



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การสร้างตัวแบบเคโมเมตริกซ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาจากใบส่องฟ้า

(*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin)

ที่สกัดด้วยน้ำสำหรับเตรียมเป็นชาผงสำเร็จรูป

Chemometric modeling of free radical-scavenging activity in the
Clausena tea (*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin)
water extract for preparing Clausena spray-dried tea.

โดย

นสภ. นวินดา จินต์จิรัฐติกาล รหัส 60210037

นสภ. อธิศรา รักษาทรัพย์ รหัส 60210244

นสภ. นภััสสร วงษ์ชัย รหัส 60210261

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การสร้างตัวแบบเคโมเมตริกซ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาจากใบส่องฟ้า

(*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin)

ที่สกัดด้วยน้ำสำหรับเตรียมเป็นชาผงสำเร็จรูป

Chemometric modeling of free radical-scavenging activity in the
Clausena tea (*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin)
water extract for preparing Clausena spray-dried tea.

โดย

นสภ. นวินดา จินต์จิรัฐติกาล รหัส 60210037

นสภ. อธิศรา รักษาทรัพย์ รหัส 60210244

นสภ. นภัสสร วงษ์ชัย รหัส 60210261

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

เนื่องมาจากประเทศไทยมีจำนวนผู้สูงอายุเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ และได้ก้าวสู่สังคมผู้สูงอายุ ทำให้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่าง ๆ มีบทบาทมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารส่วนใหญ่ไม่ได้ผ่านการผลิตที่ได้มาตรฐานและไม่มีประสิทธิภาพในการเสริมสุขภาพ จึงทำให้คณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นว่าควรนำผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ทำมาจากสมุนไพรเพื่อส่งเสริมสุขภาพโดยในที่นี้คณะผู้วิจัยได้ทำการเลือกสมุนไพรพื้นบ้านที่ ปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนองใบมาพัฒนาเป็นตำรับชาผงสำเร็จรูปเพื่อสุขภาพ โดยต้นสองฟ้า (*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin) มีสารสำคัญในส่วนใบคือ Phenolic compound ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและนำผลการศึกษาที่ได้มาสร้างโมเดลที่มีการประยุกต์ใช้หลักการ Chemometrics ร่วมด้วยเพื่อใช้ทำนายความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัม ของปริมาณผงชาชงใบสองฟ้าและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป โดยคณะผู้จัดทำหวังว่างานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์และสามารถนำไปต่อยอดงานด้านอื่นต่อไปในอนาคตได้

คณะผู้จัดทำ

นสภ. นวินดา จินต์จิรัฐติกาล	รหัสนิสิต 60210037
นสภ. อธิศรา รักษาทรัพย์	รหัสนิสิต 60210244
นสภ. นภัสสร วงษ์ชัย	รหัสนิสิต 60210261

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2564

เรื่อง การสร้างตัวแบบเคมีเมตริกซ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาจากใบส่องฟ้า (*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin) ที่สกัดด้วยน้ำสำหรับเตรียมเป็นชาผงสำเร็จรูป
ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. นวินดา จินต์จิรัฐติกาล รหัส 60210037
2. นสภ. อธิศรา รักษาทรัพย์ รหัส 60210244
3. นสภ. นภัสสร วงษ์ชัย รหัส 60210261

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ผศ.ดร.ณิชนันท์ ภิระคำ
2. ภก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง
3. ภญ.ดร.พทุธิพร คงแก้ว

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบส่องฟ้า (*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin) ที่มีสารออกฤทธิ์คือ phenolic compounds ซึ่งการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทำได้โดยนำสารสกัดใบส่องฟ้า 6 ความเข้มข้น คือ น้ำหนักใบส่องฟ้า 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS กับวิธี DPPH และทดสอบหาปริมาณ total phenolic content โดยนำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ทั้งหมด 10 ครั้ง จากนั้นนำผลที่ได้ไปคำนวณด้วยวิธี partial least square regression เพื่อสร้างโมเดล calibration และโมเดล validation เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง UV spectrum กับปริมาณ total phenolic content และความสัมพันธ์ระหว่าง UV spectrum กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการคัดเลือกโมเดลที่ดีที่สุดของการทำนายฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลดังนี้ วิธี ABTS ใช้โมเดลจากวิธี pretreatment แบบ 2nd derivative Factor 4, วิธี DPPH ใช้โมเดลจากวิธี pretreatment แบบ 1st derivative Factor 6 และโมเดลที่ดีที่สุดของการทำนายปริมาณ total phenolic content คือโมเดลจากวิธี pretreatment แบบ 2nd derivative Factor 5 เนื่องจากมีค่า R² ของ model เท่ากับ 0.95, 0.95 และ 0.85 ตามลำดับ และมีค่า R² pearson เท่ากับ 0.93, 0.92 และ 0.89 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 จะถือว่าโมเดลมีความแม่นยำของข้อมูลสูงและมีค่า error ของโมเดลต่ำ โดยพิจารณาจากค่า RMSEP เท่ากับ 4.83, 6.35 และ 2.15 ตามลำดับ และค่า bias เท่ากับ 0.05, 0.51 และ 0.45 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผศ.ดร.ณิชนันท์ ภิระคำ

Senior Project Academic Year 2022

: Chemometric modeling of free radical-scavenging activity in the *Clausena* tea (*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin) water extract for preparing *Clausena* spray-dried tea.

By 1. Miss Navinda Jinjirattitikran ID 60210037
2. Miss Teerisara Raksasab ID 60210244
3. Miss Napasson Wongchai ID 60210261

Advisor

1. Assist. Pf. Dr. Nichakan Peerakam
2. Assist. Pf. Dr. Watcharapong Chaemsawang
3. Dr. Putthiporn Khongkaew

ABSTRACT

This research aimed to study the antioxidant activities of *Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin leaves extraction, which the active ingredient is phenolic compounds. The antioxidant activities were tested by preparing six concentrations of crude extracts. The crude drugs (0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 and 1 g) were extracted by 250 ml distillation water. Then all extracts were determined antioxidant activities (DPPH, ABTS assay) and evaluated the content of phenolic compounds. The UV spectrums were repeatedly detected by UV-VIS Spectrophotometer about 10 times. Then the application of partial least squares regression for the calibration and validation models was used to predict the correlation between UV spectrum and total phenolic content and the correlation between UV spectrum and antioxidant activities. The results showed that the best model of antioxidant activities revealed ABTS assay from Pretreatment type 2nd derivative Factor 4 and DPPH assay from Pretreatment type 1st derivative Factor 6. For total phenolic content, the model from Pretreatment type 2nd derivative Factor 5 was a great model of analysis. For this reason, R^2 model = 0.95, 0.95, 0.85 respectively and R^2 pearson = 0.93, 0.92, 0.89 respectively. The model represented high precision and low error that can be considered from low RMSEP and low Bias, RMSEP = 4.83, 6.35, 2.15 respectively. Bias = 0.05, 0.51, 0.45 respectively.

Major Advisor: Assist. Prof. Dr. Nichakan Peerakam

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ผก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง, ผญ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว และ ผศ.ดร.ณิชนันต์ ภิระคำ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่คอยให้คำปรึกษาและให้ข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ จึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสามท่านเป็นอย่างสูง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัยและเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำโครงการวิจัยนี้ทำให้สามารถทำโครงการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

นสภ. นวินดา จินต์จิรัฐติกาล รหัสนิสิต 60210037

นสภ. อีริศรา รักษาทรัพย์ รหัสนิสิต 60210244

นสภ. นภัสสร วงษ์ชัย รหัสนิสิต 60210261

8 เมษายน พ.ศ. 2565

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
คำนำ	ข
บทคัดย่อ	ค
ABSTRACT	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูปภาพ	ณ
บทที่ 1	1
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
- กรอบแนวคิด	3
บทที่ 2	4
- ข้อมูลต้นส่่งฟ้า	4
- อนุมูลอิสระ	5
- สารต้านอนุมูลอิสระ	5
- พืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
-ฤทธิ์ของต้นส่่งฟ้าและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
- สารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชตระกูล Clausena	8
- สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
- Chemometrics	12
- เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dry)	13
บทที่ 3	15
- พืช	15
- วัสดุอุปกรณ์	15
- สารเคมี	15
- ขั้นตอนการดำเนินงาน	17

บทที่ 4	22
- ลักษณะของผงใบส่่งฟ้า	22
- การวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content ในสารสกัดใบส่่งฟ้า	23
- การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบส่่งฟ้าด้วยวิธี ABTS	28
- การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบส่่งฟ้าด้วยวิธี DPPH	33
- การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดใบส่่งฟ้า	37
- วิธีการเลือกโมเดลทาง chemometrics	37
- การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบส่่งฟ้า ด้วยวิธี ABTS โดยเทคนิค Chemometrics	39
- การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบส่่งฟ้า ด้วยวิธี DPPH โดยเทคนิค Chemometrics	45
- การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดใบส่่งฟ้าโดยเทคนิค Chemometric	50
- การเตรียมตำรับชาชงรูปแบบผงแห้งโดยวิธี Spray dry	54
บทที่ 5	56
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก	62
- ภาคผนวก ก	63
- ภาคผนวก ข	70

สารบัญตาราง

หัวข้อ	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงปริมาณ total phenolic content ของสารสกัดใบส่่องฟ้า	25
ตารางที่ 2 แสดงค่า %inhibition และค่าเฉลี่ยของสารสกัดใบส่่องฟ้าเมื่อทำการวิเคราะห์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS	30
ตารางที่ 3 แสดงค่า %inhibition และค่าเฉลี่ยของสารสกัดใบส่่องฟ้าเมื่อทำการวิเคราะห์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	34
ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบโมเดล Chemometrics ในแต่ละ Pretreatment ของการทำนายปริมาณ total phenolic content, วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วย วิธี DPPH และ ABTS	38
ตารางที่ 5 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery ที่นำมาใช้คำนวณ %RSD	64
ตารางที่ 6 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery	64
ตารางที่ 7 แสดงค่า Reference และค่า Prediction ที่ใช้ในการคำนวณ RMSEP	65
ตารางที่ 8 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery ที่นำมาใช้คำนวณ %RSD	66
ตารางที่ 9 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery	66
ตารางที่ 10 แสดงค่า Reference และค่า Prediction ที่ใช้ในการคำนวณ RMSEP	67
ตารางที่ 11 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery ที่นำมาใช้คำนวณ %RSD	68
ตารางที่ 12 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery ของ การทดสอบความเที่ยงตรง (Accuracy)	68
ตารางที่ 13 แสดงค่า Reference และค่า Prediction ที่ใช้ในการคำนวณ RMSEP	69

สารบัญรูปภาพ

หัวข้อ	หน้า
รูปภาพที่ 1 แผนผังกรอบแนวคิดวิจัย	3
รูปภาพที่ 2 ตัวอย่างลักษณะของต้นสอ่งฟ้า	4
รูปภาพที่ 3 ตัวอย่างสารประกอบที่พบในงานวิจัยของ Pongsakorn Jantakoon และคณะ	8
รูปภาพที่ 4 HPLC fingerprint ของสาร biomarker	9
รูปภาพที่ 5 ผล HPLC chromatograms ที่ได้จากสารสกัดใบสอ่งฟ้า	9
รูปภาพที่ 6 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ	10
รูปภาพที่ 7 สารประกอบที่เจอในงานวิจัยของ Surat laphookhieo, Wisanu Maneerat และ Sorwaporn Koysomboon	11
รูปภาพที่ 8 โครงสร้างส่วนประกอบของเครื่อง Spray dry	14
รูปภาพที่ 9 แผนผังแสดงการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และหาปริมาณ total phenolic content โดยใช้ chemometrics	20
รูปภาพที่ 10 เปรียบเทียบผงใบสอ่งฟ้าก่อนและหลังการแห้งด้วยแรงเบอร์ 60	22
รูปภาพที่ 11 เปรียบเทียบน้ำชาจากใบสอ่งฟ้าที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม (จากช้ำไปชวา)	23
รูปภาพที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent หลังทำปฏิกิริยากับสารสกัดใบสอ่งฟ้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	24
รูปภาพที่ 13 กราฟมาตรฐาน Gallic acid ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ Gallic acid	24
รูปภาพที่ 14 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ABTS เมื่อทำปฏิกิริยากับ สารสกัดใบสอ่งฟ้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	29
รูปภาพที่ 15 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH เมื่อทำปฏิกิริยากับ สารสกัดใบสอ่งฟ้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	33
รูปภาพที่ 16 สเปกตรัมของสารสกัดใบสอ่งฟ้าที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำ 250 มิลลิลิตร	37
รูปภาพที่ 17 ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบสอ่งฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัด ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี ABTS จากวิธีที่ไม่มีการ Pretreatment data	40

รูปภาพที่ 18 ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี ABTS จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2 nd derivative	41
รูปภาพที่ 19 Calibration model จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2 nd derivative factor 4 จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี ABTS	42
รูปภาพที่ 20 Validation model จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2 nd derivative factor 4 จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี ABTS	42
รูปภาพที่ 21 ค่า R ² pearson ของโมเดล	43
รูปภาพที่ 22 ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี DPPH จากวิธีที่ไม่มีการ Pretreatment data	45
รูปภาพที่ 23 สเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี DPPH จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 1 st derivative	46
รูปภาพที่ 24 Calibration model จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 1 st derivative factor 6 จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี DPPH	47
รูปภาพที่ 25 Validation model จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 1 st derivative จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี DPPH	47
รูปภาพที่ 26 R ² pearson ของโมเดล	48
รูปภาพที่ 27 สเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก จากวิธีที่ไม่มีการ Pretreatment data	50
รูปภาพที่ 28 สเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2 nd derivative	51
รูปภาพที่ 29 Calibration model จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2 nd derivative factor 5 จากการวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content	52

รูปภาพที่ 30 Validation model จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2 nd derivative factor 5 จากการวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content	52
รูปภาพที่ 31 ค่า R ² pearson ของโมเดล	53
รูปภาพที่ 32 แสดงภาพเครื่อง spray dry ที่ไม่สามารถใช้งานได้	55

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

จากข้อมูลของกรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข ประจำปี 2563 พบว่าในปี พ.ศ. 2564 ประเทศไทยจะเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ตามหลักเกณฑ์ที่ว่าผู้ที่อายุ 60 ปีขึ้นไป มีจำนวนมากกว่า 20% ของประชากรทั้งประเทศ และคาดการณ์ว่าในปี 2574 เราจะเข้าสู่ “สังคมสูงอายุระดับสุดยอด”⁽¹⁾ จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะส่งผลถึงการที่ประชากรทุกคนต้องเตรียมพร้อมไปกับภาวะต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นกับผู้สูงอายุ เมื่อเข้าสู่วัยสูงอายุจะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านร่างกายและจิตใจ มีข้อจำกัดในการทำหน้าที่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกายในทางลดลงโดยมักเริ่มตั้งแต่อยู่ในช่วงวัยกลางคน โดยปัจจัยหนึ่งที่พบว่าเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดความเสื่อมของร่างกาย คือ อนุมูลอิสระ (Free radical) และยังเป็นสาเหตุนำไปสู่การเกิดโรคบางโรคหรือความผิดปกติของพยาธิสภาพบางอย่างได้ เช่น โรคมะเร็ง การอักเสบเรื้อรัง เป็นต้นแต่อย่างไรก็ตามมีการค้นพบสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งธรรมชาติมากมายที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ถึงการศึกษาวิจัยเพื่อนำสารเหล่านั้นมาช่วยในการชะลอวัย ลดความเสื่อมของร่างกายและป้องกันโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้

จากแผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564 ที่มีมาตรการพัฒนาอุตสาหกรรมสมุนไพร, การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรไทยและการพัฒนาการตลาดสมุนไพรไทย⁽²⁾ ทำให้กลุ่มผู้วิจัยได้เล็งเห็นว่าประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพมากมาย วิถีชีวิตของคนไทยผูกพันกับสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้สืบทอดกันมาอย่างยาวนาน ดังนั้นควรมีการนำเอาสมุนไพรพื้นบ้านที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดดเด่น มาแปรรูปให้อยู่ในรูปแบบที่สะดวกต่อการรับประทาน ซึ่งส่องฟ้าเป็นสมุนไพรที่เป็นที่รู้จักในท้องถิ่น มีการใช้ประโยชน์ทั้งเป็นอาหารและเป็นยา อีกทั้งยังมีข้อมูลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งทีมผู้วิจัยมีความสนใจในสมุนไพรดังกล่าว จึงทำการเลือกต้นส่องฟ้าเพื่อการศึกษาและพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่สามารถสร้างมูลค่าให้กับสมุนไพรดังกล่าวต่อไป

ต้นส่องฟ้า (*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guill) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Rutaceae เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้มากในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และมีการศึกษาในพืช ชนิดนี้ว่ามีสารกลุ่ม carbazole alkaloids ได้แก่ heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline, 7-methoxymukonal และกลุ่ม coumarins ได้แก่ clausarin, dentatin, nordentatin และ xanthoxyletin ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง⁽³⁾ แต่อย่างไรก็ดีในงานวิจัยที่ศึกษาเรื่องการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากต้นส่องฟ้ามักสกัดสารจากเปลือกรากของ

ต้นทำให้กลุ่มผู้วิจัยได้ต่อยอดแนวคิดที่ว่าควรสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากส่วนของใบซึ่งเมื่อนำมาทำผลิตภัณฑ์อาจทำให้มีรสชาติของชาที่ดีได้ เพราะจากการค้นคว้าหาข้อมูลพบว่าใบสอ่งฟ้ามีรสชาติเผ็ดมัน มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว และมีการใช้ส่วนของใบอ่อนหรือยอดอ่อนมารับประทานเป็นผักสดร่วมกับน้ำพริก

ในส่วนของการรูปแบบการแปรรูปทางผู้วิจัยเห็นว่าชาสมุนไพรเป็นเครื่องดื่มที่เหมาะสมสำหรับทุกเพศทุกวัย ทำให้การดื่มชาสมุนไพรเป็นที่นิยมอย่างมากในกลุ่มคนทั่วไปและกลุ่มคนที่รักสุขภาพตนเอง ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้ชาสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์ที่น่าสนใจ และรูปแบบของชาสมุนไพรที่กลุ่มผู้วิจัยสนใจคือรูปแบบผงแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นกระจายหรือ Spray dry เพราะเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วกว่าชาสมุนไพรชนิดแบบบรรจุซอง หรือการชงด้วยใบชาโดยตรง เพราะผู้ที่ใช้ผลิตภัณฑ์สามารถชงด้วยน้ำอุ่นแล้วดื่มได้เลยทันที ไม่ต้องรอเวลาให้สารสำคัญละลายออกจากถุงบรรจุใบชา และไม่มีกากชาสมุนไพรที่เหลือจากการชง

โดยในงานวิจัยนี้ได้มีการใช้เทคนิค UV-VIS Spectrophotometer มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค Chemometrics ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ข้อมูลที่กำลังนิยมใช้ในปัจจุบัน เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีจำนวนมากและมีความซับซ้อน อีกทั้งใช้เพื่อศึกษาและทำนายความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมของปริมาณผงชาชงสอ่งฟ้าและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในใบสอ่งฟ้าเพื่อใช้ในการพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบชาสำเร็จรูปเพื่อให้ง่ายต่อการบริโภคและมีปริมาณสารสำคัญเพียงพอในการใช้เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ

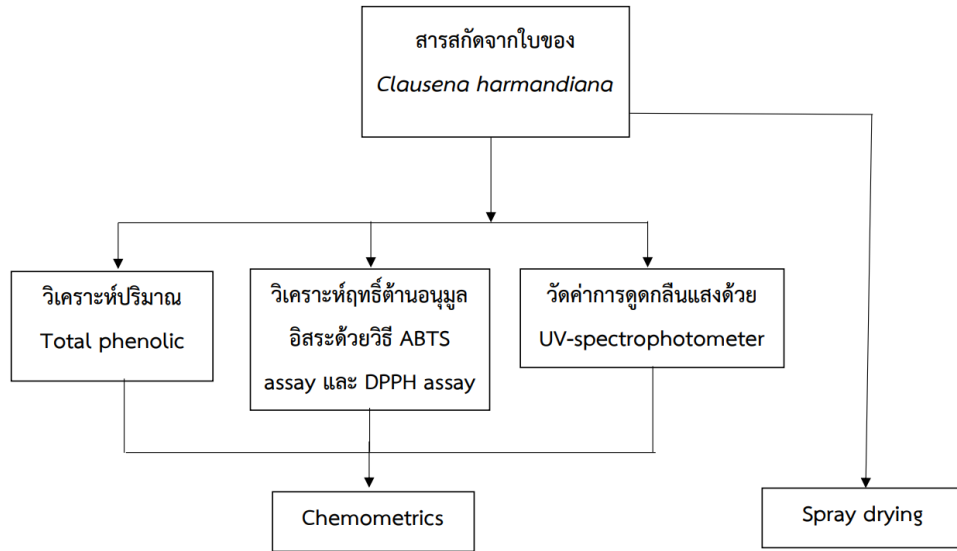
วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสารสกัดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากใบสอ่งฟ้า
2. เพื่อนำเทคนิค Chemometric มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาตำรับชาชงจากใบสอ่งฟ้า
3. เพื่อพัฒนาตำรับชาชงจากใบสอ่งฟ้าด้วยวิธี Spray dry

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดที่ได้จากใบสอ่งฟ้า
2. ได้ทราบถึงระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบสอ่งฟ้า
3. ได้ตำรับชาชงจากใบสอ่งฟ้าเพื่อใช้เป็นชาชงต้านอนุมูลอิสระ

กรอบแนวคิด



รูปภาพที่ 1 แผนผังกรอบแนวคิดวิจัย

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลต้นสอ่งฟ้า



รูปภาพที่ 2 ตัวอย่างลักษณะของต้นสอ่งฟ้า

ต้นสอ่งฟ้า (*Clausena harmandiana*) จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae เป็นไม้พุ่มสีเขียวขนาดเล็ก ลำต้นตรง สูงประมาณ 20-50 เซนติเมตร ใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ ใบรูปไข่แกมวงรี เนื้อใบมีจุดน้ำมันกระจาย ดอกเป็นดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง กลีบดอกสีขาวแกมเหลือง ผลรูปกลม สามารถพบได้ตลอดทั้งปี โดยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยต้นสอ่งฟ้าเป็นพืชที่มีประโยชน์หลากหลาย เช่น สามารถใช้เป็นอาหาร, เป็นสมุนไพรบรรเทาอาการปวดท้อง ปวดศีรษะ ลดไข้ ด้านการอักเสบ เป็นต้น⁽⁴⁾

จากงานวิจัยของ Porntip Jantamat และคณะ มีการสกัดสารจากเปลือกกรากของต้นสอ่งฟ้า (*Clausena harmandiana*) โดยสกัดสาร 7 ชนิด, carbazole alkaloids (heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline, 7-methoxymukonal) และ coumarins (clausarin, dentatin, nordentatin, and xanthoxyletin) ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ Antioxidation, cytotoxicity และ apoptosis ในการทำการทดลองในหลอดทดลอง⁽³⁾

จากงานวิจัยของ Uraiwan Songsiang และคณะ ได้มีการทดสอบสาร 15 ชนิด ในรากของ *Clausena harmandiana* โดยแบ่งเป็นสารกลุ่ม carbazole alkaloids ที่พบใหม่ 4 ตัว คือ claurailas A-D สารกลุ่ม carbazole 12 ตัว ดังนี้ girinimbine, heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline, clausine E, 3-formyl-1-hydroxy-7-methoxycarbazole, O-demethylmurrayanine, 7-methoxymurrayanine, clausine O, lansine และ clausine K⁽⁵⁾

จากงานวิจัยข้างต้น พบว่า ในรากและลำต้นจะมีปริมาณสาร antioxidation มากที่สุด แต่การที่เราใช้รากหรือลำต้นมาทำชาขงจะทำให้ใช้เวลาในการปลูกนาน ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเห็นว่าการนำใบชามานำเป็นชาขงอาจจะทำให้มีรสชาติที่ดีกว่า สะดวกรวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่า

อนุมูลอิสระ ^{(6), (7), (8)}

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวภายในอะตอม ทำให้มีความไม่คงตัวและมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในร่างกาย จากนั้นนำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์ จึงถือได้ว่าอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสื่อม โรคและความผิดปกติต่าง ๆ ภายในร่างกายได้เช่น โรคมะเร็ง การแก่ชรา โรคความจำเสื่อม โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคภูมิแพ้ เป็นต้น โดยปกติแล้วอนุมูลอิสระเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นในร่างกายอยู่แล้วและร่างกายจะมีกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ออกจากร่างกายผ่านสารต้านอนุมูลอิสระ แต่ถ้าหากว่าเกิดความไม่สมดุลกัน ระหว่างการเกิดและการต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้เกิดการส่งผลเสียต่อสุขภาพเนื่องจากการเกิดภาวะ oxidation stress

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายหรือที่เรียกว่า Reactive species (RS) สามารถพบได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species; ROS) เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion radical), อนุมูลเปอร์ออกซิล (peroxyl radical) และอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) เป็นต้น
2. กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species; RNS) เช่น อนุมูลไนตริกออกไซด์ (nitric oxide radical) และอนุมูลไนโตรเจนไดออกไซด์ (nitrogen dioxide radical) เป็นต้น
3. กลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species; RCS) เช่น อนุมูลคลอรีน (chlorine radical) และกรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid) เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระ ^{(6), (7), (8)}

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ โมเลกุลที่สามารถออกซิไดซ์ตัวเองแทนโมเลกุลสารอื่น ๆ ได้ โดยสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระและหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ได้ก่อนที่โมเลกุลสำคัญจะถูกทำลาย สารต้านอนุมูลอิสระจะมีหน้าที่หลักคือช่วยยับยั้งปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น ไอออนโลหะ ความชื้น ความร้อน และแสง เป็นต้น โดยการชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันทำได้โดย

การกำจัดออกซิเจนและไอออนโลหะที่เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกจากระบบ โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระจะแบ่งได้เป็น 5 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

1. Primary antioxidant สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน
2. Oxygen scavenger สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก หรือวิตามินซี เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ทำให้ช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบได้
3. Secondary antioxidant สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ lipid hydroperoxide
4. Enzymic antioxidant สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งแบ่งเป็น primary antioxidant enzyme และ auxiliary antioxidant enzyme ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจนโดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)
5. Chelating agent หรือ sequestrant สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริก กรดอะมิโน เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็กและทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร

กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายรูปแบบ เช่น

1. Free radical scavenging สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระและทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้นโดยเมื่อสารต้านอนุมูลอิสระได้ให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนไปแล้วก็จะเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งมีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิม อาจจะไปรวมตัวกันกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียร หรือมีสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ มาให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนเพื่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียร โดยสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ เช่น Butylated hydroxyanisole (BHA), Vitamin E (alpha-tocopherol) เป็นต้น
2. Singlet oxygen quenching ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน singlet oxygen ให้ไปอยู่ในรูป triplet oxygen และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ เช่น carotenoids

3. Metal chelating เช่น โลหะไอออนและคอปเปอร์ไอออน มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ในร่างกายซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายประเภท เช่น peroxy radical, hydroxyl radical และ alkyl radical รวมถึง singlet oxygen ดังนั้น การที่มีสารไปจับกับโลหะหนัก เหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น

4. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibitor) สารประกอบ phenolics บางชนิด เช่น flavonoids, phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Lipooxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็น cofactor ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้

พืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของสุวดี โพธิ์วิจิตรและคณะ พบว่าสารสกัดหยาบของสะค้านและมะแขว่น ในเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือในเอทิลอะซิเตท ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่เพิ่มขึ้น และให้ผลที่ดีในตัวอย่างที่มีขั้วสูง บทสรุปคือสารสกัดหยาบจากลำต้นสะค้านสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมา คือสารสกัดหยาบจากก้านมะแขว่นและสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะแขว่นตามลำดับ⁽⁹⁾

จากงานวิจัยของอนนก หาลีและคณะ พบว่ามะตูมมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกประเภทแทนนิน เป็นหลักและกระเจี๊ยบมีสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงเช่นกัน โดยเฉพาะกลุ่ม แอนโท-ไซยานิน จึงทำให้กระเจี๊ยบและมะตูมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าสมุนไพรรชนิดอื่น จากการทดสอบพบว่ากระเจี๊ยบมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสมุนไพรรชนิดอื่น⁽¹⁰⁾

ฤทธิ์ของต้นสอ่งฟ้าและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Pongsakorn Jantakoon และคณะ พบว่าในเปลือกรากของต้นสอ่งฟ้า ประกอบไปด้วยสาร coumarins และ carbazole alkaloids ที่มีฤทธิ์เป็น antiplasmodial, antimicrobial, antifungal, antioxidant โดยเมื่อสกัดเปลือกรากของต้นสอ่งฟ้าด้วย methylene chloride จะได้ค่า IC₅₀ ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 88.3 mg/ml นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถออกฤทธิ์ antioxidant ได้อย่างน้อยจะต้องมีโครงสร้าง free 5-OH group บนโครงสร้างหลัก coumarin เช่น nordenatin(7), dentatin(6), และ xanthoxyletin(5)⁽¹¹⁾

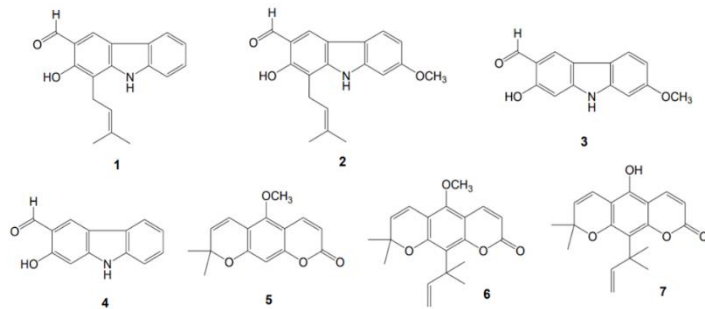


Figure 1 Isolated compounds from *Clausena harmandiana*

รูปภาพที่ 3 ตัวอย่างสารประกอบที่พบในงานวิจัยของ Pongsakorn Jantakoon และคณะ

อ้างอิงรูปจาก: https://www.aaspjournal.org/uploads/155/5952_pdf.pdf

จากงานวิจัยของ Tula thongthoom และคณะ พบว่า สารสกัดเฮกเซนของต้นสอ่งฟ้า พบว่ามีฤทธิ์ cytotoxic ที่สามารถต่อต้าน NCI-H187, MCF-7, KB และ vero cell lines นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในระดับปานกลาง คือมี IC_{50} อยู่ที่ 4.44 $\mu\text{g/mL}$ แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านวัณโรคและเชื้อรา ส่วนสารสกัดเอทิลแอสิตเททจะพบฤทธิ์ cytotoxic ที่สูงกว่าสารสกัดเฮกเซน และมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.86 $\mu\text{g/mL}$ และมีฤทธิ์ต้านวัณโรคที่ IC_{50} เท่ากับ 25.0 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹²⁾

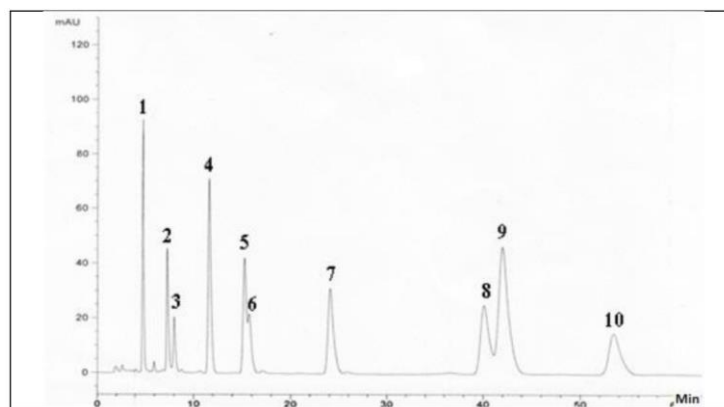
สารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชตระกูล Clausena

จากงานวิจัยของ Xiaoxiao Chang และคณะ ได้ทำการศึกษากลของระยะการพัฒนอายุของใบ *Clausena lansium* (Lour.) Skeels ต่อปริมาณของ phenolics และ flavonoids ที่ส่งผลต่อความสามารถของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ใบแก่ของพืช *Clausena lansium* (Lour.) Skeels มีปริมาณ quercetin และ ferulic acid ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่ม Phenolic compound ในปริมาณมาก และมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีค่ามากกว่าใบอ่อนของพืชแบบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽¹³⁾

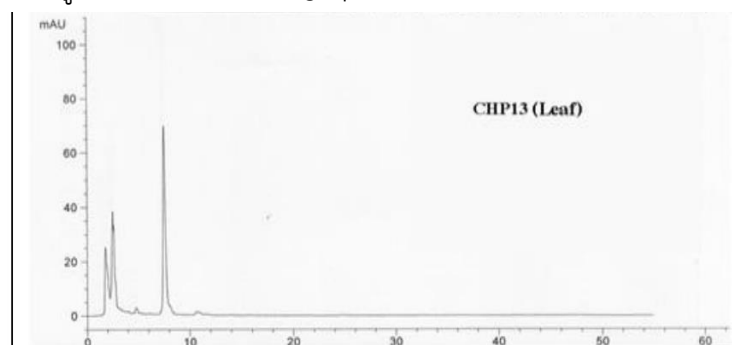
จากงานวิจัยของ Quan Li และคณะ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสำคัญในใบของ wampee (*Clausena lansium* (Lour.) Skeel) พบว่าสารออกฤทธิ์ 5 ชนิดนี้ vanillic acid, p-coumaric acid, rutin, ferulic acid และ 7-hydroxycoumarin มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant activities) ของพืช wampee อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽¹⁴⁾

จากงานวิจัยของ อนันต์ อธิพรชัย และคณะ พบว่าพืชวงศ์ส้มในสกุล *Clausena* มีองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ที่พบคือสารกลุ่มคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ (carbazole alkaloid) และคูมาริน (coumarins)⁽¹⁵⁾

จากงานวิจัยของ จินดา หวังบุญสกุล และคณะ ได้ทำการพิสูจน์สมุนไพรสกุล *Clausena* จากความแตกต่างของสารประกอบทางเคมีโดยใช้วิธี HPLC finger print โดยใช้ acetonitrile : methanol : 0.05% phosphoric acid ในน้ำ (35:20:45) เป็น mobile phase จะพบว่าสารสกัดบริสุทธิ์ที่ได้จากต้นสอ่งฟ้าที่ใช้เป็น biomarker คือ สารกลุ่ม carbazole alkaloids ได้แก่ clausine-k (1), lansine (2), 7-methoxymukonal (3), xanthoxyletin (4), 7-hydroxyhetaphylline (5), heptaphylline (8), 7-methoxyheptaphylline (9) และสารกลุ่ม coumarins ได้แก่ xanthoxyletin, nordentatin (7), osthol (6) และ dentatin (10) องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคือสารกลุ่ม carbazole alkaloids และกลุ่ม coumarins และยังพบว่าชนิดของสารสำคัญที่พบในรากและลำต้นไม่แตกต่างกัน แต่สารสำคัญในใบมีความแตกต่างอย่างมากกับสารในรากและลำต้น โดยพบว่าที่ retention time เท่ากับ 7 ผล HPLC chromatograms ที่ได้จากสารสกัดจากใบสอ่งฟ้า ดังรูปภาพที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับ HPLC fingerprint ของสาร biomarker ดังรูปภาพที่ 4 มีการแสดงที่ใกล้เคียงกัน⁽¹⁶⁾



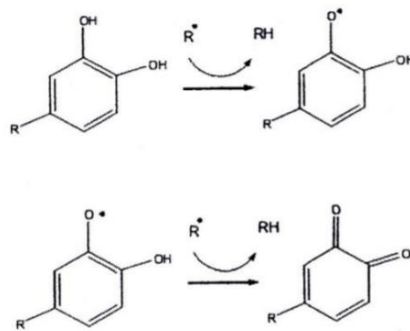
รูปภาพที่ 4 HPLC fingerprint ของสาร biomarker



รูปภาพที่ 5 ผล HPLC chromatograms ที่ได้จากสารสกัดจากใบสอ่งฟ้า

Phenolic compound และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

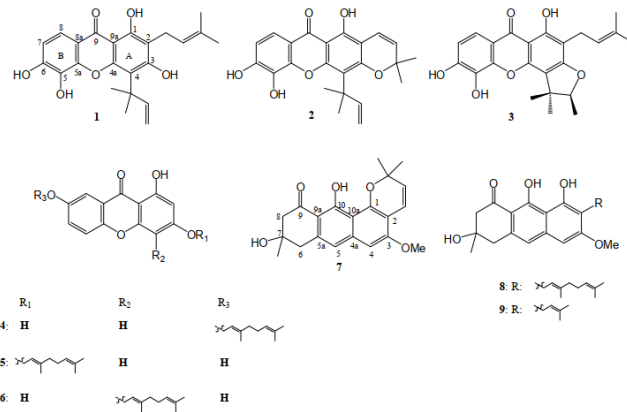
จากงานวิจัยของศิริรัตน์ พันธุ์เรือง พบว่าสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ส่วนใหญ่จะพบมากในผัก ผลไม้ ชา ซึ่งโครงสร้างหลักจะประกอบด้วย aromatic ring ที่แทนที่ด้วย hydroxyl group โดยมีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระ คือ เมื่อมีอนุมูลอิสระมาติดอิเล็กตรอนไปแต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้างส่งผลให้เกิดเป็นสารอนุมูลอิสระต่อไป⁽¹⁷⁾



รูปภาพที่ 6 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

จากงานวิจัยของณชนก เมธาอีครเดชาและคณะ พบว่า chlorogenic acid เป็นกรดฟีนอลิกที่พบในใบหม่อนและจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แสดงฤทธิ์ต้านเบาหวานและลดไขมันได้ดี โดย chlorogenic acid มีส่วนในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถึง 36.2% มากกว่า quercetin และ rutin⁽¹⁸⁾

จากงานวิจัยของ Surat laphookhieo, Wisanu Maneerat และ Sorwaporn Koysomboon กล่าวว่าการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกลำต้นของ *Cratoxylum maingayi* และ *Cratoxylum cochinchinense* ได้สารประกอบฟีนอลิก 9 ตัว คือ gerontoxanthone I, macluraxanthone, macluraxanthone, 7-geranyloxy-1,3-dihydroxyxanthone, cochinchinone G, fuscaxanthone E, vismione B, vismione F และ vismione E พบว่าสารทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย โดยจะมีกลไกไปต่อต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum* และบางตัวยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย⁽¹⁹⁾



รูปภาพที่ 7 สารประกอบที่เจอในงานวิจัยของ Surat laphookhieo, Wisanu Maneerat และ Sorwaporn Koysomboon

จากงานวิจัยของ Keerati Tanruean และคณะ ที่ศึกษาใบของพืชตระกูล *Rutaceae* ทั้ง 3 ชนิด คือ *Murraya koenigii* (L.) Spreng, *Clausena excavata* Burm.f. และ *Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin หรือชื่อภาษาไทยคือ หอมแขก, สมัดใหญ่ และ ส่องฟ้า ตามลำดับ พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบของพืชทั้งสามมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ, ใช้เป็นยาลดเบาหวานและลดความดันโลหิตได้ และยังพบว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ได้โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติของมนุษย์ เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก, ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงโดยพบมากที่สุดในการสกัดเมทานอลจากใบหอมแขก⁽²⁰⁾

จากงานวิจัยของ Ying Feng และคณะ ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืช *Lepidium meyenii* และสรุปได้ว่าสารประกอบกลุ่ม Alkaloids และ Phenols เป็นสารกลุ่มสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชมะค่าและมีแนวโน้มว่าสารกลุ่ม Alkaloids จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารกลุ่ม Phenols⁽²¹⁾

Chemometrics

Chemometric^{(22), (23)} คือ ศาสตร์ทางเคมีที่เป็นการผสมผสานศาสตร์ทางด้านสถิติ, คอมพิวเตอร์ และคณิตศาสตร์ เป็นการวิเคราะห์แบบ Multivariate analysis ที่สามารถใช้วิเคราะห์ข้อมูลที่มีจำนวนมากและซับซ้อนได้

การจัดกลุ่มของเทคนิคการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ chemometric แบ่งได้เป็น 5 กลุ่มเทคนิค ได้แก่ 1. วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อสำรวจข้อมูลเบื้องต้น (Data exploratory) 2. วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อการแบ่งกลุ่ม (Pattern recognition) 3. วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อติดตามกระบวนการผลิต (Process monitoring) 4. วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อเทียบข้อมูลที่มีหลายตัวแปร (Multivariate calibration) และ 5. วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อออกแบบการทดลอง (Design of experiments)

การวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Chemometrics นั้นเป็นการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ ถูกต้องและมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ข้อมูลสูง สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรได้แบบองค์รวม นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้ในการพัฒนางานวิจัยในระดับสูงได้ส่งผลให้เกิดประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง

โดยในงานวิจัยนี้ได้สนใจเทคนิค Partial least squares (PLS) ซึ่งเป็นเทคนิคประเภท multivariate calibration ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้น (x) และตัวแปรตาม (y) ของตัวอย่างที่ใช้สำหรับสร้างโมเดล (training sample) จากนั้นนำความสัมพันธ์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการทำนาย

จากงานวิจัยของ อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ และคณะ ได้มีการพัฒนาการประเมินคุณภาพและอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปพร้อมบริโภคด้วยวิธีแบบรวดเร็วโดยใช้ NIR spectroscopy ร่วมกับ chemometrics แบบ Partial least square regression (PLSR) เนื่องจากข้อมูลที่ได้จาก Near infrared spectroscopy มีความซับซ้อน จึงมีการเลือกใช้การวิเคราะห์ข้อมูลแบบ chemometric เข้ามาช่วยวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งพบว่าสามารถใช้ในการทำนายการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์และยังมีความถูกต้องสูง⁽²⁴⁾

จากงานวิจัยของ อาริรัตน์ อิมศิลป์ และคณะ ได้ทำการประยุกต์ใช้เทคนิค Spectrophotometry Infrared (FT - NIR spectroscopy) ร่วมกับ chemometrics มาสร้างสมการสำหรับทำนายการจำแนกกลุ่มข้าวหอมมะลิออกจากกลุ่มข้าวปริมาณอะมิโลสต่ำ ปานกลาง และสูง พบว่าเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ไม่ทำลายตัวอย่าง รวดเร็ว และลดการใช้สารเคมี ช่วยให้การจำแนกข้าวที่มีรูปร่างแตกต่างกันแม่นยำได้ถึง 90%⁽²⁵⁾

เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dry)^{(26), (27)}

การอบแห้งแบบพ่นฝอย คือกระบวนการที่ใช้ในการอบแห้งผลิตภัณฑ์อาหารเหลวที่มีความชื้นสูง โดยการพ่นกระจายอาหารเหลวเป็นฝอยลงไปในถังอบแห้งที่ภายในมีกระแสลมร้อน จะทำให้ความร้อนระเหยน้ำในอาหารเหลวออกจนหมดได้เป็นอาหารแบบผงแห้ง ซึ่งข้อดีของการอบแห้งวิธีนี้คือ วงรอบการอบแห้งจะรวดเร็วภายในเวลา 3 ถึง 10 วินาที และไม่ทำให้อาหารเกิดความเสียหาย โดยมักนิยมใช้ในการกับการผลิตอาหารที่เป็นลักษณะผง

กระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย ประกอบด้วย 4 กระบวนการ คือ

1. กระบวนการพ่นเป็นฝอยของผลิตภัณฑ์ (Atomization)
2. การรวมกันของอากาศและกระแสนุภาค (Mixing And Flow)
3. การระเหยน้ำออกไป (Moisture / Volatiles Evaporation)
4. การแยกผลิตภัณฑ์ที่แห้งออกจากอากาศ (Separation)

องค์ประกอบของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย⁽²⁸⁾ คือ

1. ตัวทำละออง (atomizer) มีหน้าที่ทำให้อาหารเหลวแตกตัวเป็นละอองฝอยเพิ่มพื้นที่สัมผัสกับความร้อนให้มากขึ้น เป็นตัวควบคุมอัตราการไหลไปยังห้องอบแห้ง และกำหนดขนาด

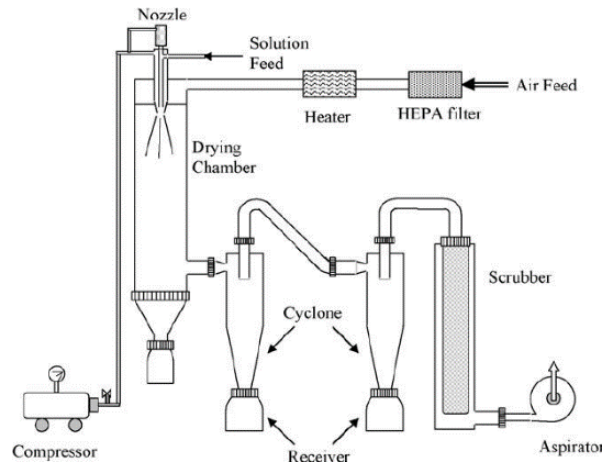
ของอนุภาคตลอดจนคุณภาพต่าง ๆ ของอาหารผงตัวทำละอองที่นิยมใช้ ได้แก่

1.1 หัวฉีดแรงดันสูง (pressure nozzles หรือ nozzle atomizer) ซึ่งตัวทำละอองประเภทนี้จะใช้แรงดันสูงดันให้อาหารเหลวไหลผ่านรูเปิดขนาดเล็ก (orifice) ขนาดของอนุภาคจะแปรผันโดยตรงกับ อัตราการไหลและความหนืดของของเหลว และเมื่อเพิ่มแรงดันขนาดของอนุภาคจะเล็กลง อาหารเหลวจะไหลกระทบกับก๊าซหรืออากาศที่เคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูง ทำให้อาหารเหลวแตกเป็นละอองฝอยได้ขนาดอนุภาคที่มีขนาดเล็กมาก สามารถใช้ได้กับอาหารที่มีความหนืดสูง

1.2 ตัวทำละอองแบบจานเหวี่ยง (centrifugal atomizer หรือ rotary atomizer)

โดยตัวทำละลาย ละอองจะมีลักษณะเป็นจาน (disk, wheel) โดยอาหารเหลวจะไหลลงบริเวณใกล้กับจุดศูนย์กลางของจานที่หมุนด้วยความเร็วรอบสูงมากถูกเหวี่ยงด้วยแรงหนีศูนย์กลาง (centrifugal force) ให้ของเหลวกระจายออกด้านข้างของจานเป็นละอองเล็ก ๆ ใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีความหนืดสูงไม่เป็นเนื้อเดียว ซึ่งอาจมีปัญหาเกิดการอุดตันหัวฉีด อุปกรณ์แยกอนุภาคผงออกจากอากาศ เช่น ไซโคลน (cyclone), ถุงกรอง (bag filter)

2. ห้องทำแห้ง (drying chamber) เป็นบริเวณที่เกิดการทำแห้งอาหารโดยอากาศร้อนแห้ง ซึ่งเป็นอากาศที่ถูกดูดผ่านระบบกรองและทำให้ร้อนจะปะทะกับอาหารเหลวบริเวณนี้เกิดการระเหยของน้ำจากหยดอาหารเหลว การสัมผัสระหว่างอากาศร้อนและอาหารเหลวอาจเป็นได้หลายทิศทางอากาศ อาหารเหลวและลมร้อนป้อนเข้าไปในทิศทางเดียวกัน อุณหภูมิลมร้อนจะลดลงระหว่างการทำแห้งเหมาะสำหรับอาหารที่ไวต่อความร้อน



รูปภาพที่ 8 โครงสร้างส่วนประกอบของเครื่อง Spray dry

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

พืช

1. ใบส่องฟ้า (*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin)
ได้มาจากห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา

วัสดุอุปกรณ์

1. Beaker 25, 50, 100, 250, 600 ml
2. Cylinder 10, 500 ml
3. Volumetric flask 10, 25 ml
4. Hot plate
5. แร้ง เบอร์ 60
6. Funnel
7. Stirring rod
8. Stand
9. Clamp
10. Quartz cuvette
11. กระดาษกรอง
12. Micropipette
13. Microplate
14. เครื่อง Microplate reader
15. เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer
16. โปรแกรม Unscrambler X

สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. Gallic acid
3. Sodium carbonate
4. Folin - Ciocalteu reagent
5. 2,2 - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl (DPPH)

6. 2,2' - azino - bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)
7. Ascorbic acid
8. Methanol

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. ศึกษาค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตลอดจนงานศึกษาที่เกี่ยวข้องกับต้นสอ่งฟ้า, วิธีการหาปริมาณ total phenolic content, วิธีการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ และวิธีการเตรียมชาขงรูปแบบผงแห้งด้วย Spray dry
2. เตรียมสารสกัดจากใบสอ่งฟ้า โดยวิธีการนำใบสอ่งฟ้าน้ำหนัก 2 กรัม ไปต้มในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 5, 10, 20 นาที เพื่อหาระยะเวลาและน้ำหนักใบสอ่งฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการสกัดจากใบสอ่งฟ้าออกมา
3. การหาสัมพันธระหว่างสเปคตรัมของความเข้มข้นของผงใบสอ่งฟ้า, total phenolic content และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
 - 3.1 เตรียมสารสกัดจากผงใบสอ่งฟ้า 6 ความเข้มข้น โดยใช้ผงใบสอ่งฟ้า 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส แล้วต้มเป็นระยะเวลา 5 นาที และทำการวัดค่าการดูดกลืนของสารละลาย ABTS และ DPPH ทุกครั้งก่อนนำไปใช้ในการทดสอบ
 - 3.2 นำแต่ละความเข้มข้นมาทำการทดสอบ โดยจะทำซ้ำความเข้มข้นละ 10 จุด

โดยการศึกษาเชิงปริมาณ total phenolic content, การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH โดยวัดค่าออกมาในรูป %inhibitor และ ทำการศึกษา UV-Spectrum

 - 3.2.1 Total phenolic content (TPC)

เตรียมสารมาตรฐาน gallic acid โดยนำ gallic acid ผสมในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น stock solution จากนั้น dilute ให้ได้ 6 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 และ 0.00625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสาร FCR โดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent dilute กับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 แล้วปิเปตสารสกัดใบสอ่งฟ้ามา 25 ไมโครลิตร มา dilute ด้วยน้ำกลั่น 75 ไมโครลิตร แล้วเติมด้วยสาร FCR 25 ไมโครลิตร ใน 96-well plate และปิเปตสารมาตรฐาน gallic acid ทั้ง 6 ความเข้มข้นมา 25 ไมโครลิตร แล้วเติมด้วยสาร FCR 25 ไมโครลิตร ใน 96-well plate จากนั้นนำไปบ่มในที่มืด 6 นาที แล้วนำไปผสมกับ 7.5% (w/v) Na_2CO_3 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm โดยใช้เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบสอ่งฟ้าโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน gallic acid และรายงานผลในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม (mg GAE/g dry sample)

3.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH โดยชั่งผง DPPH 1.97 มิลลิกรัม แล้วนำไปละลายใน methanol 50 มิลลิตร จากนั้นปิเปตสารสกัดไปส่องฟ้า 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate แล้วเติมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer จากนั้นคำนวณค่า % inhibition ดังสมการ

$$\text{Inhibition (\%)} = [A_0 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100 \text{ โดยที่}$$

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของ methanol ผสมกับ DPPH

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

A_2 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับ methanol

แล้วนำค่า %inhibitor ที่ได้ไปในการสร้างโมเดล chemometrics

3.2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

เตรียมสารละลาย 14 mM ABTS stock solution โดยใช้ ABTS 72.04 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิตร และเตรียมสารละลาย 4.9 mM potassium persulfate โดยใช้ Potassium persulfate 13.25 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิตร จากนั้นนำสารละลาย ABTS stock solution ผสมกับสารละลาย potassium persulfate อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 10 มิลลิตร บ่มในที่มืด 16 ชั่วโมง เมื่อทำการทดสอบให้นำสารละลาย ABTS มาเจือจางด้วย methanol ในอัตราส่วน 1:10 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.7-0.8 ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer จากนั้นปิเปตสารสกัดจากใบส่องฟ้า 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS 100 ไมโครลิตร ใน 96-well plate บ่มในที่มืด 6 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer แล้วนำไปผลที่ได้คำนวณค่า % inhibition ดังสมการ

$$\text{Inhibition (\%)} = [A_0 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100 \text{ โดยที่}$$

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของ methanol ผสมกับ DPPH

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

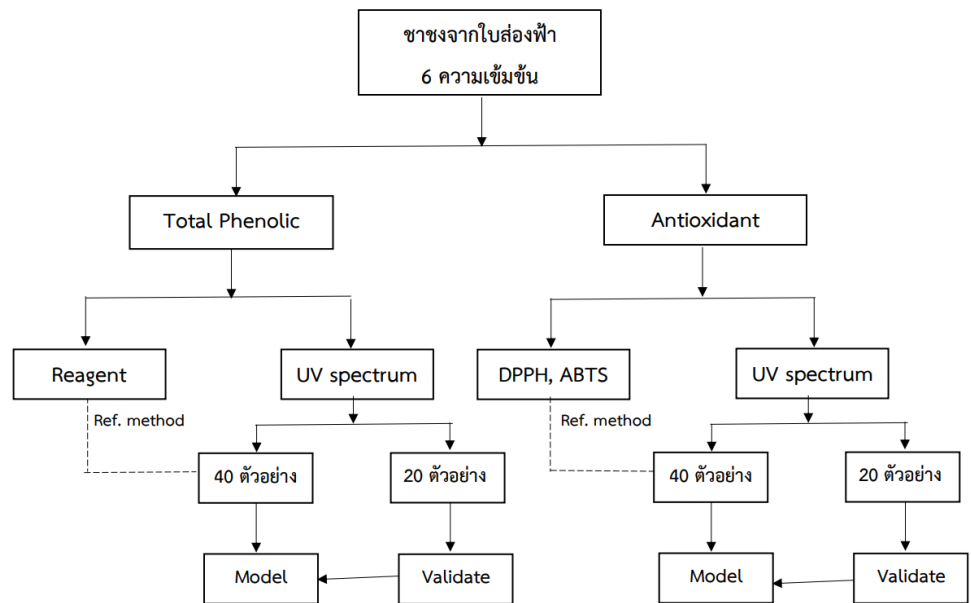
A_2 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับ methanol

แล้วนำค่า %inhibitor ที่ได้ไปในการสร้างโมเดล chemometrics

3.2.4 การวิเคราะห์สเปกตรัมของสารสกัดชาชงส่่งฟ้าด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

นำสารสกัดใบส่่งฟ้าที่ได้จากข้อ 3.1 ทั้ง 6 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.2 - 0.8

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic content และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาชงจากใบส่่งฟ้าโดยใช้ chemometrics
 - 4.1 การสุ่มตัวอย่างและวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic content และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากวิธีมาตรฐาน
 - 4.1.1 สุ่มตัวอย่างจากน้ำชาจากใบส่่งฟ้าจำนวน 60 ตัวอย่าง
 - 4.1.2 นำตัวอย่างที่สุ่มได้วิเคราะห์ปริมาณ total phenolic content, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS จากวิธีมาตรฐาน
 - 4.1.3 บันทึก UV spectrum ของทุกตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 220-700 นาโนเมตร
 - 4.2 การสร้าง calibration model
 - 4.2.1 สุ่มตัวอย่างจำนวน 40 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็น calibration set ในการสร้างโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ total phenolic content หรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากวิธีมาตรฐานและ UV spectrum ของชาชงจากใบส่่งฟ้า
 - 4.2.2 pretreatment data ด้วยวิธี SNV, first derivative, และ second derivative แล้วนำไปสร้าง calibration model เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูล original data ที่ไม่มีการ pretreatment data
 - 4.2.3 เลือกโมเดลที่ดีที่สุด โดยพิจารณาจากค่า R^2 ของโมเดลที่มีค่าเข้าใกล้ 1 มากที่สุด
 - 4.3 การหาปริมาณ total phenolic content และ antioxidant ในผงใบส่่งฟ้า
 - 4.3.1 นำตัวอย่างที่เหลือจำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อนำมาใช้เป็น validation set
 - 4.3.2 นำ UV spectrum ของสารตัวอย่างกลุ่ม validation set มาวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้โมเดลมาตรฐานที่ดีที่สุด
 - 4.3.3 เปรียบเทียบค่าที่ได้กับผลจากวิธีมาตรฐาน



รูปภาพที่ 9 แผนผังแสดงการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณ total phenolic content โดยใช้ chemometrics

4.4 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ตามแนวทางของ ASEAN Analytical Validation Guideline ที่รับมาจาก AOAC Guideline

4.4.1 การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) พิจารณาจากความเป็นเส้นตรง (correlation coefficient, r) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับค่าจากวิธีมาตรฐาน โดยควรมีค่า r เข้าใกล้ 1.0

4.4.2 การทดสอบความแม่นยำ (Precision) พิจารณาจากค่า %RSD และควรมีค่าไม่เกิน 2%

4.4.3 การทดสอบความเที่ยงตรง (Accuracy) โดยต้องมีค่าการได้กลับคืน (Recovery values) ระหว่าง 95 – 105 %

4.4.4 Root mean squared error of prediction (RMSEP) เป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของการจำลองโมเดลที่เป็น multivariate analysis สามารถคำนวณได้จาก

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (\hat{y}_i - y_{i,\text{ref}})^2}$$

เมื่อ N = จำนวนตัวอย่างของ validation set

$\hat{y}_i$ = ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากโมเดล

$y_{i,\text{ref}}$ = ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากวิธี reference

5. การเตรียมตำรับชาชงรูปแบบผงแห้งโดยวิธี Spray dry

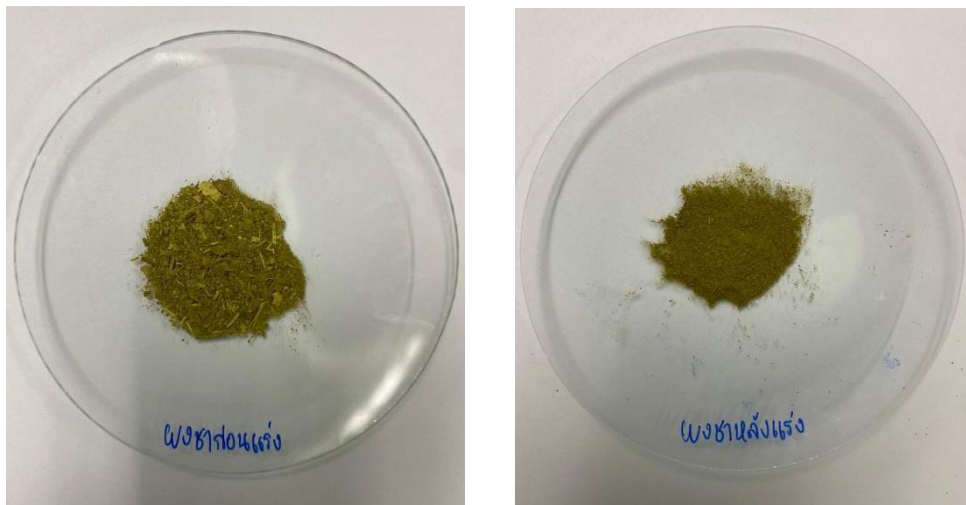
สกัดสารจากใบส่่งฟ้าโดยต้มผงใบส่่งฟ้า 2 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ต้มเป็นระยะเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมสารตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง ดังนี้ น้ำตาลแลคโตส 5% ในน้ำ 250 มิลลิลิตร, น้ำตาลแมนนิทอล 5% ในน้ำ 250 มิลลิลิตร, น้ำตาลแลคโตส 5% ในสารสกัดใบส่่งฟ้า 250 มิลลิลิตรและน้ำตาลแมนนิทอล 5% ในสารสกัดใบส่่งฟ้า 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผ่านเครื่อง Spray dry เพื่อเตรียมเป็นชาชงแบบผงแห้ง

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. ลักษณะของผงใบสอ่งฟ้า

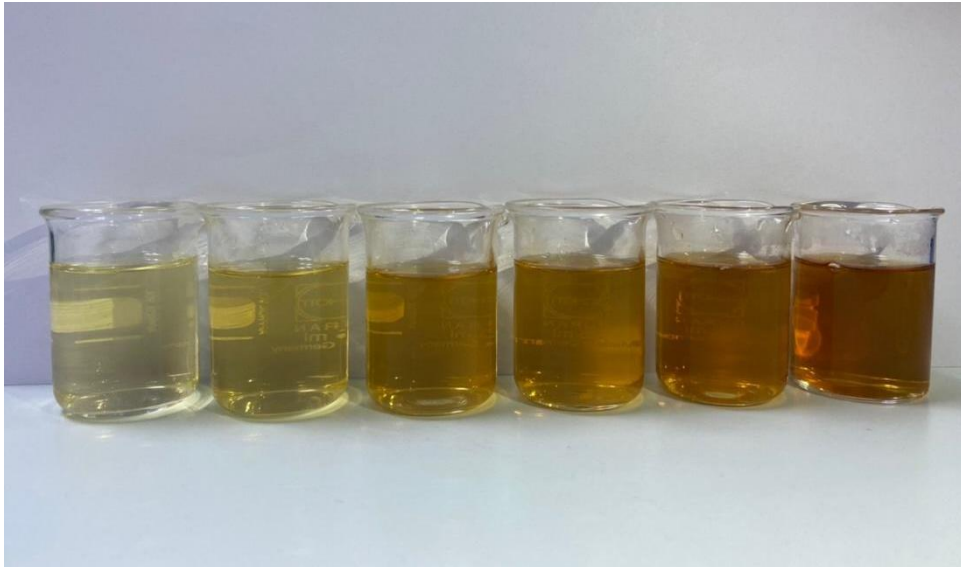
เมื่อทำการร่งผงใบสอ่งฟ้าผ่านร่งเบอร์ 60 แล้วนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะผงใบสอ่งฟ้า จะได้ผลดังแสดงในรูปภาพที่ 10



รูปภาพที่ 10 เปรียบเทียบผงใบสอ่งฟ้าก่อนและหลังการร่งด้วยร่งเบอร์ 60

จากรูปภาพที่ 10 แสดงให้เห็นว่าผงใบสอ่งฟ้าที่ยังไม่ผ่านการร่งจะเป็นผงชาสีเขียวเข้ม โดยมีชิ้นส่วนของใบสอ่งฟ้าขนาดใหญ่ปะปนเข้ามาด้วย แต่เมื่อผ่านการร่งด้วยร่งเบอร์ 60 แล้วผงใบสอ่งฟ้าที่ได้ยังมีสีเขียวเข้มเช่นเดิม แต่มีขนาดของผงชาที่เล็กละเอียดมากยิ่งขึ้น

เมื่อได้ผงใบสอ่งฟ้าข้างต้นนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง โดยมีทั้งหมด 6 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม และนำไปต้มด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปกรองจะได้เป็นสารสกัดจากใบสอ่งฟ้าโดยมีสีที่แตกต่างกันดังรูปภาพที่ 11

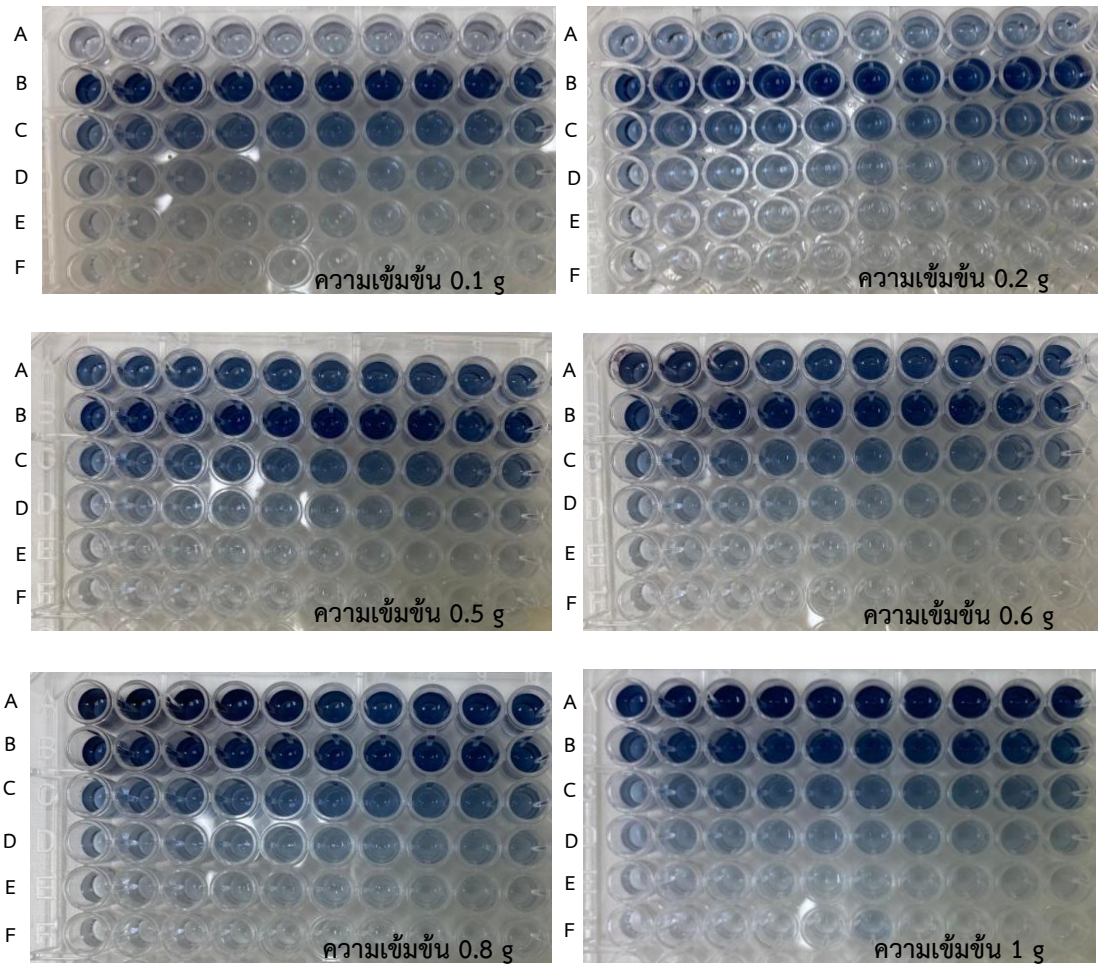


รูปภาพที่ 11 เปรียบเทียบน้ำชาจากใบส่่งฟ้าที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม (จากซ้ายไปขวา)

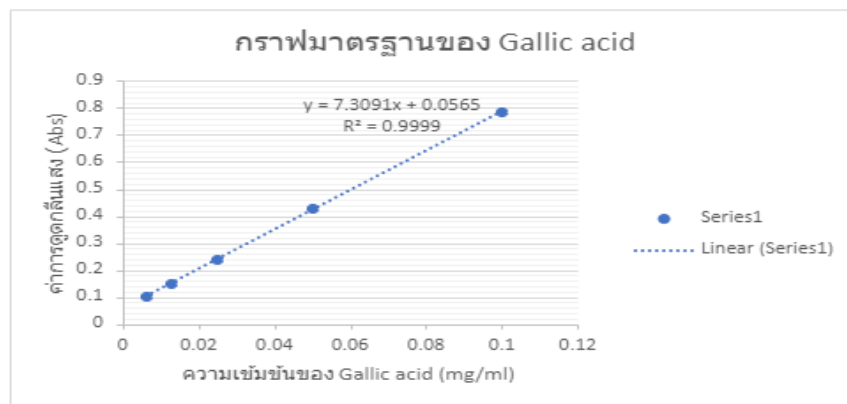
2. การวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content

จากการทดสอบวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content โดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 และ 0.00625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปทดสอบจะพบการเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดและสารมาตรฐานดังรูปภาพที่ 12 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ($y=7.3091x+0.0565$, $R^2=0.9999$) ดังรูปภาพที่ 13 พบว่าสารสกัดใบส่่งฟ้าแต่ละความเข้มข้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารตัวอย่าง ดังตารางที่ 1



รูปภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent
 หลังทำปฏิกิริยากับสารสกัดใบสอ่งฟ้าความเข้มข้นต่าง ๆ
 หมายถึง A คือ สารสกัดใบสอ่งฟ้า, B-F คือ Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปภาพที่ 13 กราฟมาตรฐาน Gallic acid
 ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ Gallic acid

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณ total phenolic content ของสารสกัดใบส่่องฟ้า

ความเข้มข้นของสารสกัดใบส่่องฟ้า	ครั้งที่	Total phenolic (mg GAE/g dry sample)	ค่าเฉลี่ย
0.1 g/250ml	1	58.07	50.20
	2	54.05	
	3	49.36	
	4	47.02	
	5	47.36	
	6	50.37	
	7	49.70	
	8	47.02	
	9	47.02	
	10	52.04	
0.2 g/250ml	1	38.33	39.81
	2	41.21	
	3	41.55	
	4	39.86	
	5	39.86	
	6	37.32	
	7	40.20	
	8	41.38	
	9	41.04	
	10	37.32	
0.5 g/250ml	1	34.90	35.88
	2	34.50	
	3	36.20	
	4	37.49	
	5	37.62	
	6	35.65	
	7	37.08	

	8	34.70	
	9	36.06	
	10	34.63	
0.6 g/250ml	1	33.72	35.51
	2	34.74	
	3	35.02	
	4	33.43	
	5	35.19	
	6	38.32	
	7	36.16	
	8	37.58	
	9	34.97	
	10	35.99	
0.8 g/250ml	1	32.82	32.53
	2	34.27	
	3	35.76	
	4	34.82	
	5	33.84	
	6	30.38	
	7	28.93	
	8	29.91	
	9	31.88	
	10	32.73	
1 g/250ml	1	29.97	32.30
	2	30.99	
	3	34.40	
	4	32.39	
	5	32.15	
	6	31.02	
	7	32.15	

8	34.06
9	32.32
10	33.55

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากใบสอ่งฟ้าด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric นิยมใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยมีหลักการคือสารประกอบฟีนอลิกรวมจะทำปฏิกิริยาร่วมกับ Folin-Ciocalteu reagent สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์ด้วย hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Tungsten และ molybdenum ซึ่งให้สีน้ำเงินที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ ดังเช่นงานวิจัยของ สมฤทัยพาที และคณะ⁽²⁹⁾ ที่ทำการศึกษางค์ประกอบทางเคมีของเหง้าเนระพูสีไทย ได้กล่าวว่าการหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่มีหลักการคือสารประกอบฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยากับ Folin-ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วยสาร Phosphomolybdic-phosphor tungstic acid โดยสารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์ด้วย phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกรวมเกิดเป็น Tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงิน

เมื่อนำสารสกัดจากใบสอ่งฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นได้แก่ 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content สารประกอบ phenolic ที่อยู่ในสารสกัดจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent แล้วได้เป็นสีน้ำเงิน ดังแสดงในรูปภาพที่ 12 ในแถว A คือสารสกัดจากใบสอ่งฟ้า จะเห็นได้ว่าสามารถเปลี่ยนสีของสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ สารมาตรฐานคือ Gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 และ 0.00625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในแถว B, C, D, E และ F ตามลำดับ โดยจะสังเกตได้ว่า เมื่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มมากขึ้น พบว่าสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent จะสามารถกลายเป็นสีน้ำเงินได้ตมมากยิ่งขึ้น จากนั้นเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ($y=7.3091x+0.0565$, $R^2=0.9999$) ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรด gallic ต่อกรัมของสารตัวอย่าง พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณฟีนอลิกรวมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ดังนี้ 50.20, 39.8, 35.88, 35.51, 32.53 และ 32.30 mg GAE/g dry sample ตามลำดับ เมื่อพิจารณาร่วมกันระหว่าง การเปลี่ยนแปลงของสีกับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบสอ่งฟ้า และผลจากการคำนวณ พบว่าผลที่ได้ไม่สอดคล้องกันคือยิ่งน้ำหนักร้อยละที่ใช้สกัดเพิ่มขึ้น ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารตัวอย่างลดลง ดังนั้นสีที่

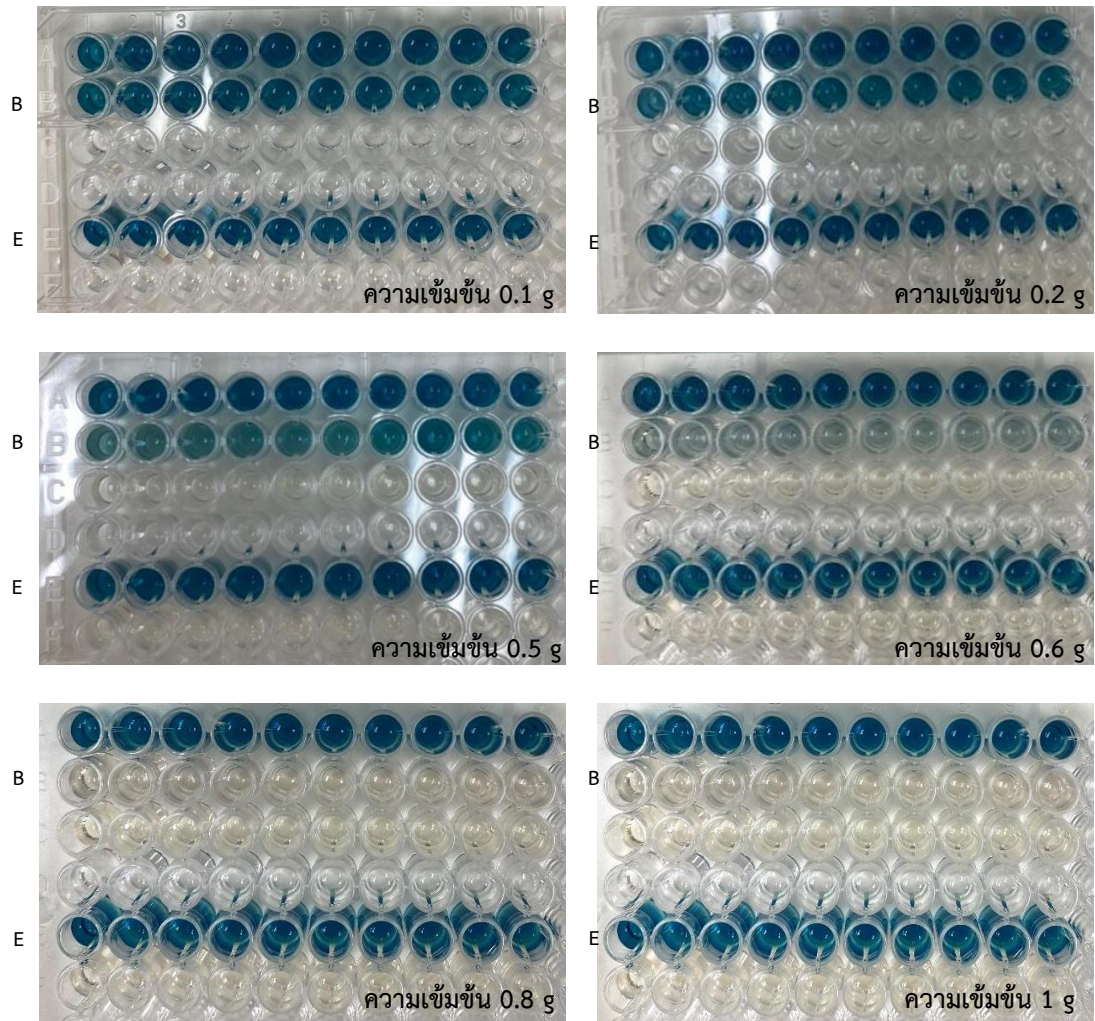
เปลี่ยนไปของการทดสอบอาจเกิดจากการที่ในสารสกัดมีสารประกอบอื่นที่มีหมู่ hydroxy group ในโมเลกุลที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ได้ และสีของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นอาจมีผลทำให้สีของ reagent หลังการทดสอบมีสีเข้มเพิ่มขึ้นได้เช่นกัน

จากผลการทดลองวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH พบว่ายิ่งปริมาณตัวอย่างใบส่่งฟ้าที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น จะพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากขึ้นด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณาร่วมกับปริมาณสารประกอบ phenolics ที่วิเคราะห์ได้ไม่เกินไปในทิศทางเดียวกัน ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวอาจเนื่องมาจากในสารสกัดใบส่่งฟ้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีสารอื่นที่ไม่ใช่สารประกอบ phenolics เพียงอย่างเดียวที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ ยกตัวอย่างเช่น สารประกอบ flavonoids ซึ่งก็มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้เช่นกัน ดังเช่นการศึกษาของ Shaymaa Fadhel Abbas Albaayit และคณะ⁽³⁰⁾ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษของสารสกัดส่วนใบของพืช *Clausena excavata* พบว่าสารสกัดส่วนใบที่ได้จากการใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย มีสารกลุ่มฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในปริมาณมาก ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ, ต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็งได้ นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่ม quercetin glycoside ที่มีความสามารถในการต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า Lawal และคณะ⁽³¹⁾ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืช *Clausena anisata* พบว่าเมื่อทำการสกัดใบของพืช *Clausena anisata* ด้วยน้ำจะสามารถสกัดสารสำคัญ ได้แก่ สารในกลุ่ม alkaloids, phenolic และ flavonoids ซึ่งสารเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืช *Clausena anisata*

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

จากการทดสอบการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าเมื่อทำการหดยดสารละลาย ABTS เพื่อทำการทดสอบหาสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบส่่งฟ้า พบว่าจากสารละลาย ABTS สีน้ำเงินเขียวจะเปลี่ยนเป็นไม่มีสี โดยจะเห็นได้ว่าที่สารสกัดใบส่่งฟ้าความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 กรัม สีของสารละลาย ABTS จะมีการเปลี่ยนแปลงสีน้อยมาก ส่วนที่สารสกัดส่่งฟ้าความเข้มข้น 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลาย ABTS ได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปภาพที่ 14 ซึ่งสอดคล้องกับค่า %inhibition เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ดังตารางที่ 2



รูปภาพที่ 14 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ABTS เมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดใบ
 ส่องฟ้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ B คือ สารสกัดใบส่องฟ้า, E คือ Blank

ตารางที่ 2 แสดงค่า %inhibition และค่าเฉลี่ยของสารสกัดใบส่องฟ้าเมื่อทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

ความเข้มข้นของสารสกัดใบส่องฟ้า	ครั้งที่	%inhibition	ค่าเฉลี่ย
0.1 g/250 ml	1	44.48	39.32
	2	39.89	
	3	38.58	
	4	40.38	
	5	40.24	
	6	35.79	
	7	36.67	
	8	40.51	
	9	42.19	
	10	34.52	
0.2 g/250 ml	1	60.96	58.16
	2	56.40	
	3	60.84	
	4	60.21	
	5	56.83	
	6	67.83	
	7	54.30	
	8	53.84	
	9	50.92	
	10	59.42	
0.5 g/250 ml	1	88.37	84.30
	2	88.38	
	3	87.61	
	4	86.58	
	5	87.64	
	6	87.00	
	7	81.43	

	8	81.81	
	9	75.25	
	10	78.97	
0.6 g/250 ml	1	90.04	89.60
	2	89.85	
	3	89.65	
	4	88.42	
	5	89.88	
	6	89.73	
	7	91.01	
	8	90.63	
	9	89.68	
	10	87.11	
0.8 g/250 ml	1	93.99	92.73
	2	90.83	
	3	90.16	
	4	94.44	
	5	92.74	
	6	94.79	
	7	90.57	
	8	95.35	
	9	90.32	
	10	94.13	
1 g/250 ml	1	98.32	98.50
	2	98.27	
	3	96.98	
	4	98.30	
	5	98.66	
	6	99.10	
	7	98.51	

8	98.49
9	99.10
10	99.23

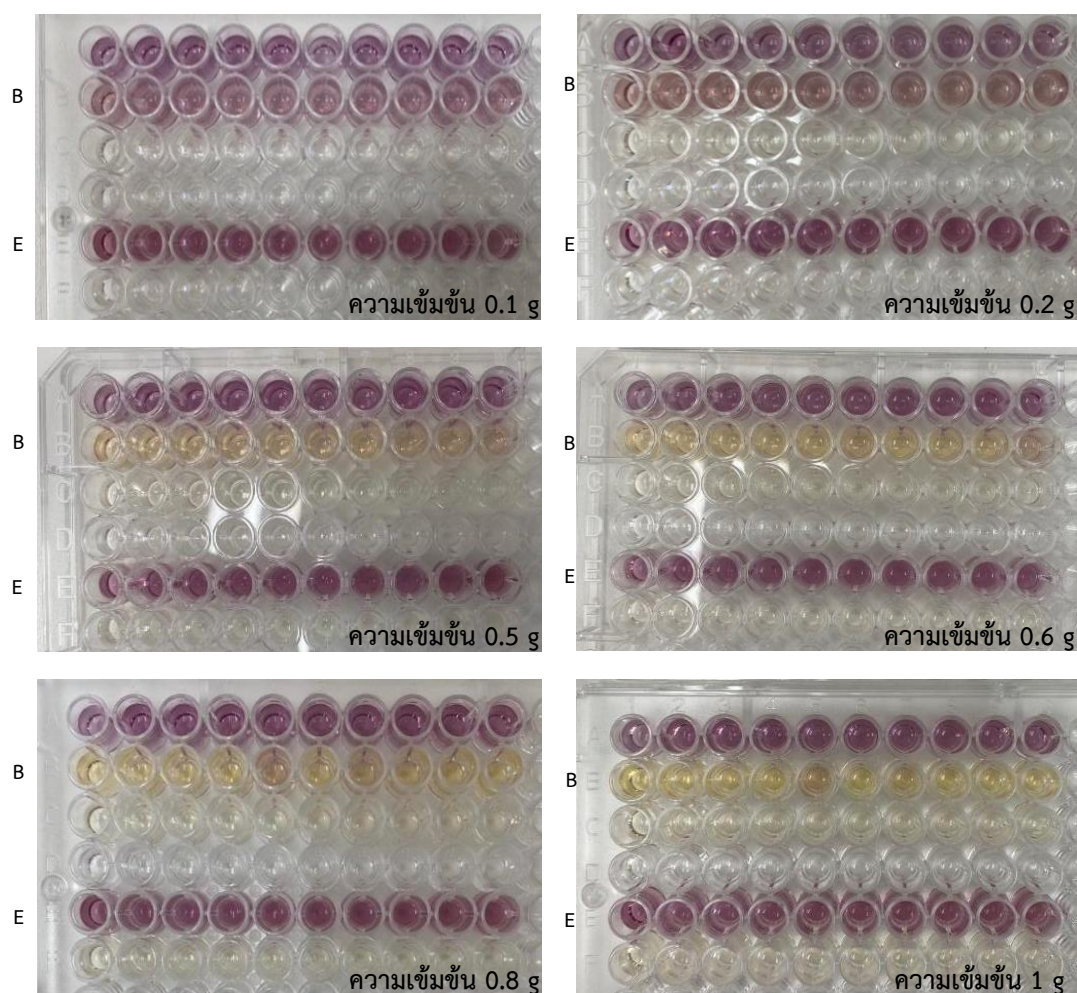
อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free Radical Scavenging Activity) ด้วยวิธี ABTS ซึ่งเป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) โดยในกระบวนการทดสอบจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ที่มีสีน้ำเงินเขียวกับสารตัวอย่าง เกิดเป็นสาร ABTS (สีเขียวจางลง) ซึ่งหากสารตัวอย่างมีความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาก หลังจากเกิดปฏิกิริยาจะได้สีสารละลาย ABTS ที่จางลงมากขึ้น

เมื่อนำสารสกัดจากใบส่อกฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าสามารถเปลี่ยนสีของสารละลาย ABTS จากสีน้ำเงินเขียวเป็นสีใสได้ ดังรูปภาพที่ 14 ในแถว B เมื่อเปรียบเทียบกับ Blank (methanol) ในแถว E ที่ยังคงมีสีน้ำเงินเขียว โดยเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดใบส่อกฟ้าเพิ่มมากขึ้น พบว่าสารละลาย ABTS จะสามารถเปลี่ยนสีกลายเป็นสีใสได้ดีมากยิ่งขึ้น จากนั้นเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณค่า %inhibition พบว่าจะมีค่าเฉลี่ย %inhibition ของความเข้มข้นใบส่อกฟ้า 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม เท่ากับ 39.32, 58.16, 84.30, 89.60, 92.73 และ 98.50% ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้มีความ สอดคล้องกันกับการเปลี่ยนแปลงสีสารละลาย ABTS โดยสารสกัดใบส่อกฟ้าที่มีความเข้มข้นสูง จะมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูง โดยแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงสีที่ลดลงของสารละลาย ABTS นั้นเอง ดังนั้นจากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบส่อกฟ้าความเข้มข้นสูง จะมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูงเช่นกัน

3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการทดสอบการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าเมื่อทำการหยดสารละลาย DPPH เพื่อทำการทดสอบหาสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดส่องฟ้า พบว่าจากสารละลาย DPPH ที่มีสีม่วงจะได้สารละลายที่มีสีใส ดังแสดงในรูปภาพที่ 15 ซึ่งพบว่าสารสกัดใบส่องฟ้าที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 กรัมจะเห็นได้ว่าการฟอกสีได้น้อย แต่สารสกัดใบส่องฟ้าที่ความเข้มข้น 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัมมีการฟอกสีของ DPPH ได้อย่างชัดเจน ซึ่งผลของการฟอกสีนี้จะสอดคล้องกับค่า %inhibition ที่ได้จากการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ดังตารางที่ 3



รูปภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH เมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดใบส่องฟ้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ B คือ สารสกัดใบส่องฟ้า, E คือ Blank

ตารางที่ 3 แสดงค่า %inhibition และค่าเฉลี่ยของสารสกัดใบสอ่งฟ้าเมื่อทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ความเข้มข้นของสารสกัดใบ สอ่งฟ้า	ครั้งที่	% inhibition	ค่าเฉลี่ย
0.1 g/ 250 ml	1	45.52	43.32
	2	41.30	
	3	44.40	
	4	48.49	
	5	48.82	
	6	47.25	
	7	46.65	
	8	47.28	
	9	48.15	
	10	42.08	
0.2 g/ 250 ml	1	47.89	52.47
	2	48.85	
	3	51.33	
	4	51.00	
	5	51.12	
	6	55.05	
	7	54.78	
	8	58.08	
	9	53.21	
	10	52.83	
0.5 g / 250 ml	1	92.51	91.83
	2	92.83	
	3	93.00	
	4	91.82	
	5	93.31	
	6	90.92	

	7	92.50	
	8	91.68	
	9	88.81	
	10	90.92	
0.6 g/ 250 ml	1	90.67	91.96
	2	92.23	
	3	91.05	
	4	92.35	
	5	93.23	
	6	90.34	
	7	92.56	
	8	91.68	
	9	90.91	
	10	92.02	
0.8 g/ 250 ml	1	93.31	92.75
	2	90.25	
	3	91.85	
	4	91.67	
	5	90.78	
	6	97.51	
	7	92.94	
	8	92.48	
	9	94.08	
	10	92.63	
1 g/ 250 ml	1	93.14	94.30
	2	100.00	
	3	95.98	
	4	90.66	
	5	93.44	
	6	91.68	

	7	92.11	
	8	97.86	
	9	92.76	
	10	95.41	

อภิปรายผลการทดลอง

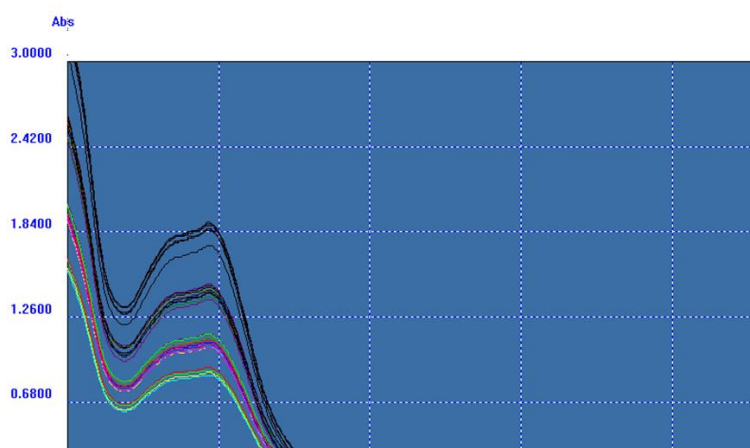
การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ซึ่ง DPPH เป็นอนุมูลอิสระไนโตรเจนที่เสถียรและมีสีม่วง แต่เมื่อสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระ DPPH จะทำให้อนุมูลอิสระดังกล่าวเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

เมื่อนำสารสกัดจากใบส่องฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัมในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสามารถเปลี่ยนสีของสารละลาย DPPH จากสีม่วงเป็นสีเหลืองได้ ดังรูปภาพที่ 15 ในแถว B ที่ความเข้มข้นของสารสกัดต่าง ๆ ที่สามารถเปลี่ยนสีของสารละลาย DPPH จากสีม่วงให้เป็นสีเหลืองได้ โดยเปรียบเทียบกับ Blank (methanol) ในแถว E ที่ยังคงเป็นสีม่วงเช่นเดิม จากข้อมูลการทดสอบจะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดใบส่องฟ้าเพิ่มมากขึ้น สีของสารละลาย DPPH จะจางลงโดยเปลี่ยนเป็นสีเหลืองใส เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณค่า %inhibition พบว่าจะมีค่าเฉลี่ย %inhibition ของความเข้มข้นใบส่องฟ้า 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม เท่ากับ 43.32, 52.47, 91.83, 91.96, 92.75 และ 94.30% ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้คล้ายกันกับผลการทดสอบด้วยวิธีของ ABTS โดยสีของสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดใบส่องฟ้าเพิ่มมากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบส่องฟ้าที่ความเข้มข้นสูงชันนั้นก็จะมีปริมาณของสารสำคัญที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระสูงชันนั่นเอง

4. การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดใบสอ่งฟ้า

จากการนำสารสกัดใบสอ่งฟ้าที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำ 250 มิลลิลิตร มาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงผ่านเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เพื่อตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดใบสอ่งฟ้าแต่ละความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) อยู่ในช่วง 0.2-0.8 ในช่วงความยาวคลื่นแสง 220-700 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank ซึ่งจากการทดสอบพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่สูงสุดมีค่าอยู่ในช่วง 0.2-0.8 ในช่วงความยาวคลื่น 220-700 นาโนเมตร

ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าสเปกตรัมที่ได้จากสารสกัดใบสอ่งฟ้า ทั้ง 6 ความเข้มข้น (ผงใบสอ่งฟ้า 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำ 250 มิลลิลิตร) อยู่ช่วงที่ปกติและสามารถนำผลการดูดกลืนแสงนี้ไปใช้คำนวณหาโมเดลด้วยเทคนิค chemometrics ได้ เพื่อใช้ทำนายความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมของปริมาณผงชาชงใบสอ่งฟ้าและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไปได้



รูปภาพที่ 16 สเปกตรัมของสารสกัดใบสอ่งฟ้าที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำ 250 มิลลิลิตร

5. วิธีการเลือกโมเดลทาง chemometrics

เมื่อได้ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic content และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ดังแสดงตามตารางที่ 1 - 3 ข้างต้น และการวัดค่าการดูดกลืนแสงผ่านเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ทั้งหมดเข้าโปรแกรม Unscrambler เพื่อใช้ในการสร้างโมเดลด้วยเทคนิค Chemometrics เพื่อนำไปทำนายความสัมพันธ์ระหว่าง UV-spectrum กับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและ UV spectrum กับปริมาณ total phenolic content เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพผงชาชงในอนาคต โดยจะได้โมเดลในแต่ละวิธีวิเคราะห์ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบโมเดล Chemometrics ในแต่ละ Pretreatment
ของการทำนายปริมาณ total phenolic content, วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี
DPPH และ ABTS

การวิเคราะห์	Pretreatment	Factor	R ² -model	R ² pearson	RMSEP	Bias
ABTS	Original	7	0.9411	0.9749	4.22	0.84
	SNV	7	0.9456	0.6502	4.13	-0.93
	1 st derivative	2	0.9095	0.9501	5.87	1.48
	2 nd derivative	4	0.9512	0.9286	4.83	0.05
DPPH	Original	7	0.9277	0.9128	6.52	-0.77
	SNV	4	0.7571	0.1233	9.01	-7.10
	1 st derivative	6	0.95	0.9235	6.35	0.51
	2 nd derivative	4	0.9238	0.89	6.04	0.78
Phenolic	Original	6	0.8171	0.8472	3.58	-0.35
	SNV	6	0.8458	0.2999	2.04	0.47
	1 st derivative	2	0.7162	0.8093	3.01	0.52
	2 nd derivative	5	0.8504	0.8902	2.15	0.45

จากตารางการเปรียบเทียบโมเดล Chemometric จะพิจารณาจากค่า R^2 ของ model, ค่า R^2 pearson, ค่า Bias และค่า RMSEP ของแต่ละโมเดล รวมถึงพิจารณาลำดับของ factor ร่วมด้วย โดยหลักการในการพิจารณาเลือกโมเดลจะเลือกจากโมเดลที่มีค่า R^2 ของ model และค่า R^2 pearson ของผลการวิเคราะห์ตัวอย่างในกลุ่ม validation set เมื่อเปรียบเทียบกับผลของตัวอย่างเดียวกันที่วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานมีค่าเข้าใกล้ 1 มากที่สุด เนื่องจากจะช่วยบอกว่าโมเดลนั้นมีความแม่นยำมาก อีกทั้งควรเป็นโมเดลที่มีค่า Bias และค่า RMSEP น้อย ซึ่งจะบอกว่าโมเดลนั้นมีแนวโน้มจะเกิดข้อผิดพลาดน้อยมากน้อยแค่ไหน รวมถึงควรเป็นโมเดลที่มีลำดับ factor น้อย เนื่องจากยิ่ง factor มีลำดับสูงยิ่งมีปัจจัยกวนที่มาก

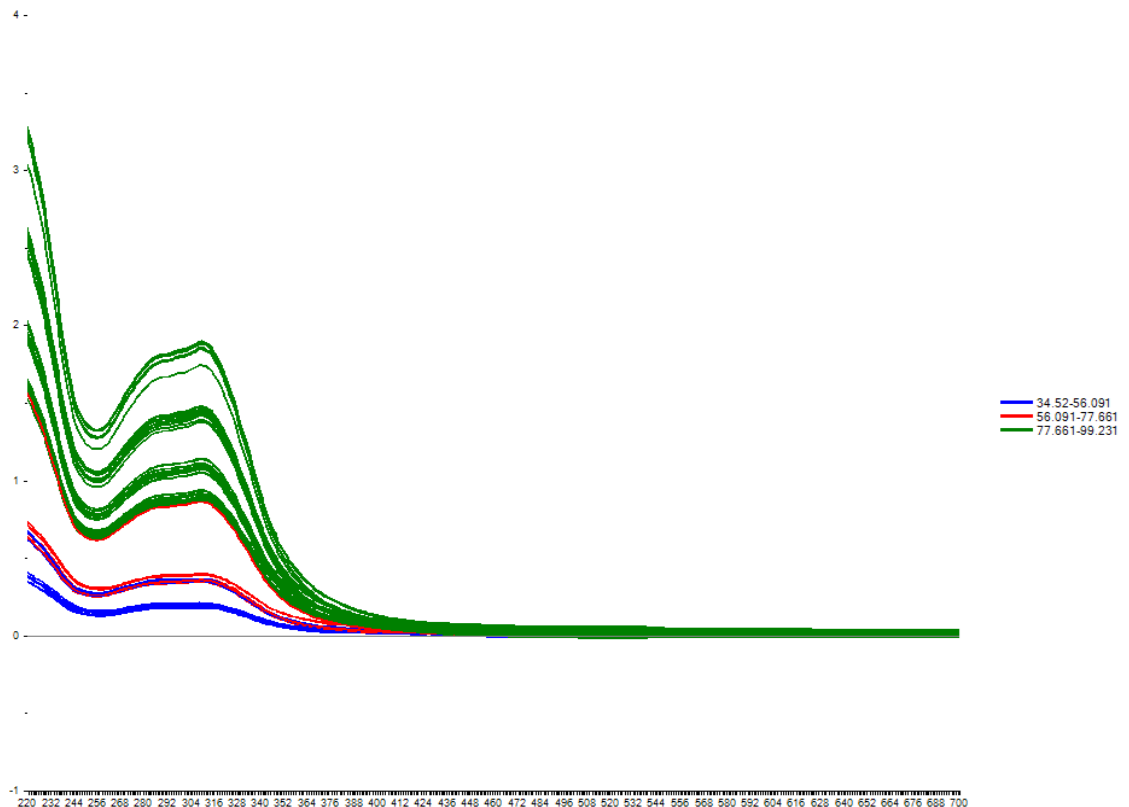
เมื่อพิจารณาค่า R^2 ของ model, ค่า R^2 pearson, ค่า Bias และค่า RMSEP ของแต่ละโมเดลตามหลักการที่กล่าวไว้ข้างต้น ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี ABTS ผู้วิจัยจึงพิจารณาเลือกใช้โมเดลจากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative Factor 4 ในวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี DPPH เลือกใช้โมเดลจากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 1st derivative Factor 6 และในการวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content ผู้วิจัยเลือกใช้โมเดลจากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative Factor 5

6. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิก โดยใช้เทคนิค

Chemometrics

6.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยใช้เทคนิค Chemometrics

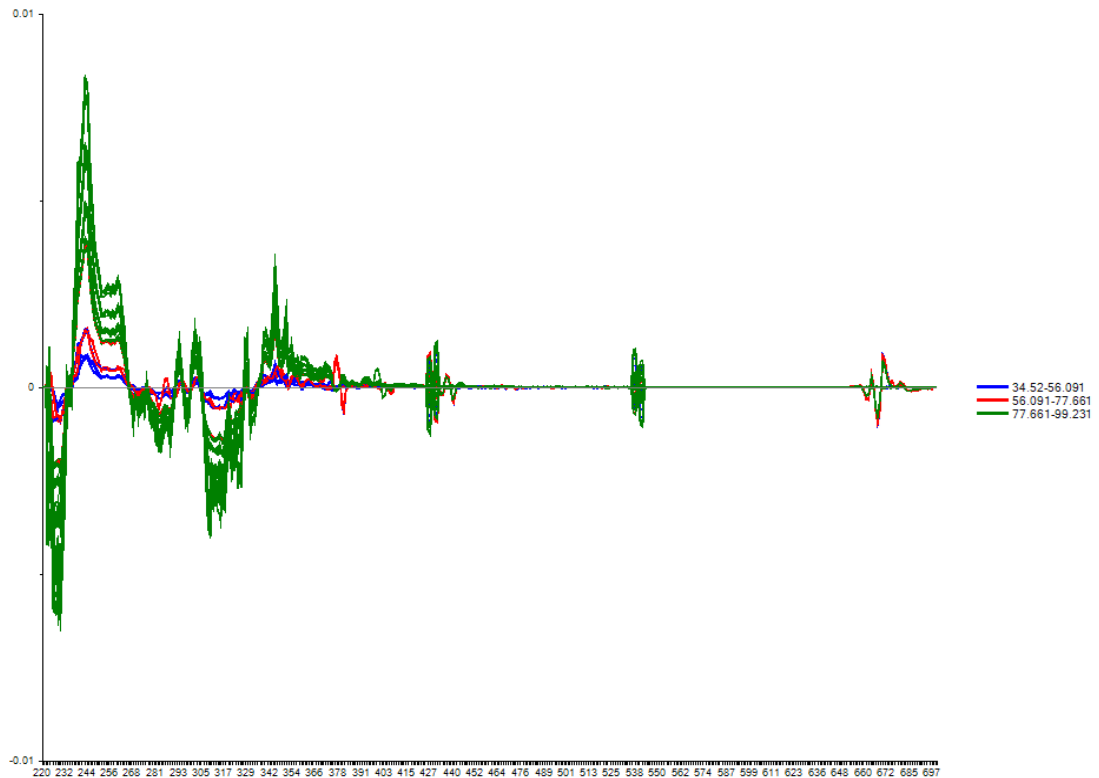
เมื่อนำโมเดลจากวิธีที่ไม่มีการ Pretreatment data Factor 7 มาทำการจัดกลุ่มสเปกตรัม จะได้ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบสอองฟ้าที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร เมื่อวัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยทำการจัดกลุ่มสเปกตรัมเป็น 3 กลุ่ม ดังรูปภาพที่ 17



รูปภาพที่ 17 ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี ABTS จากวิธีที่ไม่มีการ Pretreatment data Factor 7

จากตารางที่ 4 ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบโมเดล Chemometrics ในแต่ละ Pretreatment ของการทำนายการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี ABTS ผู้วิจัยได้ทำการพิจารณาเลือกใช้โมเดลจากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative Factor 4

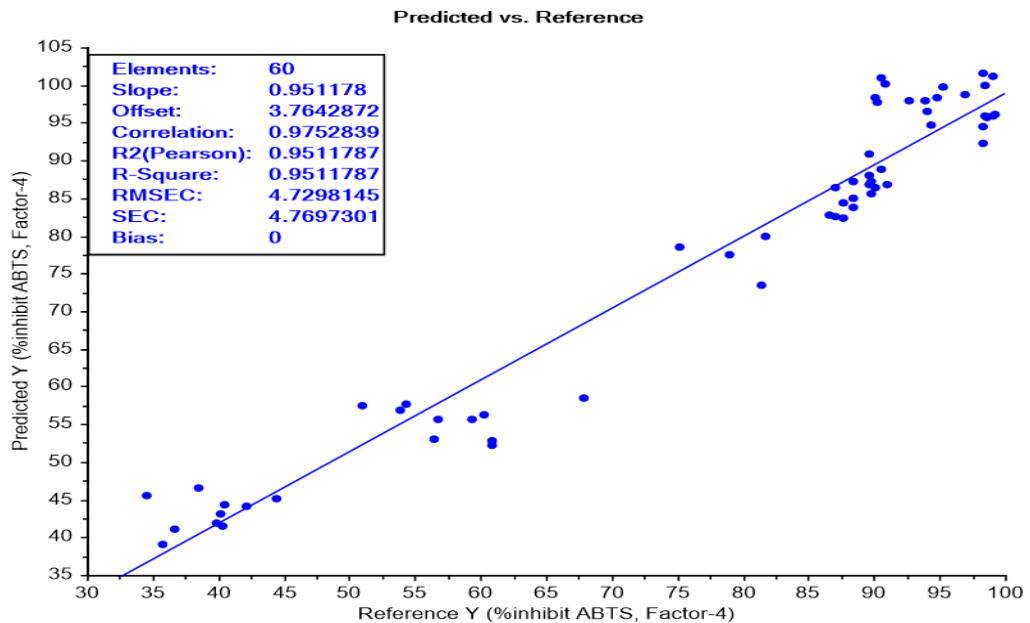
โดยเมื่อนำโมเดลจากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative Factor 4 มาทำการจัด กลุ่มสเปกตรัมจะได้ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัมในน้ำ 250 มิลลิ ลิตร เมื่อวัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยจะทำการจัดกลุ่มสเปกตรัมเป็น 3 กลุ่ม ดังรูปภาพที่ 18



รูปภาพที่ 18 ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบสอองฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี ABTS จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative

6.1.1 การสร้าง Calibration model

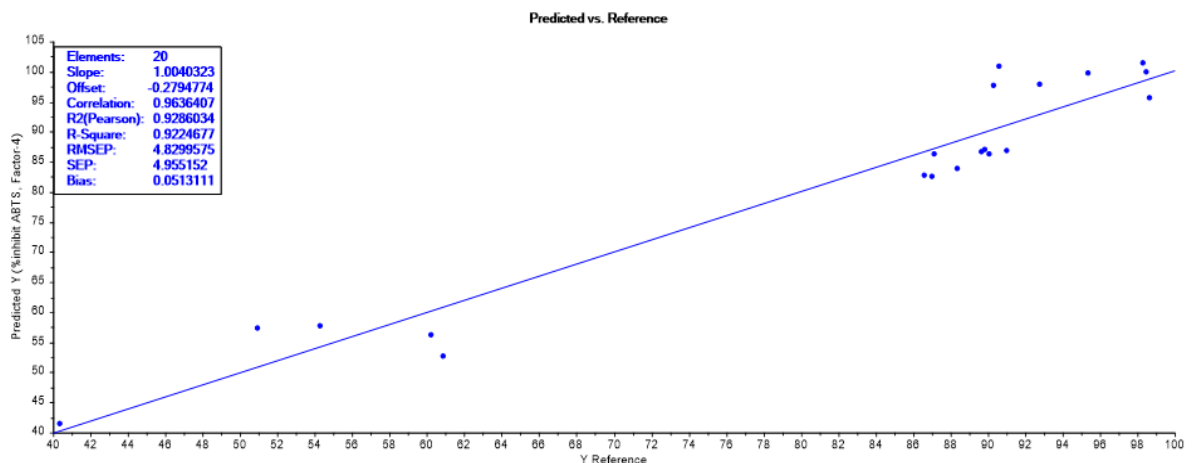
เมื่อนำ Calibration set 40 ตัวอย่างที่ได้จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Chemometrics วิธี Partial least square regression (PLS) จะได้ Calibration model ที่มีผลการวิเคราะห์ดังนี้ ค่า R^2 (Pearson) มีค่าเท่ากับ 0.9512, ค่า RMSEP มีค่าเท่ากับ 4.73 และค่า Bias เท่ากับ 0



รูปภาพที่ 19 Calibration model จากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative factor 4
จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี ABTS

6.1.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ABTS ของตัวอย่างกลุ่ม validation set

เมื่อนำ Validation set 20 ตัวอย่างที่ได้จากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative ซึ่งเป็นข้อมูลตัวอย่างที่นำมาใช้จริงในโมเดล มาเปรียบเทียบกับวิธี ABTS จะได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้ ค่า R^2 (Pearson) มีค่าเท่ากับ 0.9286, ค่า RMSEP มีค่าเท่ากับ 4.83, และค่า Bias เท่ากับ 0.05



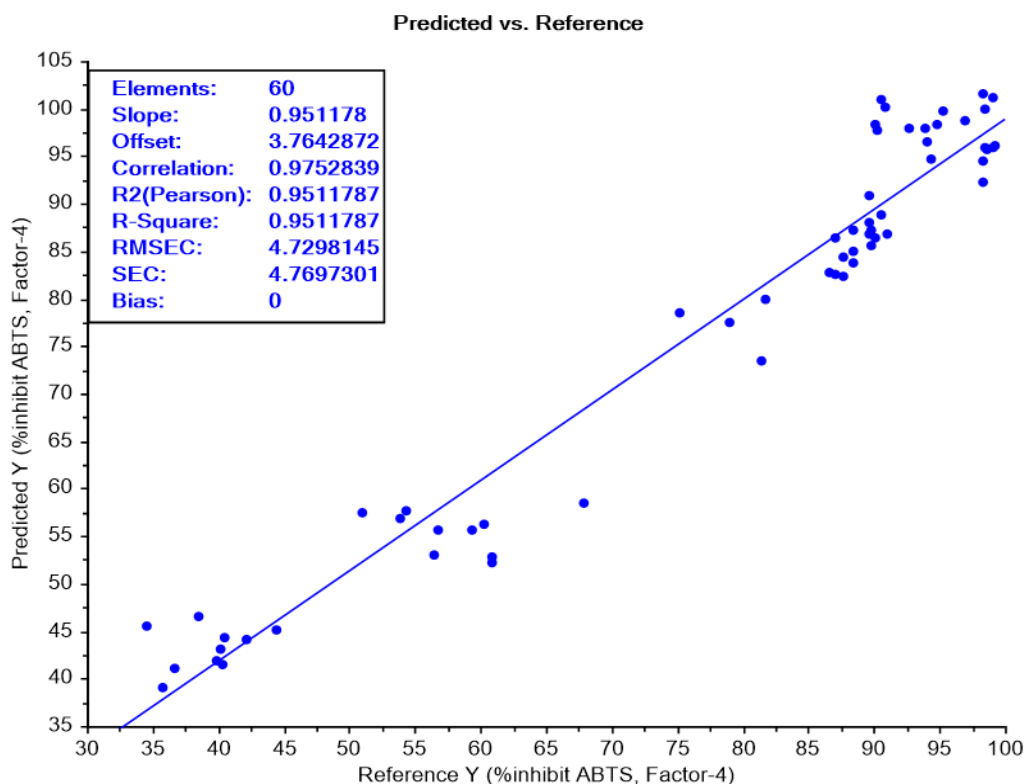
รูปภาพที่ 20 Validation model จากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative factor 4
จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี ABTS

จากการสร้าง Calibration model และผลการต้านอนุมูลอิสระของ Validation set จากการ pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative เปรียบเทียบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าเป็นโมเดลที่มีความแม่นยำ มีค่าความผิดพลาดต่ำ รวมถึงสามารถนำไปใช้ในการทำนายได้จริงและสามารถนำโมเดลไปประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคตได้

6.1.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

1) การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

จะพิจารณาจากค่า R^2 ของ model โดยนำค่าค่า R^2 มาถอดรากที่สอง จากรูปภาพที่ 21 มีค่า R^2 ของ model คือ 0.9512 ดังนั้นจะได้ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง คือ 0.98



รูปภาพที่ 21 ค่า R^2 pearson ของโมเดล

2) การทดสอบความแม่นยำ (Precision)

จะพิจารณาจากค่า %RSD และจะต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 2% โดยการคำนวณ %RSD จะได้จากการเลือกค่า Reference และค่า Prediction ของ Validation set ช่วงที่มี %inhibition กลาง ๆ มา 6 ตัวอย่าง จากนั้นทำการคำนวณ %recovery แล้วนำไปหาค่า SD และค่าเฉลี่ย จากนั้นคำนวณตามสูตร

$$\%RSD = SD/\text{ค่าเฉลี่ย}$$

เมื่อทำการคำนวณแล้วพบว่าค่า %RSD คือ 1.39% ซึ่งถือว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังนั้นแสดงว่าโมเดลนี้มีความแม่นยำ

3) การทดสอบความเที่ยงตรง (Accuracy)

จะพิจารณาจาก %recovery และจะต้องอยู่ในช่วง 95-105% โดยการคำนวณ %recovery จะได้จากการเลือกค่า Reference และค่า Prediction ของ Validation set ช่วงที่มี %inhibition สูง กลาง และต่ำ มา 10 ตัวอย่าง

เมื่อทำการคำนวณแล้วพบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างที่เลือก มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 95.45-104.62% ซึ่งอยู่ในช่วง 95-105% ดังนั้นแสดงว่าโมเดลนี้มีความเที่ยงตรง

4) Root mean squared error of prediction (RMSEP)

การคำนวณ RMSEP สามารถคำนวณได้จากค่า Reference และค่า Prediction ของ Validation set 20 ตัวอย่าง จากสูตร

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (\hat{y}_i - y_{i,ref})^2}$$

เมื่อ N = จำนวนตัวอย่างของ validation set

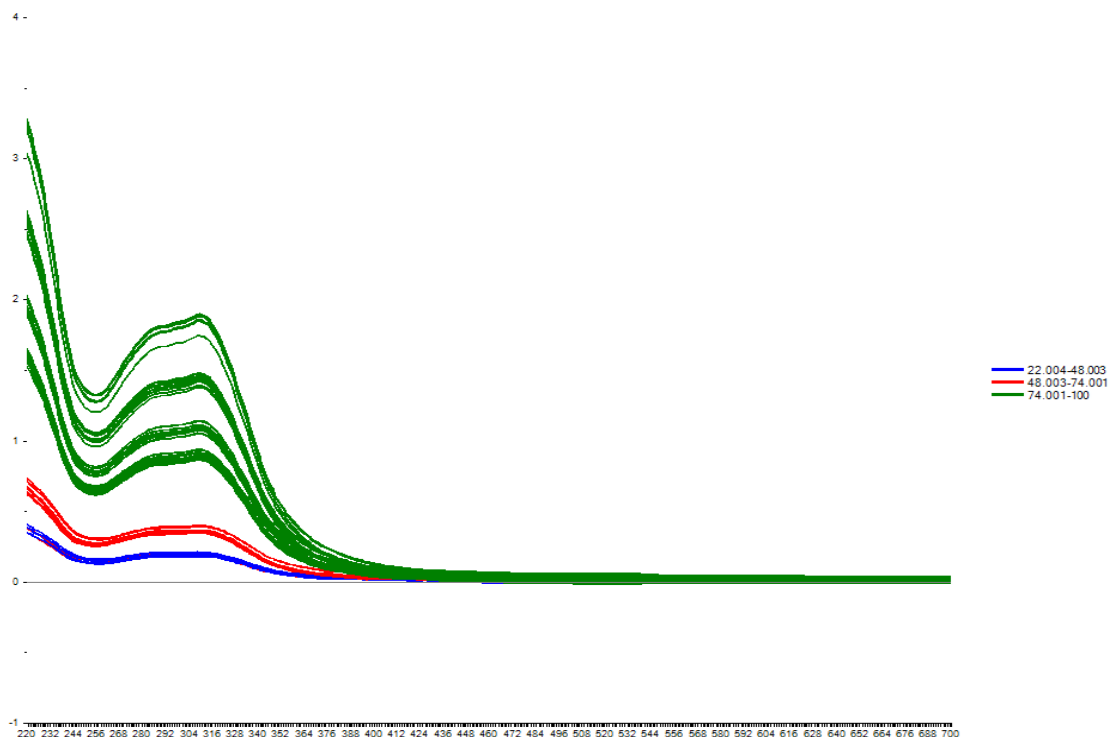
$\hat{y}_i$ = ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากโมเดล,

$y_{i,ref}$ = ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากวิธี reference

จากการคำนวณจะพบว่าโมเดลจากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative Factor 4 มีค่า RMSEP คือ 4.83

6.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยเทคนิค Chemometrics

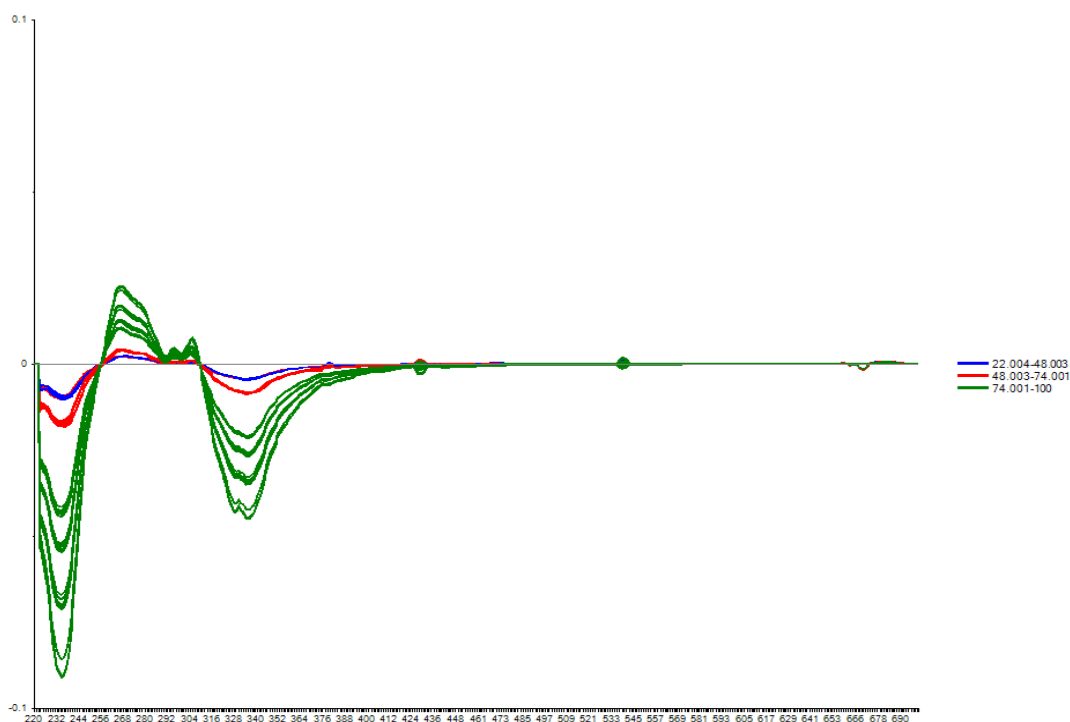
เมื่อนำโมเดลจากวิธีที่ไม่มีการ Pretreatment data Factor 7 มาทำการจัดกลุ่มสเปกตรัมจะได้ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบสอ่งฟ้าที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร เมื่อวัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยมีการจัดกลุ่มสเปกตรัมเป็น 3 กลุ่ม ดังรูปภาพที่ 22



รูปภาพที่ 22 ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบสอ่งฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี DPPH จากวิธีที่ไม่มีการ Pretreatment data Factor 7

จากตารางที่ 4 ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบโมเดล Chemometrics ในแต่ละ Pretreatment ของการทำนายการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี DPPH ผู้วิจัยได้ทำการพิจารณาเลือกใช้โมเดลจากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 1st derivative Factor 6

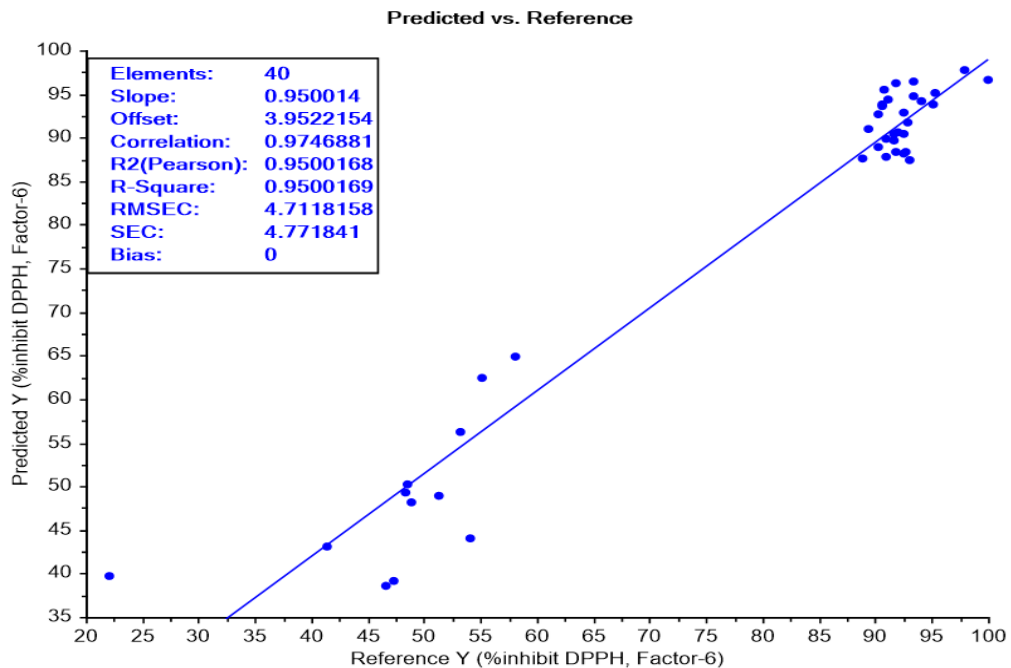
โดยเมื่อนำโมเดลจากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 1st derivative Factor 6 มาทำการจัดกลุ่มสเปกตรัมจะได้ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร เมื่อวัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยจะทำการจัดกลุ่มสเปกตรัมเป็น 3 กลุ่ม ดังรูปภาพที่ 23



รูปภาพที่ 23 สเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี DPPH จากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 1st derivative

6.2.1 การสร้าง Calibration Model

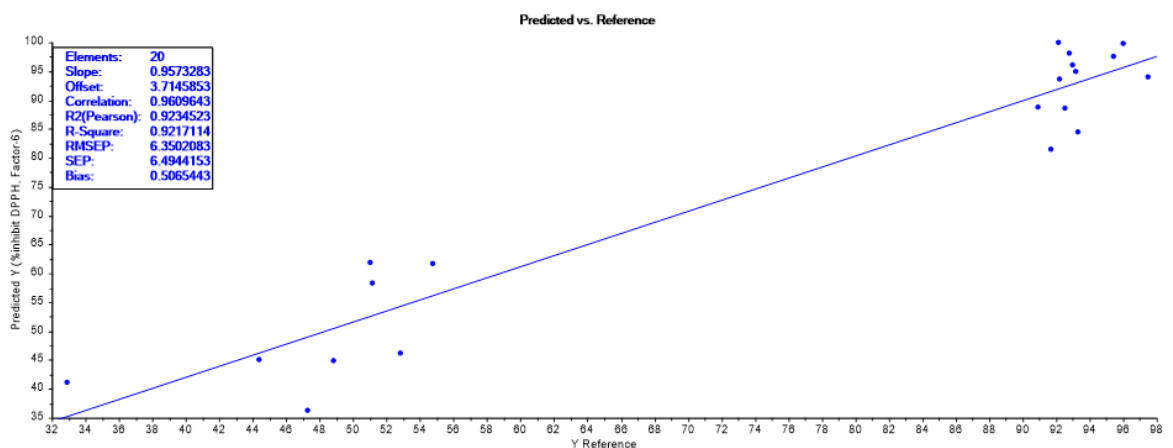
เมื่อนำ Calibration set 40 ตัวอย่างที่ได้จากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 1st derivative มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Chemometrics วิธี Partial least square regression (PLS) จะได้ Calibration model ที่มีผลการวิเคราะห์ดังนี้ ค่า R^2 (Pearson) มีค่าเท่ากับ 0.9500, ค่า RMSEP มีค่าเท่ากับ 4.71 และค่า Bias เท่ากับ 0



รูปภาพที่ 24 Calibration model จากการ pretreatment ข้อมูลแบบ 1st derivative factor 6
จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี DPPH

6.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี DPPH ของตัวอย่างกลุ่ม validation set

เมื่อนำ Validation set 20 ตัวอย่างที่ได้จากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 1st derivative ซึ่งเป็นข้อมูลตัวอย่างที่นำมาใช้จริงในโมเดล มาเปรียบเทียบกับวิธี DPPH จะได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้ ค่า R^2 (Pearson) มีค่าเท่ากับ 0.9235, ค่า RMSEP มีค่าเท่ากับ 6.35 และค่า Bias เท่ากับ 0.51

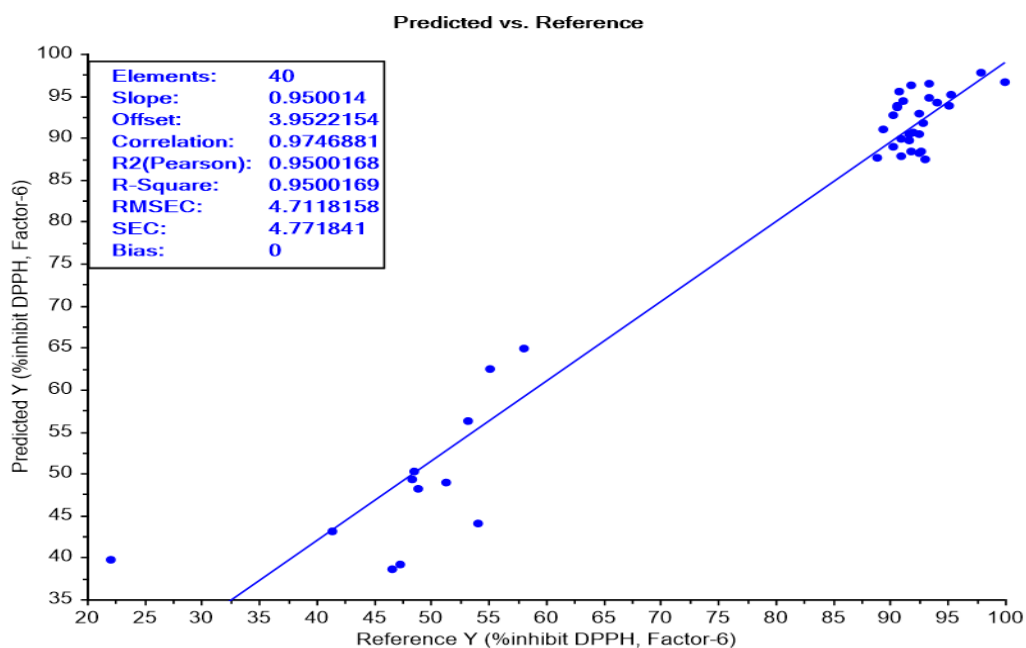


รูปภาพที่ 25 Validation model จากการ pretreatment ข้อมูลแบบ 1st derivative
จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี DPPH

6.2.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

1) การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

จะพิจารณาจากค่า R^2 ของ model โดยนำค่า R^2 มาถอดรากที่สองจากรูปภาพที่ 26 มีค่า R^2 ของ model คือ 0.9500 ดังนั้นจะได้ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง คือ 0.97



รูปภาพที่ 26 ค่า R^2 pearson ของโมเดล

2) การทดสอบความแม่นยำ (Precision)

จะพิจารณาจากค่า %RSD และจะต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 2% โดยการคำนวณ %RSD จะได้จากการเลือกค่า Reference และค่า Prediction ของ Validation set ช่วงที่มี %inhibition กลาง ๆ มา 6 ตัวอย่าง จากนั้นทำการคำนวณ %recovery แล้วนำไปหาค่า SD และค่าเฉลี่ย จากนั้นคำนวณตามสูตร

$$\%RSD = SD / \text{ค่าเฉลี่ย}$$

เมื่อทำการคำนวณแล้วพบว่า มีค่า %RSD คือ 0.99% ซึ่งถือว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังนั้นแสดงว่าโมเดลนี้มีความแม่นยำ

3) การทดสอบความเที่ยงตรง (Accuracy)

จะพิจารณาจาก %recovery และจะต้องอยู่ในช่วง 95-105% โดยการคำนวณ %recovery จะได้จากการเลือกค่า Reference และค่า Prediction ของ Validation set ช่วงที่มี %inhibition สูง กลาง และต่ำ มา 10 ตัวอย่าง

เมื่อทำการคำนวณแล้วจะพบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างที่เลือก มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 95.73 - 105.87% ซึ่งอยู่ในช่วง 95-105% ดังนั้นแสดงว่าโมเดลนี้มีความเที่ยงตรง

4) Root mean squared error of prediction (RMSEP)

การคำนวณ RMSEP สามารถคำนวณได้จากค่า Reference และค่า Prediction ของ Validation set 20 ตัวอย่าง จากสูตร

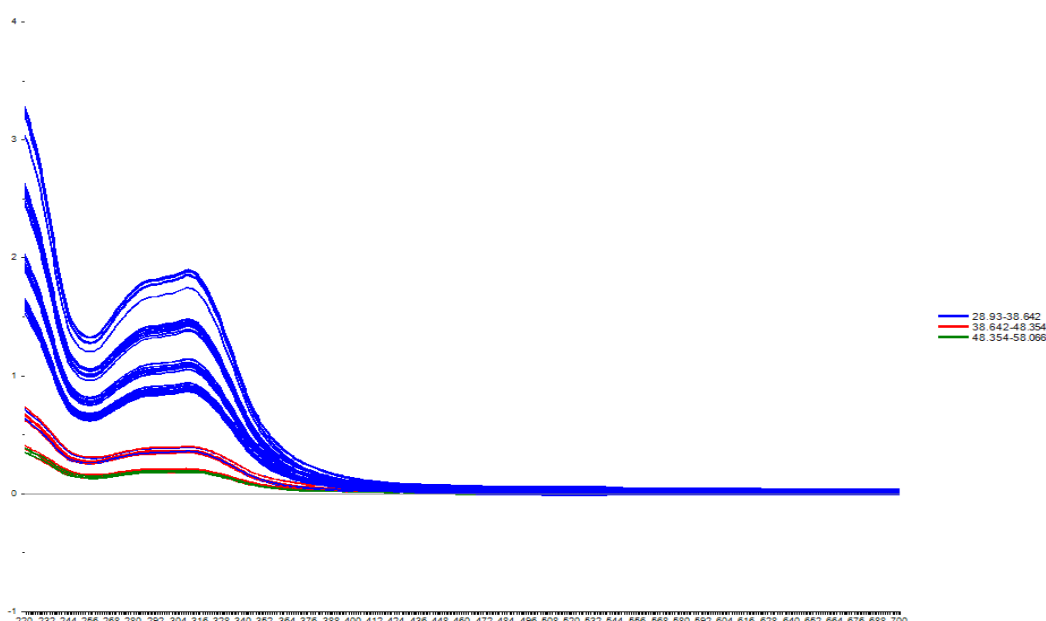
$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (y_i - y_{i,ref})^2}$$

เมื่อ N = จำนวนตัวอย่างของ validation set
 $\hat{y}_i$ = ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากโมเดล,
 $y_{i,ref}$ = ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากวิธี reference

จากการคำนวณจะพบว่าโมเดลจากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 1st derivative Factor 6 มีค่า RMSEP คือ 6.35

6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content โดยเทคนิค Chemometrics

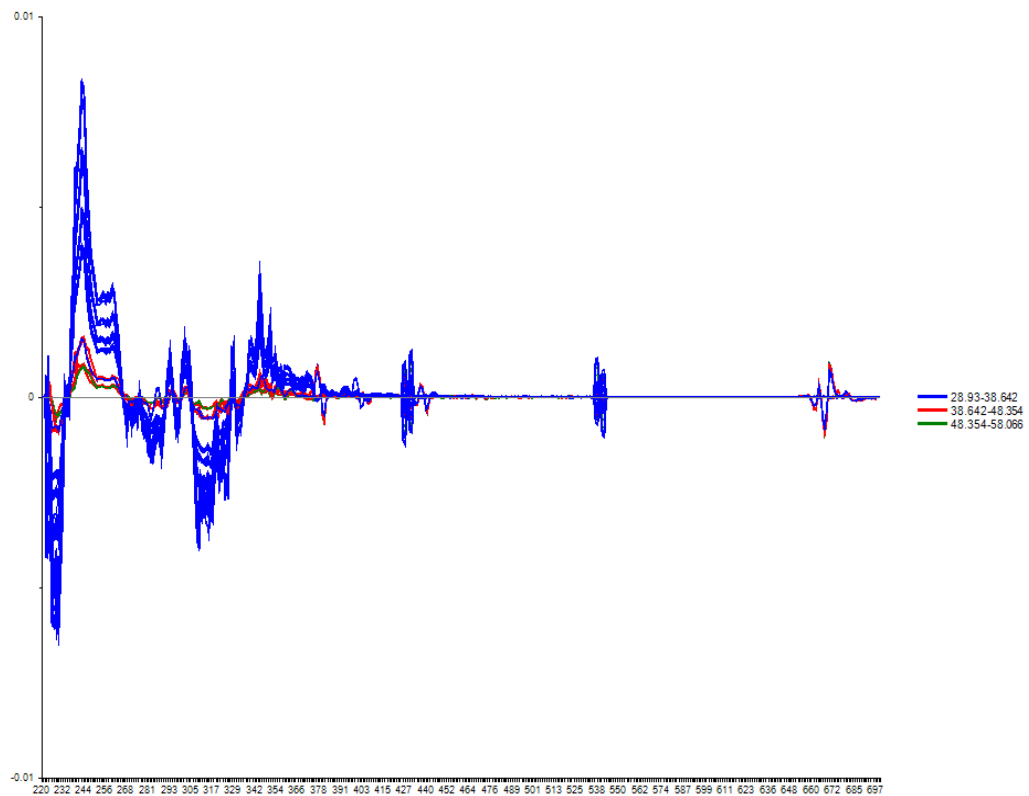
เมื่อนำโมเดลจากวิธีที่ไม่มีการ Pretreatment data Factor 6 มาทำการจัดกลุ่มสเปกตรัมจะได้ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร เมื่อวัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยมีการจัดกลุ่มสเปกตรัมเป็น 3 กลุ่ม ดังรูปภาพที่ 27



รูปภาพที่ 27 สเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก จากวิธีที่ไม่มีการ Pretreatment data Factor 6

จากตารางที่ 4 ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบโมเดล Chemometrics ในแต่ละ Pretreatment ของการทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก ผู้วิจัยได้ทำการพิจารณาเลือกใช้โมเดลจากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative Factor 5

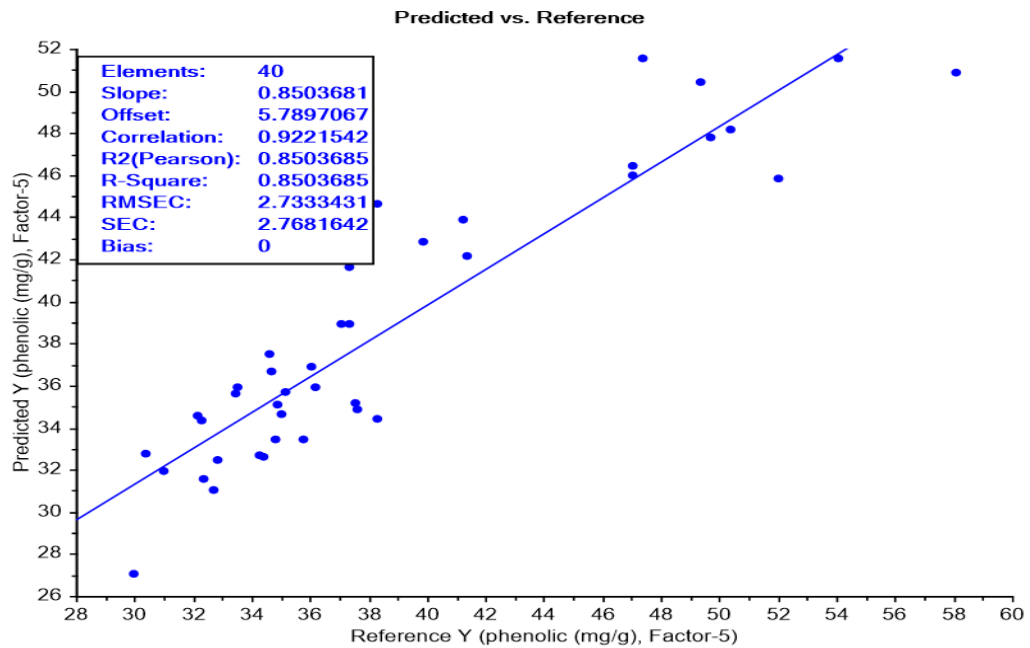
โดยเมื่อนำโมเดลจากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative Factor 5 มาทำการจัดกลุ่มสเปกตรัมจะได้ลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดใบส่องฟ้าที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร เมื่อวัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยจะทำการจัดกลุ่มสเปกตรัมเป็น 3 กลุ่ม ดังรูปภาพที่ 28



รูปภาพที่ 28 สเปกตรัมของสารสกัดใบสอ่งฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นที่วัดด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก จากการ pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative

6.3.1 การสร้าง Calibration Model

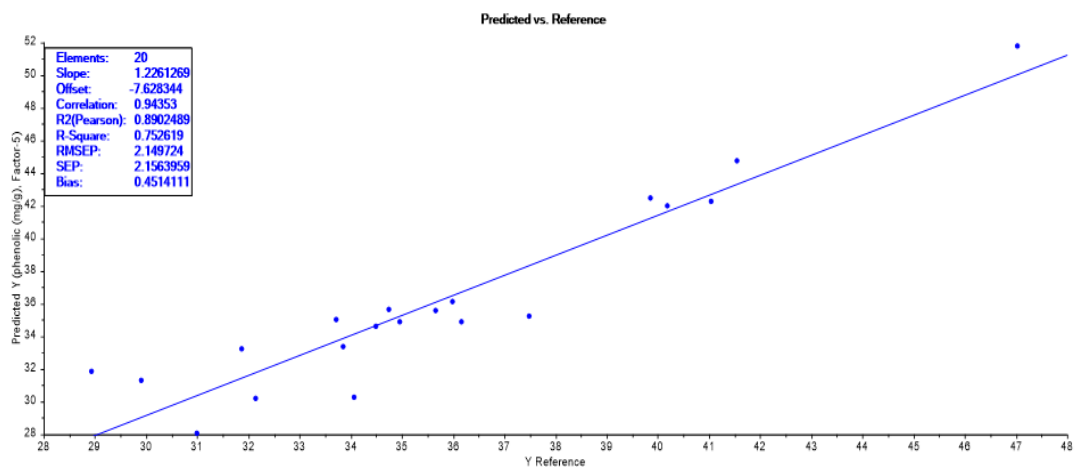
เมื่อนำ Calibration set 40 ตัวอย่างที่ได้จากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative มาวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค Chemometrics วิธี Partial least square regression (PLS) จะได้ Calibration model ที่มีผลการวิเคราะห์ดังนี้ ค่า R^2 (Pearson) มีค่าเท่ากับ 0.8504, ค่า RMSEP มีค่าเท่ากับ 2.73 และค่า Bias เท่ากับ 0



รูปภาพที่ 29 Calibration model จากวิธี pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative factor 5
จากการวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content

6.3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี total phenolic content ของตัวอย่างกลุ่ม validation set

เมื่อนำ Validation set 20 ตัวอย่างที่ได้จากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative ซึ่งเป็นข้อมูลตัวอย่างที่นำมาใช้จริงในโมเดล มาเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content จะได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้ ค่า R^2 (Pearson) มีค่าเท่ากับ 0.8902, ค่า RMSEP มีค่าเท่ากับ 2.15 และค่า Bias มีค่าเท่ากับ 0.45

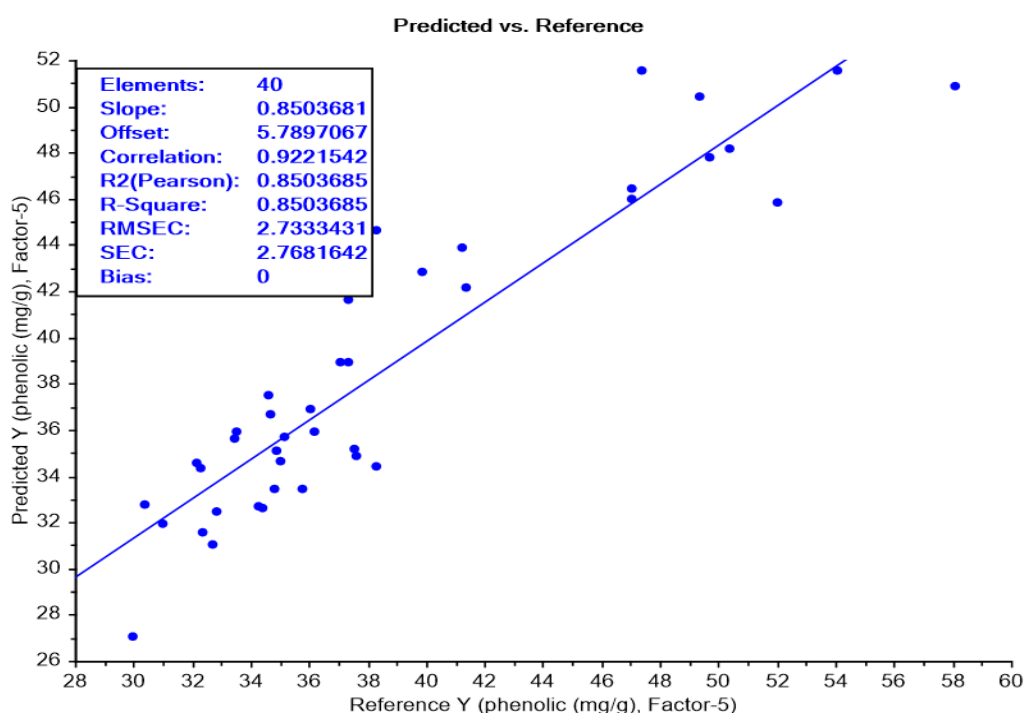


รูปภาพที่ 30 Validation model จากการ Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative factor 5
จากการวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content

6.6.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

1) การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

จะพิจารณาจากค่า R^2 ของ model โดยนำค่า R^2 มาถอดรากที่สองจากรูปภาพที่ 31 มีค่า R^2 ของ model คือ 0.8504 ดังนั้นจะได้ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง คือ 0.92



รูปภาพที่ 31 ค่า R^2 pearson ของโมเดล

2) การทดสอบความแม่นยำ (Precision)

จะพิจารณาจากค่า %RSD และจะต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 2% โดยการคำนวณ %RSD จะได้จากการเลือกค่า Reference และค่า Prediction ของ Validation set ช่วงที่มี %inhibition กลาง ๆ มา 6 ตัวอย่าง จากนั้นทำการคำนวณ %recovery แล้วนำไปหาค่า SD และค่าเฉลี่ย จากนั้นคำนวณตามสูตร

$$\%RSD = SD / \text{ค่าเฉลี่ย}$$

เมื่อทำการคำนวณแล้วพบว่า มีค่า %RSD คือ 1.49% ซึ่งถือว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังนั้นแสดงว่าโมเดลนี้มีความแม่นยำ

3) การทดสอบความเที่ยงตรง (Accuracy)

จะพิจารณาจาก %recovery และจะต้องอยู่ในช่วง 95-105% โดยการคำนวณ %recovery จะได้จากการเลือกค่า Reference และค่า Prediction ของ Validation set ช่วงที่มี %inhibition สูง กลาง และต่ำ มา 10 ตัวอย่าง

เมื่อทำการคำนวณแล้วจะพบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างที่เลือก มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 96.53-104.69% ซึ่งอยู่ในช่วง 95-105% ดังนั้นแสดงว่าโมเดลนี้ มีความเที่ยงตรง

4) Root mean squared error of prediction (RMSEP)

การคำนวณ RMSEP สามารถคำนวณได้จากค่า Reference และค่า Prediction ของ Validation set 20 ตัวอย่าง จากสูตร

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (y_i - y_{i,ref})^2}$$

เมื่อ N = จำนวนตัวอย่างของ validation set

$\hat{y}_i$ = ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากโมเดล,

$y_{i,ref}$ = ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากวิธี reference

จากการคำนวณจะพบว่าโมเดลจากวิธี Pretreatment แบบ 2nd derivative

Factor 5 มีค่า RMSEP คือ 2.15

7. การเตรียมตำรับชาขงรูปแบบผงแห้งโดยวิธี Spray dry

จากผลการทดสอบเวลา และความเข้มข้นผงใบส่่งฟ้าที่เหมาะสม คือ ต้มผงใบส่่งฟ้า 2 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยทำการทดลองตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง คือ น้ำตาลแลคโตส 5% ในน้ำ 250 มิลลิลิตร, น้ำตาลแมนนิทอล 5% ในน้ำ 250 มิลลิลิตร, น้ำตาลแลคโตส 5% ในสารสกัดใบส่่งฟ้า 250 มิลลิลิตรและน้ำตาลแมนนิทอล 5% ในสารสกัดใบส่่งฟ้า 250 มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่างเข้าเครื่อง spray dry เพื่อเตรียมเป็นชาขงแบบผงแห้ง แต่มีปัญหา คือพบว่าเครื่อง spray dry ไม่สามารถทำให้สารตัวอย่างแห้งได้ จึงได้ให้ผู้เชี่ยวชาญมาทำการตรวจสอบพบว่าเครื่องมีปัญหาจริงและจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการซ่อมนานพอสมควร ซึ่งส่งผลให้งานส่วนนี้ไม่สามารถทำการทดสอบต่อไปได้และด้วยระยะเวลาที่จำกัด กลุ่มผู้วิจัยจำเป็นต้องทำการยกเลิกการทดสอบส่วนนี้ไป อย่างไรก็ตามหากมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตผู้วิจัยสามารถใช้สัดส่วนต่าง ๆ ในการเตรียมตำรับตามที่ระบุสำหรับการทดสอบและพัฒนาต่อไปได้



รูปภาพที่ 32 แสดงภาพเครื่อง spray dry ที่ไม่สามารถใช้งานได้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการนำสารสกัดจากใบส่อดฟ้า (*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin) มาเตรียมเป็น 6 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร โดยต้มสารเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH แล้ววัดค่าออกมาในรูป %inhibition พบว่าในการทดสอบด้วยวิธี ABTS ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบส่อดฟ้า 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร มี %inhibition เฉลี่ย เท่ากับ 39.32, 58.16, 84.30, 89.60, 92.73 และ 98.50 ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบส่อดฟ้า 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร มี %inhibition เฉลี่ย เท่ากับ 43.32, 52.47, 91.83, 91.96, 92.75 และ 94.30 ตามลำดับ พบว่าทั้งการทดสอบด้วยวิธี ABTS และ DPPH ยิ่งสารสกัดใบส่อดฟ้าที่มีความเข้มข้นสูง จะมี %inhibition สูงตาม ซึ่งแสดงว่าสารสกัดใบส่อดฟ้าที่มีความเข้มข้นสูงจะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณมาก จากนั้นทำการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content) และรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบส่อดฟ้า 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร มีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 50.20, 39.81, 35.88, 32.53 และ 32.30 mg GAE/g dry sample ตามลำดับ โดยยิ่งสารสกัดใบส่อดฟ้าที่มีความเข้มข้นสูง จะมีปริมาณฟีนอลิกรวมลดลง ซึ่งผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH คณะผู้วิจัยคาดว่าเกิดจากการที่สารสกัดใบส่อดฟ้าที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มีสารอื่นที่ไม่ใช่สารประกอบ phenolic เพียงอย่างเดียวที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ ยกตัวอย่างเช่น สารประกอบ flavonoids ซึ่งก็มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้เช่นกัน ดังเช่นการศึกษาของ Shaymaa Fadhel Abbas Albaayit และคณะ⁽³⁰⁾ และการศึกษาของ Lawal และคณะ⁽³¹⁾ ที่เคยรายงานไว้

จากนั้นนำสารสกัดใบส่อดฟ้า 6 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220-700 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer พบว่าในช่วงความยาวคลื่น 220-700 นาโนเมตร สารสกัดใบส่อดฟ้า ทั้ง 6 ความเข้มข้นมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 0.2-0.8 ซึ่งเป็นการพิสูจน์ได้ว่าผลที่วัดค่าได้อยู่ช่วง ที่ปกติและสามารถนำผลการดูดกลืนแสงนี้ไปใช้คำนวณหาโมเดล ด้วยเทคนิค chemometrics ได้

จากความสัมพันธ์ระหว่าง UV-spectrum, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวม โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดส่องฟ้าทั้ง 6 ความเข้มข้นกับค่า %inhibition จากการทดสอบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH รวมถึงค่ามีลิกกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อกรัมของใบส่องฟ้าจากการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวม มาสร้างโมเดลด้วยเทคนิค chemometrics ด้วยวิธี Partial least square regression (PLS) เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของ ผงชาชงในอนาคต ทำการเลือกโมเดลโดยพิจารณาจากค่า R^2 ของ model, ค่า R^2 -pearson ของผลการวิเคราะห์ตัวอย่างในกลุ่ม validation set เมื่อเปรียบเทียบกับผลของตัวอย่างเดียวกันที่วิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานที่มีค่าเข้าใกล้ 1 มากที่สุด ซึ่งบ่งบอกถึงโมเดลนั้นมีความแม่นยำมาก มีค่า Bias และค่า RMSEP ที่น้อย ซึ่งบ่งบอกถึงโมเดลนั้นมีความผิดพลาดต่ำ ดังนั้นในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS จึงเลือกโมเดลจากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative Factor 4 เนื่องจากมีค่า R^2 ของ model เท่ากับ 0.9512, ค่า R^2 pearson เท่ากับ 0.9286, ค่า Bias เท่ากับ 0.05 และค่า RMSEP เท่ากับ 4.83 และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH จึงเลือกโมเดลจากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 1st derivative Factor 6 เนื่องจากมีค่า R^2 ของ model เท่ากับ 0.9500, ค่า R^2 -pearson เท่ากับ 0.9235, ค่า Bias เท่ากับ 0.51 และค่า RMSEP เท่ากับ 6.35 และการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม จึงเลือกโมเดลจากวิธี Pretreatment ข้อมูลแบบ 2nd derivative Factor 5 เนื่องจากมีค่า R^2 ของ model เท่ากับ 0.8504, ค่า R^2 -pearson เท่ากับ 0.8902, ค่า Bias เท่ากับ 0.45 และค่า RMSEP เท่ากับ 2.15

จากการสร้างโมเดลทาง chemometrics เพื่อทำการตรวจสอบความถูกต้อง (Method Validation) ของแต่ละโมเดลที่เลือกเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์รูปแบบต่าง ๆ โดยพิจารณาจากการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง พบว่าการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH และการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม มีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเท่ากับ 0.98, 0.97 และ 0.92 ตามลำดับ ถือว่ายอมรับได้เนื่องจากมีค่าเข้าใกล้ 1.0, การทดสอบความแม่นยำ รายงานผลเป็น %RSD พบว่าการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH และการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม มี %RSD เท่ากับ 1.39, 0.99 และ 1.49 ตามลำดับ ถือว่าโมเดลมีความแม่นยำเนื่องจากมีค่า %RSD ไม่เกิน 2%, การทดสอบความเที่ยงตรง รายงานผลเป็น %recovery พบว่าการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH และการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม มี %recovery อยู่ในช่วง 95.45-104.62%, 95.73-105.87% และ 96.53-104.69 ตามลำดับ ถือว่าโมเดลมีความแม่นยำ เนื่องจากมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 95-105% และค่า Root mean squared error of prediction (RMSEP) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ประเมิน ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ พบว่าการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ด้วยวิธี ABTS และ DPPH และการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 4.83, 6.35 และ 2.15 ตามลำดับ

จากโมเดลทาง chemometrics ของการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH และการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม จะพบว่าโมเดลของการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH สามารถใช้เป็นโมเดลในการนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและควบคุมคุณภาพของชาชงแบบผงแห้งในอนาคตได้ เนื่องจากมีค่า R^2 ของ model มากกว่า 0.9 แต่ในส่วนหนึ่งของโมเดลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม อาจจะยังไม่เหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต เนื่องจากมีค่า R^2 ของ model ที่น้อยกว่า 0.9 ซึ่งคณะผู้วิจัยคาดว่าเกิดจากการที่สารสกัดใบส่อดฟ้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีสารอื่นที่ไม่ใช่สารประกอบ phenolic เพียงอย่างเดียวที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ แต่วิธีที่ผู้วิจัยใช้ในการวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะสารประกอบฟีนอลิกเท่านั้น โดยในอนาคตหากมีการศึกษาเพิ่มเติมผู้วิจัยควรทำการศึกษาในกลุ่มสารสำคัญอื่น ๆ (เช่น Phytochemical screening) ในใบส่อดฟ้า ก่อน แล้วนำข้อมูลมาใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ร่วมกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เพื่อสร้างโมเดลทาง chemometrics ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและควบคุมคุณภาพของชาชงแบบผงแห้งในอนาคตต่อไปได้

การสร้างโมเดลทาง chemometrics เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต คือการใช้โมเดลในการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและควบคุมคุณภาพของชาชงแบบผงแห้งในอนาคต โดยไม่ต้องทำการทดสอบหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีมาตรฐานใหม่ทุกครั้งทำให้ช่วยประหยัดเวลา, สารเคมีและต้นทุนในการทดสอบ

จากนั้นนำสารสกัดจากใบส่อดฟ้าไปเตรียมตำรับชาชงแบบผงแห้งด้วยวิธี spray dry โดยใช้ตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง คือน้ำตาลแลคโตส 5% ในน้ำ 250 มิลลิลิตร, น้ำตาลแมนนิทอล 5% ในน้ำ 250 มิลลิลิตร, น้ำตาลแลคโตส 5% ในสารสกัดใบส่อดฟ้า 250 มิลลิลิตรและน้ำตาลแมนนิทอล 5% ในสารสกัดใบส่อดฟ้า 250 มิลลิลิตร แต่มีปัญหา คือพบว่าเครื่อง spray dry ไม่สามารถทำให้สารตัวอย่างแห้งได้ จึงได้ให้ผู้เชี่ยวชาญมาทำการตรวจสอบพบว่าเครื่องมีปัญหาจริงและจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการซ่อมนานพอสมควร ซึ่งส่งผลให้งานส่วนนี้ไม่สามารถทำการทดสอบต่อไปได้และด้วยระยะเวลาที่จำกัด กลุ่มผู้วิจัยจำเป็นต้องทำการยกเลิกการทดสอบส่วนนี้ไป อย่างไรก็ตามหากมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตผู้วิจัยสามารถใช้สัดส่วนต่าง ๆ ในการเตรียมตำรับตามที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบและพัฒนาต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. กระทรวงสาธารณสุข ศูนย์ข้อมูลข่าวสารด้านเวชภัณฑ์.
แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ.2560-2564 [Internet].
ศูนย์ข้อมูลข่าวสารด้านเวชภัณฑ์ กระทรวงสาธารณสุข. [cited 2021Nov1]. Available from:
<http://dmsic.moph.go.th/index/detail/6938>
2. Amornvit Amattayakong. 2016 กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข [Internet]. หน้าหลัก.
[cited 2021Nov1]. Available from: [https://www.dmh.go.th/news-](https://www.dmh.go.th/news-dmh/view.asp?id=30453)
[dmh/view.asp?id=30453](https://www.dmh.go.th/news-dmh/view.asp?id=30453)
3. Jantamat P, Weerapreeyakul N, Puthongking P. Cytotoxicity and apoptosis induction of coumarins and carbazole alkaloids from Clausena harmandiana. Molecules. 2019;24(18):3385.
4. Thailandplus. สมุนไพรน่ารู้ อภัยภูเบศร : ส่องฟ้า ยาต้านพิษ พิษิตปวดเมื่อย [Internet].
Thailand Plus Online. [cited 2021Nov1]. Available from:
<https://www.thailandplus.tv/archives/290011>
5. Songsiang U, Thongthoom T, Boonyarat C, Yenjai C. Claurailas a–d, cytotoxic carbazole alkaloids from the roots of Clausena harmandiana. Journal of Natural Products. 2011;74(2):208–12.
6. อนนนาฏ ไพนุพงศ์. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระกับสุขภาพ. PKRU SciTech Journal. 2017;1(2):20-7
7. บัณฑิตวรรณ ชูระพระ , จันทนา บุญยะรัตน์, เยาวเรศ ชูลิขิต และสุภาวดี ดาวดี.
การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส้มโอ. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 2559;
80-91
8. ปฏินิวิทย์ ลอยพิมาย. การประเมินความสามารถต้านออกซิเดชันรวมในหลอดทดลอง. กรุงเทพฯ:
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา; 2554
9. Phowichit S, Ratanachamnong P, Matsathit U, Ussawawongaraya W.
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์
ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยพื้นบ้านสะค้านและมะแขว่นในเขตท้อง
ถิ่นภาคเหนือ. RMUTT Research Journal Rajamangala University of Technology
Thanyaburi. 2019;18(1):25-39.
10. วัชรพล พรหมสุต, ธนพร อัครพัฒนากุล. การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรไทย.
Journal of Science & Technology MSU. 2019;38(6).

11. Pongsakorn Jantakoon, Sarin Tadtong, Ploenthip Puthongking. Neuritogenic and antioxidant activities of nordentatin from *Clausena harmandiana*. Journal of Asian Association of Schools of Pharmacy. 2012;1:180-6.
12. Thongthoom T, Songsiang U, Phaosiri C, Yenjai C. Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana*. Archives of Pharmacal Research. 2010;33(5):675-80.
13. Chang X, Lu Y, Lin Z, Qiu J, Guo X, Pan J, et al. Impact of leaf development stages on polyphenolics profile and antioxidant activity in *clausena lansium* (Lour.) Skeels. BioMed Research International. 2018;2018:1-8.
14. Li Q, Chang X, Guo R, Wang Q, Guo X. Dynamic effects of fermentation on phytochemical composition and antioxidant properties of wampee (*clausena lansium* (Lour.) Skeel) leaves. Food Science & Nutrition. 2018;7(1):76-85.
15. อนันต์ อธิพรชัย. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสกุล *Clausena* สำหรับการรักษาโรคเบาหวาน (Bioactive compounds from *Clausena* plants for diabetes treatment) [วิทยานิพนธ์]. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2562.
16. จินดา หวังบุญสกุล, สุรัตน์ ละภูเขียว และวาทีกานต์ ศศิธรเวชกุล. การพิสูจน์สมุนไพรสกุล *Clausena* จากความแตกต่างของสารประกอบทางเคมี โดยใช้วิธี HPLC fingerprint [วิทยานิพนธ์]. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2554.
17. ศิริรัตน์ พันธุ์เรือง, วิษณุ ธงไชย และเฉลิมพร ทองพูน. ศึกษาวิธีการสกัดและทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดมะขามป้อม. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม; 2558
18. ณชนก เมธาอัครเดชา, อนงค์ ศรีโสภา. ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในชาใบหม่อนและชาผงใบหม่อนชนิดละลายน้ำ. Thai Journal of Science and Technology. 2020 Feb 25;9(2):230-42.
19. Laphookhieo S, Maneerat W, Koysomboon S. Antimalarial and cytotoxic phenolic compounds from *Cratogeomys maingayi* and *Cratogeomys Cochinchinense*. Molecules. 2009;14(4):1389-95.
20. Tanruean K, Poolprasert P, Suwannarach N, Kumla J, Lumyong S. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant and biological activities of extracts from three *Clauseneae* plants in northern Thailand. Plants. 2021;10(1):117.

21. Gan J, Feng Y, He Z, Li X, Zhang H. Correlations between antioxidant activity and alkaloids and phenols of maca (*lepidium meyenii*). *Journal of Food Quality*. 2017;2017:1–10.
22. Brereton, R. G., *Introduction to Multivariate Calibration in Analytical Chemistry*. *Analyst* 2006, 125 (11), 2125-2154.
23. Geladi, P.; Dowalski, B. R., *Partial Least-Squares Regression – a Tutorial*. *Anal. Chim. Acta* 1986, 185, 1-17
24. อุบลรัตน์ สิริภัทรวรรณ, สุวิสา พงษ์อำไพ.
การประเมินอายุการเก็บแบบรวดเร็วของผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปโดยใช้ NIR spectroscopy และ Chemometrics. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2557
25. อาริรัตน์ อิมศิลป์, ปิยรัตน์ สิริธัญกิจ, รจนา ประสิทธิ์.
การจำแนกข้าวหอมมะลิออกจากข้าวพันธุ์อื่น ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี อินฟราเรด ย่านใกล้. *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science*. 2012;5(2):37-52.
26. ชูทวีป ปาลกะวงศ์ ณ อยุธยา. การทำแห้งน้ำใบย่านางด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย.
มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม; 2559.
27. กลอยใจ เขยกลิ่นเทศ.
การผลิตสีผงสำหรับผสมอาหารจากวัสดุธรรมชาติด้วยวิธีการทำแห้งแบบฉีดพ่นฝอย. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยราชชมงคลธัญบุรี; 2556
28. ศิริพร, สอน สมบูรณ์สุข. การพัฒนาผลิตภัณฑ์มะตูมผงสำเร็จรูปด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Doctoral dissertation, สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตรและอาหาร สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี).
29. สมฤทัย พาที. องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพจากเหง้าของเนระพูสีไทย. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2560
30. Shaymaa Fadhel Abbas Albaayit, Yusuf Abba, Rasedee Abdullah, and Noorlidah Abdullah. Evaluation of Antioxidant Activity and Acute Toxicity of *Clausena excavata* Leaves Extract. 2014 ;2014(1):1-10.
32. Lawal, I. O., Grierson, D. S. and Afolayan, A. J. Phytochemical and antioxidant investigations of a *Clausena anisata* Hook, A south African Medicinal Plant. 2015;12(1).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลที่ใช้ในการคำนวณการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ด้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

ตารางที่ 5 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery ที่นำมาใช้คำนวณ %RSD

ของการทดสอบความแม่นยำ (Precision)

ลำดับที่	Reference	Prediction	% Recovery
1	86.58338	82.75636	95.58
2	90.04215	86.41143	95.97
3	89.84615	87.13724	96.98
4	91.00899	86.86694	95.45
5	89.67774	86.75777	96.74
6	87.10819	86.29604	99.07

ตารางที่ 6 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery ของการทดสอบ

ความเที่ยงตรง (Accuracy)

ลำดับที่	Reference	Prediction	% Recovery
1	40.37736	41.44113	102.63
2	86.58338	82.75636	95.58
3	90.04215	86.41143	95.97
4	89.84615	87.13724	96.98
5	91.00899	86.86694	95.45
6	87.10819	86.29604	99.07
7	95.3513	99.75633	104.62
8	98.27411	101.5127	103.29
9	98.65604	95.68898	96.99
10	98.49222	99.94826	101.48

ตารางที่ 7 แสดงค่า Reference และค่า Prediction ที่ใช้ในการคำนวณ RMSEP

ลำดับที่	Reference	Prediction
1	40.37736	41.44113
2	60.83731	52.74485
3	60.20779	56.33061
4	54.30393	57.68189
5	50.92492	57.44607
6	88.38243	83.84267
7	86.58338	82.75636
8	87.00108	82.54902
9	90.04215	86.41143
10	89.84615	87.13724
11	91.00899	86.86694
12	89.67774	86.75777
13	87.10819	86.29604
14	92.74364	97.95802
15	90.57421	100.8585
16	95.3513	99.75633
17	90.31728	97.75163
18	98.27411	101.5127
19	98.65604	95.68898
20	98.49222	99.94826

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ด้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ตารางที่ 8 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery ที่นำมาใช้คำนวณ %RSD

ของการทดสอบความแม่นยำ (Precision)

ลำดับที่	Reference	Prediction	% Recovery
1	44.39655	45.13541	101.66
2	92.2252	93.71658	101.62
3	92.94479	96.1424	103.44
4	93.14214	94.90067	101.89
5	95.98393	99.87149	104.05
6	95.40816	97.64693	102.35

ตารางที่ 9 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery ของการทดสอบ

ความเที่ยงตรง (Accuracy)

ลำดับที่	Reference	Prediction	% Recovery
1	44.39655	45.13541	101.66
2	92.49592	88.54738	95.73
3	92.2252	93.71658	101.62
4	90.90909	88.80096	97.68
5	97.51038	94.03128	96.43
6	92.94479	96.1424	103.44
7	93.14214	94.90067	101.89
8	95.98393	99.87149	104.05
9	92.76411	98.21356	105.87
10	95.40816	97.64693	102.35

ตารางที่ 10 แสดงค่า Reference และค่า Prediction ที่ใช้ในการคำนวณ RMSEP

ลำดับที่	Reference	Prediction
1	44.39655	45.13541
2	48.82227	44.89005
3	47.25275	36.38826
4	32.91457	41.24541
5	51.00223	61.86032
6	51.11607	58.39506
7	54.77707	61.7336
8	52.82609	46.26601
9	93.31352	84.40923
10	92.49592	88.54738
11	91.68082	81.56793
12	92.2252	93.71658
13	90.90909	88.80096
14	97.51038	94.03128
15	92.94479	96.1424
16	93.14214	94.90067
17	95.98393	99.87149
18	92.10526	99.95929
19	92.76411	98.21356
20	95.40816	97.64693

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content

ตารางที่ 11 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery ที่นำมาใช้คำนวณ %RSD
ของการทดสอบความแม่นยำ (Precision)

ลำดับที่	Reference	Prediction	% Recovery
1	34.49622	34.58878	100.27
2	35.65176	35.55463	99.73
3	34.7379	35.63184	102.57
4	34.9652	34.91612	99.86
5	35.9877	36.1464	100.44
6	33.841	33.40817	98.72

ตารางที่ 12 แสดงค่า Reference, ค่า Prediction และค่า %Recovery ของการทดสอบ
ความเที่ยงตรง (Accuracy)

ลำดับที่	Reference	Prediction	% Recovery
1	40.19513	41.99729	104.48
2	41.04134	42.27522	103.01
3	34.49622	34.58878	100.27
4	35.65176	35.55463	99.73
5	36.1581	34.90485	96.53
6	34.9652	34.91612	99.86
7	35.9877	36.1464	100.44
8	33.841	33.40817	98.72
9	29.9124	31.31479	104.69
10	31.8767	33.22693	104.24

ตารางที่ 13 แสดงค่า Reference และค่า Prediction ที่ใช้ในการคำนวณ RMSEP

ลำดับที่	Reference	Prediction
1	47.02205	51.76778
2	41.54907	44.74625
3	39.85664	42.47673
4	40.19513	41.99729
5	41.04134	42.27522
6	34.49622	34.58878
7	37.48703	35.27068
8	35.65176	35.55463
9	33.7154	35.03035
10	34.7379	35.63184
11	36.1581	34.90485
12	34.9652	34.91612
13	35.9877	36.1464
14	33.841	33.40817
15	28.9303	31.83273
16	29.9124	31.31479
17	31.8767	33.22693
18	30.9907	28.03655
19	32.1492	30.23299
20	34.0574	30.29037

ภาคผนวก ข
แบบฟอร์มรายงานการเงิน

แบบฟอร์มรายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ

การสร้างตัวแบบเคมีเมตริกซ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาจากใบสอ่งฟ้า (*Clausena harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin) ที่สกัดด้วยน้ำสำหรับเตรียมเป็นชาผงสำเร็จรูป

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.ณิชนันท์ ภิระคำ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 11 กุมภาพันธ์ 2564 ถึง 11 เมษายน 2565

ระยะเวลาการดำเนินการ 1 ปี 2 เดือน ตั้งแต่วันที่ 11 กุมภาพันธ์ 2564 ถึง 11 เมษายน 2565

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 15,000 บาท เมื่อวันที่ 18 มกราคม 2565

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าพืชสมุนไพร	3,500 บาท	2,000 บาท	คงเหลือ 1,500 บาท
2. ค่าอุปกรณ์สำหรับปฏิบัติการ	2,500 บาท	2,000 บาท	คงเหลือ 500 บาท
3. ค่าสารเคมีและวัตถุดิบ	7,000 บาท	8,000 บาท	เกิน 1,000 บาท
4. ค่าโปสเตอร์	500 บาท	1,000 บาท	เกิน 500 บาท
5. ค่าพิมพ์เอกสาร	500 บาท	1,500 บาท	เกิน 1,000 บาท
6. ค่าวิทยานิพนธ์	1,000 บาท	1,000 บาท	พอดี
รวม	15,000 บาท	15,500 บาท	เกิน 500 บาท

งบประมาณส่วนเกินได้รับจาก ภก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย