีดวิเคราะห์สารละลายสกัดชาเขียวมัทฉะในวันเดียวกัน สภาวะการทดลองเดียวกัน ทำการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ
- ความเที่ยงต่างวัน นำสารละลายสารสกัดชาเขียวมัทฉะหลังจากวันที่ฉีดวิเคราะห์ความเที่ยงในวันเดียวกันแล้วเก็บไว้จนครบเวลา 4 วัน มาทำการฉีดวิเคราะห์ 6 ซ้ำ

### 3.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance Liquid Chromatography; HPLC)

#### 1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard solutions)

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน caffeine ในน้ำ ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 0.1, 0.075, 0.025, 0.01 และ 0.005 mg/ml

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน epicatechin ในน้ำ ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 0.2, 0.15, 0.10, 0.05 และ 0.01 mg/ml

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate ในน้ำ ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 0.4, 0.25, 0.04, 0.025 และ 0.015 mg/ml

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะที่พัฒนาแล้ว ดังนี้ วัฏภาคคงที่แบบย้อนกลับด้วยคอลัมน์ชนิด RP-C18 reversed phase (ความยาว 25 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มม.) วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย water: acetonitrile: methanol: ethyl acetate: glacial acetic acid อัตราส่วนคงที่ 89: 6: 1: 3: 1 (โดยปริมาตร) อัตราการไหล 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ปริมาณสารละลายตัวอย่างที่ฉีดครั้งละ 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่าง ที่แต่ละความเข้มข้นอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีค (peak area) ทั้ง 5 ความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละตัวมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

#### 2) การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

- เตรียมสารสกัดชาเขียวมัทฉะใน 40% เอทานอล ให้มีความเข้มข้น 2 mg/ml แล้วนำไปกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ 0.22 ไมครอน

- ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะ ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และนำพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย

- นำพื้นที่ใต้พีคของ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate เพื่อคำนวณหาปริมาณ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะ โดยคำนวณจากสมการเชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ที่ได้จากการหาความสัมพันธ์เชิงเส้น

### 3.3.6 การเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันพื้น และไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ โดยการสร้างแผนภาพไตรภาคเทียม

งานวิจัยนี้เตรียมตำรับไมโครอิมัลชันพื้นฐาน (microemulsion base) โดยใช้วัสดุภาคสารลดแรงตึงผิวผสมระหว่าง span80: cremophor RH40, span80: kolliphor EL, span80: kolliphor HS15 ที่อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก โดยเตรียมสารลดแรงตึงผิวผสมดังกล่าว และน้ำมันโจโจบา (jojoba oil) ให้ได้สัดส่วนโดยมวลเป็น 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 จากนั้นนำมาไทเทรตด้วยน้ำ โดยค่อยๆ หยดน้ำลงไปผสม คนตลอดจนกว่าจะเข้ากันดี สังเกตลักษณะด้วยตาเปล่า และหยุดการไทเทรตเมื่อพบว่าระบบเกิดการเปลี่ยนแปลงจากใสไปขุ่น ระบบที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสเป็นระบบวัฏภาคเดี่ยว (one phase system) จัดว่าเป็นไมโครอิมัลชัน จากนั้นนำค่าปริมาตรน้ำที่ได้ไปคำนวณเป็นสัดส่วนเปอร์เซ็นต์โดยมวลของระบบ และบันทึกผลลงในแผนภาพไตรภาคเทียมด้วยซอฟต์แวร์ Sigma Plot 11.0 เพื่อเปรียบเทียบพื้นที่ของไมโครอิมัลชัน

จากการทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิว span80: cremophor RH40 ให้ขอบเขตของการเกิดไมโครอิมัลชันมากที่สุด จึงเลือกมาศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดของ span80: cremophor RH40 โดยปรับอัตราส่วนจาก 1:1 เป็น 2:1 ร่วมกับการใช้สารลดแรงตึงผิวร่วม isopropyl alcohol (IPA) คัดเลือกจุดที่เหมาะสมภายในพื้นที่ของระบบวัฏภาคเดี่ยวในแผนภาพไตรภาคเทียมเป็นตัวแทนของตำรับ เพื่อประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และความคงตัว จากนั้นจึงเลือกตำรับไมโครอิมัลชันพื้นฐานที่มีความคงตัวดีทั้งหมด 6 ตำรับมาผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ (Matcha green tea loaded microemulsion; GLM) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของตำรับไมโครอิมัลชันที่คัดเลือกมาผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

ตำรับ	ส่วนประกอบ (%w/w)			
	jojoba oil	span80: cremophor RH40 (1:1)	water: IPA (1:1)	Matcha green tea extract
GLM 1	43.34	45.53	10.63	0.50
GLM 2	33.99	49.90	15.61	0.50
GLM 3	29.36	49.90	20.24	0.50
GLM 4	24.31	49.90	25.29	0.50
GLM 5	29.05	54.76	15.69	0.50
GLM 6	23.98	54.76	20.76	0.50

### 3.3.7 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

1) ลักษณะภายนอก: ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของตำรับไมโครอิมัลชัน เช่น ตรวจสอบสี กลิ่น ความใส หรือการแยกชั้น เป็นต้น โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า (visual observation)

2) ประเภทของไมโครอิมัลชัน: นำตำรับไมโครอิมัลชันมาหยดด้วยสไลด์ลายน้ำ จับเวลา 10 นาที เปรียบเทียบกับตำรับไมโครอิมัลชันที่หยดสไลด์ลายน้ำมัน แล้วจึงสังเกตการแพร่กระจายของสีในตำรับไมโครอิมัลชันเปรียบเทียบกับ

3) ขนาด และการกระจายอนุภาค (size and polydispersity index; PI) วัดด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค BECKMAN COULTER<sup>®</sup> รุ่น Delsa™ Nano C ที่อุณหภูมิ 25°C ด้วยเทคนิค photon correlation spectroscopy (PCS) วัดซ้ำ 3 ครั้ง

4) การนำไฟฟ้า (conductivity) วัดด้วยเครื่อง Mettler teledo™ conductivity อุณหภูมิ 25°C วัดซ้ำ 3 ครั้ง

5) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) วัดด้วยเครื่อง Eutech™ pH 700 ที่อุณหภูมิ 25°C วัดซ้ำ 3 ครั้ง

6) ความหนืด (viscosity) วัดด้วยเครื่อง Brookfield DVII++ Pro Viscometer ต่อกับ small sample adapter วัดที่อุณหภูมิ 25°C ซ้ำ 3 ครั้ง

### 3.3.8 การเตรียมตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

ตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะได้ดัดแปลงสูตรจากงานวิจัยของ ขวลิขิต คำทวี และชานนท์ เรืองรัตน์วณิชยา<sup>(14)</sup> โดยเตรียมได้จากส่วนประกอบดังตารางที่ 3 เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะในขั้นตอนต่อไป

### ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

ส่วนประกอบ	%w/w
water	82.17
glycerin	11.06
70% sorbitol	2.43
span 80	0.55
germaben II	0.55
triethanolamine	0.52
carbopol 940	1.11
dimethicone	1.11
Matcha green tea extract	0.50

#### 3.3.9 การทดสอบความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

- เก็บที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) โดยเก็บตัวอย่างตำรับไมโครอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน และประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และเคมีตามหัวข้อ 3.3.8 ทุก ๆ 15 วัน

- เก็บที่สภาวะเร่ง (heating/cooling) โดยเก็บตัวอย่างตำรับไมโครอิมัลชันสลับอุณหภูมิ ดังนี้ ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สลับกับอุณหภูมิสูงที่ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คิดเป็น 1 รอบ ทำทั้งหมด 6 รอบ แล้วจึงประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และเคมีตามหัวข้อ 3.3.8

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าตำรับ GLM4 มีความคงตัวดีที่สุดใน การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และเคมีเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ และนำไปตรวจสอบสัณฐานวิทยา (morphology) และโครงสร้าง โดยย้อมสีตัวอย่างด้วย uranyl acetate (negative strain) แล้วส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) รุ่น Tecnai<sup>TM</sup> 20 Twin ที่ศักย์ไฟฟ้า 120 kV รวมทั้งการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

### 3.3.10 การเปรียบเทียบความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ GLM4 กับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

นำตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะมาทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน และ heating/cooling cycle 6 รอบ แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และความหนืดของทั้ง 2 ตำรับเปรียบเทียบกัน

### 3.3.11 การเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

ทำการชั่งตัวอย่างทั้ง 2 ตำรับมาจำนวนอย่างละ 1 g ละลายด้วย absolute ethanol 9 ml เขย่าให้สารละลายเข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วจึงค่อยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เอาเฉพาะส่วนใสไปกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22 $\mu$  นำสารละลายที่กรองได้ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ได้พัฒนาแล้ว โดยมีสถานะในการทดลองดังหัวข้อที่ 3.3.4 จากนั้นคำนวณหาปริมาณ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate จากกราฟมาตรฐานของสารสำคัญแต่ละชนิด และรายงานผลเป็น มก.ต่อกรัมสารสกัด (mg/g dry weight) จากนั้นจึงคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารสำคัญคงเหลือในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะเปรียบเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

### 3.3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากข้อมูลผลการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วจึงวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 17.0 และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (three-way ANOVA) ด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 ( $p < 0.05$ ) ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างผลการวิเคราะห์หา total phenolics และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธีได้แก่ DPPH และ ABTS assay ของสารสกัดชาเขียว อีกทั้งวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันทั้ง 6 ตำรับเปรียบเทียบกัน แล้วจึงเปรียบเทียบระหว่างวันเริ่มต้นเก็บที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน และ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบ และใช้สถิติ Independent sample T-Test ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างเปอร์เซ็นต์สารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวเปรียบเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน และ heating/cooling cycle จำนวน 6 รอบ

### 3.4 ระยะเวลาและแผนการดำเนินงาน

#### แผนภูมิที่ 4 ระยะเวลาและแผนการดำเนินงาน

การดำเนินงาน	พ.ศ. 2556	พ.ศ.2557				พ.ศ.2558			
		ม.ค.- มี.ค.	เม.ย.- มิ.ย.	ก.ค.- ก.ย.	ต.ค.- ธ.ค.	ม.ค.- มี.ค.	เม.ย.- มิ.ย.	ก.ค.- ก.ย.	ต.ค.- ธ.ค.
1. ทบทวนวรรณกรรม	↔								
2.เตรียมตำรับไมโครอิมัลชัน พื้นฐาน ประเมินคุณลักษณะ ทางกายภาพ และทางเคมี และ ศึกษาความคงตัว	↔								
3. สกัดชาเขียว 3 ชนิดที่สภาวะ ในการสกัดแตกต่างกัน			↔						
4. วิเคราะห์หาปริมาณ total phenolics				↔					
5. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธี DPPH และ ABTS				↔					
6. วิเคราะห์หาปริมาณ สารสำคัญในสารสกัดชาเขียว ด้วยเทคนิค HPLC					↔				
7. ตรวจสอบความถูกต้องของ วิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC					↔				
8. เตรียมตำรับไมโครอิมัลชัน และตำรับเจลผสมสารสกัดชา เขียว รวมทั้งประเมินความคง ตัวทางกายภาพ และทางเคมี						↔			
9. วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ สารสำคัญคงเหลือในตำรับไม โครอิมัลชัน และตำรับเจลผสม สารสกัดชาเขียวเปรียบเทียบกัน						↔			
10. สรุปและอภิปรายผล						↔	↔	↔	↔
11. ตีพิมพ์ผลงาน									↔
12. เขียนรายงาน						↔	↔	↔	↔

## บทที่ 4 ผลการวิจัย และอภิปรายผล

### 4.1 การเตรียมสารสกัดชาเขียว และหาปริมาณสาร total phenolics

เพื่อศึกษาว่าปัจจัยดังต่อไปนี้ มีผลต่อปริมาณสาร total phenolics ที่สกัดได้จากชาเขียวหรือไม่

- ชนิดของชาเขียว ได้แก่ ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเซนฉะ และชาเขียวบันฉะ
- สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำ, 40% เอทานอล และ 70% เอทานอล
- สภาวะในการสกัด ได้แก่ 80 องศาเซลเซียส 15 นาที 80 องศาเซลเซียส 30 นาที 100 องศาเซลเซียส 15 นาที และ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที

ผลการทดลองพบว่าการสกัดชาเขียว 3 ชนิด ด้วยสภาวะการสกัดที่แตกต่างกันทำให้ได้ปริมาณ total phenolics แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รายละเอียดการวิเคราะห์สถิติแสดงในภาคผนวก ก) กล่าวคือ ชาเขียวมัทฉะที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 80°C โดยใช้ตัวทำละลาย 40% เอทานอล และใช้เวลาในการสกัดนาน 30 นาที ได้ปริมาณ total phenolics มากที่สุดเท่ากับ  $137.0333 \pm 1.5948$  mg GAE /g น้ำหนักชาเขียวแห้ง และชาเขียวบันฉะที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 80°C โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย และเวลาในการสกัด 15 นาที ได้ปริมาณ total phenolics น้อยที่สุดเท่ากับ  $36.6000 \pm 0.7000$  mg GAE /g น้ำหนักชาเขียวแห้ง

### 4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาเขียว

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาเขียว 2 วิธี ได้แก่ DPPH และ ABTS Assay โดยวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid พบว่า สารมาตรฐานมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.0052 \pm 0.0001$  mg/ml และ  $0.0321 \pm 0.0001$  mg/ml ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาเขียว 3 ชนิด ได้แก่ ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเซนฉะ และชาเขียวบันฉะ ที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดแตกต่างกันคือน้ำ, 40% เอทานอล และ 70% เอทานอล รวมทั้งสภาวะในการสกัดแตกต่างกันคือ 80°C 15 นาที, 80 °C 30 นาที, 100 °C 15 นาที และ 100 °C 30 นาทีนั้นมีค่า  $IC_{50}$  ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รายละเอียดการวิเคราะห์สถิติแสดงในภาคผนวก ก) กล่าวคือ การสกัดชาเขียวมัทฉะด้วย 40% เอทานอล ที่อุณหภูมิ 80°C 30 นาที ได้ค่า  $IC_{50}$  ของวิธี DPPH และ ABTS น้อยที่สุดเท่ากับ  $0.0504 \pm 0.0003$  และ  $0.0352 \pm 0.0001$  mg/ml ตามลำดับ และชาเขียวบันฉะสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 80 °C 15 นาทีได้ค่า  $IC_{50}$  มากที่สุดเท่ากับ  $0.1002 \pm 0.0010$  mg/ml และ  $0.2174 \pm 0.0003$  mg/ml ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่า  $IC_{50}$  ของชาเขียวมัทฉะที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS assay นั้นมีค่า  $IC_{50}$  ใกล้เคียงกับ



สารมาตรฐาน L-ascorbic acid แสดงว่าสารสกัดชาเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสอดคล้องกับปริมาณ total phenolics เนื่องจากชาเขียวมีฤทธิ์สกัดด้วย 40% เอทานอล ที่อุณหภูมิ 80°C 30 นาทีได้ปริมาณ total phenolics มากที่สุด และชาเขียวบดจะสกัดด้วยน้ำ 80°C เป็นเวลา 15 นาทีได้ปริมาณ total phenolics น้อยที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดชาเขียวมีฤทธิ์ที่สภาวะนี้ไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

#### 4.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

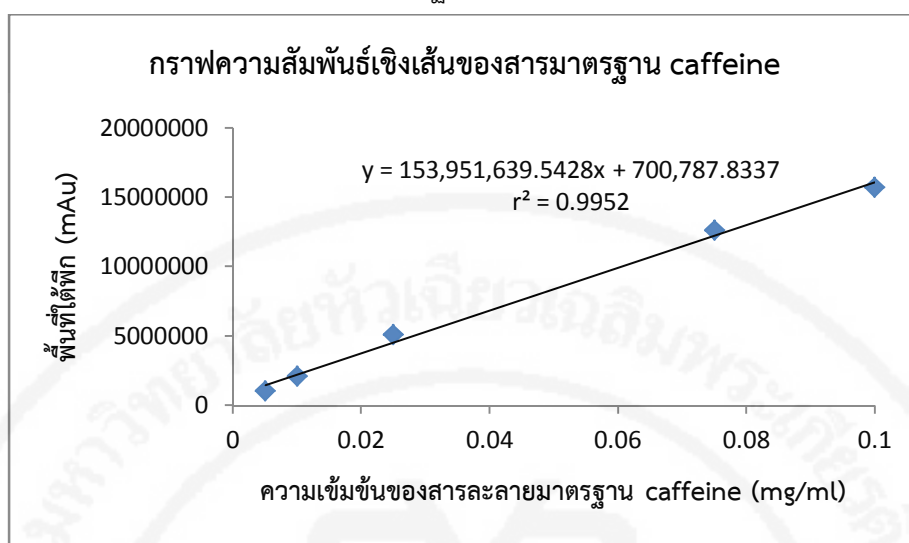
##### 1. ความสัมพันธ์เชิงเส้น

สร้างกราฟมาตรฐานของ caffeine โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน caffeine ความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 และ 0.1 mg/ml สมการเส้นตรงหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.9952 ดังแสดงในตารางที่ 4 และแผนภูมิที่ 5

ตารางที่ 4 รีเทนชันไทม์ และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน caffeine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ลำดับ	สารมาตรฐาน caffeine		
	ความเข้มข้น (mg/ml)	รีเทนชันไทม์เฉลี่ย (นาที)	พื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย (mAu)
1	0.0050	4.017	1040788.00
2	0.0100	4.017	2124480.00
3	0.0250	4.026	5101874.67
4	0.0750	4.033	12640321.00
5	0.1000	4.036	15696078.00
ความชัน	700787.8337		
จุดตัดแกน Y	153951639.5428		
$r^2$	0.9952		

แผนภูมิที่ 5 ความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารมาตรฐาน caffeine

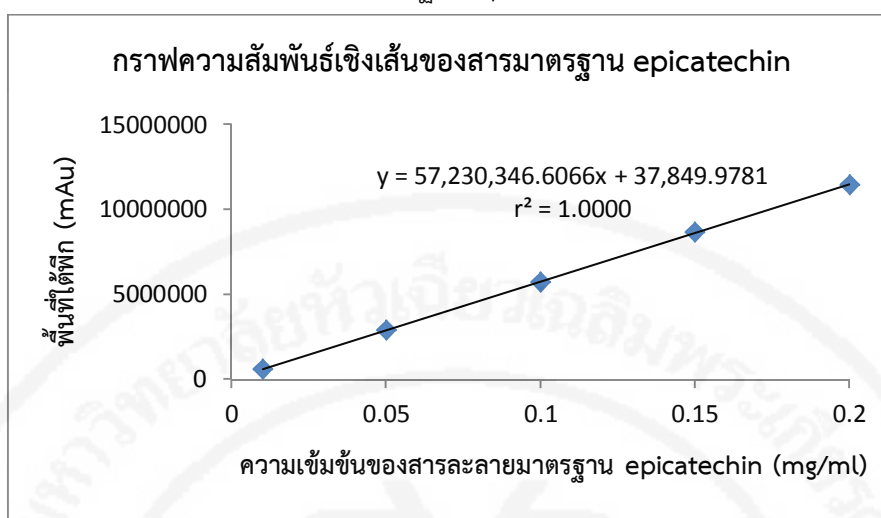


สร้างกราฟมาตรฐานของสาร epicatechin โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน epicatechin ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 mg/ml สมการเส้นตรงหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ ( $r^2$ ) เท่ากับ 1.0000 ดังแสดงในตารางที่ 5 และแผนภูมิที่ 6

ตารางที่ 5 รีเทนชันไทม์ และพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน epicatechin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ลำดับ	สารมาตรฐาน epicatechin		
	ความเข้มข้น (mg/ml)	รีเทนชันไทม์เฉลี่ย (นาที)	พื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย (mAu)
1	0.0100	8.988	605692
2	0.0500	8.972	2905152.33
3	0.1000	8.943	5740777.67
4	0.1500	8.842	8662214.33
5	0.2000	9.027	11462890.33
ความชัน	37849.9781		
จุดตัดแกน Y	57230346.6066		
$r^2$	1.0000		

แผนภูมิที่ 6 ความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารมาตรฐาน epicatechin

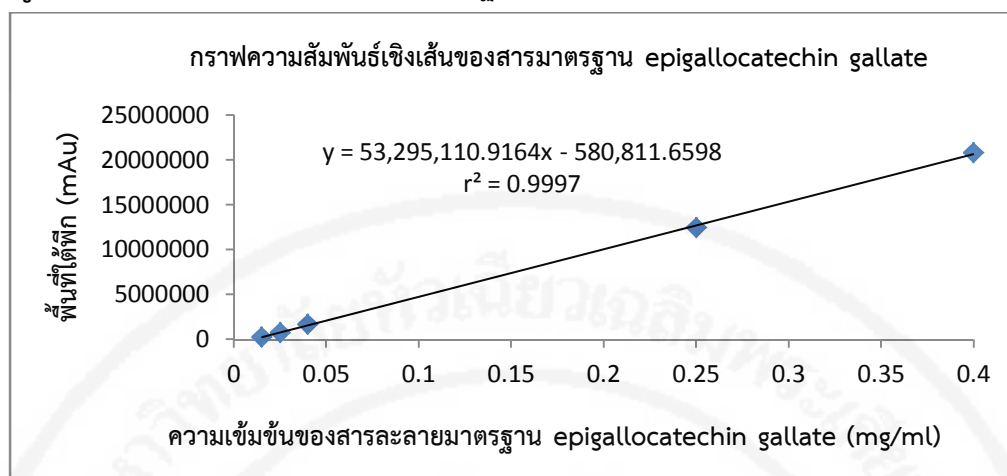


สร้างกราฟมาตรฐานของสาร epigallocatechin gallate โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate ความเข้มข้น 0.015, 0.025, 0.04, 0.25 และ 0.4 mg/ml สมการเส้นตรงหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.9997 แสดงในตารางที่ 6 และแผนภูมิที่ 7

ตารางที่ 6 รีเทนชันไทม์ และพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน epigallocatechin gallate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ลำดับ	สารมาตรฐาน epigallocatechin gallate		
	ความเข้มข้น (mg/ml)	รีเทนชันไทม์เฉลี่ย (นาที)	พื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย (mAu)
1	0.0150	16.709	230931.33
2	0.0250	16.411	730813.67
3	0.0400	16.684	1660440.67
4	0.2500	16.694	12500560.33
5	0.4000	16.641	20878626.67
ความชัน	580811.6598		
จุดตัดแกน Y	53295110.9164		
$r^2$	0.9997		

แผนภูมิที่ 7 ความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารมาตรฐาน epigallocatechin gallate



## 2. ความแม่นยำ

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้วลงไปในการละลายตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าร้อยละการกลับคืน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 7 ซึ่งจากการทดลองมีค่าร้อยละการกลับคืนตั้งแต่  $92.67 \pm 3.1458$  ถึง  $113.89 \pm 6.0589$  ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 7 ร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

ปริมาณเฉลี่ยของสารสกัดที่ได้จากการวิเคราะห์ (mg/ml)	สารมาตรฐานที่เติม	ระดับความเข้มข้น (%)	ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงไป (mg/ml)	ปริมาณเฉลี่ยที่พบ (mg/ml)	ร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย (%)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
0.0298	caffeine	80%	0.0240	0.0570	113.33	5.0000
		100%	0.0300	0.0628	110.00	5.8145
		120%	0.0360	0.0708	113.89	6.0589
0.0071	epicatechin	80%	0.0400	0.0442	92.67	3.1458
		100%	0.0500	0.0600	105.87	2.0232
		120%	0.0600	0.0670	99.89	0.3811
0.0605	epigallocatechin gallate	80%	0.0480	0.1102	107.57	1.8444
		100%	0.0600	0.1281	112.67	7.7931
		120%	0.0720	0.1366	106.53	4.0053

### 3. ความเที่ยง

การทดสอบความเที่ยงทราบได้จากการวิเคราะห์ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง รายงานผลเป็นค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ต้องมีค่าน้อยกว่า 2 จึงจะยอมรับความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา 2 ลักษณะคือ ความเที่ยงในวันเดียวกัน และความเที่ยงต่างวันกัน

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ความเที่ยงในวันเดียวกัน โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดจากชาเขียวมัทฉะ ที่สกัดด้วยเอทานอล 40% ที่อุณหภูมิ 80 องศา เป็นเวลา 30 นาที ความเข้มข้น 2 mg/ml โดยทำการฉีควิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซ้ำ 6 ครั้ง ผลการคำนวณหา %RSD ของสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ได้เท่ากับ 1.4539, 1.5482 และ 1.7362 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้

ตารางที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์ความเที่ยงต่างวันกัน โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดจากชาเขียวมัทฉะ ความเข้มข้น 2 mg/ml เดียวกับที่ทำการวิเคราะห์ความเที่ยงในวันเดียวกัน หลังจากเก็บครบ 4 วัน นำมาทำการฉีควิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซ้ำ 6 ครั้ง ผลการคำนวณหา %RSD ของสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ได้เท่ากับ 1.3780, 1.7281 และ 1.4117 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงในวันเดียวกัน

ครั้งที่	สารสกัดชาเขียวมัทฉะความเข้มข้น (2 mg/ml)					
	ความเที่ยงในวันเดียวกัน					
	caffeine		epicatechin		epigallocatechin gallate	
	รีเทนชันไทม์	พื้นที่ใต้พีค	รีเทนชันไทม์	พื้นที่ใต้พีค	รีเทนชันไทม์	พื้นที่ใต้พีค
1	4.322	8170828	8.705	618519	16.842	7229807
2	4.315	8222998	8.662	625077	16.700	7201236
3	4.323	8251092	8.720	611216	16.805	7192590
4	4.317	8351646	8.703	620039	16.757	7440538
5	4.322	8030959	8.685	638960	16.768	7288963
6	4.327	8069755	8.735	616126	16.788	7486081
mean	4.321	8182880	8.7017	621656.2	16.77667	7306536
SD	0.0043	118967.9000	0.0257	9624.5690	0.04804	126854.9000
%RSD	0.0995	1.4539	0.2953	1.5482	0.2861	1.7362

**ตารางที่ 9** ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ของความเที่ยงต่างวันกัน

ครั้งที่	สารสกัดชาเขียวมัทฉะความเข้มข้น (2 mg/ml)					
	ความเที่ยงต่างวันกัน					
	caffeine		epicatechin		epigallocatechin gallate	
	รีเทนชันไทม์	พื้นที่ใต้พีค	รีเทนชันไทม์	พื้นที่ใต้พีค	รีเทนชันไทม์	พื้นที่ใต้พีค
1	4.313	8053490	8.697	618738	17.057	7159036
2	4.105	8120801	8.850	604184	17.39	7204791
3	4.123	8301199	8.887	600980	17.815	7287079
4	4.115	8299383	8.852	603629	17.558	7021257
5	4.108	8094854	8.780	627810	17.623	7220373
6	4.125	8273008	8.823	607158	17.215	7300001
mean	4.148167	8190456	8.814833	610416.5	17.443	7198756
SD	0.0811	112867.3000	0.0678	10548.5600	0.2785	101625.6000
%RSD	1.9551	1.3780	0.7692	1.7281	1.5966	1.4117

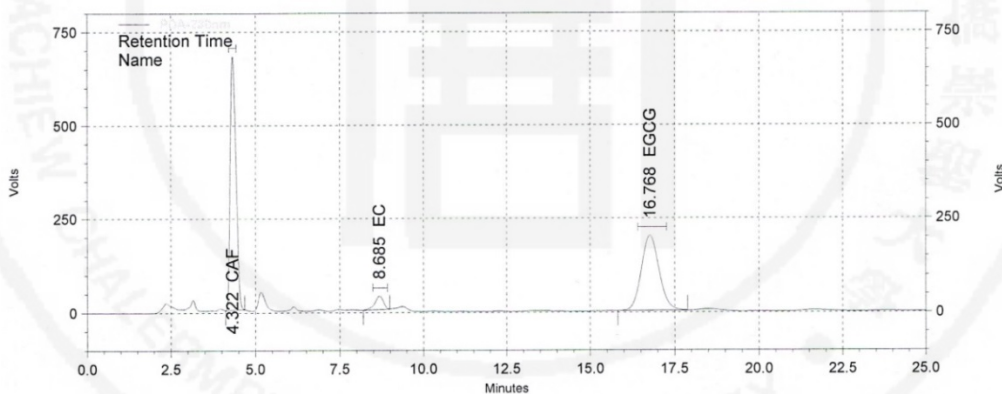
#### 4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะด้วยเครื่อง HPLC

จากการศึกษาสภาวะในการสกัด การหาปริมาณ total phenolics และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดชาเขียวดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้วนั้น พบว่าสารสกัดจากชาเขียวที่มีปริมาณสาร total phenolics และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ สารสกัดจากชาเขียวมัทฉะที่สกัดด้วย 40% เอทานอล อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จึงนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่แน่นอนด้วยเครื่อง HPLC ที่พัฒนาแล้ว โดยใช้วัฏภาคคงที่แบบย้อนกลับด้วยคอลัมน์ชนิด RP-C18 reversed phase (ความยาว 25 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มม.) วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย water: acetonitrile: methanol: ethyl acetate: glacial acetic acid อัตราส่วนคงที่ 89: 6: 1: 3: 1 (โดยปริมาตร) อัตราการไหล 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจจับที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ปริมาณสารละลายตัวอย่างที่ฉีด 20 ไมโครลิตร ผลการทดลองพบว่า caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ของสารสกัดจากชาเขียวมัทฉะความเข้มข้น 2 mg/ml มีปริมาณสารสำคัญ และ รีเทนชันไทม์ (retention time) ดังแสดงในตารางที่ 10 สารสกัดจากชาเขียวมัทฉะมี retention time ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน (แผนภูมิที่ 8) พีคของสารสกัดไม่มีพีคซ้อนทับ และลักษณะสเปกตรัมเดียวกับสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) แสดงว่า caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะเป็นตัวเดียวกันกับสารมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate (แผนภูมิที่ 9a, b และ c)

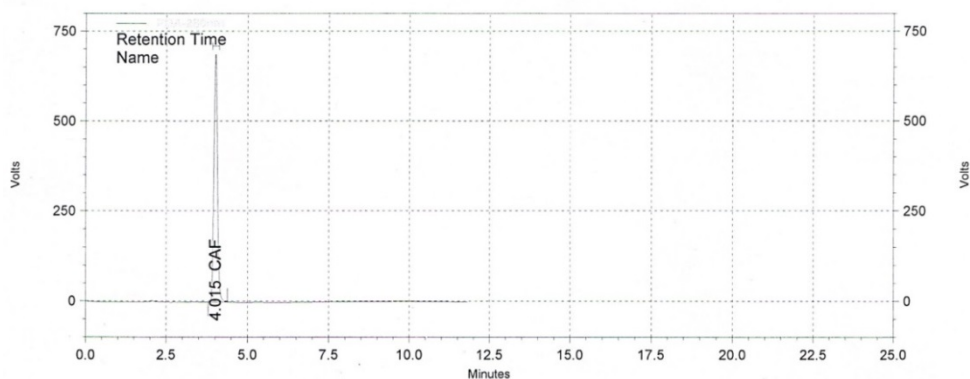
ตารางที่ 10 ปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ที่พบในสารสกัดชาเขียวมัทฉะความเข้มข้น 2 mg/ml

ซ้ำ	ปริมาณสารสำคัญที่พบ (mg/g dry weight)					
	caffeine	รีเทนชัน ไทม์	epicatechin	รีเทนชัน ไทม์	epigallocatechin gallate	รีเทนชัน ไทม์
1	24.2500	4.322	5.0500	8.685	62.4000	16.768
2	24.4500	4.315	5.1500	8.662	62.1000	16.700
3	24.8500	4.317	5.1000	8.703	64.3500	16.757
mean	24.5167	4.318	5.1000	8.683	62.9500	16.742
SD	0.3055	0.0036	0.0500	0.0206	1.2217	0.0365
%RSD	1.2461	0.0832	0.9804	0.2372	1.9407	0.2180

แผนภูมิที่ 8 โครมาโทแกรมของสาร caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

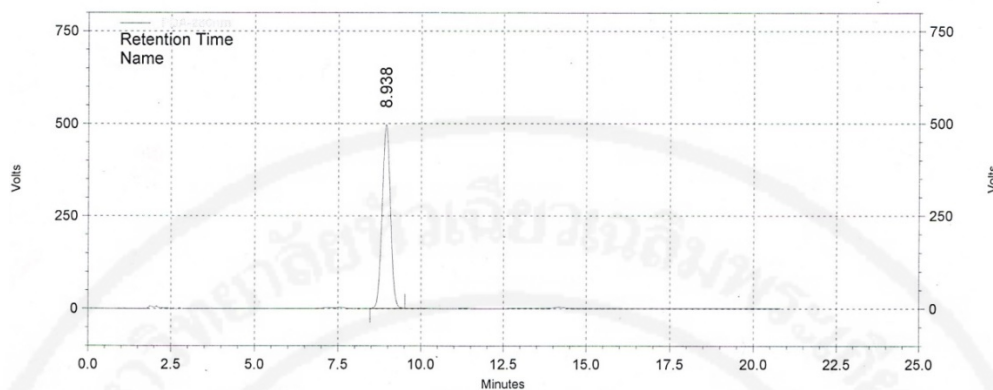


แผนภูมิที่ 9 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน caffeine (a), epicatechin (b) และ epigallocatechin gallate (c)

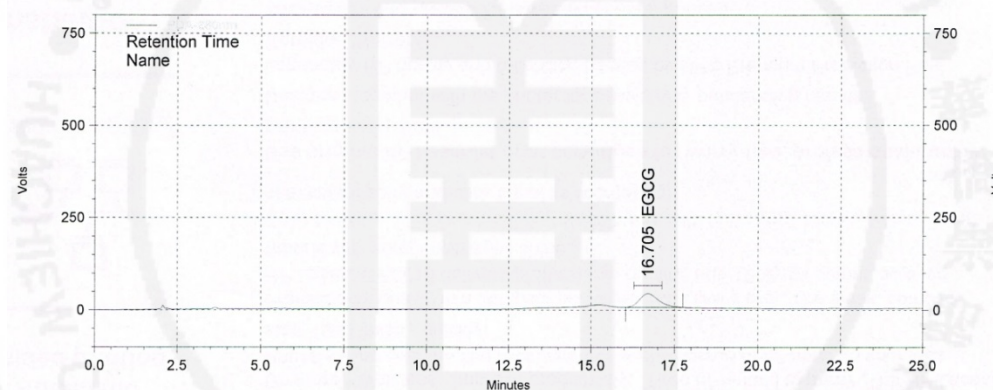


(a) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน caffeine ที่ความเข้มข้น 0.025 mg/ml

แผนภูมิที่ 9 (ต่อ) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน caffeine (a), epicatechin (b) และ epigallocatechin gallate (c)



(b) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน epicatechin ที่ความเข้มข้น 0.15 mg/ml



(c) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน epigallocatechin gallate ที่ความเข้มข้น 0.04 mg/ml

#### 4.5 การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน

##### 4.5.1 การเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันพื้น (microemulsion base) และไมโครอิมัลชัน

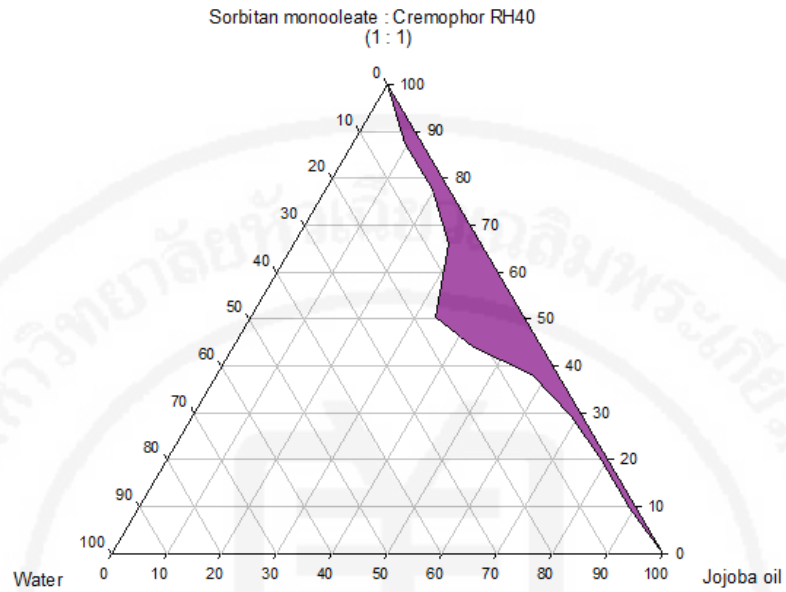
ผสมสารสกัดจากชาเขียว โดยการสร้างแผนภาพไตรภาคเทียม

งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ jojoba oil เป็นวัฏภาคน้ำมัน เนื่องจากสามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ดี ใส และคงตัวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน<sup>(43)</sup> และใช้ span80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) และมีค่า HLB ต่ำ ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุที่มีค่า HLB สูง เพื่อให้ได้ค่า HLB ในช่วงของการเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุนี้อาจจะไม่เกิดประจุแม้ความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเป็นกรดอ่อนๆ หรือกลาง และเข้าได้ดีกับสภาพ pH ของผิวหนัง จึงไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง<sup>(44)</sup> ซึ่งสารลดแรงตึงผิวผสมที่แตกต่างกันระหว่าง span80: cremophor RH40, span80: kolliphor EL และ span80: kolliphor HS15 ที่อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก มีค่า HLB ดังนี้ 9.15, 8.15 และ 9.15

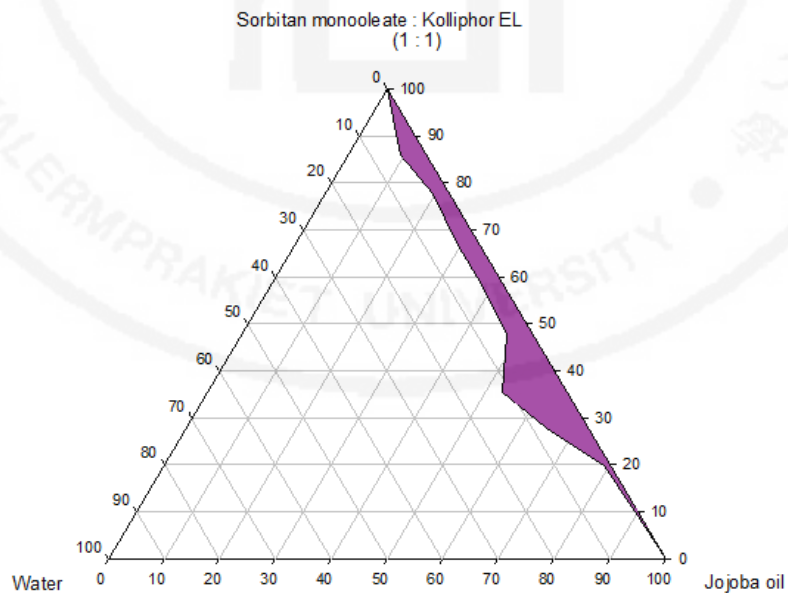


ตามลำดับ จากนั้นทำการชั่งสัดส่วนโดยมวลของสารผสมระหว่าง jojoba oil กับสารลดแรงตึงผิวผสม เป็นไปตามสัดส่วน ดังนี้ 1.0:9.0, 2.0:8.0, 3.0:7.0, 4.0:6.0, 5.0:5.0, 6.0:4.0, 7.0:3.0, 8.0:2.0, 9.0:1.0 แล้วจึงนำมาทำการไทเทรตด้วยน้ำปราศจากไอออนคนตลอดเวลาภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง จนถึงจุดยุติที่สารผสมเปลี่ยนจากใสไปเป็นขุ่นให้หยุดทำการไทเทรต บันทึกอัตราส่วนที่ได้ แล้วนำไปสร้างแผนภาพไตรภาคเทียมด้วยโปรแกรม Sigma plot เวอร์ชัน 11.0 ผลการทดลองดังแสดงในแผนภูมิที่ 10, 11 และ 12 ระบบที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวผสม (span80: cremophor RH40 อัตราส่วน 1:1) เป็นระบบที่มีบริเวณของเหลวใสที่จัดเป็นวัฏภาคเดี่ยว (one phase system) มากที่สุด จึงถูกเลือกเพื่อทำการศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวร่วม IPA ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่ม IPA เข้าไปในระบบ โดยเพิ่มเข้าไปในวัฏภาคน้ำด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก สามารถเพิ่มการละลายของส่วนประกอบในตำรับได้ดียิ่งขึ้น เพิ่มขอบเขตของไมโครอิมัลชันให้กว้างขึ้น (แผนภูมิที่ 13) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rukmini et al.<sup>(45)</sup> และ Fouad et al.<sup>(46)</sup> ที่ว่าไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันหากประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวร่วมจะสามารถลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับน้ำมัน และยังเพิ่มความยืดหยุ่นของพื้นที่ผิวอีกด้วย และเมื่อทดลองเปลี่ยนอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมระหว่าง span80: cremophor RH40 จาก 1:1 ไปเป็น 2:1 (HLB=7.54) นั้นพบว่า ขอบเขตของไมโครอิมัลชันกลับลดลง (แผนภูมิที่ 14) ดังนั้นจึงเลือกไมโครอิมัลชันที่มีส่วนประกอบดังนี้ jojoba oil, span80: cremophor RH40 อัตราส่วน 1:1 และน้ำ: IPA อัตราส่วน 1:1 มาประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และความคงตัว โดยพบว่ามีตำรับไมโครอิมัลชันพื้น 6 ตำรับที่มีความคงตัวดี จึงเลือกมาผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 2)

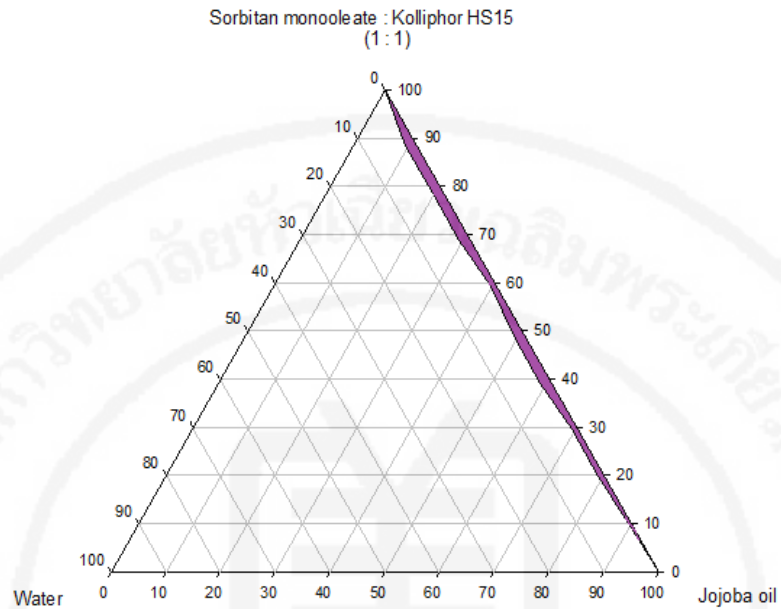
แผนภูมิที่ 10 ขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่ประกอบด้วย jojoba oil, สารลดแรงตึงผิวผสม (span80: cremophor RH40 อัตราส่วน 1:1) และน้ำ



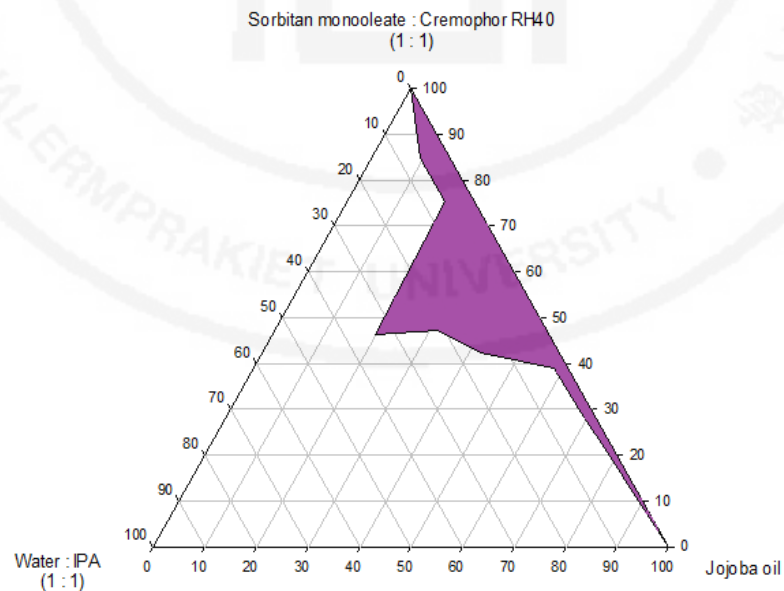
แผนภูมิที่ 11 ขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่ประกอบด้วย jojoba oil, สารลดแรงตึงผิวผสม (span80: kolliphor EL อัตราส่วน 1:1) และน้ำ



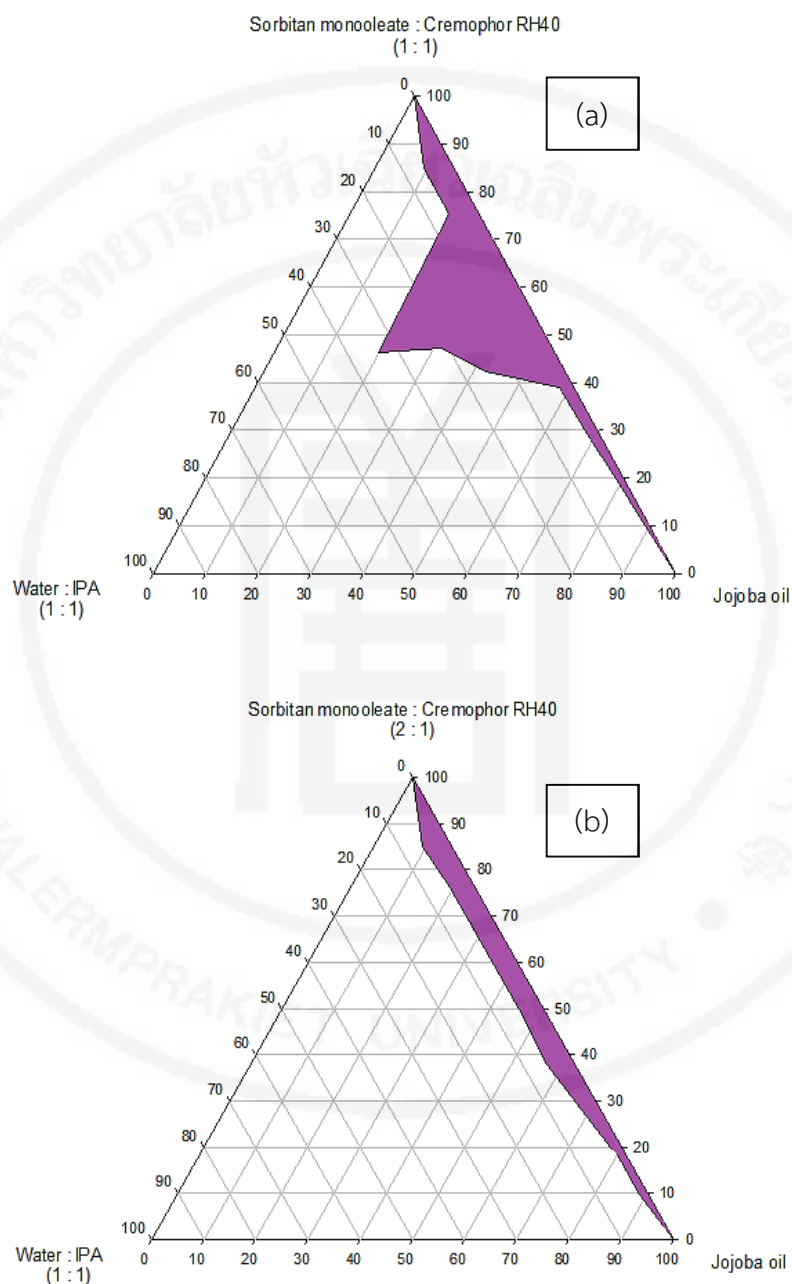
แผนภูมิที่ 12 ขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่ประกอบด้วย jojoba oil, สารลดแรงตึงผิวผสม (span80: kolliphor HS15 อัตราส่วน 1:1) และน้ำ



แผนภูมิที่ 13 ขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่ประกอบด้วย jojoba oil, สารลดแรงตึงผิวผสม (span80: cremophor RH40 อัตราส่วน 1:1) และน้ำ: IPA (อัตราส่วน 1:1)



แผนภูมิที่ 14 เปรียบเทียบขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่ประกอบด้วย jojoba oil, สารลดแรงตึงผิวผสม [span80: cremophor RH40 อัตราส่วน 1:1 (a) และ 2:1 (b)] และน้ำ: IPA (อัตราส่วน 1:1)



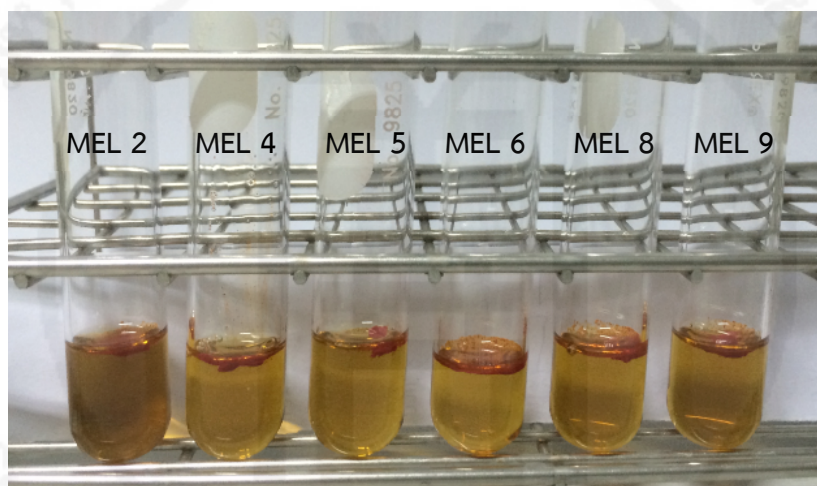
#### 4.5.2 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

เมื่อเก็บตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะทั้ง 6 ตำรับที่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน และที่สภาวะ heating/cooling 6 รอบ ตามลำดับ ได้ผลการทดลองดังนี้

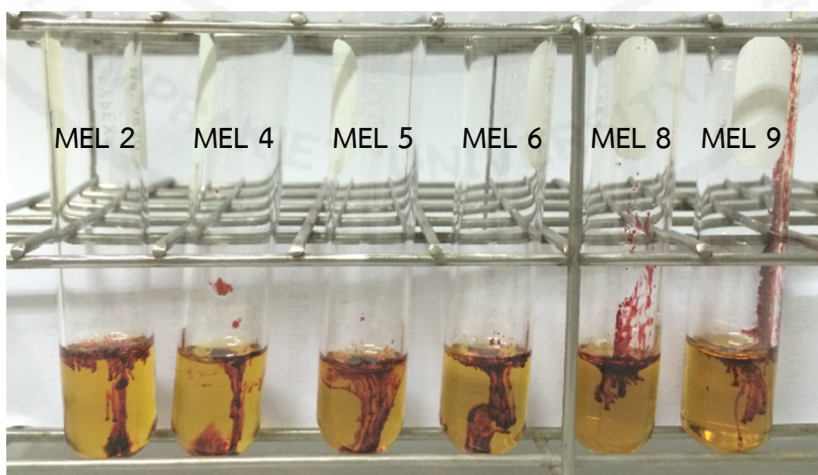
ลักษณะภายนอก: ทุกตำรับมีความคงตัวดี โดยสังเกตได้จากการไม่แยกชั้น สีเหลืองเข้มขึ้นเล็กน้อยจากวันเริ่มต้น แต่กลิ่นและความใสไม่เปลี่ยนแปลง

ประเภทของไมโครอิมัลชัน: ผลการตรวจสอบประเภทของไมโครอิมัลชันโดยการหยดสีละลายน้ำ เปรียบเทียบกับการหยดสีละลายน้ำมัน พบว่าสีละลายน้ำมันกระจายตัวได้เร็วกว่าสีละลายน้ำในทุกตำรับไมโครอิมัลชันที่นำมาทดสอบ (ภาพที่ 11) เนื่องจากมีวิฤภาคภายนอกเป็นน้ำมัน แสดงว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้เป็นชนิดน้ำในน้ำมัน<sup>(47)</sup>

ภาพที่ 11 ทดสอบประเภทของไมโครอิมัลชันกักเก็บสารสกัดจากชาเขียวโดยการหยดสีละลายน้ำและสีละลายน้ำมัน



(a) ตำรับไมโครอิมัลชันกักเก็บสารสกัดจากชาเขียวโดยการหยดสีละลายน้ำ



(b) ตำรับไมโครอิมัลชันกักเก็บสารสกัดจากชาเขียวโดยการหยดสีละลายน้ำมัน

ขนาดและการกระจายอนุภาค: เริ่มต้นก่อนเก็บตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัดจะเพื่อทดสอบความคงตัวพบว่ามีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง  $28.33 \pm 0.47$  ถึง  $54.63 \pm 1.76$

nm หลังจากเก็บทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน และที่ heating/cooling 6 รอบ (ตารางที่ 11 และ 12) พบว่าเมื่อปริมาณน้ำมันในตำรับเพิ่มขึ้น มีแนวโน้มทำให้ขนาดหยดไขมันภายในใหญ่ขึ้นด้วย โดยมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง  $20.70 \pm 1.82$  ถึง  $32.03 \pm 2.35$  nm และ  $22.37 \pm 2.25$  ถึง  $40.07 \pm 5.26$  nm ตามลำดับ ซึ่งตำรับ GLM4 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยค่อนข้างเล็กกว่าตำรับอื่นๆ โดยวันเริ่มต้นมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ  $28.33 \pm 0.47$  nm ซึ่งหลังเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ heating/cooling มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ  $26.37 \pm 9.47$  และ  $22.37 \pm 2.25$  nm (ตารางที่ 11) ตามลำดับ เมื่อเทียบขนาดอนุภาคของวันเริ่มต้นกับหลังเก็บทดสอบความคงตัว พบว่าตำรับ GLM4 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคจากวันเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) แสดงว่าตำรับ GLM4 มีความคงตัวดี โดยขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงของไมโครอิมัลชัน (10-140 nm) ซึ่งสัมพันธ์กับค่าการกระจายอนุภาคที่มีค่าน้อยกว่า 1 ในทุกตำรับ ทั้งก่อนเก็บ และหลังเก็บทดสอบความคงตัว (ตารางที่ 12) แสดงว่าหยดอนุภาคภายในจะไม่เกิดการรวมตัวกันได้เป็นอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น และไม่นำไปสู่ความไม่คงตัวของอิมัลชัน<sup>(48)</sup>

ตารางที่ 11 ขนาดอนุภาคของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว (n=3)

ตำรับ	ขนาดอนุภาค (nm±SD)		
	วันที่ 0	เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน	เก็บสลับอุณหภูมิร้อนเย็น 6 รอบ
GLM 1	$54.63 \pm 1.76^*a$	$27.00 \pm 2.12^*a$	$40.07 \pm 5.26^*a$
GLM 2	$38.03 \pm 0.95^*a$	$26.57 \pm 0.38^*a$	$32.87 \pm 0.64^*a$
GLM 3	$35.20 \pm 3.78^*b$	$23.67 \pm 0.49^*a$	$32.77 \pm 0.81^*b$
GLM 4	$28.33 \pm 0.47^*b$	$26.37 \pm 9.47^*b$	$22.37 \pm 2.25^*b$
GLM 5	$41.70 \pm 0.90^*a$	$20.70 \pm 1.82^*b$	$25.50 \pm 6.25^*b$
GLM 6	$30.40 \pm 3.31^*b$	$32.03 \pm 2.35^*b$	$23.37 \pm 1.88^*a$

หมายเหตุ : \* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแต่ละสูตรตำรับ

(GLM1- GLM6) ภายในการเก็บทดสอบความคงตัวที่สภาวะเดียวกัน

a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน

และหลังเก็บทดสอบความคงตัวภายในสูตรตำรับเดียวกัน

b ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน

และหลังเก็บทดสอบความคงตัวภายในสูตรตำรับเดียวกัน

ตารางที่ 12 การกระจายอนุภาคของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว (n=3)

ตำรับ	การกระจายอนุภาค		
	วันที่ 0	เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน	เก็บสลับอุณหภูมิร้อนเย็น 6 รอบ
GLM 1	0.376±0.06*b	0.402±0.07*b	0.326±0.08*b
GLM 2	0.343±0.01*b	0.279±0.10*b	0.288±0.01*b
GLM 3	0.247±0.03*b	0.126±0.02*b	0.193±0.13*b
GLM 4	0.248±0.03*b	0.120±0.03*b	0.187±0.03*b
GLM 5	0.428±0.01*b	0.565±0.05*b	0.484±0.19*b
GLM 6	0.337±0.02*b	0.390±0.09*b	0.611±0.04*a

หมายเหตุ : \* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแต่ละสูตรตำรับ

(GLM1- GLM6) ภายในการเก็บทดสอบความคงตัวที่สภาวะเดียวกัน

a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน

และหลังเก็บทดสอบความคงตัวภายในสูตรตำรับเดียวกัน

b ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน

และหลังเก็บทดสอบความคงตัวภายในสูตรตำรับเดียวกัน

การนำไฟฟ้า: ตำรับไมโครอิมัลชันทั้ง 6 ตำรับมีค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งก่อนเก็บ และหลังเก็บทดสอบความคงตัว โดยที่ตำรับ GLM4 มีค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยสูงกว่าตำรับอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เนื่องจากมีอัตราส่วนวัฏภาคน้ำในตำรับมากที่สุด โดยวันเริ่มต้นมีค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยเท่ากับ  $17.21 \pm 0.08$  ไมโครซีเมนต์ต่อตารางเซนติเมตร ( $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ ) หลังเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ heating/cooling 6 รอบ มีค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยเท่ากับ  $16.18 \pm 0.01$  และ  $18.75 \pm 0.07$   $\mu\text{S}/\text{cm}^2$  ตามลำดับ (ตารางที่ 13) พบว่ามีค่าการนำไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเก็บทดสอบความคงตัว แต่ค่าที่ได้ยังอยู่ในช่วงของไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน กล่าวคือ โดยทั่วไปอิมัลชันทุกชนิดที่มีค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า  $50 \mu\text{S}/\text{cm}^2$  จะเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ซึ่งหากค่าการนำไฟฟ้าต่ำกว่านี้จะเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน<sup>(49)</sup> ดังนั้นจากการทดลองค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้น้อยกว่า  $50 \mu\text{S}/\text{cm}^2$  แสดงว่าตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมีผลที่เตรียมได้เป็นชนิดน้ำในน้ำมัน

ตารางที่ 13 ค่าการนำไฟฟ้าของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว (n=3)

ตำรับ	การนำไฟฟ้า		
	วันที่ 0	เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน	เก็บสลับอุณหภูมิร้อนเย็น 6 รอบ
GLM 1	0.91±0.00*a	0.79±0.00*a	0.95±0.01*a
GLM 2	3.70±0.02*a	3.59±0.01*a	2.74±0.01*a
GLM 3	9.41±0.02*a	10.97±0.16*a	10.12±0.09*a
GLM 4	17.21±0.08*a	16.18±0.01*a	18.75±0.07*a
GLM 5	3.31±0.02*b	2.84±0.00*a	3.36±0.08*b
GLM 6	7.89±0.03*a	7.61±0.04*a	8.42±0.07*a

หมายเหตุ : \* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแต่ละสูตรตำรับ (GLM1- GLM6) ภายในการเก็บทดสอบความคงตัวที่สภาวะเดียวกัน

a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน และหลังเก็บทดสอบความคงตัวภายในสูตรตำรับเดียวกัน

b ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน และหลังเก็บทดสอบความคงตัวภายในสูตรตำรับเดียวกัน

ค่าความเป็นกรด-ด่าง: ตำรับไมโครอิมัลชันทุกตำรับมี pH เป็นกลาง ตำรับ GLM4 มีค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยเท่ากับ  $7.67 \pm 0.01$  ในวันเริ่มต้น แต่หลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ heating/cooling มีค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยเท่ากับ  $7.27 \pm 0.15$  และ  $7.54 \pm 0.01$  ตามลำดับ (ตารางที่ 14) ซึ่งความแตกต่างจากวันเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) แสดงว่าระยะเวลาในการเก็บ มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมีผลเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย



ตารางที่ 14 ความเป็นกรด-ด่างของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว (n=3)

ตำรับ	ความเป็นกรด-ด่าง		
	วันที่ 0	เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน	เก็บสลับอุณหภูมิร้อนเย็น 6 รอบ
GLM 1	7.38±0.07*a	7.10±0.01*a	7.64±0.02*a
GLM 2	7.75±0.00*a	7.45±0.01*a	7.62±0.01*a
GLM 3	7.73±0.01*a	7.39±0.01*a	7.58±0.03*a
GLM 4	7.64±0.01*b	7.27±0.15*a	7.54±0.01*b
GLM 5	7.72±0.01*a	7.18±0.02*a	7.63±0.02*a
GLM 6	7.68±0.02*a	7.37±0.02a*	7.59±0.01*a

หมายเหตุ : \* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแต่ละสูตรตำรับ

(GLM1- GLM6) ภายในการเก็บทดสอบความคงตัวที่สภาวะเดียวกัน

a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน

และหลังเก็บทดสอบความคงตัวภายในสูตรตำรับเดียวกัน

b ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน

และหลังเก็บทดสอบความคงตัวภายในสูตรตำรับเดียวกัน

ความหนืด: ตำรับ GLM4 มีความหนืดน้อยกว่าตำรับอื่นๆ เนื่องจากมีปริมาณอัตราส่วนวัฏภาคน้ำมากกว่าตำรับอื่น ทำให้ใช้วัฏภาคสารลดแรงตึงผิว และน้ำมันน้อยกว่า ซึ่งหลังเก็บทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง และ heating/cooling พบว่ามีความหนืดเฉลี่ยเท่ากับ  $179.83 \pm 0.29$  และ  $184.57 \pm 5.25$  เซนติพอยส์ (cP) ตามลำดับ (ตารางที่ 15) ซึ่งความหนืดไม่เปลี่ยนแปลงจากวันเริ่มต้นที่มีค่าเท่ากับ  $181.33 \pm 2.02$  cP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เนื่องจากตำรับ GLM4 มีวัฏภาคน้ำมากที่สุด ทำให้ใช้ปริมาณวัฏภาคน้ำมัน และสารลดแรงตึงผิวที่มีลักษณะค่อนข้างหนืดในปริมาณที่น้อยลง ดังนั้นจึงทำให้ตำรับ GLM4 มีความหนืดน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับตำรับไมโครอิมัลชันอื่นๆ

ตารางที่ 15 ความหนืดของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว (n=3)

ตำรับ	ความหนืด		
	วันที่ 0	เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน	เก็บสลับอุณหภูมิร้อนเย็น 6 รอบ
GLM 1	205.83±2.36*b	196.17±1.16*a	203.77±1.31*b
GLM 2	224.50±0.50*a	233.60±1.39*b	231.10±5.43*b
GLM 3	200.67±1.61*b	198.67±1.53*b	198.77±3.07*b
GLM 4	181.33±2.02*b	179.83±0.29*b	184.57±5.25*b
GLM 5	248.73±4.07*a	239.07±2.02*b	242.77±1.70*b
GLM 6	237.23±3.33*b	232.30±1.97*b	249.23±6.83*a

หมายเหตุ : \* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแต่ละสูตรตำรับ

(GLM1- GLM6) ภายในการเก็บทดสอบความคงตัวที่สภาวะเดียวกัน

a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน

และหลังเก็บทดสอบความคงตัวภายในสูตรตำรับเดียวกัน

b ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน

และหลังเก็บทดสอบความคงตัวภายในสูตรตำรับเดียวกัน

#### 4.5.3 การเปรียบเทียบความคงตัวทางกายภาพ และทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมีทอะ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมีทอะ

จากผลการทดลองข้างต้น ได้คัดเลือกสูตรตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมีทอะ GLM4 เนื่องจากเป็นสูตรที่มีอัตราส่วนวัฏภาคน้ำในตำรับมากที่สุด (ตารางที่ 2) จึงมีความหนืดน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรอื่นๆ และความหนืดไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบก่อน และหลังการทดสอบความคงตัว (ตารางที่ 15) อีกทั้งขนาดอนุภาคและการกระจายอนุภาคไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) (ตารางที่ 11 และ 12) ผลการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีพบว่า ลักษณะภายนอกของตำรับ GLM4 และตำรับเจลหลังเก็บทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน และที่ heating/cooling 6 รอบ สีของตำรับมีการเปลี่ยนแปลงเข้มขึ้นเล็กน้อย แต่กลิ่น ความใส ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับวันเริ่มต้น และไม่พบการแยกชั้น

ขณะที่ pH เฉลี่ยของตำรับ GLM4 หลังเก็บทดสอบความคงตัวมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $7.27 \pm 0.15$  และ  $7.54 \pm 0.01$  ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าตำรับเจลที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $5.82 \pm 0.01$

และ  $5.81 \pm 0.01$  ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงว่าตำรับ GLM4 มีความเป็นกลาง ซึ่งยังถือว่ามีความ pH ใกล้กับ pH ของผิวหนัง ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ตำรับ GLM4 มีความหนืดเฉลี่ยเท่ากับ  $179.83 \pm 0.29$  และ  $184.57 \pm 5.25$  cP ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าตำรับเจลที่มีความหนืดเฉลี่ยเท่ากับ  $901.80 \pm 4.63$  และ  $1004.23 \pm 5.75$  cP ตามลำดับ (ตารางที่ 16) เนื่องจากตำรับเจลหลังเก็บที่ heating/cooling เกิดการจับตัวกันเป็นก้อน จึงทำให้มีความหนืดเพิ่มขึ้น

**ตารางที่ 16** คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ GLM4 เปรียบเทียบกับตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ หลังเก็บทดสอบความคงตัว (n=3)

ตำรับ	สถานะในการเก็บทดสอบความคงตัว	ขนาดอนุภาค (nm $\pm$ SD)	การกระจายอนุภาค	การนำไฟฟ้า ( $\mu$ S/cm <sup>2</sup> $\pm$ SD)	ความเป็นกรด-ด่าง	ความหนืด (cP $\pm$ SD)
GLM 4	Initial day	28.33 $\pm$ 0.47 **	0.248 $\pm$ 0.03 **	17.21 $\pm$ 0.08*	7.64 $\pm$ 0.01**a	181.33 $\pm$ 2.02**a
	Room temperature 90 days	26.37 $\pm$ 9.47 **	0.120 $\pm$ 0.03 **	16.18 $\pm$ 0.01*	7.27 $\pm$ 0.15*a	179.83 $\pm$ 0.29**a
	Heating/cooling 6 cycles	22.37 $\pm$ 2.25 **	0.187 $\pm$ 0.03 **	18.75 $\pm$ 0.07*	7.54 $\pm$ 0.01**a	184.57 $\pm$ 5.25**a
Gel	Initial day	-	-	-	5.78 $\pm$ 0.01*a	904.77 $\pm$ 10.27**a
	Room temperature 90 days	-	-	-	5.82 $\pm$ 0.01**a	901.80 $\pm$ 4.63**a
	Heating/cooling 6 cycles	-	-	-	5.81 $\pm$ 0.01**a	1004.23 $\pm$ 5.75*a

หมายเหตุ : \* แสดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบภายในสูตรตำรับ

เดียวกัน ระหว่างเก็บทดสอบความคงตัวที่สภาวะต่างๆ

\*\* ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบภายในสูตรตำรับ

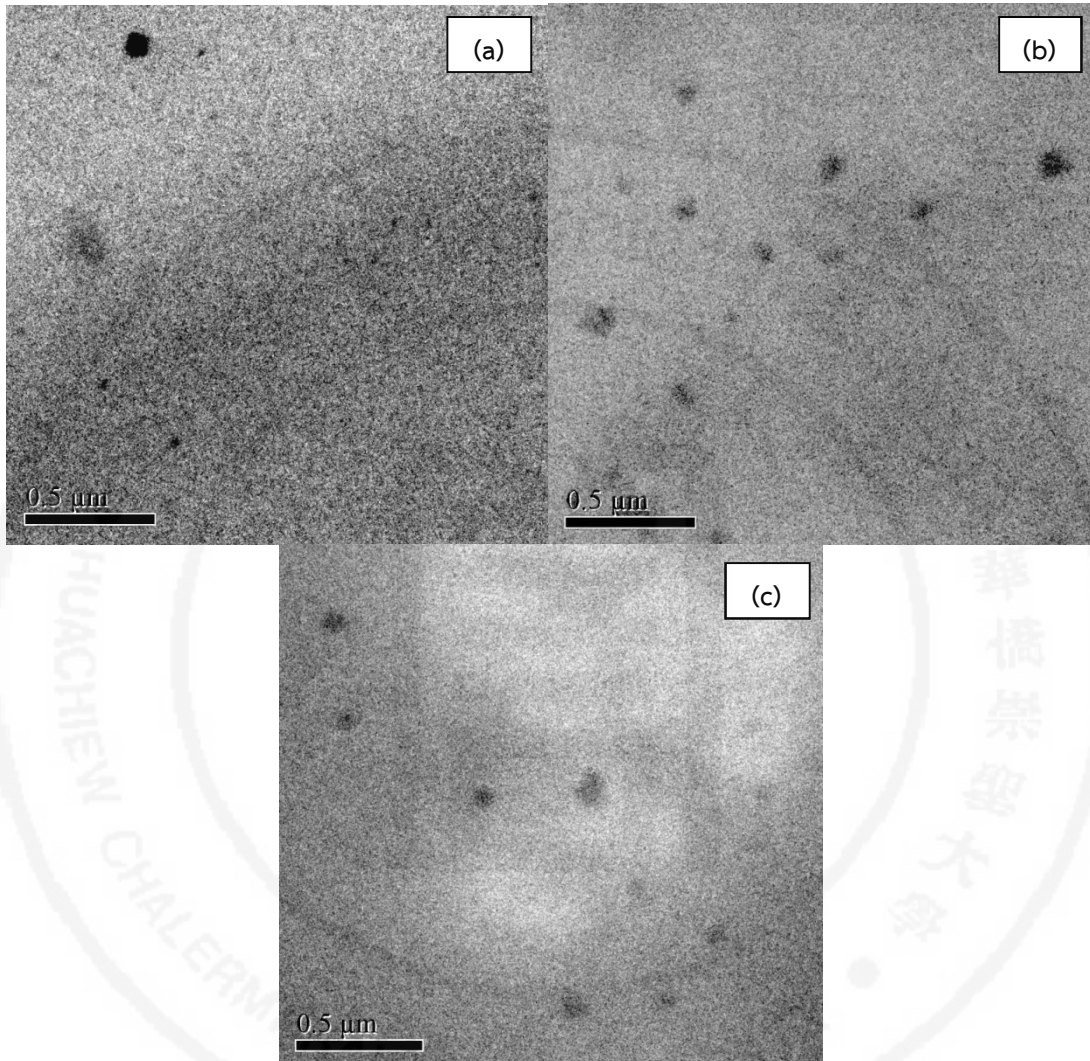
เดียวกัน ระหว่างเก็บทดสอบความคงตัวที่สภาวะต่างๆ

a แสดงต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตำรับ

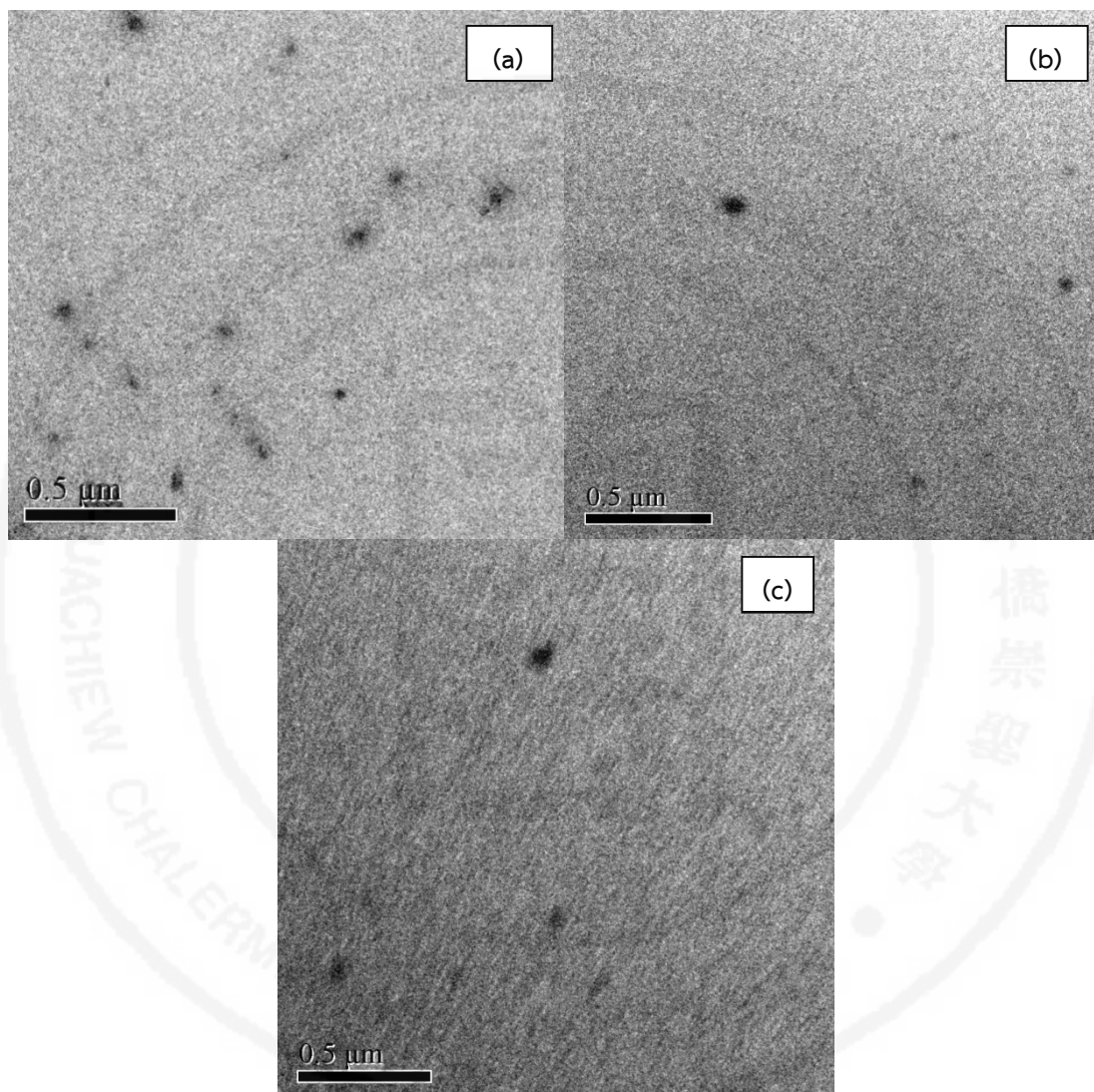
GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว

การตรวจสอบสัณฐานวิทยา และโครงสร้างของตำรับ GLM4 ด้วยการถ่ายภาพผ่าน TEM (ภาพที่ 12 และ 13) พบว่าหยดอิมัลชันในมีลักษณะเป็นหยดของเหลวทรงกลมขนาดเฉลี่ยประมาณ 50 nm ซึ่งสอดคล้องกับขนาดอนุภาคที่วัดได้จากเครื่องวัดขนาดอนุภาคโดยใช้เทคนิค PCS

ภาพที่ 12 สัณฐานวิทยาและโครงสร้างของตำรับไมโครอิมัลชันพื้นฐานที่ initial day (a), หลังเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน (b) และหลังเก็บที่ heating/cooling cycles 6 รอบ (c)



ภาพที่ 13 สัณฐานวิทยาและโครงสร้างของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ (GLM4) ที่ initial day (a), หลังเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน (b) และหลังเก็บที่ heating/cooling cycles 6 รอบ (c)

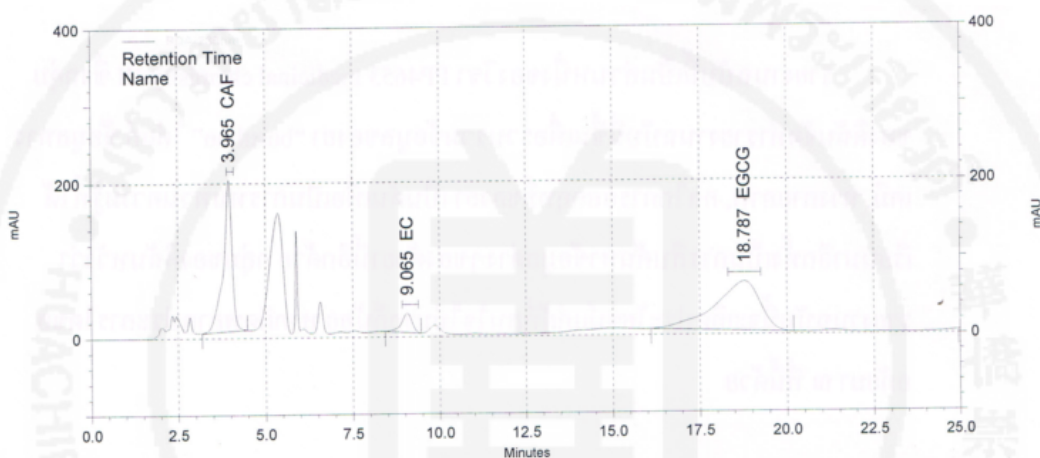


4.5.4 การเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

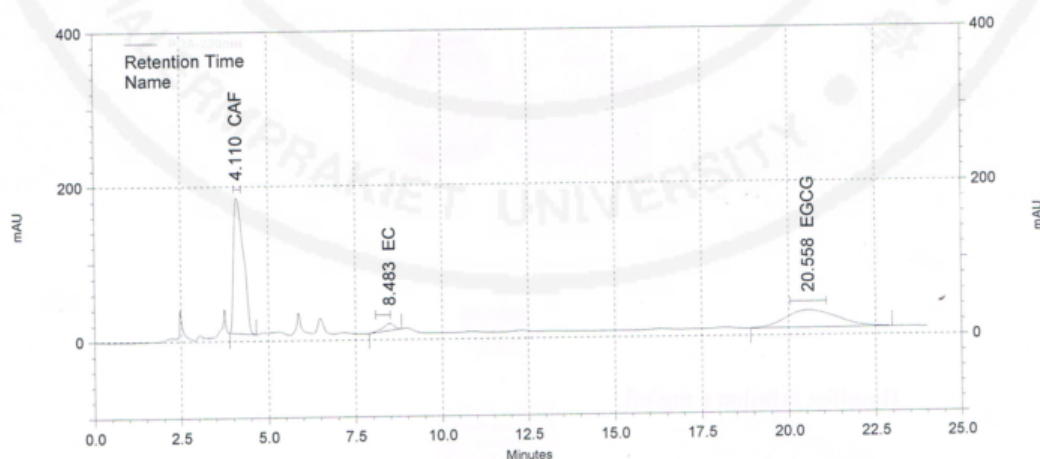
การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate จากการสร้างกราฟมาตรฐานของ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ที่มีความเข้มข้น 0.01-0.1, 0.01-0.2 และ 0.01-0.2 mg/ml ตามลำดับ นำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการพัฒนาแล้ว ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง พบว่า

retention time ของ สารมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate เป็น 4.026, 8.842 และ 16.684 นาที (ภาพที่ 8a, b และ c) ตามลำดับ โดยสารสำคัญทุกตัวในทุกลำดับที่ผ่านการทดสอบความคงตัวจะให้ค่า retention time ที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน (ภาพที่ 15a และ b)

**แผนภูมิที่ 15** โครมาโทแกรมของสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตัวอย่างตำรับไมโครอิมัลชัน GLM4 (a) และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว (b)



(a) ตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียว GLM4 หลังเก็บทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน



(b) ตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว หลังเก็บทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน

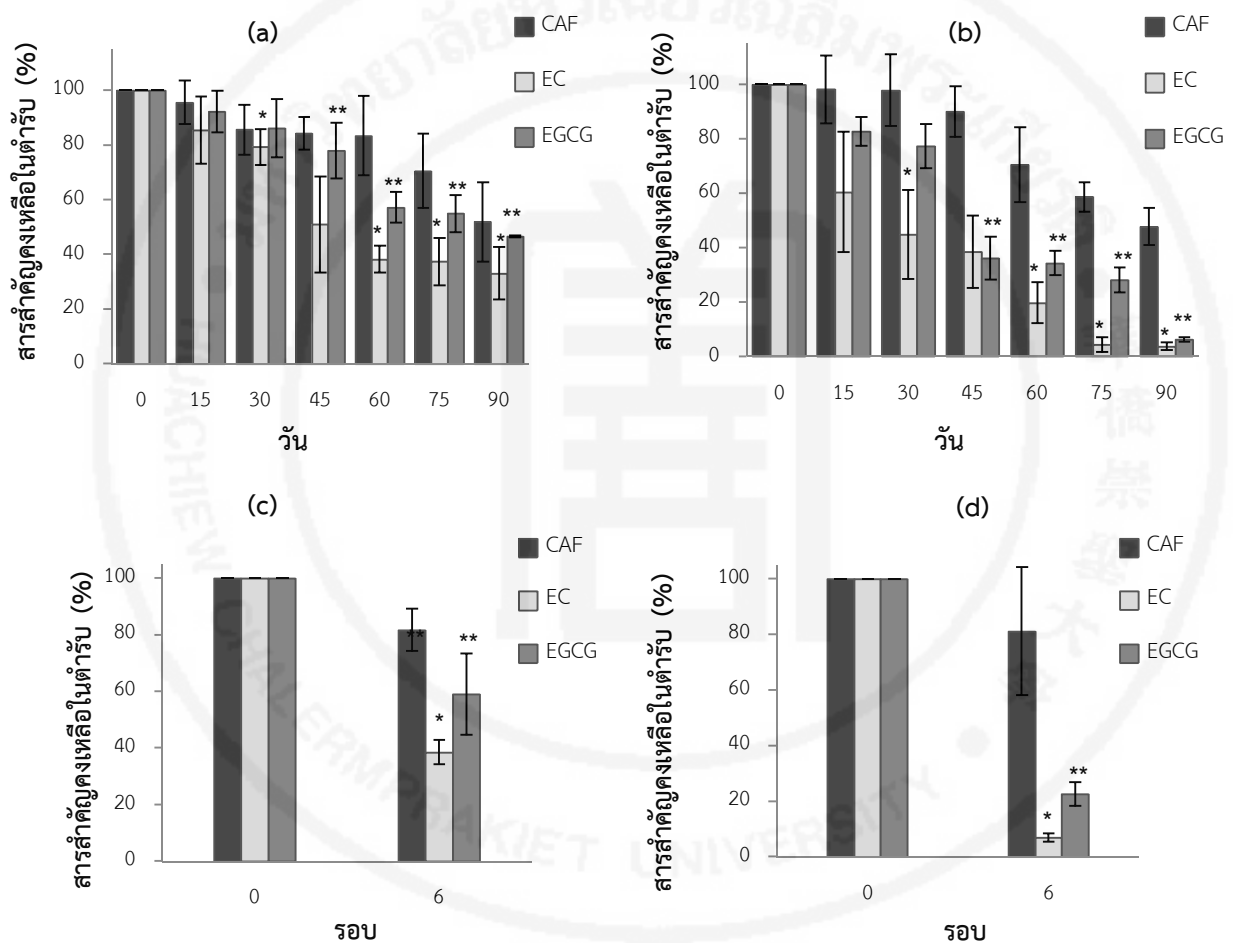
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดชาเขียวมัทฉะก่อนถูกกักเก็บในตำรับ GLM4 ด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามี caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate เท่ากับ  $31.71 \pm 0.01$ ,  $9.20 \pm 0.23$  และ  $91.45 \pm 0.98$  มก.ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และจากการหาปริมาณ

สารสำคัญหลังถูกกักเก็บในตำรับ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ โดยทำการสกัด แยกสารสำคัญที่อยู่ในวัฏภาคน้ำด้วย absolute ethanol แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกองค์ประกอบ อื่นๆ ที่อยู่ในตำรับและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าตำรับ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัด ชาเขียวมัทฉะที่อุณหภูมิห้องมีเปอร์เซ็นต์สารสำคัญ caffeine คงเหลือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ( $p>0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์สารสำคัญ epicatechin คงเหลือในทั้ง 2 ตำรับ พบว่าที่ 30, 60, 75 และ 90 วัน ตำรับเจลมีปริมาณ epicatechin ลดลงมากกว่าตำรับ GLM4 อย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) ส่วนการเปรียบเทียบปริมาณสาร epigallocatechin gallate คงเหลือ ในทั้ง 2 ตำรับ พบว่าที่ 45, 60, 75 และ 90 วัน ตำรับเจลมีปริมาณ epicatechin ลดลงมากกว่า GLM4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) ซึ่งเมื่อครบ 90 วันมีเปอร์เซ็นต์ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือในตำรับไมโครอิมัลชันเท่ากับ  $51.88\pm 14.53$ ,  $33.05\pm 9.69$  และ  $46.45\pm 0.38\%$  ตามลำดับ (แผนภูมิที่ 16a) ขณะที่ตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะคงเหลือ เท่ากับ  $47.77\pm 6.86$ ,  $3.74\pm 1.42$  และ  $6.23\pm 0.78\%$  ตามลำดับ (แผนภูมิที่ 16b)

นอกจากนี้ยังพบว่าตำรับ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะที่ผ่านการ ทดสอบความคงตัวที่ heating/cooling cycles 6 รอบ มีเปอร์เซ็นต์สารสำคัญ caffeine คงเหลือ ของทั้ง 2 ตำรับไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) แต่เปอร์เซ็นต์สารสำคัญ epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) เมื่อเก็บครบ 6 รอบ ซึ่ง GLM4 มีเปอร์เซ็นต์ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate คงเหลือเท่ากับ  $81.72\pm 7.40$ ,  $38.50\pm 4.34$  และ  $59.01\pm 14.29\%$  ตามลำดับ (แผนภูมิที่ 16c) ขณะที่ตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ มีเปอร์เซ็นต์คงเหลือเท่ากับ  $81.16\pm 23.01$ ,  $6.86\pm 1.52$  และ  $22.54\pm 4.15\%$  ตามลำดับ (แผนภูมิที่ 16d)

จากผลการทดลองพบว่าสารสำคัญจากสารสกัดชาเขียวมัทฉะที่ถูกกักเก็บในตำรับ ไมโครอิมัลชัน และตำรับเจล มีปริมาณลดลงหลังจากเก็บทดสอบความคงตัว อาจเนื่องจากคาเทชิน มีความคงตัวดีในสภาวะที่เป็นกรด ( $pH<4$ ) แต่จะไม่คงตัวในสภาวะที่เป็นด่าง ( $pH>8$ ) และถ้าเก็บ ในสภาวะที่มีความชื้นมาก ๆ ก็ทำให้เกิดการสลายตัวได้ง่าย<sup>(4)</sup> จากผลการศึกษาในครั้งนี้ตำรับ ไมโครอิมัลชันมีค่า pH เกือบจะเป็นด่าง และทำการทดสอบความคงตัวที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง ดังนั้น จึงทำให้สารคาเทชินที่ถูกกักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชันบางส่วนสลายตัวไป แต่เมื่อเปรียบเทียบ ระหว่างตำรับ GLM4 และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ พบว่าตำรับไมโครอิมัลชันสามารถเก็บ กัก และมีความคงตัวของสารสำคัญในสารสกัดชาเขียวมัทฉะดีกว่าตำรับเจล โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร epicatechin และ epigallocatechin gallate ที่มีเปอร์เซ็นต์คงเหลือในตำรับ GLM4 สูงกว่า ในตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ แต่เปอร์เซ็นต์ caffeine คงเหลือในตำรับทั้งสองมีค่าไม่ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

**แผนภูมิที่ 16** เปรอร์เซ็นต์สารสำคัญ caffeine (CAF), epicatechin EG) และ epigallocatechin gallate (EGCG) คงเหลือในตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ (a) และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ (b) หลังเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน และตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ (c) และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ (d) หลังเก็บที่สภาวะ heating-cooling จำนวน 6 รอบ (n=3)



**หมายเหตุ :** \* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ epicatechin (EC) คงเหลือระหว่างตำรับไมโครอิมัลชัน และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว

\*\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ epigallocatechin gallate (EGCG) คงเหลือระหว่างตำรับไมโครอิมัลชัน และตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียว



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

ชาเขียว (*Camelia sinensis*) อุดมไปด้วยสารโพลีฟีนอลในกลุ่มคาเทชิน ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี เหมาะที่จะนำมาพัฒนาเป็นส่วนประกอบที่สามารถออกฤทธิ์ในทางเครื่องสำอาง โดยงานวิจัยนี้ได้พัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันเพื่อสามารถกักเก็บสารสำคัญจากชาเขียวให้อยู่ภายในหยดวิภาคขนาดเล็กระดับนาโนเมตร เพื่อลดการเสื่อมสลายของคาเทชินจากสภาวะแวดล้อมภายนอกได้ โดยงานวิจัยนี้ได้เริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญออกจากชาเขียว 3 ชนิด ได้แก่ ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเซนฉะ และชาเขียวบันฉะ โดยใช้สภาวะการทดลองดังนี้ สกัดด้วยตัวทำละลาย (น้ำ 40% เอทานอล และ 70% เอทานอล) อุณหภูมิ (80 และ 100°C) และเวลาในการสกัด (15 และ 30 นาที) ที่แตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่า ชาเขียวมัทฉะที่สกัดด้วย 40% เอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที สามารถสกัดสารสำคัญออกมาได้มากที่สุด โดยมีปริมาณสาร total phenolics เท่ากับ  $137.0333 \pm 1.5948$  mg GAE/g extract ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีดังกล่าวพบว่าได้ค่าสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดอื่น ๆ โดยมีค่า  $IC_{50}$  จากการวัดด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay น้อยที่สุดเท่ากับ  $0.0504 \pm 0.0003$  และ  $0.0352 \pm 0.0001$  mg/ml ตามลำดับ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดชาเขียวมัทฉะด้วยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาแล้วพบว่า epigallocatechin มีปริมาณเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ  $62.9500 \pm 1.2217$  mg/g dry weight รองลงคือ caffeine มีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ  $24.5167 \pm 0.3055$  mg/g dry weight ส่วน epicatechin พบปริมาณเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ  $5.1000 \pm 0.0500$  mg/g dry weight ซึ่งจากฉีควิเคราะห์ด้วย HPLC นั้นพีคของสารสกัดที่ได้ไม่มีการซ้อนทับกัน สเปกตรัมของสารสำคัญในสารสกัดชาเขียวตรงกับสเปกตรัมของสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) และมีค่ารีเทนชันไทม์ใกล้เคียงกันกับสารมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ที่เวลา 4.318, 8.683 และ 16.742 นาที ตามลำดับ ส่วนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่ามีความแม่นยำและถูกต้องสอดคล้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ A.O.A.C.<sup>(35)</sup> โดยความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate มีค่าสัมประสิทธิ์ ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.9952, 1.0000 และ 0.9997 ตามลำดับ ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ได้ร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง  $92.67 \pm 3.15$  ถึง  $113.89 \pm 6.06\%$  และผลการทดลองความเที่ยง พบว่าความเที่ยงภายในวันเดียวกันมีค่า %RSD ของ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate เท่ากับ 1.4539,

1.5428 และ 1.7362 ตามลำดับ และความเที่ยงต่างวันมีค่า %RSD เท่ากับ 1.3780, 1.7281 และ 1.4117 ตามลำดับ

การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันเพื่อหาส่วนประกอบ และอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน เพื่อใช้ในการกักเก็บสารสำคัญจากชาเขียวมัทฉะ โดยสร้างแผนภาพไตรภาคเทียม ใช้ jojoba oil เป็นวัฏภาคน้ำมัน ใช้สารลดแรงตึงผิวผสมแตกต่างกัน คือ span80: cremophor RH40, span80: kolliphor EL, span80: kolliphor HS15 ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก พบว่าสารลดแรงตึงผิวผสมที่มีขอบเขตไมโครอิมัลชันมากที่สุด คือ span80: cremophor RH40 จึงเลือกมาศึกษาต่อโดยการเปลี่ยนอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมจากร้อยละ 1:1 เป็น 2:1 โดยน้ำหนัก ร่วมกับการสารลดแรงตึงผิวร่วม IPA พบว่า IPA ช่วยขยายขอบเขตของไมโครอิมัลชันให้กว้างขึ้นได้ แต่การเพิ่มอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมเป็น 2:1 มีผลทำให้ขอบเขตไมโครอิมัลชันลดลง ดังนั้น ส่วนประกอบที่เหมาะสมในการเตรียมไมโครอิมัลชันน้ำในน้ำมัน เพื่อใช้กักเก็บสารสำคัญจากชาเขียวมัทฉะ คือ jojoba oil, span80: cremophor RH40 (1:1), water: IPA (1:1) โดยที่ตำรับ GLM4 มีความคงตัวทางกายภาพ และเคมีมากที่สุด มีขนาดอยู่ในช่วงของการเกิดไมโครอิมัลชัน (10-140 nm) การกระจายอนุภาคน้อยกว่า 1 และเมื่อเทียบก่อน และหลังเก็บทดสอบความคงตัวพบว่า ขนาดและการกระจายอนุภาคไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) มีความหนืดต่ำ ค่าการนำไฟฟ้า และความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และปริมาณสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตำรับไมโครอิมัลชันคงตัวอยู่ในตำรับได้นานกว่าตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) หลังเก็บทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง 90 วัน และที่สภาวะ heating/cooling cycle 6 รอบ อาจเนื่องจากคุณสมบัติคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ของไมโครอิมัลชัน จึงทำให้สารสำคัญคงตัวได้นานกว่าตำรับเจลแม้อุณหภูมิระหว่างการเก็บรักษามีการเปลี่ยนแปลง รวมถึงการกักเก็บสารสำคัญอยู่ในหยดวัฏภาคภายใน จึงสามารถป้องกันสารสำคัญไม่ให้ถูกทำลายจากสิ่งกระตุ้นจากภายนอกได้ดีกว่าตำรับเจลผสมสารสกัดชาเขียวมัทฉะ

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียวมัทฉะที่ผสมในตำรับไมโครอิมัลชัน เป็นเพียงการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้น ดังนั้นอาจมีการศึกษาหาความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถกักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชัน

2. ควรมีการศึกษาความสามารถในการซึมผ่านของสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนัง เพื่อให้ได้ผลการทดลองมารองรับข้อดีของไมโครอิมัลชันในแง่ของการเป็นระบบนำส่งสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนัง และทำให้งานวิจัยมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

3. ควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ หรือทดสอบการแพ้ในอาสาสมัคร เป็นต้น เพื่อสามารถใช้ประโยชน์จากตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดชาเขียวที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ในด้านอื่น ๆ มากขึ้น

### บรรณานุกรม

1. รัตนา อินทรานุปกรณ์. การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร. เครื่องสำอางเพื่อความงามและสุขภาพ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชการ; หน้า 27-50. 2552.
2. Gramza A., Korczak J, Amarowicz R. Tea polyphenols-their antioxidant properties and biological activity: A review. *FNS*. 2005;14/55(3):219-235.
3. Komes D, Horzic D, Belcak A, Ganic KK, Vulic I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *FOOD RES INT*. 2010;43:167-176.
4. ชีรพงษ์ เทพกรณ์. คาเทชินในชาเขียวและความคงตัวของระหว่างเก็บรักษา. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2556;41(1):46.55.
5. Sang S, Lambert DJ, Ho CT, Yang CS. The chemistry and biotransformation of tea catechins. *PHARMACOL RES*. 2011;64:87-99.
6. Hsu S. Review: Green tea and the skin. *AAD*. 2005;1049-1059.
8. Komes D, Horzic D, Belcak A, Ganic KK, Vulic I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Res Int*. 2010;43:167-176.
7. Rashidinejad A, Birch EJ, Waterhouse DS, Everett DW. Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chem*. 2014;156:176-183.
9. World tea production and trade current and future development. Food and agriculture organization of the united nations. Rome; 2015. [cited 2015 May]. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i4480e.pdf>
10. Cabrera C, Artacho R, Gimenez R. Beneficial Effects of green tea: A review. *ACN*. 2006;25(2):79-99.
11. Gadkari PV, Balaraman M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *FOOD BIOPROD PROCESS*. 2015;93:122-138.
12. พิมพ์ ลิลาพรพิสิฐ. อิมัลชันทางเครื่องสำอาง. เชียงใหม่: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2534.
13. เกษร จันท์ศิริ. อิมัลชันทางเภสัชกรรม. กรุงเทพมหานคร: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; หน้า 147-148. 2006.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

14. ขวลิต คำทวี, ชานนท์ เรืองรัตน์วณิชยา. การพัฒนาเจลสารสกัดเมล็ดลิ้นจี่. โครงการพิเศษสายวิชาเทคโนโลยีการผลิตและพัฒนาเกษตรภัณฑ์. สมุทรปราการ: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ; หน้า 46. 2554.
15. ไร่ชาเขียว. ไทยวิกิพีเดีย. [cited 2015 April]. Available from: <https://th.wikipedia.org/wiki/ชาเขียว>
16. ยอดใบชาเขียว. ประโยชน์ต่อทคอม. [cited 2015 April]. Available from: <http://prayod.com/ชาเขียว>
17. Changkid V. ประเภทของชาเขียวญี่ปุ่น. สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) [cited 2015 April]. Available from: <http://nstda.or.th/blog/?p=9733>
18. ลักษณะชาเขียวมัทฉะ. [cited 2015 April]. Available from: <http://beta.soccersuck.com/boards/topic/1072465>
19. ลักษณะชาเขียวเซนฉะ. [cited 2015 April]. Available from: <http://www.jeveryday.com/detail.php?cat=2&id=235>
20. ลักษณะชาเขียวบั้นฉะ. [cited 2015 April]. Available from: <http://www.jeveryday.com/detail.php?cat=2&id=235>
21. Tea components. World Green Tea Association. [cited 2015 May]. Available from: [https://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0CDsQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.o-cha.net%2Fenglish%2Fcup%2Fpdf%2F38.pdf&ei=NDhLVbmyGtWluATinYCgDQ&usg=AFQjCNE\\_L\\_MdaPazBRd2B2kALp1q17b2IA&sig2=9xr7w4q9JnuLineMgoJ\\_QQ](https://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0CDsQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.o-cha.net%2Fenglish%2Fcup%2Fpdf%2F38.pdf&ei=NDhLVbmyGtWluATinYCgDQ&usg=AFQjCNE_L_MdaPazBRd2B2kALp1q17b2IA&sig2=9xr7w4q9JnuLineMgoJ_QQ)
22. Jun X, Deji S, Ye L, Rui Z. Comparison of in vitro antioxidant activities and bioactive components of green tea extracts by different extraction methods. *Int. J. Pharm.* 2011;408:97-101.
23. Rusak G, Komes D, Likic S, Horzic D, Kovac M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chem.* 2008;110:852-858.
24. Hong YH, Jung EY, Noh DO, Suh HJ. Physiological effects of formulation containing tannase-converted green tea extract on skin care: physical stability, collagenase, elastase and tyrosinase activities. *IMR.* 2014;3:25-33.

## บรรณานุกรม (ต่อ)

25. Gupta S, Sahni JK, Ali J, Gabrani R, Dang S. Development and characterization of green tea loaded microemulsion for vaginal infections. *Adv. Mater. Lett.* 2012;3(6):493-497.
26. Manea AM, Andronescu C, Meghea A. Green tea extract loaded into solid lipid nanoparticles. *U.P.B. Sci. Bull.* 2014;76(2):125-136.
27. สถาบันชามหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. องค์ประกอบทางเคมีในใบชาสด. [cited 2015 April]. Available from: <http://teainstitutemfu.com/main/blog/องค์ประกอบทางเคมี/>
28. รัตนา อินทรานุปกรณ์. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography. เอกสารประกอบการสอนรายวิชาการควบคุมมาตรฐานสมุนไพร. สมุทรปราการ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ; พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 22-29. 2547.
29. A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemistry. 18<sup>th</sup> ed. Arlington, Virginia, Appendix D. page9/Appendix E. 2005; page 2-3.
30. คู่มือปฏิบัติการ การหาปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่มโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. พิษณุโลก: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร; 2555. [cited 2015 April]. Available from: [www.sci.nu.ac.th/chemistry/directionlab/media\\_doc/256254/เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง](http://www.sci.nu.ac.th/chemistry/directionlab/media_doc/256254/เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง)
31. รัตนา อินทรานุปกรณ์. High Performance Liquid Chromatography. เอกสารประกอบการสอนรายวิชา เภสัชวิเคราะห์ 2. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ; พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 49. 2548.
32. Saito ST, Welzel A, Suyenaga S, Bueno F. A method fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C), and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas.* 2006;26(2):394-400.
33. สุนีย์ ชาญณรงค์. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง. เครื่องสำอางเพื่อความและสุขภาพ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชการ; หน้า 63-81. 2552.

## บรรณานุกรม (ต่อ)

34. ประภาพร บุญมี. อิทธิพลโครงสร้างระดับไมโครของไมโครอิมัลชันและชนิดของสารลดแรงตึงผิว ต่อประสิทธิภาพในการซึมผ่านผิวหนังของยาที่ไม่ชอบน้ำ และยาที่ชอบน้ำ. Faculty of Graduation Studies. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยมหิดล; 2552.
35. Pakpayat N, Yotsawimonwat S, Boonme P. Green microemulsions for cosmetics. Thai pharmaceutical and Health Science Journal. 2011;6(4):290-298. [cited 2013 February]. Available from: <http://ejournals.swu.ac.th/>
36. Huang YB, Lin YH, Lu TM, Wang RJ, Tsai YH, Wu PC. Transdermal delivery of capsaicin derivative-sodium nonivamide acetate using microemulsions as vehicles. *Int. J. Pharm.* 2008;349:206-211.
37. Shakeel F, Ramadan W. Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. *Colloids Surf., B.* 2010;75:356-362.
38. Constantinides PP, Scalart JP. Formulation and characterization of water-in-oil microemulsions containing long-versus medium-chain glycerides. *Int. J. Pharm.* 1997;158:57-68.
39. นิภาพร ประเสริฐวิทย์. การพัฒนาตำรับยาทาต้านเชื้อราในระบบไมโครอิมัลชันที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal. 2009; page 4.
40. Trotta M, Cavalli R, Ugazio E, Gasco MR. Phase behaviour of microemulsion systems containing lecithin and lysolecithin as surfactant. *Int. J. Pharm.* 1996;143:67-73.
41. Li P, Ghosh A, Wagner RF, Krill S, Joshi YM, Serajuddin ATM. Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsion. *Int. J. Pharm.* 2005;288:27-34.
42. Ndlovu G, Fouche G, Tselanyane M, Cordier W, Steenkamp V. In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. *BMC Complementary & Alternative Medicine.* 2013;13:304.
43. Garti N, Shevachman M, Shani A. Solubilization of lycopene in jojoba oil microemulsion. *JAOCs.* 2004;81(9):873-877.

**บรรณานุกรม (ต่อ)**

44. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. นาโนเทคโนโลยี: การนำส่งยาและเครื่องสำอางทางผิวหนัง. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ประชาชน; หน้า 129-166. 2552.
45. Rukmini A, Raharjo S, Hastuti P, Supriyadi S. Formulation and stability of water-in-virgin coconut oil microemulsion using ternary food grade nonionic surfactants. *Int Food Res J*. 2012;19(1):259-264.
46. Fouad AS, Basalious BE, EL.Nabarawi AM, Tayel AS. Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: in vitro/in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 2013;453:569-578.
47. Xu J, Fan JQ, Yin QZ, et al. The preparation of neem oil microemulsion (*Azadirachta indica*) and the comparison of acaricidal time between neem oil microemulsion and others formulations in vitro. *Vet. Parasitol.* 2010;169:399-403.
48. Patel V, Kukadiya H, Mashru R, Surti N, Mandal S. Development of microemulsion for solubility enhancement of clopidogrel. *Iran J Pharm Res.* 2010;9(4):327-334.
59. Pinkhien T. The development of nanoemulsions containing grape seed extracts from *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) and their bioefficacy study [Thesis]. Samutprakarn: Huachiew Chalermprakiet University; 2014.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบวิธีการสกัดชาเขียวที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Totalphenolic

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	113905.841 <sup>a</sup>	35	3254.453	796.449	.000
Intercept	700656.122	1	700656.122	171468.721	.000
Tea	12300.588	2	6150.294	1505.136	.000
Solvent	56349.824	2	28174.912	6895.131	.000
Condition	27433.451	3	9144.484	2237.892	.000
Tea * Solvent	6222.337	4	1555.584	380.692	.000
Tea * Condition	1429.291	6	238.215	58.297	.000
Solvent * Condition	7854.214	6	1309.036	320.355	.000
Tea * Solvent * Condition	2316.137	12	193.011	47.235	.000
Error	294.207	72	4.086		
Total	814856.170	108			
Corrected Total	114200.048	107			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .996)

ตาราง three way ANOVA แสดงผลการวิเคราะห์ค่าสถิติระหว่างกลุ่ม (ชนิดของชาxตัวทำละลายxสภาวะในการสกัด) ได้ค่าสถิติ F เท่ากับ 47.235 และมีค่า Sig เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 3 ตัวแปรต้น ซึ่งส่งผลต่อตัวแปรตาม จึงต้องใช้สถิติ one way ANOVA เพื่อช่วยในการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่าง โดยแทนด้วยตัวเลขดังตารางต่อไปนี้

- ชาเขียวมัทฉะ (แทนด้วย 1), ชาเขียวเซนฉะ (แทนด้วย 2) และชาเขียวบันฉะ (แทนด้วย 3)
- สกัดด้วยน้ำ (แทนด้วย 1), 40% ethanol (แทนด้วย 2) และ 70% ethanol (แทนด้วย 3)
- สภาวะในการสกัด เช่น 80°C 15 นาที (แทนด้วย 1), 80°C 30 นาที (แทนด้วย 2), 100°C 15 นาที (แทนด้วย 3) และ 100°C 30 นาที (แทนด้วย 4)

## Descriptives

Totalphenolic

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
111	3	51.300000	4.3312816	2.5006666	40.540500	62.059500	48.7000	56.3000
112	3	63.000000	.5291503	.3055050	61.685518	64.314482	62.6000	63.6000
113	3	56.666667	.7637626	.4409586	54.769375	58.563958	56.0000	57.5000
114	3	54.700000	1.1135529	.6429101	51.933781	57.466219	53.7000	55.9000
121	3	62.366667	1.3203535	.7623064	59.086727	65.646607	61.2000	63.8000
122	3	137.033333	1.5947832	.9207485	133.071672	140.994994	135.7000	138.8000
123	3	124.500000	1.1357817	.6557439	121.678562	127.321438	123.7000	125.8000
124	3	116.666667	.7094599	.4096069	114.904271	118.429063	115.9000	117.3000
131	3	74.033333	1.5947832	.9207485	70.071672	77.994994	72.7000	75.8000
132	3	132.033333	1.7473790	1.0088497	127.692603	136.374063	130.1000	133.5000
133	3	121.200000	.3000000	.1732051	120.454759	121.945241	120.9000	121.5000
134	3	102.433333	3.1628047	1.8260461	94.576491	110.290176	98.9000	105.0000
211	3	43.166667	.5859465	.3382964	41.711095	44.622239	42.5000	43.6000
212	3	52.433333	.7371115	.4255715	50.602247	54.264420	51.6000	53.0000
213	3	51.100000	1.0583005	.6110101	48.471036	53.728964	49.9000	51.9000
214	3	49.233333	1.7214335	.9938701	44.957055	53.509611	48.0000	51.2000
221	3	73.600000	2.2538855	1.3012814	68.001038	79.198962	72.2000	76.2000
222	3	132.466667	1.8475209	1.0666667	127.877170	137.056163	131.4000	134.6000
223	3	122.900000	.8544004	.4932883	120.777552	125.022448	122.1000	123.8000
224	3	96.733333	.4163332	.2403701	95.699104	97.767562	96.4000	97.2000
231	3	62.066667	5.5716545	3.2167962	48.225910	75.907424	58.8000	68.5000
232	3	130.766667	1.9295941	1.1140517	125.973289	135.560044	128.6000	132.3000
233	3	119.500000	2.7055499	1.5620499	112.779042	126.220958	116.9000	122.3000
234	3	77.633333	.6806859	.3929942	75.942416	79.324251	77.1000	78.4000
311	3	36.600000	.7000000	.4041452	34.861104	38.338896	35.9000	37.3000
312	3	50.700000	1.1789826	.6806859	47.771245	53.628755	49.7000	52.0000
313	3	45.800000	2.6851443	1.5502688	39.129732	52.470268	44.2000	48.9000
314	3	41.566667	2.2052967	1.2732286	36.088406	47.044927	39.7000	44.0000
321	3	68.900000	4.5177428	2.6083200	57.677305	80.122695	64.9000	73.8000
322	3	121.066667	.6429101	.3711843	119.469590	122.663744	120.6000	121.8000
323	3	111.933333	.4725816	.2728451	110.759376	113.107291	111.4000	112.3000
324	3	82.866667	2.4906492	1.4379770	76.679551	89.053782	80.0000	84.5000
331	3	41.666667	1.7214335	.9938701	37.390389	45.942945	39.7000	42.9000
332	3	69.266667	.9865766	.5696002	66.815875	71.717459	68.6000	70.4000
333	3	64.700000	1.3453624	.7767453	61.357935	68.042065	63.2000	65.8000
334	3	57.033333	.7767453	.4484541	55.103791	58.962876	56.4000	57.9000
Total	108	80.545370	32.6694072	3.1436152	74.313520	86.777221	35.9000	138.8000

## ANOVA

Totalphenolic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	113905.841	35	3254.453	796.449	.000
Within Groups	294.207	72	4.086		
Total	114200.048	107			

สรุปผลคือ ได้ค่าสถิติ F เท่ากับ 796.449 และมีค่า Sig เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 ดังนั้น จึงปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณโททอลฟีนอลิกของชาเขียว 3 ชนิดได้แก่ ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเซนฉะ และชาเขียวบันฉะ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกันคือ น้ำปราศจากไอออน 40% เอทานอล และ 70% เอทานอล และสภาวะในการสกัด ดังนี้ 80 องศาเซลเซียส 15 นาที 80 องศาเซลเซียส 30 นาที 100 องศาเซลเซียส 15 นาที และ 100 องศาเซลเซียส 30 นาทีนั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งกลุ่มที่ได้ปริมาณสาร total phenolics มากที่สุดได้แก่ การสกัดชาเขียวมัทฉะด้วย 40% ethanol ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ  $137.0333 \pm 1.5948$  mg GAE/g น้ำหนักชาเขียวแห้ง

2. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบวิธีการสกัดชาเขียวที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (IC<sub>50</sub>) ด้วยวิธี DPPH assay

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:IC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.033 <sup>a</sup>	35	.001	1491.739	.000
Intercept	.561	1	.561	888885.529	.000
Tea	.002	2	.001	1760.980	.000
Solvent	.024	2	.012	18617.210	.000
Condition	.004	3	.001	1935.235	.000
Tea * Solvent	.002	4	.000	682.439	.000
Tea * Condition	5.819E-5	6	9.699E-6	15.366	.000
Solvent * Condition	.001	6	.000	168.713	.000
Tea * Solvent * Condition	.001	12	9.545E-5	151.212	.000
Error	4.545E-5	72	6.312E-7		
Total	.594	108			
Corrected Total	.033	107			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .998)

ตาราง three way ANOVA แสดงผลการวิเคราะห์ค่าสถิติระหว่างกลุ่ม (ชนิดของชาตัวทำละลายxสภาวะในการสกัด) ได้ค่าสถิติ F เท่ากับ 151.212 และมีค่า Sig เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 3 ตัวแปรต้น ซึ่งส่งผลต่อตัวแปรตาม จึงต้องใช้สถิติ one way ANOVA เพื่อช่วยในการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่าง โดยแทนด้วยตัวเลขดังตารางต่อไปนี้

- ชาเขียวมัทฉะ (แทนด้วย 1), ชาเขียวเซนฉะ (แทนด้วย 2) และชาเขียวบันฉะ (แทนด้วย 3)
- สกัดด้วยน้ำ (แทนด้วย 1), 40% ethanol (แทนด้วย 2) และ 70% ethanol (แทนด้วย 3)
- สภาวะในการสกัด เช่น 80°C 15 นาที (แทนด้วย 1), 80°C 30 นาที (แทนด้วย 2), 100°C 15 นาที (แทนด้วย 3) และ 100°C 30 นาที (แทนด้วย 4)

## Descriptives

IC50

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
111	3	.091967	.0003786	.0002186	.091026	.092907	.0917	.0924
112	3	.075667	.0003055	.0001764	.074908	.076426	.0754	.0760
113	3	.088300	.0002646	.0001528	.087643	.088957	.0880	.0885
114	3	.091533	.0006658	.0003844	.089879	.093187	.0911	.0923
121	3	.076700	.0009539	.0005508	.074330	.079070	.0761	.0778
122	3	.050367	.0003215	.0001856	.049568	.051165	.0500	.0506
123	3	.052700	.0002646	.0001528	.052043	.053357	.0525	.0530
124	3	.055933	.0002309	.0001333	.055360	.056507	.0558	.0562
131	3	.060933	.0000577	.0000333	.060790	.061077	.0609	.0610
132	3	.052167	.0000577	.0000333	.052023	.052310	.0521	.0522
133	3	.054667	.0002082	.0001202	.054150	.055184	.0545	.0549
134	3	.057633	.0011846	.0006839	.054691	.060576	.0569	.0590
211	3	.096400	.0003606	.0002082	.095504	.097296	.0960	.0967
212	3	.091867	.0018771	.0010837	.087204	.096530	.0897	.0930
213	3	.092300	.0002000	.0001155	.091803	.092797	.0921	.0925
214	3	.094200	.0003606	.0002082	.093304	.095096	.0939	.0946
221	3	.064033	.0005132	.0002963	.062759	.065308	.0636	.0646
222	3	.051167	.0002517	.0001453	.050542	.051792	.0509	.0514
223	3	.054367	.0012503	.0007219	.051261	.057473	.0531	.0556
224	3	.058267	.0004726	.0002728	.057093	.059441	.0579	.0588
231	3	.077467	.0002082	.0001202	.076950	.077984	.0773	.0777
232	3	.052400	.0002646	.0001528	.051743	.053057	.0522	.0527
233	3	.055667	.0002309	.0001333	.055093	.056240	.0554	.0558
234	3	.059533	.0002309	.0001333	.058960	.060107	.0594	.0598
311	3	.100167	.0010017	.0005783	.097678	.102655	.0994	.1013
312	3	.093967	.0000577	.0000333	.093823	.094110	.0939	.0940
313	3	.096000	.0002000	.0001155	.095503	.096497	.0958	.0962
314	3	.098033	.0007572	.0004372	.096152	.099914	.0975	.0989
321	3	.064533	.0008386	.0004842	.062450	.066617	.0640	.0655
322	3	.055467	.0004509	.0002603	.054347	.056587	.0550	.0559
323	3	.057600	.0002646	.0001528	.056943	.058257	.0574	.0579
324	3	.058500	.0021703	.0012530	.053109	.063891	.0560	.0599
331	3	.096567	.0006807	.0003930	.094876	.098258	.0958	.0971
332	3	.064467	.0023180	.0013383	.058708	.070225	.0620	.0666
333	3	.069433	.0001155	.0000667	.069146	.069720	.0693	.0695
334	3	.083800	.0002646	.0001528	.083143	.084457	.0835	.0840
Total	108	.072077	.0175619	.0016899	.068727	.075427	.0500	.1013

## ANOVA

IC50

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.033	35	.001	1491.739	.000
Within Groups	.000	72	.000		
Total	.033	107			

สรุปผลคือ ได้ค่าสถิติ F เท่ากับ 1491.739 และมีค่า Sig เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 ดังนั้น จึงปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าค่า  $IC_{50}$  เฉลี่ยของวิธี DPPH assay จากการสกัดชาเขียว 3 ชนิดได้แก่ ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเซนฉะ และชาเขียวบันฉะ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกันคือ น้ำปราศจากไอออน 40% เอทานอล และ 70% เอทานอล และสภาวะในการสกัด ดังนี้ 80 องศาเซลเซียส 15 นาที 80 องศาเซลเซียส 30 นาที 100 องศาเซลเซียส 15 นาที และ 100 องศาเซลเซียส 30 นาทีนั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งกลุ่มที่ได้  $IC_{50}$  เฉลี่ยของวิธี DPPH assay น้อยที่สุดคือ การสกัดชาเขียวมัทฉะด้วย 40% ethanol ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.0504 \pm 0.0003$  mg/ml

3. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบวิธีการสกัดชาเขียวที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (IC<sub>50</sub>) ด้วยวิธี ABTS assay

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:IC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.334 <sup>a</sup>	35	.010	4210.448	.000
Intercept	1.286	1	1.286	566651.469	.000
Tea	.037	2	.019	8204.406	.000
Solvent	.147	2	.074	32412.304	.000
Condition	.087	3	.029	12763.472	.000
Tea * Solvent	.012	4	.003	1349.874	.000
Tea * Condition	.007	6	.001	538.509	.000
Solvent * Condition	.009	6	.001	652.824	.000
Tea * Solvent * Condition	.035	12	.003	1274.530	.000
Error	.000	72	2.269E-6		
Total	1.620	108			
Corrected Total	.335	107			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = .999)

ตาราง three way ANOVA แสดงผลการวิเคราะห์ค่าสถิติระหว่างกลุ่ม (ชนิดของชาxตัวทำละลายxสภาวะในการสกัด) ได้ค่าสถิติ F เท่ากับ 1274.530 และมีค่า Sig เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 3 ตัวแปรต้น ซึ่งส่งผลต่อตัวแปรตาม จึงต้องใช้สถิติ one way ANOVA เพื่อช่วยในการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่าง โดยแทนด้วยตัวเลขดังตารางต่อไปนี้

- ชาเขียวมัทฉะ (แทนด้วย 1), ชาเขียวเซนฉะ (แทนด้วย 2) และชาเขียวบันฉะ (แทนด้วย 3)
- สกัดด้วยน้ำ (แทนด้วย 1), 40% ethanol (แทนด้วย 2) และ 70% ethanol (แทนด้วย 3)
- สภาวะในการสกัด เช่น 80°C 15 นาที (แทนด้วย 1), 80°C 30 นาที (แทนด้วย 2), 100°C 15 นาที (แทนด้วย 3) และ 100°C 30 นาที (แทนด้วย 4)



## Descriptives

IC50

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
111	3	.192267	.0053594	.0030943	.178953	.205580	.1861	.1958
112	3	.110433	.0003055	.0001764	.109674	.111192	.1101	.1107
113	3	.129967	.0001528	.0000882	.129587	.130346	.1298	.1301
114	3	.131867	.0015885	.0009171	.127921	.135813	.1309	.1337
121	3	.120433	.0000577	.0000333	.120290	.120577	.1204	.1205
122	3	.035233	.0000577	.0000333	.035090	.035377	.0352	.0353
123	3	.049367	.0007572	.0004372	.047486	.051248	.0485	.0499
124	3	.072167	.0003055	.0001764	.071408	.072926	.0719	.0725
131	3	.083867	.0002517	.0001453	.083242	.084492	.0836	.0841
132	3	.037333	.0030892	.0017836	.029659	.045007	.0355	.0409
133	3	.070000	.0022539	.0013013	.064401	.075599	.0686	.0726
134	3	.077633	.0007095	.0004096	.075871	.079396	.0770	.0784
211	3	.189933	.0000577	.0000333	.189790	.190077	.1899	.1900
212	3	.132733	.0003786	.0002186	.131793	.133674	.1323	.1330
213	3	.137300	.0001000	.0000577	.137052	.137548	.1372	.1374
214	3	.156700	.0001000	.0000577	.156452	.156948	.1566	.1568
221	3	.088433	.0005508	.0003180	.087065	.089801	.0878	.0888
222	3	.036533	.0000577	.0000333	.036390	.036677	.0365	.0366
223	3	.060967	.0001155	.0000667	.060680	.061254	.0609	.0611
224	3	.078833	.0000577	.0000333	.078690	.078977	.0788	.0789
231	3	.121833	.0021385	.0012347	.116521	.127146	.1195	.1237
232	3	.039967	.0002517	.0001453	.039342	.040592	.0397	.0402
233	3	.072000	.0006000	.0003464	.070510	.073490	.0714	.0726
234	3	.081700	.0025239	.0014572	.075430	.087970	.0796	.0845
311	3	.217367	.0002517	.0001453	.216742	.217992	.2171	.2176
312	3	.143700	.0005292	.0003055	.142386	.145014	.1431	.1441
313	3	.171733	.0004619	.0002667	.170586	.172881	.1712	.1720
314	3	.201133	.0020599	.0011893	.196016	.206250	.1992	.2033
321	3	.101700	.0001000	.0000577	.101452	.101948	.1016	.1018
322	3	.071867	.0008327	.0004807	.069798	.073935	.0712	.0728
323	3	.073900	.0013892	.0008021	.070449	.077351	.0730	.0755
324	3	.079467	.0001528	.0000882	.079087	.079846	.0793	.0796
331	3	.278800	.0016643	.0009609	.274666	.282934	.2776	.2807
332	3	.097167	.0015373	.0008876	.093348	.100986	.0954	.0982
333	3	.101900	.0019079	.0011015	.097161	.106639	.1001	.1039
334	3	.081700	.0025239	.0014572	.075430	.087970	.0796	.0845
Total	108	.109109	.0559149	.0053804	.098443	.119775	.0352	.2807

## ANOVA

IC50

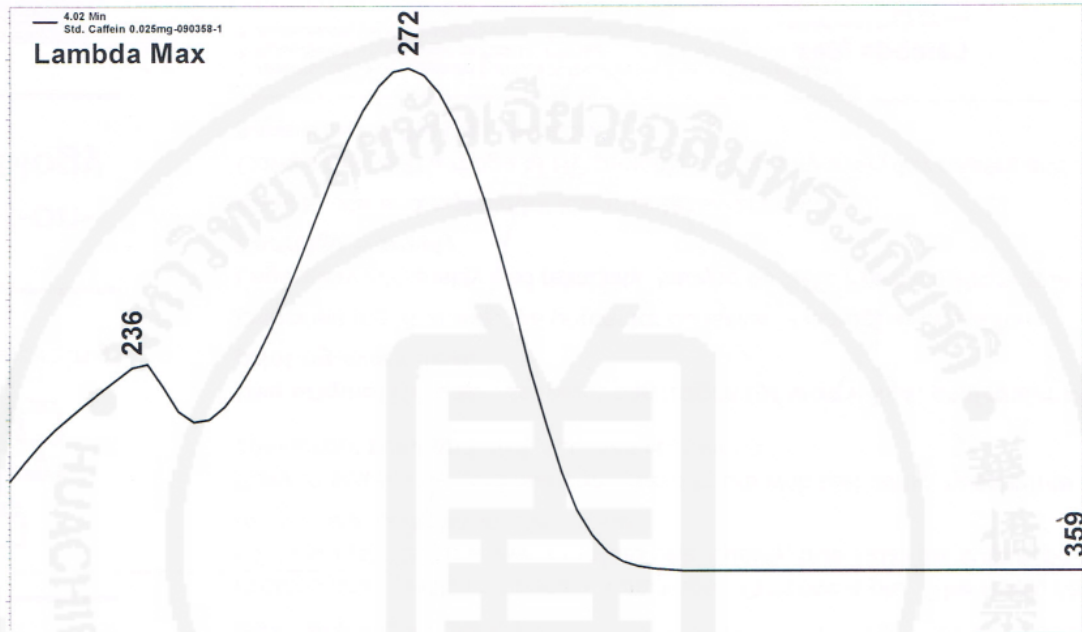
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.334	35	.010	4210.448	.000
Within Groups	.000	72	.000		
Total	.335	107			

สรุปผลคือ ได้ค่าสถิติ F เท่ากับ 4210.448 และมีค่า Sig เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 ดังนั้น จึงปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าค่า  $IC_{50}$  เฉลี่ยของวิธี ABTS assay จากการสกัดชาเขียว 3 ชนิดได้แก่ ชาเขียวมัทฉะ ชาเขียวเซนฉะ และชาเขียวบั้นฉะ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกันคือ น้ำปราศจากไอออน 40% เอทานอล และ 70% เอทานอล และสภาวะในการสกัด ดังนี้ 80 องศาเซลเซียส 15 นาที 80 องศาเซลเซียส 30 นาที 100 องศาเซลเซียส 15 นาที และ 100 องศาเซลเซียส 30 นาทีนั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งกลุ่มที่ได้  $IC_{50}$  เฉลี่ยของวิธี ABTS assay น้อยที่สุดคือ การสกัดชาเขียวมัทฉะด้วย 40% ethanol ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.0352 \pm 0.0001$  mg/ml

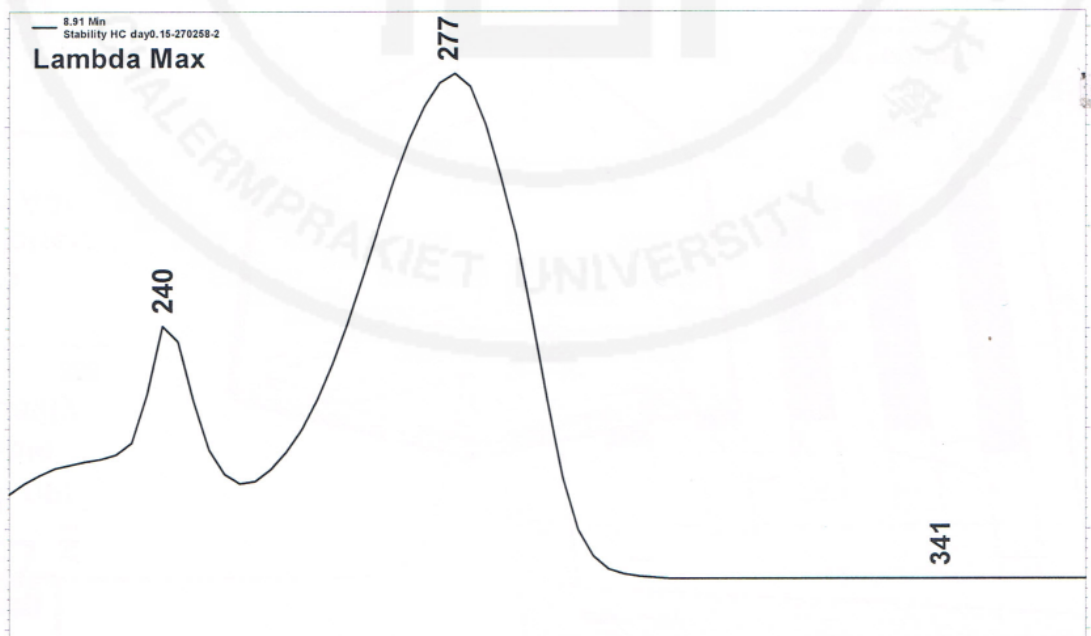
## ภาคผนวก ข

สเปกตรัมของสารมาตรฐาน caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate

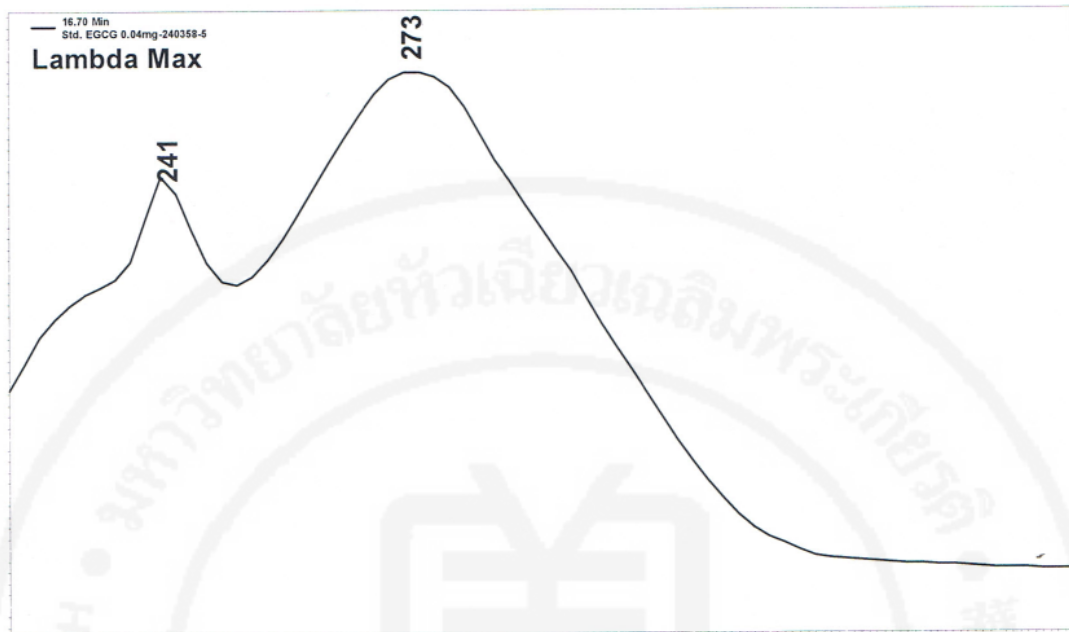
## 1. สเปกตรัมของสารมาตรฐาน caffeine



## 2. สเปกตรัมของสารมาตรฐาน epicatechin

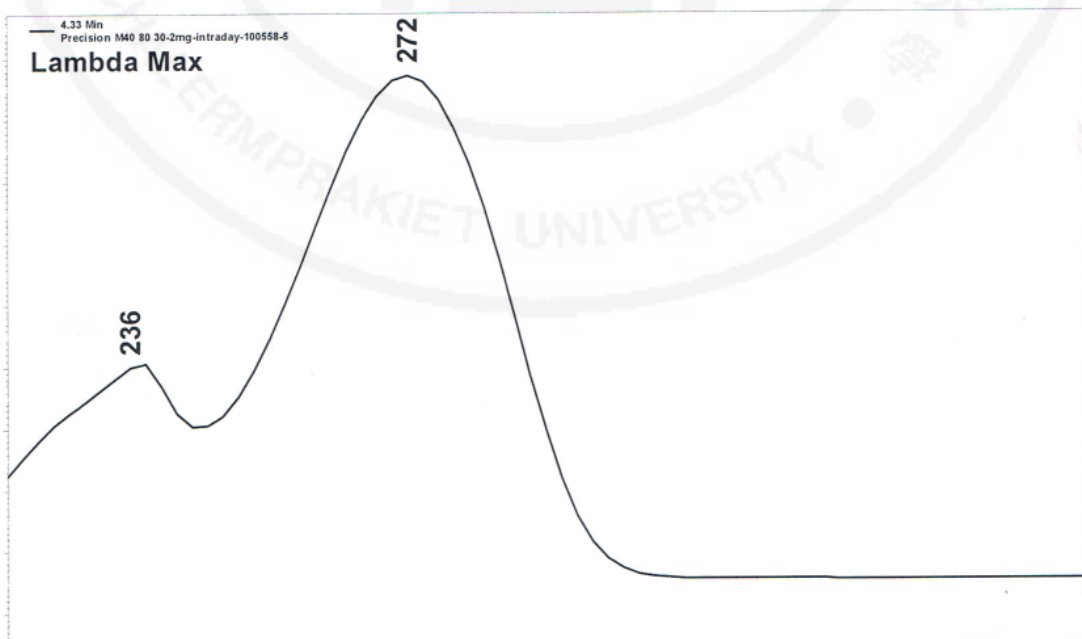


### 3. สเปกตรัมของสารมาตรฐาน epigallocatechin gallate

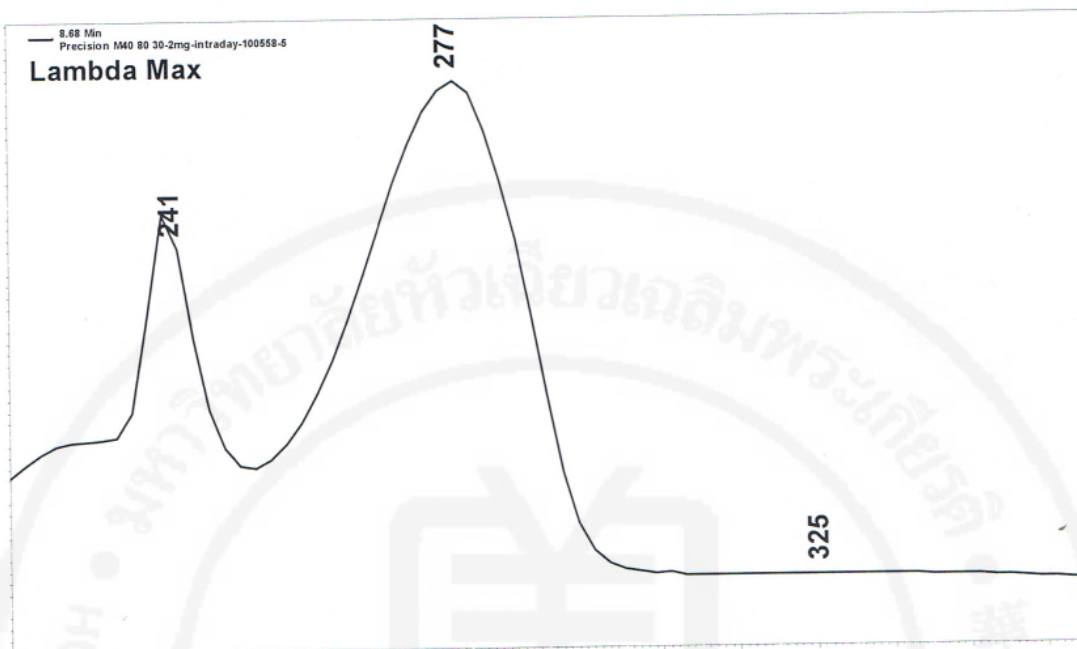


### 4. สเปกตรัมของสารสำคัญ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในสกัดชาเขียวมัทฉะ

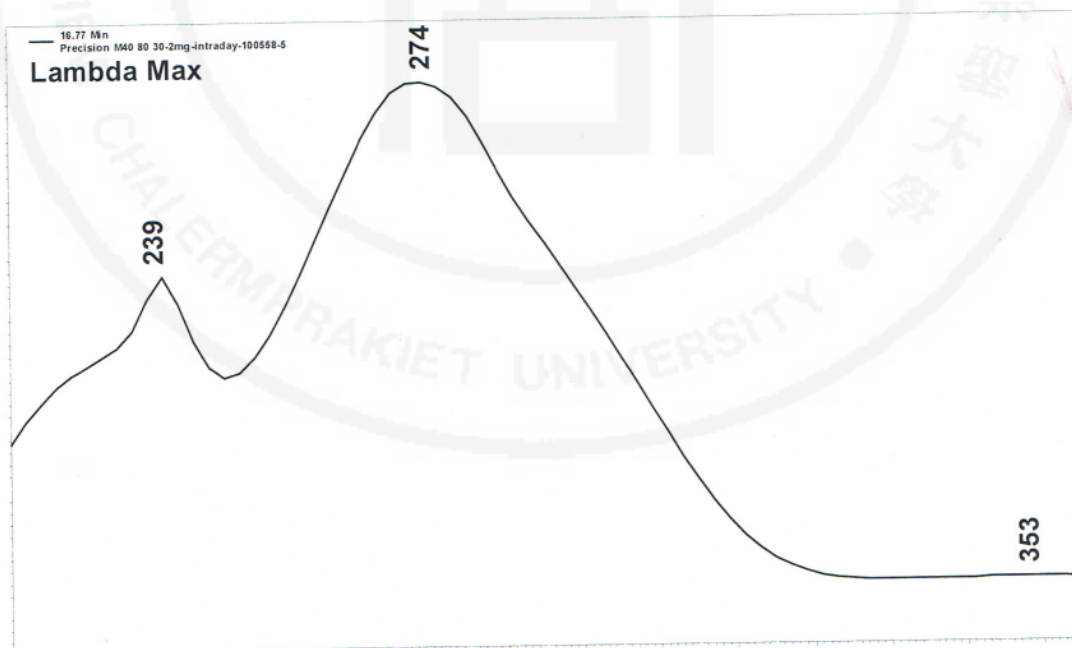
#### 4.1) สารสำคัญ Caffeine



4.2) สารสำคัญ epicatechin



4.3) สารสำคัญ Epigallocatechin gallate



**ประวัติผู้เขียน**

ชื่อ - สกุล	นางสาวอัจฉราภรณ์ สิงห์หาญ
วัน เดือน ปีเกิด	16 เมษายน 2532
ที่อยู่ปัจจุบัน	57 หมู่ 10 ตำบลทางขวาง อำเภอเวียงน้อย จังหวัดขอนแก่น 40230
ประวัติการศึกษา	คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2553	

