



ผลของการผสมสารสกัดชาต่อปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
EFFECTS OF TEA EXTRACT BLEND ON PHENOLIC CONTENT AND
ANTIOXIDANT CAPACITY

ภาคิน เตชะกัลยาณิน

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ผลของการผสมสารสกัดชาต่อปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
EFFECTS OF TEA EXTRACT BLEND ON PHENOLIC CONTENT AND
ANTIOXIDANT CAPACITY

ภาคิน เตชะกัลยาณิน

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง



หน้าอนุมัติการค้นคว้าอิสระ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

การค้นคว้าอิสระเรื่อง ผลของการผสมสารสกัดชาต่อปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Effects of Tea Extract Blend on Phenolic Content
and Antioxidant Capacity

ผู้ประพันธ์ ภาคิน เตชะกัลยาณิน

คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง

ประธานกรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรिता สังข์ทอง

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัทวัฒน์ สีขาว

กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรिता สังข์ทอง)

คณบดี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรिता สังข์ทอง ที่มีส่วนในการช่วยให้การศึกษาค้นคว้าวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมไปถึงการให้ความรู้ การให้คำชี้แนะที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับการดำเนินงานวิจัยในส่วนต่าง ๆ การช่วยเหลือและแก้ไขปัญหาดังต่าง ๆ ของการทำวิจัย การดูแลเอาใจใส่ตลอดจนงานวิจัยเสร็จสิ้น อีกทั้งช่วยตรวจสอบและแก้ไขรูปแบบของการศึกษาค้นคว้าอิสระฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์จากสำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงทุกท่าน ที่มีส่วนในการถ่ายทอดความรู้ และให้คำชี้แนะที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ คุณธนัชชา ประเสริฐ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่มีส่วนในการให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ในการปฏิบัติการทดลองสำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณครอบครัวที่สนับสนุนโดยการนำวัตถุดิบมาเพื่อให้ทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ จากสำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่คอยช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้มาโดยตลอดการทำงานวิจัย

ภาคิน เตชะกัลยาณิน

ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ	ผลของการผสมสารสกัดชาต่อปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ผู้ประพันธ์	ภาคิน เตชะกัลยาณิน
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรिता สังข์ทอง

บทคัดย่อ

ชาหลากหลายชนิดมีสารองค์ประกอบที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน การค้นคว้าวิจัยอิสระนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาและวิเคราะห์ผลของการเสริมฤทธิ์ที่ได้จากการผสมสารสกัดชาแต่ละชนิด โดยมีการเตรียมสารสกัดจากชาทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ชาเขียว ชาอู่หลง ชาดำ และ ชาขาว ด้วย 50% เอทานอล ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP รวมไปถึงศึกษาการผสมสารสกัดชา 3 ชนิดที่มีฤทธิ์มากที่สุด เพื่อให้เกิดการเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพ ในงานวิจัยนี้ได้นำผงชาทั้ง 4 ชนิด มาทำการสกัดด้วย 50% เอทานอล อัตราส่วน 1:10 โดยใช้เครื่องเขย่าคลื่นเสียงอัลตราโซนิก (40 kHz) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นกรองด้วยระบบน้ำไหลผ่าน และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดชาในรูปแบบเดี่ยวที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH (IC_{50}) และ FRAP มากที่สุด คือ ชาขาว มีค่าเท่ากับ 750.15 ± 12.54 mg GAE/g extract, 43.409 ± 2.209 μ g/mL และ $9,173.38 \pm 29.47$ mg TEAC/g extract ตามลำดับ สารสกัดชาในรูปแบบผสมที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH (IC_{50}) และ FRAP มากที่สุด คือ การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง มีค่าเท่ากับ 793.08 ± 23.28 mg GAE/g extract, 66.007 ± 11.450 μ g/mL และ $8,337.27 \pm 142.11$ mg TEAC/g extract ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดชาในรูปแบบเดี่ยว และรูปแบบผสมที่ให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด คือ ชาเขียว และ การผสมชาเขียวและชาขาว มีค่าเท่ากับ $11,006.02 \pm 195.94$ และ $18,668.67 \pm 474.24$ mg QE/g extract ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าชาดำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับชาทั้งหมด จึงไม่นำมารวมในการศึกษาการผสมชาในรูปแบบต่าง ๆ ดังนั้น ชาขาว และ การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง มีศักยภาพเป็นสารสกัด

สำคัญที่สามารถเพิ่มมูลค่าในการพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ ช่วยเสริมฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางหรืออุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: ชา, สารประกอบฟีนอลิกรวม, สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม, ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ, การเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพ



Independent Study Title Effects of Tea Extract Blend on Phenolic Content and Antioxidant Capacity

Author Pakin Techakallayanin

Degree Master of Science (Cosmetic Science)

Advisor Assistant Professor Sarita Sangthong, Ph. D.

ABSTRACT

Various types of tea contain different bioactive compounds that exhibit diverse biological activities. This independent research aimed to investigate and analyze the synergistic effects resulting from the combination of different tea extracts. Four types of tea were prepared as extracts using 50% ethanol: green tea, oolong tea, black tea, and white tea. The study examined the total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity using DPPH and FRAP assays. Furthermore, it investigated the combination of the three tea extracts with the highest individual activities to achieve biological synergism. In this research, the four types of tea powder were extracted with 50% ethanol at a ratio of 1:10 using an ultrasonic shaker (40 kHz) at 40 °C for 30 minutes. The extracts were then filtered through a flow-through system and evaporated using a rotary evaporator at 40-50 °C. The results showed that the single tea extract with the highest total phenolic content and antioxidant activity as determined by DPPH (IC_{50}) and FRAP was white tea, with values of 750.15 ± 12.54 mg GAE/g extract, 43.409 ± 2.209 μ g/mL, and $9,173.38 \pm 29.47$ mg TEAC/g extract, respectively. The mixed tea extract with the highest total phenolic content and antioxidant activity as determined by DPPH (IC_{50}) and FRAP was the combination of green tea, white tea, and oolong tea, with values of 793.08 ± 23.28 mg GAE/g extract, 66.007 ± 11.450 μ g/mL, and $8,337.27 \pm 142.11$ mg TEAC/g extract, respectively. Additionally, the single and mixed tea extracts with the highest total flavonoid content were green tea and the combination of green tea and white tea, with values of $11,006.02 \pm 195.94$ and $18,668.67 \pm 474.24$ mg QE/g extract, respectively. The

experimental results indicated that black tea had the lowest total phenolic content, total flavonoid content, and DPPH and FRAP antioxidant activities compared to all other teas. Therefore, black tea was not included in the study of various tea combinations. In conclusion, white tea and the combination of green tea, white tea, and oolong tea have the potential to be important extracts that can add value to product development, enhance antioxidant activity, and can be applied in the cosmetic or other industries in the future.

Keywords: Tea, Phenolic Compounds, Flavonoid Compounds, Antioxidant, Synergistic Effects



สารบัญ

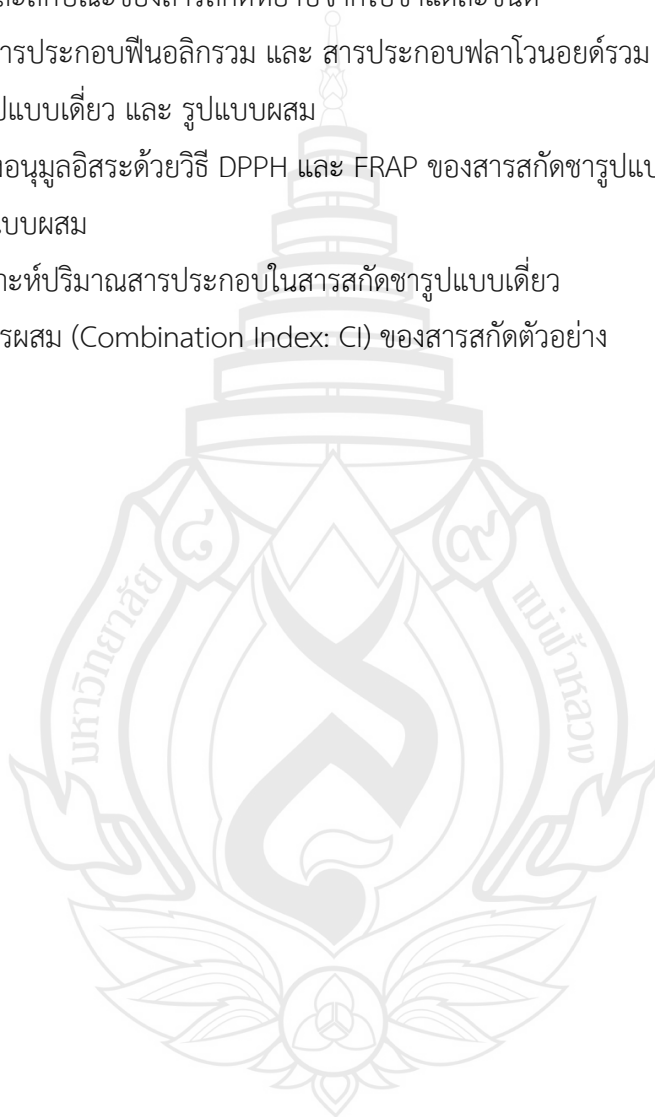
บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
1.1 ที่มาปัญหาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 ชา (<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze)	4
2.2 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)	8
2.3 สารอนุมูลอิสระ (Free Radical)	8
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)	9
2.5 การหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัด	13
2.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	15
2.7 Synergism และ Antagonism	16
3 ระเบียบวิธีวิจัย	20
3.1 สารเคมีและวัตถุดิบ	20
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้	20
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย	21
3.4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ	25
4 ผลของการศึกษาและอภิปรายผล	26
4.1 สารสกัดชา	26
4.2 สารสกัดจากชาด้วยวิธี 50% เอทานอล	27
4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดชา	29
4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดชา	33

สารบัญ

บทที่	หน้า
4.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay	35
4.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP Radical Scavenging Assay	38
4.7 การวิเคราะห์เปรียบเทียบสารประกอบในสารสกัดชาเดี่ยวและสารสกัดชาผสม ด้วยเทคนิค HPLC-QTOF-MS/MS	40
4.8 การผสมสารสกัดชาและทดสอบการเสริมฤทธิ์	45
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	52
5.1 สรุปผลการศึกษาวิจัย	52
5.2 ข้อเสนอแนะ	53
รายการอ้างอิง	54
ภาคผนวก	59
ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐาน	59
ภาคผนวก ข กราฟ IC_{50} ของสารสกัดรูปแบบเดี่ยว และ รูปแบบผสม	61

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ระดับการเสริมฤทธิ์ (Synergistic Level)	19
4.1 ผลผลิตและลักษณะของสารสกัดหยาบจากใบชาแต่ละชนิด	28
4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และ สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และ รูปแบบผสม	32
4.3 การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และ รูปแบบผสม	37
4.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว	42
4.5 ค่าดัชนีการผสม (Combination Index: CI) ของสารสกัดตัวอย่าง	51



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 กระบวนการผลิตของชาแต่ละชนิด	6
2.2 กลไกปฏิกิริยาของ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	10
2.3 กลไกปฏิกิริยาของ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)	12
2.4 แสดงปฏิกิริยาของ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)	12
2.5 กลไกปฏิกิริยาของ 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)	13
2.6 องค์ประกอบของ HPLC	16
2.7 Isobologram ของ การต้านฤทธิ์ การเพิ่มฤทธิ์ และการเสริมฤทธิ์	17
4.1 ลักษณะของใบชาทั้ง 4 ชนิด	26
4.2 ลักษณะของผงชาทั้ง 4 ชนิด	27
4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในสารสกัดชารูปแบบผสม	44
4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TPC และ TFC ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และ รูปแบบผสม	47
4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TPC และ DPPH ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และ รูปแบบผสม	47
4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TPC และ FRAP ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และ รูปแบบผสม	48
4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TFC และ DPPH ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และ รูปแบบผสม	48
4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TFC และ FRAP ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และ รูปแบบผสม	49

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาปัญหาและความสำคัญ

ในปัจจุบันอนุมูลอิสระสามารถพบได้จากปัจจัยภายนอกร่างกาย เช่น แสงแดด ฝุ่นละออง ควัน ความร้อน รังสียูวี และมลพิษต่าง ๆ ซึ่งทำให้อนุมูลอิสระมีการสะสมในร่างกายเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระที่เข้าทำลายโครงสร้างทางชีวภาพจำพวก โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และสารพันธุกรรม เกิดสภาวะไม่สมดุลขึ้น จึงทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อภายในร่างกายของมนุษย์เกิดการเสื่อมสภาพและมีการทำงานที่เปลี่ยนแปลงไป ปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลให้เกิดสภาวะผิดปกติทางสุขภาพซึ่งเป็นภัยคุกคามต่อร่างกายมนุษย์ ร่างกายของมนุษย์เรานั้นมีกระบวนการป้องกันและกำจัดอนุมูลอิสระได้ด้วยตัวเอง โดยอาศัยกระบวนการทำงานของการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกาย (Di Meo & Venditti, 2020; Martemucci et al., 2022)

สารต้านอนุมูลอิสระมักปรากฏภายในอาหารและภายในร่างกายของมนุษย์ โดยมีคุณสมบัติในการช่วยลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยลดสิ่งที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันและกำจัดสิ่งที่จะเกิดขึ้นหลังจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน อีกทั้งยังค้นพบสารกลุ่มฟีนอลในพืช ซึ่งมีศักยภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันตามธรรมชาติ (Gulcin, 2020)

ชาเป็นพืชที่นิยมอย่างมาก และสายพันธุ์ของชาในประเทศไทยได้แบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์ใหญ่ ๆ คือ ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) และ ชาจีน (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) (Tang et al., 2022) ซึ่งนิยมบริโภคกันแพร่หลาย ชาจำแนกได้ 6 ประเภท ตามกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน ได้แก่ ชาเหลือง ชาขาว ชาเขียว ชาอู่หลง ชาแดง และ ชาดำ (Jiang et al., 2019) อาทิเช่น ชาเหลือง เริ่มต้นจากการเก็บใบชาสด การผึ่งชา การนึ่งชา การให้ความร้อนสูง (Sweltering) ซึ่งเป็นกระบวนการที่พบได้ในเพียงชาเหลืองเท่านั้น การนวดชา การอบแห้ง และ ไม่มีกระบวนการหมัก ตามลำดับ สำหรับชาขาวมีกระบวนการผลิตเป็นการเก็บใบชาสด การผึ่งชา การอบแห้ง และ ไม่มีกระบวนการหมัก ชาเขียวมีกระบวนการผลิตเป็น การเก็บใบชาสด การผึ่งชา การนึ่งชา การนวดชา การอบแห้ง และ ไม่มีกระบวนการหมัก ตามลำดับ ชาอู่หลงมีกระบวนการผลิตเป็น การเก็บใบชาสด การผึ่งชา การหมักบางส่วน การนึ่งชา การนวดชา การอบแห้ง การคั่วชา ตามลำดับ ชาแดงมีกระบวนการผลิตเป็น การเก็บใบชาสด การผึ่งชา การหมักแบบสมบูรณ์ การนวด

ชา การอบแห้ง ชาดำมีกระบวนการผลิตเป็น การเก็บใบชาสด การผึ่งชา การนึ่งชา การนวดชา การอบแห้ง การบ่มชา และมีกระบวนการหลังกระบวนการหมัก ตามลำดับ (Vinci et al., 2022)

ชาอุดมด้วยคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน การบรรเทาอาการอักเสบ การเสริมสร้างสุขภาพหัวใจและหลอดเลือด การยับยั้งเซลล์มะเร็ง การปกป้องตับ การควบคุมน้ำหนัก การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด และอื่น ๆ (Shang et al., 2021) ชายังคงไว้ซึ่งสารสำคัญทางชีวภาพนานาชนิด ตัวอย่างเช่น สารกลุ่มโพลีฟีนอล โดยเน้นไปที่สารฟลาโวนอยด์ กรดอะมิโน และสารประกอบกลุ่มฟีนอลอื่น ๆ (Xu et al., 2019) ในปัจจุบัน ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ ได้รับความสนใจในด้านคุณสมบัติ และมีสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตลอดจนสารสำคัญอื่น ๆ ที่พบได้ในชา ชาดำพบสารสำคัญอย่าง Thearubigins (TR) และ Theaflavins (TF) ในปริมาณมาก ชาอู่หลงมี Theasinensins และสารประกอบฟีนอลิกอื่น ๆ ทั้งนี้สารสำคัญที่อยู่ในชาเขียว คือ Epigallocatechin gallate (EGCG) ซึ่งมีปริมาณมากที่สุด, Epicatechin gallate (ECG), Epicatechin (EC) และ Epigallocatechin (EGC) (Koch et al., 2019)

งานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่ กรรมวิธีในการแยกสาร ประสิทธิภาพของการแยกสาร ตัวกลางที่ใช้ในกระบวนการแยกสาร ศักยภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน องค์ประกอบสำคัญที่พบในชา และปัจจัยอื่น ๆ อีกมากมาย (Das et al., 2019; Vural et al., 2020; Imran et al., 2021) การศึกษาของ Rohadi et al. (2019) ได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง พบว่าชาอู่หลงมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลสูงกว่าชาเขียว และชาดำ ชาเขียวมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์โดดเด่น รองลงมาคือ ชาอู่หลงและชาดำ อีกทั้งการศึกษาของ Makanjuola et al. (2015) ได้ทำการศึกษากิจกรรมการผสมผสานของสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อทำให้เกิดผลในการเสริมฤทธิ์กัน จึงได้ศึกษาการผสมสารสกัดของชาและชิง จากนั้นพบว่า สารสกัดชาผสมชิงแสดงผลในการเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic effects) หมายถึง การทำงานร่วมกัน และ ผลลัพธ์ที่ปรากฏอาจกล่าวได้ว่าเป็นการประสานกันที่ก่อให้เกิดผลลัพธ์ที่เหนือกว่าการรวมกันขององค์ประกอบต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญ

ด้วยเหตุนี้ ผู้ทำการศึกษาจึงมีความสนใจสารสกัดชาผสมชา โดยชาทั้ง 4 ชนิดที่นำมาศึกษา ได้แก่ ชาเขียว สายพันธุ์อู่หลงไทย เบอร์ 17 ชาอู่หลง สายพันธุ์จีนแถบพู่เจี้ยน ชาดำจ๊วยเซียน สายพันธุ์จีนแถบพู่เจี้ยน และ ชาขาว สายพันธุ์อัสสัมไทย อนึ่งยังไม่มีการศึกษาใดที่ทำการผสมสารสกัดจากชาทั้ง 4 ประเภทนี้เข้าด้วยกัน งานวิจัยของ Hung et al. (2021), Vural et al. (2020) และ Imran et al. (2021) กล่าวว่า สารละลายเอทานอล 50% ให้ผลลัพธ์การแยกสารที่ดีเยี่ยมที่สุด ทั้งนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการสกัดใบชาด้วย 50% เอทานอล และ เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดด้วยปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และ ชนิดของสารองค์ประกอบต่าง ๆ รวมไปถึงการเปรียบเทียบจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-

picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) radical scavenging assay

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อเตรียมสารสกัดชาทั้ง 4 ชนิดและวิเคราะห์สารสำคัญ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก รวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ FRAP radical scavenging assay

1.2.2 เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ผลของการเสริมฤทธิ์ที่ได้จากการผสมสารสกัดชาแต่ละชนิด

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1.3.1 การเตรียมสารสกัดจากชาทั้ง 4 ประเภท ได้แก่ ชาเขียว ชาอู่หลง ชาดำ และ ชาขาว ด้วย 50% เอทานอล

1.3.2 วิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดชา ได้แก่ วิเคราะห์สารองค์ประกอบด้วยเทคนิค HPLC สารประกอบฟีนอลิกรวม และ สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

1.3.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาด้วยหลากหลายวิธี ได้แก่ DPPH radical scavenging assay และ FRAP radical scavenging assay

1.3.4 การผสมสารสกัดชา 2-3 ชนิดที่มีฤทธิ์มากที่สุดเพื่อให้เกิดการเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพ (Synergistic effect)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลลัพธ์จากการศึกษานี้ได้มาซึ่งสารสกัดผสมจากชาที่มีศักยภาพสูง เหมาะสมอย่างยิ่ง สำหรับการประยุกต์ใช้เป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์เสริมความงาม และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับผู้สนใจศึกษาต่อยอดหรือพัฒนาเพิ่มเติมในภายภาคหน้า

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ชา (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)

2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของชา

ต้นชามีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze เป็นพืชในวงศ์ Theaceae ซึ่งโดยทั่วไปสายพันธุ์ของชาในประเทศไทยได้แบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์ใหญ่ ๆ คือ ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) ซึ่งมีใบชาขนาดใหญ่ และ ชาจีน (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) ซึ่งมีใบชาขนาดเล็กและขนาดปานกลาง (Tang et al., 2022)

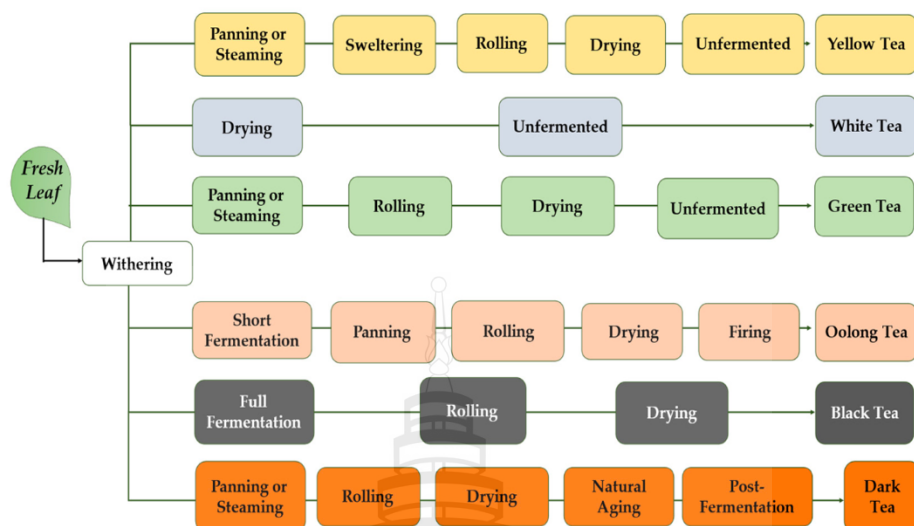
ชาอัสสัมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* var. *assamica* ซึ่งมีลักษณะเป็นลำต้นเดี่ยวที่มีขนาดใหญ่ สูงประมาณ 6 ถึง 18 เมตร ประกอบด้วยใบเดี่ยวสีเขียวอ่อนที่มีขนาดใหญ่ แผ่นใบโปนเป็นคลื่น ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ปลายใบแหลม การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับและเกลียว ต้นเจริญเติบโตเร็วจึงทำให้มีผลผลิตมากกว่าชาจีน ปลูกดูแลง่าย ทนแล้ง และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดี (สถาบันชาและกาแฟ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง, ม.ป.ป.)

ชาจีนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* var. *sinensis* ซึ่งมีลักษณะลำต้นเป็นพุ่มเตี้ย สูงประมาณ 2-6 เมตร ประกอบด้วยใบขนาดเล็ก ยาวแคบ ตั้งตรง มีสีเขียวเข้ม ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ผิวใบเรียบและค่อนข้างตั้งกว่าชาอัสสัม การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับและเกลียว ต้นเจริญเติบโตช้าและจำเป็นต้องดูแลรักษาในเรื่องการปลูกมากกว่าชาอัสสัม ทนทานต่อสภาพอากาศหนาวเย็นและสภาพแวดล้อมที่แปรปรวนได้เป็นอย่างดี (สถาบันชาและกาแฟ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง, ม.ป.ป.)

การจำแนกประเภท คุณสมบัติต่าง ๆ คุณภาพ องค์ประกอบทางเคมี ลักษณะเฉพาะทางกลิ่นและสีของชา ซึ่งสิ่งเหล่านี้สอดคล้องกับกระบวนการต่าง ๆ ในการผลิตใบชา ได้แก่ การเก็บเกี่ยว การทำความสะอาดใบชา การเลือกและคัดสรรใบชา การทำให้ใบชาแห้ง การบดและการเก็บรักษาใบชา รวมไปถึงระดับของกระบวนการหมักชา ได้แก่ ไม่มีกระบวนการหมัก กระบวนการหมักบางส่วน กระบวนการหมักทั้งหมด และ หลังกระบวนการหมัก จากกระบวนการผลิตของชาสามารถจำแนกชาชนิดต่าง ๆ ได้เป็น ชาเหลือง ชาขาว ชาเขียว ชาอู่หลง ชาแดง และ ชาดำ (Bortolini et al., 2021)

2.1.2 กระบวนการผลิตชา

ในกระบวนการผลิตชาแต่ละประเภทมีขั้นตอนในการผลิต ได้แก่ การเก็บใบชา (tea plucking) การผึ่งชา (withering) การนึ่งชา (steaming) การคั่วชา (firing) การนวดชา (rolling) การหมักชา (fermentation) โดยแบ่งออกเป็น 4 ประเภท ได้แก่ ไม่มีกระบวนการหมัก (unfermented) การหมักบางส่วน (short fermentation) การหมักแบบสมบูรณ์ (full fermentation) หลังกระบวนการหมัก (post-fermentation) การอบแห้ง (drying) การให้ความร้อนสูง (sweltering or yellowing only yellow tea) การบ่มชา (aging) (Bortolini et al., 2021) ซึ่งกระบวนการผลิตชาสามารถจำแนกประเภทชาได้หลากหลายชนิดตามรูปแบบด้านล่างนี้ โดยชาเหลือง เริ่มต้นจากการเก็บใบชาสด การผึ่งชา การนึ่งชา การให้ความร้อนสูง (sweltering) ซึ่งเป็นกระบวนการที่พบได้ในเพียงชาเหลืองเท่านั้น การนวดชา การอบแห้ง และ ไม่มีกระบวนการหมัก ตามลำดับ สำหรับชาขาวมีกระบวนการผลิตเป็นการเก็บใบชาสด การผึ่งชา การอบแห้ง และ ไม่มีกระบวนการหมัก ชาเขียวมีกระบวนการผลิตเป็น การเก็บใบชาสด การผึ่งชา การนึ่งชา การนวดชา การอบแห้ง และ ไม่มีกระบวนการหมัก ตามลำดับ ชาอู่หลงมีกระบวนการผลิตเป็น การเก็บใบชาสด การผึ่งชา การหมักบางส่วน การนึ่งชา การนวดชา การอบแห้ง การคั่วชา ตามลำดับ ชาแดงมีกระบวนการผลิตเป็น การเก็บใบชาสด การผึ่งชา การหมักแบบสมบูรณ์ การนวดชา การอบแห้ง ชาดำมีกระบวนการผลิตเป็น การเก็บใบชาสด การผึ่งชา การนึ่งชา การนวดชา การอบแห้ง การบ่มชา และ มีกระบวนการหลังกระบวนการหมัก ตามลำดับ (Vinci et al., 2022) โดยประเภทชาที่นำมาใช้งานวิจัย ได้แก่ ชาเขียว ชาดำ ชาอู่หลง และ ชาขาว



ที่มา Vinci et al. (2022)

ภาพที่ 2.1 กระบวนการผลิตของชาแต่ละชนิด

2.1.3 สารสำคัญที่พบในชา

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถพบได้ในชา คือ โพลีฟีนอล (polyphenols) โดยส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ flavones, flavanones, isoflavones, flavonols, flavanols และ anthocyanins ทั้งนี้ฟลาโวนอยด์ที่พบมากที่สุดในการชา คือ ฟลาวานอล (flavanols) ซึ่งเรียกว่า คาเทชิน (catechins) โดยมีประมาณ 60-70% ของโพลีฟีนอลทั้งหมด กลุ่มของ คาเทชินที่พบมากในชา อาทิเช่น (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG) และ (-)-Epicatechin (EC) กลุ่มของ Catechins ที่พบในปริมาณน้อยลงมา ได้แก่ (-)-Gallocatechin (GC), (+)-Catechin (C), (-)-Gallocatechin gallate (GCG) และ (-)-Catechin gallate (CG) (สถาบันชาและกาแฟ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง, ม.ป.ป.)

เอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) ที่พบภายในชาอู่หลงและชาดำ มีส่วนช่วยในการเร่งปฏิกิริยา oxidation และ polymerization ของคาเทชินจึงทำให้เปลี่ยนเป็นสารโพลีฟีนอลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ได้แก่ theaflavins และ thearubigins ซึ่งเป็นกลุ่มของโพลีฟีนอลที่พบมากในชาหมัก โดยชาที่ผ่านการหมักอย่างสมบูรณ์จะพบ thearubigins ในปริมาณมาก (สถาบันชาและกาแฟ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง, ม.ป.ป.)

2.1.4 งานวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับชา

จากการศึกษาการสกัดชาเขียวด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกันได้มีการใช้สารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยง่ายถึง 267 ชนิดเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการสกัด ซึ่งการสกัดด้วยวิธี Ultra-sonication ได้ 212 ชนิด การสกัดด้วยวิธีการเขย่า (agitation) ได้ 201 ชนิด การสกัดโดยการใช้น้ำร้อน (hot water) ได้ 103 ชนิด และการสกัดแบบธรรมดาด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ (conventional extraction - maceration, percolation and soxhlet extraction) ได้ 65 ชนิด ทั้งนี้ผลผลิตและวิธีการสกัดชาเขียวที่ได้สารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยง่าย ได้แก่ ultra-sonication และ agitation ซึ่งมีแนวโน้มที่ได้สารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยง่ายในปริมาณมากกว่าวิธีการสกัดแบบใช้น้ำร้อน และแบบธรรมดา ในการศึกษายังได้มีการใช้กรดอะมิโนและกรดอินทรีย์ที่ได้จากการสกัดชาเขียว ผลจากการดอะมิโนที่ใช้วิธีการสกัดที่ต่างกัน อาทิเช่น การสกัดด้วยวิธี ultra-sonication ได้ปริมาณ 54.57 mg/100g การสกัดด้วยวิธีการเขย่า (agitation) ได้ปริมาณ 54.35 mg/100g การสกัดโดยการใช้น้ำร้อน (hot water) ได้ปริมาณ 27.11 mg/100g และการสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้ปริมาณ 12.67 mg/100g ผลจากการดอินทรีย์ที่ใช้วิธีการสกัดที่ต่างกัน อาทิเช่น การสกัดด้วยวิธี ultra-sonication ได้ปริมาณ 5.96 mg/100g การสกัดด้วยวิธีการเขย่า (agitation) ได้ปริมาณ 6.19 mg/100g การสกัดโดยการใช้น้ำร้อน (hot water) ได้ปริมาณ 3.81 mg/100g และ การสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้ปริมาณ 1.68 mg/100g ซึ่งวิธีที่ดีที่สุด คือ ultra-sonication และ ตัวทำละลายที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ 50% เมทานอล ซึ่งให้สารประกอบฟีนอลิกมากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ (Das et al., 2019; Vural et al., 2020)

จากการศึกษาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระและสารสำคัญในชาดำพบว่า การสกัดสารสำคัญที่อยู่ในชาดำได้ใช้ตัวทำละลายถึง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอล และ เมทานอล โดยการศึกษาได้ใช้วิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ร่วมกับตัวทำละลายในการสกัด (ultrasound-assisted extraction) และ การสกัดแบบธรรมดาด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ (conventional solvent extraction) จากการทดลองการสกัดด้วยวิธี ultrasound-assisted extraction และ conventional solvent extraction เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพและให้ปริมาณในการสกัดสารมากที่สุดจากทั้ง 3 ชนิดของตัวทำละลาย จากการทดสอบพบว่าการสกัดชาดำด้วยวิธีการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ร่วมกับตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล และน้ำ ได้ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 915 ± 6.42 , 788 ± 4.49 และ 649 ± 4.21 mg/100 g GAE ตามลำดับ การสกัดชาดำด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ (conventional solvent extraction) ในตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล และ น้ำ ได้ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 894 ± 1.02 , 767 ± 1.09 และ 635 ± 1.2 mg/100 g GAE ตามลำดับ ทั้งนี้การสกัดที่ได้ประสิทธิภาพมากที่สุด คือ วิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ร่วมกับตัวทำละลายในการสกัด (ultrasound-assisted extraction) และ ตัวทำละลายที่ให้ผลลัพธ์ที่

ดีที่สุด คือ 50% เอทานอล ซึ่งให้สารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด และมีผลดังนี้ 50% EtOH > 75% EtOH > 75% MeOH > 50% MeOH > 100% (absolute) MeOH > water > 100% (absolute) EtOH (Vural et al., 2020; Imran et al., 2021)

2.2 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ฟลาโวนอยด์สามารถพบได้ในพืช ผัก ผลไม้ ดอกไม้ และเมล็ดต่าง ๆ ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูง โดยฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชมีคุณสมบัติที่ดีต่อร่างกายมนุษย์ อาทิ ป้องกันโดยการกรองแสงยูวี กำจัดอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species หรือ ROS) และคงทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี (Dias et al., 2021)

ฟลาโวนอยด์แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ flavonols, flavones และ flavanols โดย flavonols ประกอบไปด้วย quercetin, kaempferol, fisetin, isorhamnetin และ myricetin ซึ่งสามารถพบได้ในใบของพืช ผลไม้ และ เมล็ดข้าวต่าง ๆ flavones ประกอบไปด้วย luteolin, apigenin, sinensetin, isosinensetin, nobiletin, tangeretin, galangin และ chrysin ซึ่งสามารถพบได้ในใบ ดอกไม้ และ ผลไม้ต่าง ๆ ในส่วนของ flavanols ประกอบไปด้วย catechin, epicatechin, epicatechin gallate, gallocatechin, epigallocatechin และ epigallocatechin gallate โดย Flavanols สามารถพบได้มากที่สุดในต้นชา (*Camellia sinensis*) (Dias et al., 2021)

ในกระบวนการสกัดได้ใช้วิธีการสกัดแบบธรรมดาด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ การหมักแช่ (maceration) และ การสกัดแบบ soxhlet ซึ่งมีคุณสมบัติในการแยกสารจำพวกฟลาโวนอยด์ได้ และใช้ต้นทุนที่ต่ำในการสกัดสาร ในทางตรงกันข้าม นักวิจัยหลาย ๆ ท่านได้พัฒนาวิธีการสกัดเพื่อทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพเพิ่มมากยิ่งขึ้น โดยได้มีการใช้วิธีการสกัดแบบพิเศษ อาทิ ultrasound-assisted extraction (UAE), microwave-assisted extraction (MAE), supercritical fluid extraction (SFE), and pressurized liquid extraction (PLE) ซึ่งวิธีการเหล่านี้ช่วยเร่งการสกัดสาร และสามารถลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายลงได้ (Dias et al., 2021)

2.3 สารอนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุล ไอออน หรืออะตอมที่เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนออกไปจึงทำให้เกิดความไม่เสถียรของพลังงานขึ้นภายในโมเลกุล ไอออน หรืออะตอม และเกิดปฏิกิริยาการรบกวนที่รุนแรง โดยการขโมยหรือแย่งจับอิเล็กตรอนของโมเลกุลอื่น ๆ จึงส่งผลให้โครงสร้างของโมเลกุลนั้น ๆ

มีการเปลี่ยนแปลงและผิดเพี้ยนไป อนุมูลอิสระสามารถพบได้จากปัจจัยภายนอกในร่างกาย เช่น แสงแดด ฝุ่น ควัน ความร้อน รังสียูวี และอื่น ๆ อีกมากมาย ซึ่งทำให้เกิดการสะสมอนุมูลอิสระในร่างกายเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากความไม่สมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกซิแดนต์ที่ไปทำลายสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก จึงทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อภายในร่างกายของมนุษย์เกิดการเสื่อมสภาพและมีการทำงานที่เปลี่ยนแปลงไป ทั้งหมดนี้สามารถนำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ ภายในร่างกายมนุษย์และยังเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ (Di Meo & Venditti, 2020; Martemucci et al., 2022)

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สำคัญและสามารถพบได้ในอาหารและร่างกายของมนุษย์ ซึ่งช่วยลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และผลกระทบร้ายแรงที่เกิดจากอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species หรือ ROS) อีกทั้งสารต้านอนุมูลอิสระมีส่วนช่วยในการป้องกัน และกำจัดสิ่งที่จะเกิดขึ้นหลังจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยคำจำกัดความของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่มีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species หรือ ROS) ได้โดยตรง หรือสามารถกำจัดโดยทางอ้อมเพื่อควบคุมปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการผลิตอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species หรือ ROS) (Gulcin, 2020)

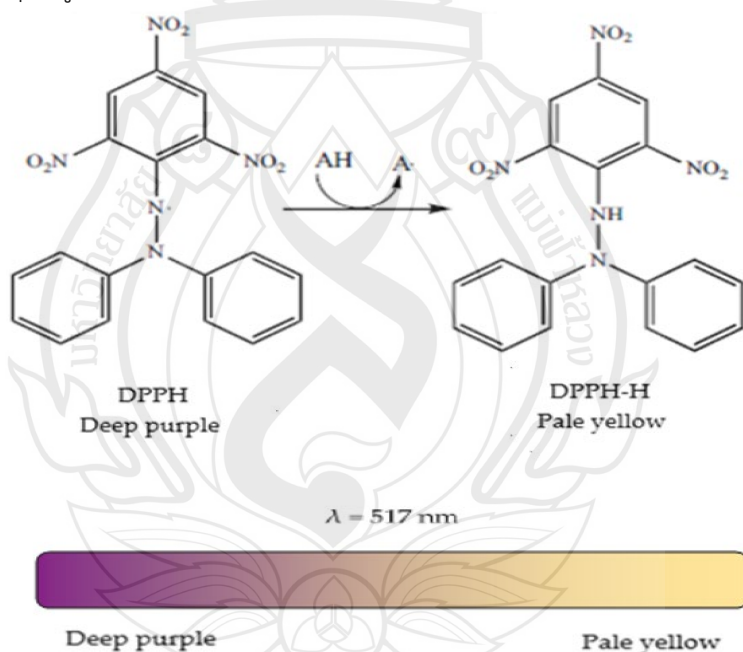
ในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระ อาทิ วิตามินซี วิตามินอี แคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ มักจะถูกเพิ่มเข้าไปในอาหารเพื่อป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ (free radical chain reaction) ซึ่งสามารถยับยั้งตั้งแต่การเริ่มต้นไปจนถึงการสิ้นสุดของกระบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ อีกทั้งสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ เช่น พืช ได้ถูกนำมาใช้เพื่อป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species หรือ ROS) และโรคต่าง ๆ ที่ถูกกระตุ้นโดยอนุมูลอิสระ แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติส่วนใหญ่ล้วนเป็นสารประกอบฟีนอลิกของพืช ซึ่งสามารถพบได้ในทุกส่วนของพืช อาทิเช่น ผลไม้ ผัก เมล็ด ถั่ว ใบ ราก และ เปลือก (Gulcin, 2020)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางโครงสร้างและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสารที่ได้จากพืช ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีส่วนช่วยในการป้องกันสุขภาพของมนุษย์และให้คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อต่าง ๆ ด้านการอักเสบ ด้านสารก่อมะเร็ง ด้านสารการก่อกลายพันธุ์ และอื่น ๆ

สารประกอบฟีนอลิกที่พบมากในพืช ได้แก่ กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ลิกแนน และเทอร์ปีน สามารถช่วยยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ (Gulcin, 2020)

2.4.1 Antioxidant Activity (การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) - DPPH Radical Scavenging Assay

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay เป็นหนึ่งในวิธีดั้งเดิมที่มีประสิทธิภาพสำหรับการวิเคราะห์และประเมินฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้งานง่าย สะดวก รวดเร็ว และยังคงเป็นที่นิยมกันแพร่หลาย การทดสอบด้วย DPPH radical scavenging assay เป็นการวัดความสามารถในการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีต่อ DPPH (Gulcin, 2020) โดยโมเลกุลของ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวและมีสีม่วง เมื่อนำสารละลายของ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารละลายที่สามารถบริจาคไฮโดรเจนอะตอมทำให้สารละลายสีม่วงจางลงจนกลายเป็นสีเหลืองอ่อนในที่สุด ซึ่งการกำจัดอนุมูลอิสระแสดงเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งสูงสุดอยู่ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Hasanaha & Hilmaa, 2016)



ที่มา Munteanu and Apetrei (2021)

ภาพที่ 2.2 กลไกปฏิกิริยาของ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำให้สามารถคำนวณค่า % radical scavenging activity ดังสมการ

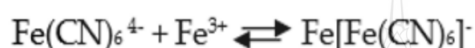
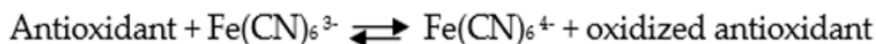
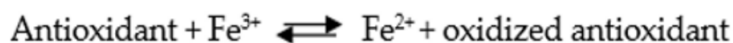
$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = \{(A \text{ control} - A \text{ sample}) \div A \text{ control}\} \times 100$$

โดยที่ A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงควบคุม A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (Baliyan et al., 2022) การทำวิธี DPPH radical scavenging assay ให้ผลลัพธ์เป็นฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ซึ่งแสดงเป็นค่า IC_{50} (inhibition concentration at 50%) คือ ค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% จึงส่งผลให้ค่าการดูดซึมของ DPPH ลดลง 50 % เมื่อค่า IC_{50} อยู่ในระดับต่ำจึงอนุมานได้ว่า ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น (Akar et al., 2017; Gulcin, 2020; Jug et al., 2021)

2.4.2 Antioxidant Activity (การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) - FRAP Radical Scavenging Assay

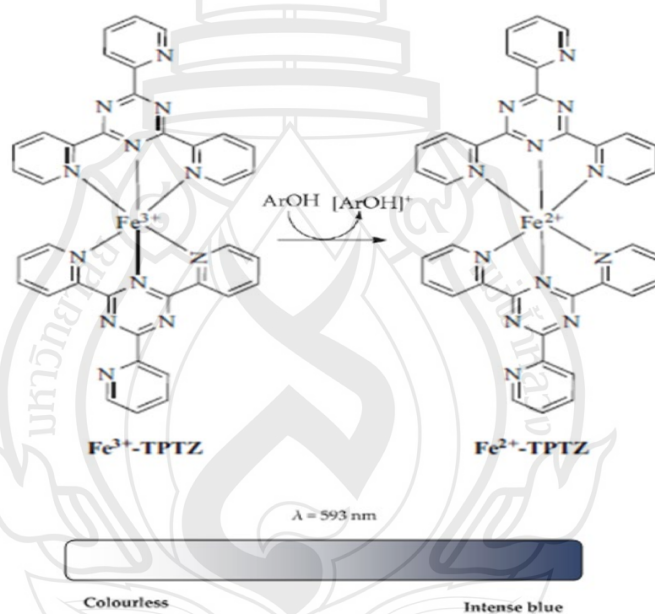
Ferric reducing antioxidant power (FRAP) radical scavenging assay เป็นวิธี SET-based method ทั่วไปที่ใช้วัดการลดความเข้มข้นของเฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) ไปสู่เฟอร์รัสไอออนที่มีสีน้ำเงินเข้ม (Fe^{2+}) โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระของสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด ในกระบวนการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจาก FRAP แสดงการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร และ ผลลัพธ์ที่ได้แสดงเป็นค่าเทียบเท่าไมโครโมลาร์ของเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) หรือสัมพันธ์กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน การทดสอบของ FRAP สามารถดำเนินการในสภาวะที่เป็นกรดได้ ซึ่ง pH อยู่ที่ 3.6 เพื่อรักษาความสามารถในการละลายของธาตุเหล็ก (Munteanu & Apetrei, 2021)

ปัจจุบันในการทดสอบของ FRAP ได้นำ potassium ferricyanide ซึ่งเป็น ferric reagent ที่มีการใช้เป็นตัวทดสอบมากที่สุด โดยสีปรัสเซียนบลูเป็นผลลัพธ์ขั้นตอนสุดท้ายจากการทดสอบเชิงปริมาณทางสเปกโตรโฟโตเมตริก และสามารถบ่งบอกได้ถึงการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาทดสอบ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสามารถลด Fe^{3+} ในสารละลายให้กลายเป็น Fe^{2+} โดยการเข้าไปจับ ferricyanide เพื่อให้ได้สีปรัสเซียนบลู และสามารถลด ferricyanide ให้กลายเป็น ferrocyanide โดยการเข้าไปจับ Fe^{3+} ที่เป็นโมเลกุลอิสระ ซึ่งอยู่ในสารละลายเพื่อให้เกิดสีปรัสเซียนบลูในที่สุด (Munteanu & Apetrei, 2021)



ที่มา Munteanu and Apetrei (2021)

ภาพที่ 2.3 กลไกปฏิกิริยาของ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)



ที่มา Munteanu and Apetrei (2021)

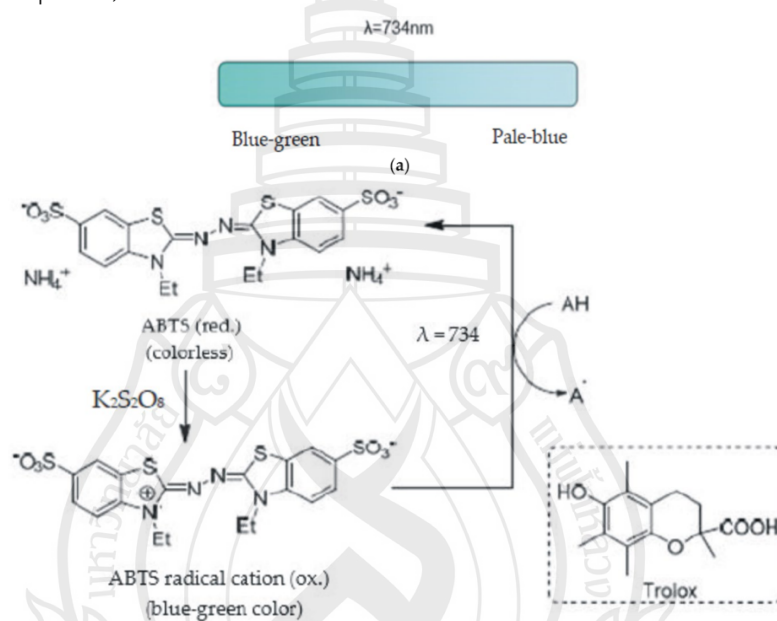
ภาพที่ 2.4 แสดงปฏิกิริยาของ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

2.4.3 Antioxidant Activity (การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) - ABTS Radical Scavenging Assay

2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging assay เป็นการทดสอบเพื่อวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้าน 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร และมีลักษณะเป็นสีน้ำเงินเขียวสามารถดูดซับได้สูงสุดอยู่ที่ 734 นาโนเมตร ทั้งนี้อนุมูลอิสระ ABTS สามารถละลาย

ได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำให้กำหนดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบที่ขบบน้ำและน้ำมันได้ (Munteanu & Apetrei, 2021)

กระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS สามารถทำการประเมินค่า pH ในช่วงที่กว้างมาก จึงได้นำมาใช้ในการศึกษาผลของค่า pH ต่อกลไกการต้านอนุมูลอิสระในส่วนประกอบของอาหารหลากหลายชนิด ในกระบวนการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจาก ABTS แสดงการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ซึ่งปัจจุบัน Potassium persulphate เป็นสารออกซิแดนท์ที่มีการใช้มากที่สุดสำหรับการสร้าง $ABTS^{+}$ (Munteanu & Apetrei, 2021)



ที่มา Munteanu and Apetrei (2021)

ภาพที่ 2.5 กลไกปฏิกิริยาของ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

2.5 การหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัด

2.5.1 Total Phenolic Content

วิธี Folin-Ciocalteu ได้ถูกนำมาใช้ในการหาสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดต่าง ๆ โดยนำสารสกัดที่ต้องการศึกษามาทำการเจือจาง (1:100) กับตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดที่เจือจางเรียบร้อยแล้ว ปริมาณ 1 มล. ผสมกับ FC reagent ที่เจือจาง (1:100) ด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 5 มล. ในหลอดทดลองและทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นนำสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7.5%, w/v) ปริมาณ 5 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองและผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมทั้งหมดที่อยู่ในหลอดทดลองไว้ในที่มืดเป็น

เวลา 1 ชม. หลังจากครบ 1 ชม. นำส่วนผสมทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer และได้ใช้เมทานอลเป็นตัวควบคุม จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ซึ่งค่าของสารประกอบฟีนอลิกรวมจะแสดงเป็นค่ากรัม ของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อ กิโลกรัมของสารสกัด (g GAE/kg) (Imran et al., 2021; Rajapaksha & Shimizu, 2022)

จากการศึกษาการเปรียบเทียบสารต้านอนุมูลอิสระในชาขาว ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ พบว่า การใช้เอทานอลสกัดและให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด คือ ชาอู่หลง และตามมาด้วย ชาเขียว ชาขาว และ ชาดำ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 31.93 ± 0.49 , 30.89 ± 0.01 , 29.93 ± 0.04 และ 25.67 ± 0.01 g-GAE/100g ตามลำดับ โดยการศึกษาเบื้องต้นได้มีการใช้ตัวทำละลาย 70% เมทานอล ในการสกัดชาขาว ชาเขียว ชาดำ และผลที่ได้ คือ 21.54 %, 19.18% และ 16.5% ตามลำดับ (Rohadi et al., 2019)

จากการศึกษาปริมาณคาเทชินของสารสกัดต้นชาพบว่า การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ อาทิ น้ำ 10% เอทานอล 50% เอทานอล และ 95% เอทานอล ซึ่งได้สารประกอบฟีนอลิกรวมเป็น 121.2 ± 3.9 , 153.3 ± 6.0 , 161.3 ± 8.5 และ 126.9 ± 3.8 mg GAE/L ตามลำดับ ทั้งนี้การสกัดด้วย 50% เอทานอล แสดงให้เห็นถึงค่าของสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด (Hung et al., 2021)

2.5.2 Total Flavonoid Content

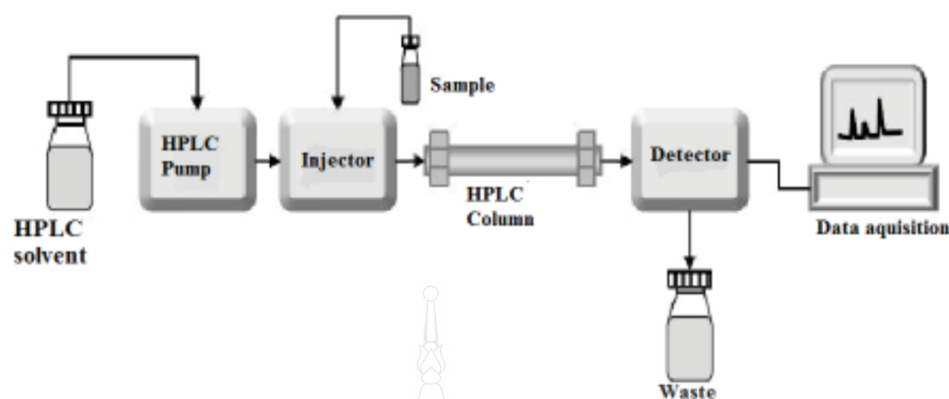
Calorimetric method ได้ถูกนำมาใช้ในการหาสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจากสารสกัดต่าง ๆ โดยเตรียมสารสกัด 4 มก. ผสมรวมกับเมทานอลปริมาณ 4 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มล. ในเวลาเดียวกัน เตรียมสารละลาย 5% NaNO_3 , 5% NaOH และ 7% AlCl_3 โดยใช้น้ำซึ่งใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. เริ่มแรกนำสารสกัดปริมาณ 300 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ 75 ไมโครลิตรของ 5% NaNO_3 และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ 7% AlCl_3 ปริมาณ 1.25 มล. และ 5% NaOH ปริมาณ 0.5 มล. ใส่รวมกับสารละลายก่อนหน้าที่ได้เตรียมเอาไว้ และทำการโซนิเคชันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้น นำส่วนผสมที่เตรียมไว้และสารละลายมาตรฐานไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer และได้ใช้เมทานอลเป็นตัวควบคุม จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ซึ่งค่าของสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจะแสดงเป็นค่า ไมโครกรัม ของ quercetin equivalent (QE) ต่อสารสกัด 1 กรัม (Hossain et al., 2019)

จากการศึกษาการเปรียบเทียบสารต้านอนุมูลอิสระในชาขาว ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ พบว่า ชาเขียวมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด ตามมาด้วย ชาอู่หลง ชาขาว และ ชาดำ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 17.52 ± 0.42 , 16.44 ± 0.53 , 15.60 ± 0.58 และ 14.73 ± 0.36 g-QE/100g ตามลำดับ (Rohadi et al., 2019)

จากการศึกษาปริมาณ catechin ของสารสกัดจากต้นชาพบว่า การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ น้ำ 10% เอทานอล 50% เอทานอล และ 95% เอทานอล ซึ่งสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมอยู่ที่ 218.4 ± 4.0 , 269.5 ± 14.8 , 278.9 ± 12.2 และ 271.1 ± 28.3 mg QE/L ตามลำดับ ทั้งนี้การสกัดด้วย 50% เอทานอล แสดงให้เห็นถึงค่าของสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด (Hung et al., 2021)

2.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ปัจจุบัน High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ได้รับความนิยมอย่างมาก และเป็นหนึ่งในเครื่องมือที่ดีที่สุดในสาขาเคมีวิเคราะห์ ซึ่งมีความสามารถในการแยก ระบุ และหาปริมาณสารประกอบหลากหลายชนิดที่มีอยู่ในตัวอย่างใด ๆ ที่สามารถละลายในของเหลวได้ โดยวิธีนี้ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ในหลากหลายแขนงสาขา อาทิ อุตสาหกรรมยา เทคโนโลยีชีวภาพ สิ่งแวดล้อม โพลีเมอร์ และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น HPLC สามารถทำได้โดยการฉีดตัวอย่างของเหลวในปริมาณเล็กน้อยเข้าไปในกระแสของเหลวเคลื่อนที่ เรียกว่า ระยะเวลาเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ที่อุดมไปด้วยอนุภาคของระยะคงที่ (stationary phase) โดยการแยกส่วนผสมออกเป็นส่วนประกอบแต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่แตกต่างกันของแต่ละองค์ประกอบในคอลัมน์ HPLC เป็น Liquid Chromatography ประเภทหนึ่ง ซึ่ง Reversed-phase HPLC เป็นประเภทของ HPLC ที่พบมากที่สุด โดยปกติระยะเวลาเคลื่อนที่ (mobile phase) ของ HPLC ค่อนข้างไม่มีขั้ว และ ระยะคงที่ (stationary phase) ค่อนข้างมีขั้ว ในทางกลับกัน Reversed-phase HPLC คือ ระยะเวลาเคลื่อนที่ (mobile phase) ของ HPLC ค่อนข้างมีขั้ว และ ระยะคงที่ (stationary phase) ค่อนข้างไม่มีขั้ว ทั้งนี้กระบวนการ HPLC เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่แม่นยำที่สุดที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ยา และสามารถบ่งบอกความเสถียรของผลิตภัณฑ์ยาได้ (Ali, 2022)

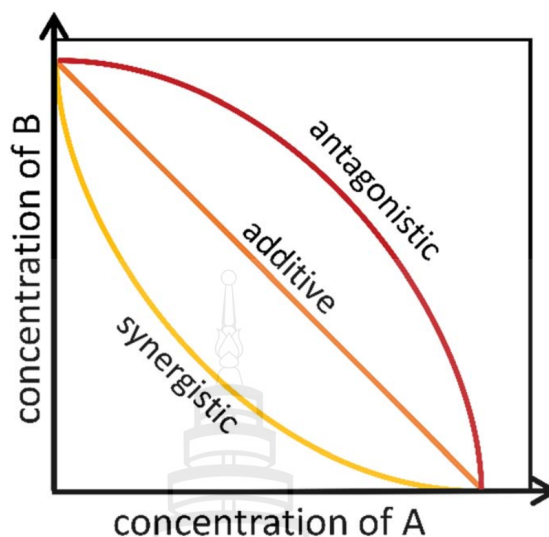


ที่มา Ali (2022)

ภาพที่ 2.6 องค์ประกอบของ HPLC

2.7 Synergism และ Antagonism

การทำงานร่วมกัน หรือ การเสริมฤทธิ์ (synergy หรือ synergism) ซึ่งมาจากคำในภาษากรีก "syn-ergo" หมายถึง การทำงานร่วมกัน และ ผลลัพธ์ที่ได้ทำนายได้ว่าเป็นการรวมกันที่มากกว่าผลรวมของส่วนต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญ การเพิ่มฤทธิ์หรือการประเมนผลรวม (additive หรือ summative) สามารถเกิดขึ้นได้เมื่อนำสารรวมเข้าด้วยกันจึงทำให้เกิดการปรับปรุงหรือเพิ่มประสิทธิภาพได้ การโต้ตอบเป็นศูนย์หรือไม่มีคำตอบได้ (noninteractive หรือ zero interaction) คือ การตอบสนองเมื่อสาร 2 ตัวมารวมกันและไม่แสดงผลเชิงบวกหรือเชิงลบต่อกัน การต่อต้านกัน หรือ การต้านฤทธิ์กัน (antagonism) เป็นปรากฏการณ์ที่สารตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไปรวมกันทำให้มีผลกระทบโดยรวมน้อยกว่าผลรวมของผลกระทบเชิงเดี่ยว (van Vuuren et al., 2011) ทั้งนี้การเพิ่มฤทธิ์ (additive) บ่งชี้ให้เห็นว่าผลรวมของสารทั้งสองเป็นผลรวมบริสุทธิ์ ในขณะที่ การเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน (antagonistic) ส่งผลให้มีผลที่น้อยกว่าการเพิ่มฤทธิ์ (additive) ปฏิปักษ์เชิงบวก หรือ การทำงานร่วมกัน (synergy) จะเกิดขึ้นต่อเมื่อผลรวมขององค์ประกอบมีมากกว่าผลของการเพิ่มฤทธิ์ (additive) (Caesar & Cech, 2019)



ที่มา Caesar and Cech (2019)

ภาพที่ 2.7 Isobologram ของ การต้านฤทธิ์ การเพิ่มฤทธิ์ และการเสริมฤทธิ์

จากการศึกษา “Combination of Antioxidants from Different Sources Could Offer Synergistic Benefits: A Case Study of Tea and Ginger Blend” ของ Makanjuola et al. (2015) พบว่า การผสมสารสกัดชาและขิงในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1:1 1:2 และ 2:1 และใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ น้ำ น้ำ-เอทานอล และ เอทานอล ส่งผลให้เกิดการเสริมฤทธิ์กัน (synergism) ของ ABTS radical activity ยกเว้นการสกัดโดยใช้เอทานอลของสารสกัดชา-ขิงที่อัตราส่วน 1:2 ที่มีการต้านฤทธิ์กัน (antagonism) ในส่วนของ DPPH radical activity สารสกัดชาผสมขิงส่วนใหญ่ให้ผลลัพธ์เป็นการเสริมฤทธิ์กัน (synergism) ยกเว้นการสกัดด้วยน้ำของสารสกัดชา-ขิงที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 สำหรับ Peroxide scavenging effect สารสกัดชาผสมขิงทั้งหมดส่งผลให้เกิดการเพิ่มฤทธิ์กัน (additive) ยกเว้นเพียงแค่การสกัดโดยใช้เอทานอลของสารสกัดชา-ขิงที่อัตราส่วน 1:2 ที่มีการต้านฤทธิ์กัน (antagonism) ในส่วนของ Iron chelating effect การสกัดโดยใช้เอทานอลของสารสกัดชา-ขิงที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 ทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์กัน (synergism) ในขณะที่สารสกัดชา-ขิงในอัตราส่วนอื่น ๆ นั้นเกิดการเพิ่มฤทธิ์กัน (additive) โดยสรุปแล้วการผสมสารสกัดของชาและขิงส่วนใหญ่แสดงให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์กัน (synergism) และการเพิ่มฤทธิ์กัน (additive)

การสกัดด้วยเอทานอลของสารสกัดชาผสมขิงพบว่า มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC) สูงที่สุด โดยสารสกัดชา-ขิงในอัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมอยู่ที่ 886.7, 803.3 และ 611.7 mg CE/ L ตามลำดับ สารสกัดชา-ขิงในอัตราส่วน 2:1, 1:2 และ 1:1 มีค่า DPPH radical activity อยู่ที่ 86.7%, 75.4% และ 62.8% ตามลำดับ ในขณะที่การสกัดด้วยน้ำของสารสกัดชาผสม

จึงพบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) และ peroxide scavenging effect (PS) สูงที่สุด โดยสารสกัดชา-ชิงในอัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 มีปริมาณฟีนอลิกรวมเป็น 219.8, 170.7 และ 169.5 mg GAE/ L ตามลำดับ อีกทั้ง สารสกัดชา-ชิงในอัตราส่วน 1:1, 2:1 และ 1:2 มีค่า peroxide scavenging อยู่ที่ 95.7%, 92.4% และ 91.1% ตามลำดับ (Makanjuola et al., 2015)

การคำนวณค่าการเสริมฤทธิ์ (synergist) และการจัดระดับของผลการเสริมฤทธิ์ (synergistic level) เป็นกระบวนการที่ใช้ในการประเมินผลของการผสมผสานสารเคมีหรือยาหลายชนิดเข้าด้วยกัน เพื่อวิเคราะห์ว่าการรวมกันนั้นส่งผลให้ฤทธิ์ของสารเพิ่มขึ้น (synergy) เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารแต่ละชนิดเมื่อใช้แยกกันหรือไม่ โดยการคำนวณค่าการเสริมฤทธิ์ได้อิงมาจากวิธีของ Chou-Talalay Method ซึ่งวิธี Chou-Talalay ถือเป็นหนึ่งในวิธีที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการตรวจวิเคราะห์และประเมินเชิงปริมาณของปฏิกิริยาการเสริมฤทธิ์ระหว่างยาอย่างน้อยสองชนิดขึ้นไป โดยหนึ่งในวิธีที่ได้รับความนิยมในการประเมินผลการเสริมฤทธิ์กันของสารสองชนิด คือ ดัชนีการผสม (Combination Index: CI) ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Chou และ Talalay ทั้งนี้หลักการพื้นฐานอยู่บนทฤษฎีปริมาณและผล (Median-Effect Principle) โดยสามารถคำนวณค่า CI ได้จากสูตรดังนี้ (Roell & Motsinger-Reif, 2017)

$$CI = \frac{D_1}{E_1} + \frac{D_2}{E_2}$$

โดยที่ :

D_1 และ D_2 หมายถึง ปริมาณยาที่ใช้จริงในการทดลองแบบผสม

E_1 และ E_2 หมายถึง ค่าทางทฤษฎีของปริมาณยาของแต่ละชนิดที่คาดว่าจะต้องใช้ เพื่อให้เกิดระดับการตอบสนองที่สอดคล้องกับผลที่สังเกตได้จากการทดลอง

ทั้งนี้ค่าดัชนี CI ที่น้อยกว่า 1 บ่งชี้ถึงฤทธิ์เสริมกันของยา (synergism) ค่าที่มากกว่า 1 แสดงถึงฤทธิ์ต้านกัน (antagonism) และ ค่าที่เท่ากับ 1 สะท้อนถึงฤทธิ์รวมกันแบบเพิ่มพูน (additivity) (Ma & Motsinger-Reif, 2019)

ตารางที่ 2.1 ระดับการเสริมฤทธิ์ (Synergistic Level)

ช่วงค่า CI	การแปลผล
$CI < 1$	ฤทธิ์เสริมกัน (synergism)
$CI = 1$	ฤทธิ์รวมกันแบบเพิ่มพูน (additivity)
$CI > 1$	ฤทธิ์ต้านกัน (antagonism)

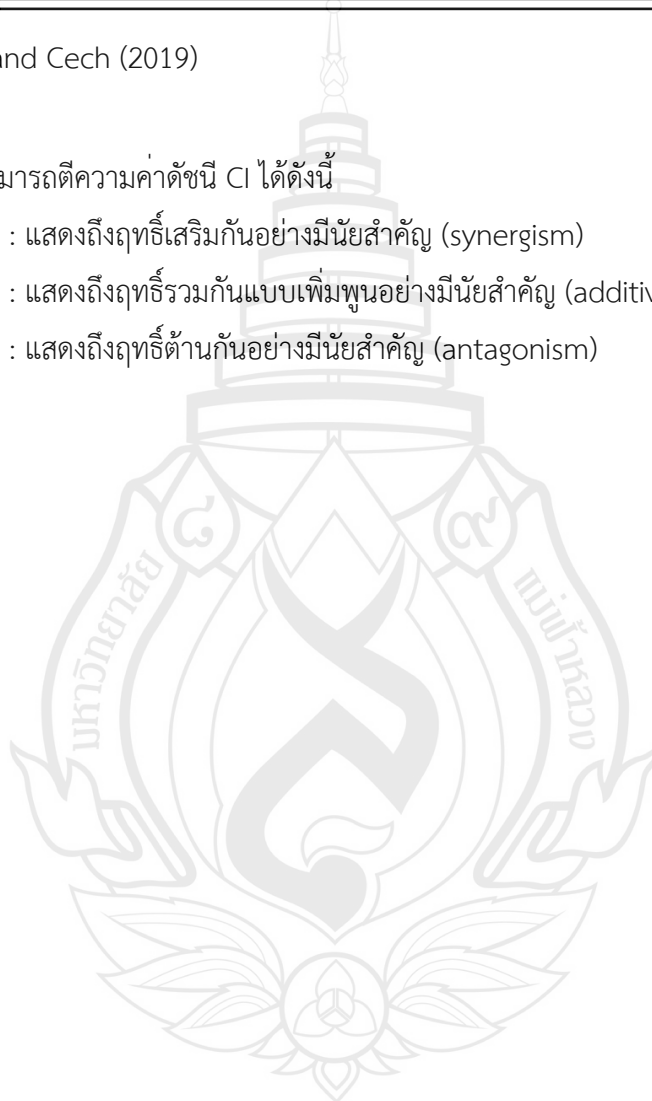
ที่มา Caesar and Cech (2019)

โดยสามารถตีความค่าดัชนี CI ได้ดังนี้

$CI < 1$: แสดงถึงฤทธิ์เสริมกันอย่างมีนัยสำคัญ (synergism)

$CI = 1$: แสดงถึงฤทธิ์รวมกันแบบเพิ่มพูนอย่างมีนัยสำคัญ (additivity)

$CI > 1$: แสดงถึงฤทธิ์ต้านกันอย่างมีนัยสำคัญ (antagonism)



บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สารเคมีและวัตถุดิบ

3.1.1 ผงใบชา	จังหวัดกรุงเทพ
3.1.2 DI water	J.T baker
3.1.3 Ethanol	Merck, Germany
3.1.4 Gallic acid	Merck, Germany
3.1.5 Folin-Ciocalteu's reagent	Merck, Germany
3.1.6 Quercetin	Sigma-Aldrich, USA
3.1.7 Sodium Carbonate	Merck, Germany
3.1.8 Sodium Nitrite	Merck, Germany
3.1.9 Aluminum Chloride	Sigma-Aldrich, Germany
3.1.10 Sodium hydroxide (NaOH)	Supelco, Germany
3.1.11 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	Sigma, China
3.1.12 Trolox	CARLO ERBA, France
3.1.13 FRAP reagent	Supelco, Germany
3.1.14 Sodium acetate	Supelco, Germany
3.1.15 TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl-5-Triazine))	Sigma-Aldrich, Germany
3.1.16 Iron (III) chloride (FeCl ₃)	Supelco, Germany

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

3.2.1 เครื่องปั่นละเอียด	Hong Li, China
3.2.2 ตะแกรงร่อนมาตรฐาน (Sieve) ขนาด 40 mesh	China
3.2.3 เครื่องเขย่าคลื่นความถี่สูง (Sonicator)	CREST/ รุ่น 690DAE, Malaysia

3.2.4 เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator)	Heidolph/BathHei- VAPcore/ Rotovac Valve Tec and EYELA/BathOSB-2000/A-1000S
3.2.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Microplate reader)	BMGlabtech/FLUOstar OMEGA
3.2.6 กระดาษกรอง (Filter Papers)	Whatman, England
3.2.7 Micropipettes	OHAUS, USA
3.2.8 เครื่องชั่งตวงวัด 2 ตำแหน่ง	Percisa/ XB 2200C, Switzerland
3.2.9 ตู้แช่อุณหภูมิตั้งที่ 4 องศา	Haier, China
3.2.10 เครื่อง Filter suction	Duran, Germany
3.2.11 เครื่องเขย่าสาร (Vortex)	OHAUS, USA

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างจากใบชาทั้ง 4 ชนิด

เตรียมใบชาทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ชาเขียว สายพันธุ์อุหลงไทย เบอร์ 17 ชาอุหลง สายพันธุ์จินแถบฟูเจี้ยน ชาดำจ๊วยเซียน สายพันธุ์จินแถบฟูเจี้ยน และ ชาขาว สายพันธุ์อัสสัมไทย มาจาก บริษัท ลิ้มเมี่ยง จำกัด (LIM MIA KEE COMPANY LIMITED) ที่อยู่ 104 ถนนผดุงด้าว แขวงสัมพันธวงศ์ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร 10100 จากนั้นนำใบชาทั้ง 4 ชนิดมาบดละเอียดให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่น และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh เก็บใส่ถุงซิปล็อคเพื่อไม่ให้อากาศเข้าไปด้านใน ห่อด้วยกระดาษฟรอยด์เพื่อป้องกันแสงจากภายนอก และใส่ถุงซิปล็อคไว้ชั้นนอกสุด จากนั้นเก็บไว้ในตู้เก็บความเย็นที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำไปทำการสกัดต่อไป

3.3.2 การเตรียมสารสกัดชาทั้ง 4 ชนิด

นำตัวอย่างผงชาทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ชาเขียว สายพันธุ์อุหลงไทย เบอร์ 17 ชาอุหลง สายพันธุ์จินแถบฟูเจี้ยน ชาดำจ๊วยเซียน สายพันธุ์จินแถบฟูเจี้ยน และ ชาขาว สายพันธุ์อัสสัมไทย มาสกัดด้วย 50% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:10 เขย่าด้วยเครื่องเขย่าคลื่นเสียงอัลตราโซนิก (ultra-sonication) ที่คลื่นความถี่ 40 kHz เพื่อให้สารตัวอย่างกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปกรองผ่านเครื่องกรองด้วยระบบน้ำไหลผ่าน และใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 เป็นตัวกรอง เมื่อได้สารสกัดสีที่ผ่านการกรองแล้วนำไปเข้าเครื่องระเหยสุญญากาศ

แบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เพื่อทำการระเหยแห้ง หลังจากผ่านกระบวนการเหล่านี้จนได้สารสกัดหยาบแล้ว ให้ทำการชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้เพื่อไปคำนวณหา % yield ของสารสกัดแห้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างสารสกัดในตู้เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำสารสกัดไปทำการทดสอบในด้านต่าง ๆ ต่อไป โดยการสกัดซ้ำทั้ง 4 ชนิดต้องทำการสกัดตัวอย่างละ 3 ครั้ง (triplicate)

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric Method

การทดสอบหาสารประกอบฟีนอลิกได้ดัดแปลงวิธีการมาจาก Rahman et al. (2022) โดยเตรียมสารละลาย 95 % เอทานอล 1 mg/mL ของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ และเตรียมสารละลาย 7.5% Na_2CO_3 โดยใช้น้ำ และใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL. เริ่มแรกปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาณ 20 μL ผสมกับ FC reagent ปริมาณ 90 μL ลงในหลุมของไมโครเวลเพลท และตั้งทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตปริมาณ 90 μL และตั้งทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้นำส่วนผสมทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader ซึ่งได้ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมความเข้มข้นให้อยู่ในช่วง 0.1-1 mg/mL จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ซึ่งค่าของสารประกอบฟีนอลิกรวมจะแสดงเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (gallic acid equivalent, GAE) ต่อกรัมของสารสกัด (mg GAE/ g extract) โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณดังสมการ

$$\text{mg GAE/ g extract} = \frac{(\text{Abs } 765 - C) \times \text{dilution factor} \times \text{total volume (ml)} \times \text{volume of extract (ml)}}{\text{slope} \times \text{volume of sample used (ml)} \times \text{weight of extract (g)}}$$

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminum Chloride Colorimetric Method

การทดสอบหาสารประกอบฟลาโวนอยด์ได้ดัดแปลงวิธีการมาจาก Junsathian et al. (2022) โดยเตรียมสารละลาย 95 % เอทานอล 1 mg/mL ของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ในเวลาเดียวกันเตรียมสารละลาย 5% NaNO_2 10% AlCl_3 และ 10% NaOH โดยใช้น้ำในการเตรียมสารละลายเหล่านี้ และใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL. เริ่มแรกปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาณ 45 μL ผสมรวมกับ 36 μL ของ 5% NaNO_2 และตั้งทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที ถัดไปเติม 10% AlCl_3 ปริมาณ 36 μL และตั้งทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ 10% NaOH ปริมาณ 180 μL ใส่รวมกับสารละลายก่อนหน้าที่ได้เตรียมเอาไว้ และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนถึง 300 μL แล้วจึงทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่เตรียมไว้และ

สารละลายมาตรฐานไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader ซึ่งได้ใช้เคอร์เซทิน (quercetin) เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมความเข้มข้นให้อยู่ในช่วง 0.1-1 mg/mL จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ซึ่งค่าของสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจะแสดงเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของเคอร์เซทิน (quercetin equivalent, QE) ต่อกรัมของสารสกัด (mg QE/ g extract) โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณดังสมการ

$$\text{mg QE/ g extract} = \frac{(\text{Abs } 510 - C) \times \text{dilution factor} \times \text{total volume (ml)} \times \text{volume of extract (ml)}}{\text{slope} \times \text{volume of sample used (ml)} \times \text{weight of extract (g)}}$$

3.3.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดชา

3.3.5.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดชาด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดชาด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ได้ดัดแปลงวิธีการจาก Rahman et al. (2022) โดยเตรียมสารละลาย 95 % เอทานอลของ DPPH จากการผสม 2.4 มิลลิกรัมของ DPPH และ 25 มิลลิลิตรของ 95 % เอทานอล เริ่มแรกปิเปต 180 μL ของสารละลาย DPPH ผสมรวมกับ 20 μL ของสารละลายตัวอย่าง (1 mg/mL) ที่ต้องการทดสอบลงในหลุมของไมโครเวลเพลท และบ่มไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader ซึ่งได้ใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน แล้วคำนวณค่า % Scavenging ดังสมการ

$$\% \text{ Scavenging} = \frac{A_{\text{control (Blank)}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control (Blank)}}} \times 100$$

โดยที่ $A_{\text{control (Blank)}}$ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของสารควบคุม

A_{sample} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของสารตัวอย่าง

และคำนวณค่า IC_{50} (inhibition concentration at 50%) โดยนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่าง % scavenging และ ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

3.3.5.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดชาด้วยวิธี FRAP Radical Scavenging Assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดชาด้วยวิธี FRAP radical scavenging assay ได้ดัดแปลงวิธีการจาก Panyatip et al. (2022) โดยการเตรียม FRAP reagent ซึ่งเป็นการผสม 25 mL ของ 300 mM acetate buffer (pH 3.6) และ 2.5 mL ของ 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl และ 2.5 mL ของ 20 mM FeCl₃ solution (สัดส่วน 10:1:1) เริ่มแรกปิเปตสารละลายตัวอย่าง (1 mg/mL) ปริมาณ 20 µL ผสมรวมกับ FRAP reagent ปริมาณ 80 µL ลงในหลุมของไมโครเวลเพลท และตั้งทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader ซึ่งได้ใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำข้อมูลไปสร้างกราฟมาตรฐาน และ คำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลโทรอกซ์ ต่อกรัมของสารสกัด (mg TEAC/g extract) โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณค่าเฉลี่ย

$$\text{mg TEAC/ g extract} = \frac{(\text{Abs } 593 - C) \times \text{dilution factor} \times \text{total volume (ml)} \times \text{volume of extract (ml)}}{\text{slope} \times \text{volume of sample used (ml)} \times \text{weight of extract (g)}}$$

3.3.6 การวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดชาด้วยเทคนิค HPLC-QTOF-MS/MS

การวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดชาด้วยเทคนิค HPLC ได้อ้างอิงวิธีการมาจาก Zhao et al. (2019) ซึ่งเป็นการตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิกและคาเฟอีน โดยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) A และ B เป็นเมทานอล และ ฟอร์มิก 0.1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ กำหนดอุณหภูมิอยู่ที่ 35 °C และ มีอัตราการไหลอยู่ที่ 1.0 มล./นาที การไล่ระดับการชะล้าง หรือ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องถูกตั้งค่าไว้ดังนี้ : 5% A (0 นาที), 20% A (10 นาที), 22% A (15 นาที), 25% A (20 นาที), 40% A (40 นาที), 42% A (50 นาที), 50% A (60 นาที), 95% A (70 นาที), 5% A (70.1 นาที) และ 5% A (75 นาที) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกและคาเฟอีนจากชาได้มีการเปรียบเทียบเวลาในการเก็บรักษา และ สเปกตรัมที่มองเห็นด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV-vis spectra) กับสารประกอบมาตรฐาน ทั้งนี้การวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ดำเนินการตามพื้นที่สูงสุดภายใต้ความยาวคลื่นการดูดกลืนแสงสูงสุด และผลถูกแสดงเป็น มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง (mg/g DW) โดย limit of detection (LOD) และ limit of quantity (LOQ) ของวิธีนี้คือ 2 และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.3.7 การผสมสารสกัดชาและทดสอบการเสริมฤทธิ์

คัดเลือกสารสกัดชา 2-3 ชนิดที่มีฤทธิ์มากที่สุดมาทำการผสมในอัตราส่วน 1:1 และ 1:1:1 จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อให้เกิดการเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพ (Synergistic effect) ที่ดีที่สุด และนำไปวิเคราะห์สารองค์ประกอบต่าง ๆ ด้วยเทคนิค HPLC-QTOF-MS/MS ต่อไป

3.4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลที่ได้จากสารสกัดชาทั้ง 4 ชนิดด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล ซึ่งทุกการทดลองมีการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ข้อมูลทั้งหมดได้ถูกเก็บพร้อมทั้งนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ standard deviation) โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Science (SPSS Statistic 27) ในการคำนวณค่าและประมวลผลเพื่อหาค่าทางสถิติของสารสกัดชาทั้ง 4 ชนิดว่าแตกต่างกันหรือไม่อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากนั้นนำค่าเฉลี่ยมาทดสอบความแปรปรวนโดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan test เพื่อตรวจสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากตัวอย่างชาประเภทต่าง ๆ และได้มีการกำหนดนัยสำคัญทางสถิติเป็น $p < 0.05$

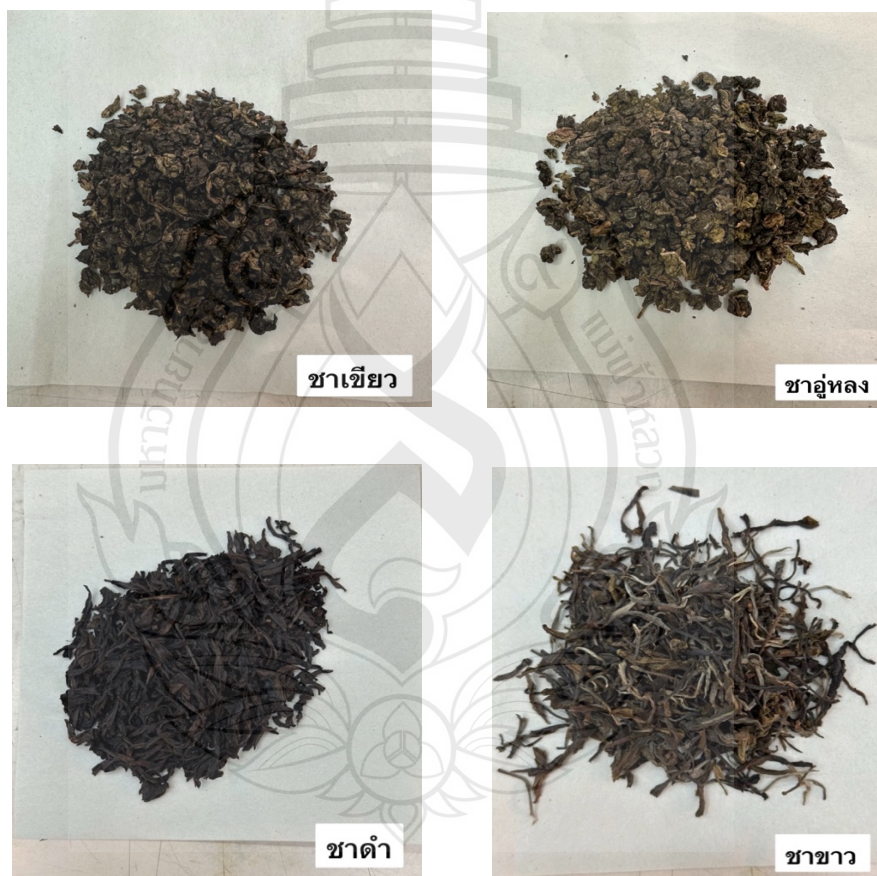


บทที่ 4

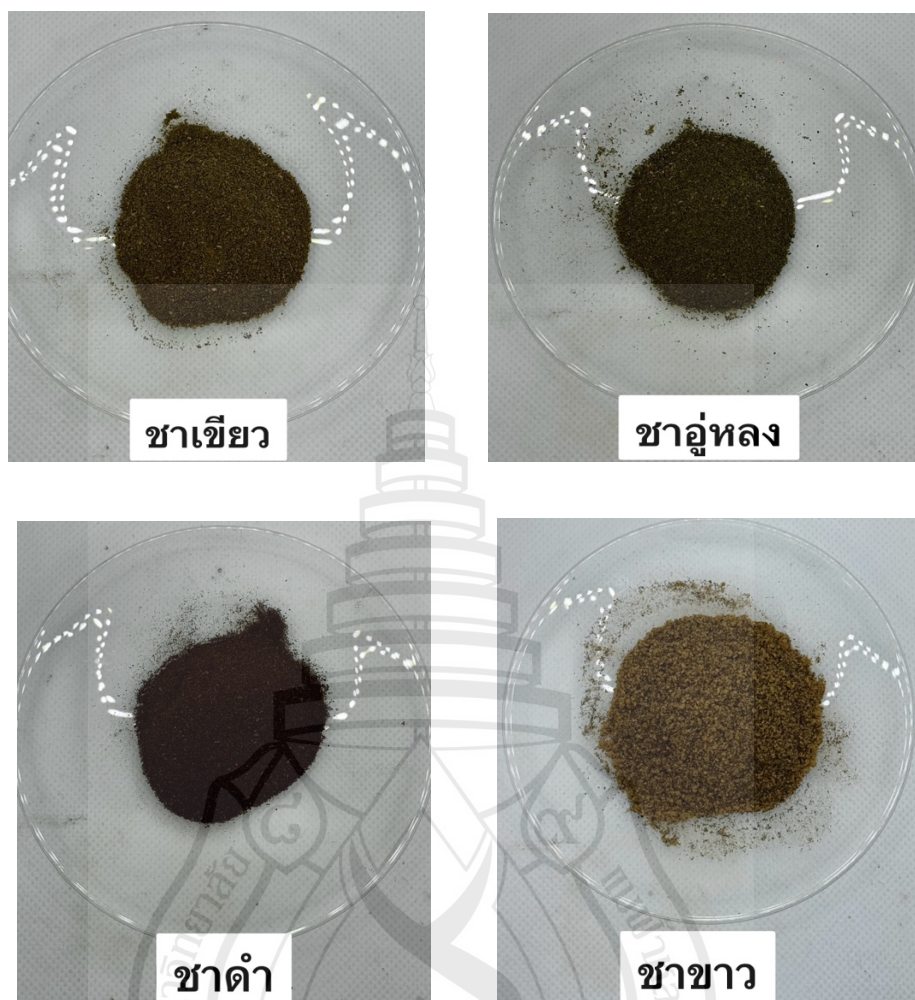
ผลของการศึกษาและอภิปรายผล

4.1 สารสกัดชา

นำใบชาแห้ง 4 ชนิด ได้แก่ ชาเขียว สายพันธุ์อุหลงไทย เบอร์ 17 ชาอุหลง สายพันธุ์จินแถบ
ฟูเจี้ยน ชาดำจ๊วยเซียน สายพันธุ์จินแถบฟูเจี้ยน และ ชาขาว สายพันธุ์อัสสัมไทย บดเป็นผงจนละเอียด
และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh แสดงดังภาพที่ 4.1 และ 4.2



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของใบชาทั้ง 4 ชนิด



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของผงชาทั้ง 4 ชนิด

4.2 สารสกัดจากชาด้วยวิธี 50% เอทานอล

การสกัดผงชาทั้ง 4 ชนิดด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอลในอัตราส่วนตัวอย่างพืชต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (W/V) โดยใช้วิธีการสกัดด้วยเครื่องเขย่าคลื่นเสียงอัลตราโซนิก ที่คลื่นความถี่ 40 KHz ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองโดยใช้เครื่องกรองด้วยระบบน้ำไหลผ่าน พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วย 50 % เอทานอลให้สีตามธรรมชาติของชาแต่ละชนิด แล้วทำการระเหยตัวทำละลาย 50 % เอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) จนได้สารสกัดหยาบ พบว่าลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากชาทั้ง 4 ชนิด มีลักษณะเป็นผงหยาบที่แห้ง มีสีน้ำตาลไปจนถึงสีดำ และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวของชาแต่ละชนิด แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลผลิตและลักษณะของสารสกัดหยาบจากใบชาแต่ละชนิด

ชนิดของชา	ร้อยละผลผลิต จากตัวทำละลาย 50 % เอทานอล	ลักษณะของ สารสกัดหยาบ
ชาเขียว สายพันธุ์อุหลงไทย เบอร์ 17	20.1 ± 1.75^a	
ชาอู่หลง สายพันธุ์จินแถบฟูเจี้ยน	18.97 ± 1.68^{ab}	
ชาดำจู่เซียน สายพันธุ์จินแถบฟูเจี้ยน	18.20 ± 1.80^b	
ชาขาว สายพันธุ์ฮัสัมไทย	16.38 ± 1.32^c	

หมายเหตุ ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD), $n=3$ และด้วยก
อักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กแสดงถึงความแตกต่างของสารสกัดหยาบจากใบชาแต่ละชนิด
โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ANOVA, Duncan Test

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดชา

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ของสารสกัดชาทั้ง 4 ชนิด โดยมีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50% เอทานอลพบว่าปริมาณสารฟีนอลิกรวมของชาทั้ง 4 ชนิดอยู่ระหว่าง 355.40 ± 17.19 ถึง 750.15 ± 12.54 mg GAE/g extract อย่างไรก็ตามชาขาวมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุดอยู่ที่ 750.15 ± 12.54 mg GAE/g extract อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งมากกว่าชาอู่หลง ชาเขียว และ ชาดำ โดยมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 489.27 ± 10.31 357.19 ± 14.76 และ 355.40 ± 17.19 mg GAE/g extract ตามลำดับ ทั้งนี้ชาเขียวและชาดำแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนชาอู่หลงและชาขาวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยเป็นที่มาของการนำชาดำออกจากการผสมสารสกัด แสดงผลดังตารางที่ 4.2

จากการศึกษาใบชาหมัลเบอร์รี่ 2 สายพันธุ์ของ Panyatip et al. (2022) ได้มีการนำใบชาหมัลเบอร์รี่มาผ่านกระบวนการต่าง ๆ จนกลายเป็นชาเขียว และชาดำ พบว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลด้วยวิธีการเขย่าคลื่นเสียงอัลตราโซนิกได้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 129.93 ± 2.37 ถึง 390.89 ± 3.90 mg GAE/g dry sample ชาเขียวมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 129.93 ± 2.37 ถึง 194.69 ± 2.81 mg GAE/g dry sample โดยชาเขียวสายพันธุ์อู่หลงไทย เบอร์ 17 ของผู้วิจัยนั้นได้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 357.19 ± 14.76 mg GAE/g extract ชาดำได้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 252.15 ± 4.72 ถึง 261.10 ± 1.69 mg GAE/g extract ซึ่งชาดำจ๊วยเซียนสายพันธุ์จินแถบฟูเจียนของผู้วิจัยนั้นได้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 355.40 ± 17.19 mg GAE/g extract ทั้งนี้การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50% เอทานอลของผู้วิจัยได้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากกว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล

การศึกษชาสายพันธุ์จิน 30 ชนิดของ Zhao et al. (2019) พบว่าการสกัดแบบใช้น้ำกลั่นด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียสมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 24.77 ± 2.02 ถึง 252.65 ± 4.74 mg GAE/g dry sample โดยชาเขียวสายพันธุ์จิน 9 ชนิดให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 148.16 ± 2.72 ถึง 252.65 ± 4.74 mg GAE/g dry sample ชาอู่หลงสายพันธุ์จิน 4 ชนิดให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 86.83 ± 0.61 ถึง 150.10 ± 0.56 mg GAE/g dry sample ชาดำสายพันธุ์จิน 4 ชนิดให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 37.23 ± 0.28 ถึง 101.94 ± 4.14 mg GAE/g dry sample ส่วนชาขาวสายพันธุ์จิน 3 ชนิดให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 51.92 ± 0.56 ถึง 77.29 ± 2.33 mg GAE/g dry sample ซึ่งการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50% เอทานอลของ

ผู้วิจัยได้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากกว่าการสกัดแบบใช้น้ำกลั่นด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส

การศึกษาดำสายพันธุ์จากประเทศซาอุดีอาระเบียหลากหลายยี่ห้อในท้องตลาดของ Bakht et al. (2019) พบว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 80% เมทานอลด้วยวิธีการเขย่าคลื่นเสียงอัลตราโซนิค (ultra-sonication) ได้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 14.34 ± 0.12 ถึง 40.88 ± 0.14 mg GAE/g dry sample ซึ่งชาดำจ๊วยเซียนสายพันธุ์จีนแถบฟูเจี้ยนของผู้วิจัยนั้นได้พบปริมาณสารฟีนอลิกรวมอยู่ที่ 355.40 ± 17.19 mg GAE/g extract ทั้งนี้การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50% เอทานอลของผู้วิจัยได้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากกว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 80% เมทานอล

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ของสารสกัดชารูปแบบผสมพบว่าปริมาณสารฟีนอลิกรวมของการผสมชาทั้ง 4 รูปแบบอยู่ระหว่าง 477.04 ± 25.38 ถึง 793.08 ± 23.28 mg GAE/g extract โดยการผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุดอยู่ที่ 793.08 ± 23.28 mg GAE/g extract อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่การผสมชาเขียวและชาขาว และ การผสมชาขาวและชาอู่หลง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมต่ำเป็นลำดับรองลงมา โดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 652.36 ± 34.75 และ 640.43 ± 19.92 mg GAE/g extract ตามลำดับ อีกทั้งการผสมชาเขียวและชาอู่หลง มีปริมาณฟีนอลิกรวมต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 477.04 ± 25.38 mg GAE/g extract ทั้งนี้การผสมชาเขียวและชาอู่หลง และ การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงผลดังตารางที่ 4.2

การศึกษากการเสริมฤทธิ์ของชาผสมชิงของ Makanjuola et al. (2015) พบว่า การผสมชาและชิงในอัตราส่วน 1:1 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมอยู่ที่ 60.5 mg GAE L⁻¹ ซึ่งให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมน้อยกว่าของผู้วิจัยที่ได้มีการผสมชาและชาเข้าด้วยกัน การศึกษากการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรร (Hibiscus sabdariffa) เพื่อการรักษากฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของชาเขียวที่ไม่มีคาเฟอีนจากส่วนต่าง ๆ ของชาอัสสัมของ Das et al. (2019) พบว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนได้ปริมาณฟีนอลิกรวมระหว่าง 121.3 ± 6.06 ถึง 133.7 ± 6.68 mg GAE/g green tea และการสกัดด้วย Ethyl acetate ได้ปริมาณฟีนอลิกรวมระหว่าง 125.9 ± 6.29 ถึง 137.2 ± 6.86 mg GAE/g green tea ในขณะที่ของผู้วิจัยสกัดด้วย 50% เอทานอลได้ปริมาณฟีนอลิกรวมระหว่าง 477.04 ± 25.38 ถึง 793.08 ± 23.28 mg GAE/g extract ซึ่งผลของการผสมสารสกัดชาของผู้วิจัยได้ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่า

ในส่วนของการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และ ชารูปแบบผสมแต่ละประเภทพบว่าการผสมชาทั้ง 4 รูปแบบทำให้มีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดชาเขียว สารสกัดชาอู่หลง และสารสกัดชาดำ โดยสารสกัดชาอู่หลง และ การผสมชาเขียวและชาอู่หลง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามสารสกัดชาขาวมีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าการผสมชาเขียวและชาขาว การผสมชาเขียวและชาอู่หลง และ การผสมชาขาวและชาอู่หลง อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้การผสมชาเขียว ชาขาว และชาอู่หลง มีค่าปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุดและมากกว่าชาทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ชาเขียว ชาอู่หลง ชาดำ และ ชาขาว อย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถสรุปได้ว่าการนำชาเขียวกับชาอู่หลงมาผสมรวมกับชาขาวทำให้ลดปริมาณการใช้ชาขาวลงได้จำนวน 3 เท่า โดยทำให้ปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าชาขาวรูปแบบเดี่ยว แสดงผลดังตารางที่ 4.2



ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และ สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดชา
รูปแบบเดี่ยว และ รูปแบบผสม

Sample	TPC (mg GAE/g extract)	TFC (mg QE/g extract)
<u>Single</u>		
Green Tea	357.19 ± 14.76 ^{Ce}	11,006.02 ± 195.94 ^{Ab}
Oolong Tea	489.27 ± 10.31 ^{Bd}	5,804.48 ± 256.26 ^{Ce}
Black Tea	355.40 ± 17.19 ^{Ce}	3,830.91 ± 43.45 ^{Df}
White Tea	750.15 ± 12.54 ^{Ab}	7,844.96 ± 114.97 ^{Bd}
<u>Blend</u>		
GW (Green + White)	652.36 ± 34.75 ^{Bc}	18,668.67 ± 474.24 ^{Aa}
GO (Green + Oolong)	477.04 ± 25.38 ^{Cd}	9,168.76 ± 437.42 ^{Cc}
WO (White + Oolong)	640.43 ± 19.92 ^{Bc}	7,529.69 ± 352.42 ^{Dd}
GWO (Green + White + Oolong)	793.08 ± 23.28 ^{Aa}	11,108.88 ± 361.82 ^{Bb}

หมายเหตุ ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD), n=3 และด้วย
อักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่แสดงถึงความแตกต่างภายในกลุ่มตัวอย่างสารสกัดชารูปแบบ
เดี่ยว และภายในกลุ่มตัวอย่างสารสกัดชาแบบผสม และ ด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัว
เล็กแสดงถึงความแตกต่างโดยรวมของทั้งสารสกัดชาแบบเดี่ยว และรูปแบบผสม โดย
มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ANOVA, Duncan Test

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดชา

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric method ของสารสกัดชาทั้ง 4 ชนิด โดยมีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50% เอทานอลพบว่า ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของชาทั้ง 4 ชนิดอยู่ระหว่าง $3,830.91 \pm 43.45$ ถึง $11,006.02 \pm 195.94$ mg QE/g extract อย่างไรก็ตามชาเขียวมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดอยู่ที่ $11,006.02 \pm 195.94$ mg QE/g extract อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งมากกว่าชาขาว ชาอู่หลง และ ชาดำ โดยมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ $7,844.96 \pm 114.97$, $5,804.48 \pm 256.26$ และ $3,830.91 \pm 43.45$ mg QE/g extract ตามลำดับ ทั้งนี้ชาเขียว ชาขาว ชาอู่หลง และ ชาดำแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ชาดำมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมต่ำที่สุด จึงเป็นที่มาของการนำชาดำออกจากการผสมสารสกัด แสดงผลดังตารางที่ 4.2

จากการศึกษาใบชาหมัลเบอร์รี่ 2 สายพันธุ์ของ Panyatip et al. (2022) ได้มีการนำใบชาหมัลเบอร์รี่มาผ่านกระบวนการต่าง ๆ จนกลายเป็นชาเขียว และชาดำ พบว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลด้วยวิธีการเขย่าคลื่นเสียงอัลตราโซนิกได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 10.15 ± 0.21 ถึง 39.09 ± 0.48 mg QE/g dry sample ชาเขียวมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 29.42 ± 1.06 ถึง 30.76 ± 0.05 mg QE/g dry sample โดยชาเขียวสายพันธุ์อู่หลงไทย เบอร์ 17 ของผู้วิจัยนั้นได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ $11,006.02 \pm 195.94$ mg QE/g extract ส่วนชาดำมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 30.24 ± 0.17 ถึง 39.09 ± 0.48 mg QE/g extract ซึ่งชาดำจ๊วยเซียนสายพันธุ์จินแถบฟูเจี้ยนของผู้วิจัยนั้นได้ปริมาณมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ $3,830.91 \pm 43.45$ mg QE/g extract ทั้งนี้การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50% เอทานอลของผู้วิจัยได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล

การศึกษาชาดำสายพันธุ์จากประเทศซาอุดีอาระเบียหลากหลายยี่ห้อในท้องตลาดของ Bakht et al. (2019) พบว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 80% เมทานอลด้วยวิธีการเขย่าคลื่นเสียงอัลตราโซนิก (ultra-sonication) ได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 11.19 ± 0.27 ถึง 34.14 ± 0.33 mg QE/g dry sample ซึ่งชาดำจ๊วยเซียนสายพันธุ์จินแถบฟูเจี้ยนของผู้วิจัยนั้นได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ $3,830.91 \pm 43.45$ mg QE/g extract ทั้งนี้การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50% เอทานอลของผู้วิจัยได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 80% เมทานอล

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric method ของสารสกัดชาในรูปแบบผสมพบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของการผสมชาทั้ง 4

รูปแบบอยู่ระหว่าง $7,529.69 \pm 352.42$ ถึง $18,668.67 \pm 474.24$ mg QE/g extract ทั้งนี้การผสมชาเขียวและชาขาว มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดเท่ากับ $18,668.67 \pm 474.24$ mg QE/g extract อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง การผสมชาเขียวและชาอู่หลง และ การผสมชาขาวและชาอู่หลง มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมต่ำเป็นลำดับรองลงมา และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ $11,108.88 \pm 361.82$ $9,168.76 \pm 437.42$ และ $7,529.69 \pm 352.42$ mg QE/ g extract ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.2

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร (*Hibiscus sabdariffa*) เพื่อการรักษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาเขียวที่ไม่มีคาเฟอีนจากส่วนต่าง ๆ ของชาอัสสัมของ Das et al. (2019) พบว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมระหว่าง 16.8 ± 0.84 ถึง 21.4 ± 1.07 mg QCE/g green tea และการสกัดด้วย Ethyl acetate ได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ระหว่าง 27.8 ± 1.39 ถึง 34.5 ± 1.72 mg QCE/g green tea ในขณะที่ของผู้นักวิจัยสกัดด้วย 50% เอทานอลได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมระหว่าง $7,529.69 \pm 352.42$ ถึง $18,668.67 \pm 474.24$ mg QE/g extract ซึ่งผลของการผสมสารสกัดชาของผู้นักวิจัยได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่า ส่วนการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของชาผสมขิงของ Makanjuola et al. (2015) พบว่าการผสมชาและขิงในอัตราส่วน 1:1 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมอยู่ที่ 495 mg CE L^{-1} ซึ่งให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมน้อยกว่าของผู้นักวิจัยที่ได้มีการผสมชาและชาเข้าด้วยกัน

ในส่วนของการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และ ชารูปแบบผสมแต่ละประเภทพบว่าการผสมชาเขียวและชาขาว และ การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง ให้ผลลัพธ์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมที่โดดเด่นมากกว่าสารสกัดชาทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ชาเขียว ชาอู่หลง ชาดำ และ ชาขาว อย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งการผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง และ สารสกัดชาเขียว แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามสารสกัดชาเขียวมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าการผสมชาเขียวและชาอู่หลง และ การผสมชาขาวและชาอู่หลง อย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถสรุปได้ว่าการนำชาเขียวผสมรวมกับชาขาวทำให้ลดปริมาณการใช้ชาเขียวลงได้จำนวน 2 เท่า โดยทำให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าชาเขียวรูปแบบเดี่ยว แสดงผลดังตารางที่ 4.2

4.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ของสารสกัดชาทั้ง 4 ชนิด โดยมีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50% เอทานอลพบว่าปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC_{50}) ของชาทั้ง 4 ชนิดอยู่ระหว่าง 43.409 ± 2.209 ถึง $268.783 \pm 24.758 \mu\text{g/mL}$ อย่างไรก็ตามชาขาวมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดอยู่ที่ $43.409 \pm 2.209 \mu\text{g/mL}$ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งมากกว่าชาอู่หลง ชาเขียว และชาดำ โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 76.655 ± 6.817 , 92.656 ± 3.476 และ $268.783 \pm 24.758 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งชาอู่หลงและชาเขียวแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนชาขาวและชาดำแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ชาดำมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC_{50}) ต่ำที่สุด เนื่องจากมีค่า IC_{50} สูงกว่าชาอีก 3 ชนิดจึงเป็นที่มาของการนำชาดำออกจากการผสมสารสกัด แสดงผลดังตารางที่ 4.3

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากชาสมุนไพรหลายหลากชนิดของ Kumari et al. (2022) พบว่าการสกัดด้วยการแช่แบบใช้อุณหภูมิมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่าง 27.58 ± 4.74 ถึง $226.28 \pm 2.72 \mu\text{g/mL}$ GAE โดยชาเขียว 9 ชนิดที่นำมาทดสอบให้ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่าง 27.58 ± 4.74 ถึง $128.36 \pm 4.24 \mu\text{g/mL}$ GAE และชาดำอีก 9 ชนิดที่นำมาทดสอบให้ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่าง 39.3 ± 2.74 ถึง $144.8 \pm 3.46 \mu\text{g/mL}$ GAE ซึ่งผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของชาเขียวสอดคล้องกับงานของผู้วิจัย โดยมีค่าเท่ากับ $92.656 \pm 3.476 \mu\text{g/mL}$ อย่างไรก็ตามชาดำของผู้วิจัยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ $268.783 \pm 24.758 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าของ Kumari et al. (2022)

การศึกษาใบชาหมัลเบอร์รี่ 2 สายพันธุ์ของ Panyatip et al. (2022) ได้นำใบชาหมัลเบอร์รี่มาผ่านกระบวนการต่าง ๆ จนกลายเป็นชาเขียว และชาดำ พบว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลด้วยวิธีการเขย่าคลื่นเสียงอัลตราโซนิก (ultra-sonication) ได้ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่าง 96.17 ± 2.28 ถึง $253.70 \pm 1.71 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งชาเขียวมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 121.55 ± 1.23 ถึง $253.70 \pm 1.71 \mu\text{g/mL}$ ในขณะที่ชาเขียวของผู้วิจัยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ $92.656 \pm 3.476 \mu\text{g/mL}$ จึงทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่า อย่างไรก็ตามชาดำมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 117.69 ± 0.90 ถึง $117.75 \pm 1.42 \mu\text{g/mL}$ โดยชาดำของผู้วิจัยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ $268.783 \pm 24.758 \mu\text{g/mL}$ จึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าของ Panyatip et al. (2022)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ของสารสกัดชารูปแบบผสมพบว่าปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC₅₀) ของการผสมชาทั้ง 4 รูปแบบอยู่ระหว่าง 66.007 ± 11.450 ถึง 71.574 ± 11.731 $\mu\text{g/mL}$ ทั้งนี้การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดอยู่ที่ 66.007 ± 11.450 $\mu\text{g/mL}$ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่การผสมชาขาวและชาอู่หลง การผสมชาเขียวและชาอู่หลง และ การผสมชาเขียวและชาขาว มีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC₅₀) ต่ำเป็นลำดับรองลงมาและแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ซึ่งมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC₅₀) เท่ากับ 67.808 ± 12.335 70.316 ± 7.838 และ 71.574 ± 11.731 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.3

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรร (Hibiscus sabdariffa) เพื่อการรักษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาเขียวที่ไม่มีคาเฟอีนจากส่วนต่าง ๆ ของชาอัสสัมของ Das et al. (2019) พบว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่าง $1,178.5 \pm 58.92$ ถึง $1,329.1 \pm 66.4$ mM TE/g green tea และการสกัดด้วย Ethyl acetate มีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่าง $1,275.2 \pm 63.7$ ถึง $1,395.7 \pm 60.4$ mM TE/g green tea และการศึกษาผลของการเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกหอมหมื่นลี้กับชาหลากหลายชนิดของ Mao et al. (2017) พบว่า การผสมดอกหอมหมื่นลี้กับชาหลงจิ่งให้ผลลัพธ์การเสริมฤทธิ์เพื่อต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดและมีค่าเท่ากับ 0.23% ซึ่งการผสมดอกหอมหมื่นลี้กับชาดำ ชาผู่เออร์ และ ชาตีกวอนอิม มีค่าเท่ากับ 0.16% 0.12% และ 0.04% ตามลำดับ โดยเป็นการเสริมฤทธิ์เพื่อต้านอนุมูลอิสระที่มีค่าต่ำกว่าการผสมดอกหอมหมื่นลี้กับชาหลงจิ่ง

ในส่วนของการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และ ชารูปแบบผสมแต่ละประเภทพบว่า การผสมชาทั้ง 4 รูปแบบทำให้มีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC₅₀) สูงกว่าสารสกัดชาเขียว สารสกัดชาอู่หลง และสารสกัดชาดำ โดยสารสกัดชาอู่หลง และ การผสมชาเขียวและชาขาว และ การผสมชาเขียวและชาอู่หลง แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามสารสกัดชาขาว มีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC₅₀) ที่โดดเด่นมากกว่าสารสกัดชารูปแบบผสมทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ แสดงผลดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และรูปแบบผสม

Sample	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	FRAP (mg TEAC/g extract)
<u>Single</u>		
Green Tea	92.656 ± 3.476 ^{Bc}	8,063.93 ± 22.28 ^{Cb}
Oolong Tea	76.655 ± 6.817 ^{Bbc}	8,363.00 ± 67.76 ^{Bb}
Black Tea	268.783 ± 24.758 ^{Cd}	6,314.54 ± 49.51 ^{Dd}
White Tea	43.409 ± 2.209 ^{Aa}	9,173.38 ± 29.47 ^{Aa}
<u>Blend</u>		
GW (Green + White)	71.574 ± 11.731 ^{Abc}	7,600.86 ± 355.56 ^{Bc}
GO (Green + Oolong)	70.316 ± 7.838 ^{Abc}	7,658.74 ± 253.48 ^{Bc}
WO (White + Oolong)	67.808 ± 12.335 ^{Ab}	7,761.65 ± 87.00 ^{Bc}
GWO (Green + White + Oolong)	66.007 ± 11.450 ^{Ab}	8,337.27 ± 142.11 ^{Ab}

หมายเหตุ ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD), n=3 และด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่แสดงถึงความแตกต่างภายในกลุ่มตัวอย่างสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และภายในกลุ่มตัวอย่างสารสกัดชารูปแบบผสม และ ด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กแสดงถึงความแตกต่างโดยรวมของทั้งสารสกัดชาแบบเดี่ยว และรูปแบบผสม โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ANOVA, Duncan Test

4.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP Radical Scavenging Assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP radical scavenging assay ของสารสกัดชาทั้ง 4 ชนิด โดยมีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50% เอทานอลพบว่า ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของชาทั้ง 4 ชนิดอยู่ระหว่าง $6,314.54 \pm 49.51$ ถึง $9,173.38 \pm 29.47$ mg TEAC/g extract อีกทั้งชาขาวมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงที่สุดอยู่ที่ $9,173.38 \pm 29.47$ mg TEAC/g extract อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งมากกว่าชาอู่หลง ชาเขียว และชาดำ โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ $8,363.00 \pm 67.76$, $8,063.93 \pm 22.28$ และ $6,314.54 \pm 49.51$ mg TEAC/g extract ตามลำดับ ทั้งนี้ชาขาว ชาอู่หลง ชาเขียว และชาดำแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ชาดำมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ต่ำที่สุดจึงเป็นที่มาของการนำชาดำออกจากการผสมสารสกัด แสดงผลดังตารางที่ 4.3

จากการศึกษาใบชามัลเบอร์รี่ 2 สายพันธุ์ของ Panyatip et al. (2022) ได้นำใบชามัลเบอร์รี่มาผ่านกระบวนการต่างๆจนกลายเป็นชาเขียว และชาดำ พบว่า การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลด้วยวิธีการเขย่าคลื่นเสียงอัลตราโซนิก (ultra-sonication) ได้ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP อยู่ระหว่าง 111.62 ± 1.96 ถึง 239.26 ± 1.78 mmole/100 g Extract ซึ่งชาเขียวมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ 143.15 ± 0.44 ถึง 173.52 ± 1.29 mmole/100 g Extract ในขณะที่ชาเขียวของผู้วิจัยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ $8,063.93 \pm 22.28$ mg TEAC/g extract อย่างไรก็ตามชาดำมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ 187.54 ± 0.94 ถึง 239.26 ± 1.78 mmole/100 g Extract โดยชาดำของผู้วิจัยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ $6,314.54 \pm 49.51$ mg TEAC/g extract

การศึกษาชาสายพันธุ์จีน 30 ชนิดของ Zhao et al. (2019) พบว่าการสกัดแบบใช้น้ำกลั่นด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียสมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP อยู่ระหว่าง 504.80 ± 17.44 ถึง $4,647.47 \pm 57.87$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g DW}$ โดยชาเขียวสายพันธุ์จีน 9 ชนิดมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ $2,824.80 \pm 107.63$ ถึง $4,647.47 \pm 57.87$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g DW}$ ชาอู่หลงสายพันธุ์จีน 4 ชนิดมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ $1,055.47 \pm 30.02$ ถึง $2,002.13 \pm 47.72$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g DW}$ ชาดำสายพันธุ์จีน 4 ชนิดมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ 530.13 ± 23.44 ถึง $2,670.13 \pm 34.02$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g DW}$ ส่วนชาขาวสายพันธุ์จีน 3 ชนิดมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ 911.47 ± 44.06 ถึง $1,299.47 \pm 40.07$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g DW}$ ทั้งนี้ผลชาทั้ง 4 ชนิดของผู้วิจัยอยู่ระหว่าง $6,314.54 \pm 49.51$ ถึง $9,173.38 \pm 29.47$ mg TEAC/g extract ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP มากกว่าของ Zhao et al. (2019)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP radical scavenging assay ของสารสกัดชารูปแบบผสมพบว่าปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของการผสมชาทั้ง 4 รูปแบบอยู่ระหว่าง $7,600.86 \pm 355.56$ ถึง $8,337.27 \pm 142.11$ mg TEAC/g extract ทั้งนี้การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงที่สุดอยู่ที่ $8,337.27 \pm 142.11$ mg TEAC/g extract อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่การผสมชาขาวและชาอู่หลง การผสมชาเขียวและชาอู่หลง และ การผสมชาเขียวและชาขาว มีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ต่ำเป็นลำดับรองลงมาและแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ และมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ $7,761.65 \pm 87.00$ $7,658.74 \pm 253.48$ และ $7,600.86 \pm 355.56$ mg TEAC/g extract ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.3

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร (*Hibiscus sabdariffa*) เพื่อการรักษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาเขียวที่ไม่มีคาเฟอีนจากส่วนต่าง ๆ ของชาอัสสัมของ Das et al. (2019) พบว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ระหว่าง $1,245 \pm 45.19$ ถึง $1,383 \pm 56.49$ mM TE/g green tea และการสกัดด้วย Ethyl acetate มีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ระหว่าง $1,244 \pm 43.63$ ถึง $1,387 \pm 45.12$ mM TE/g green tea และการศึกษาผลของการเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกหอมหมื่นลี้กับชาหลากหลายชนิดของ Mao et al. (2017) พบว่าการผสมดอกหอมหมื่นลี้กับชาหลงจิ่งให้ผลลัพธ์ในการเสริมฤทธิ์เพื่อต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.23% ซึ่งการผสมดอกหอมหมื่นลี้กับชาดำ ชาผู่เออร์ และ ชาตีกวนอิม มีค่าเท่ากับ 0.16% 0.12% และ 0.04% ตามลำดับ ทั้งนี้การเสริมฤทธิ์สำหรับการต้านอนุมูลอิสระมีค่าต่ำกว่าการผสมดอกหอมหมื่นลี้กับชาหลงจิ่ง

ในส่วนของการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และ ชารูปแบบผสมแต่ละประเภทพบว่าการผสมชาทั้ง 4 รูปแบบทำให้มีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงกว่าสารสกัดชาดำ โดยสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาอู่หลงมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงกว่าการผสมชาเขียวและชาขาว การผสมชาเขียวและชาอู่หลง และ การผสมชาขาวและชาอู่หลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสารสกัดชาอู่หลง และ การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลงแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามสารสกัดชาขาวมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ FRAP มากกว่าสารสกัดชารูปแบบผสมทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ แสดงผลดังตารางที่ 4.3

4.7 การวิเคราะห์เปรียบเทียบสารประกอบในสารสกัดชาเดี่ยวและสารสกัดชาผสมด้วยเทคนิค HPLC-QTOF-MS/MS

จากการศึกษาวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบทางเคมีในสารสกัดจากชา 4 ประเภท ได้แก่ ชาดำ ชาเขียว ชาอู่หลง และชาขาว โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบทางเคมีจำนวน 36 ชนิด ซึ่งแสดงผลในรูปแบบเชิงปริมาณ 3 ระดับ ได้แก่ ปริมาณต่ำถึงต่ำมาก (แสดงผลเป็น +), ปริมาณปานกลาง (แสดงผลเป็น ++), และปริมาณสูงถึงสูงมาก (แสดงผลเป็น +++) แสดงข้อมูลดังตารางที่ 4.4

ชาดำพบสารบางชนิดในระดับสูงเช่น Pyrogallol-2-O-glucuronide, Delphinidin 3,7,3'-triglucoside, m-Coumaric acid, Epigallocatechin gallate, 5-Methyl-2-furancarboxaldehyde และ Naringin ซึ่งมีบทบาทในการสร้างกลิ่นและรสชาติของชาดำ รวมถึงมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา เช่นฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยที่สาร Pyrogallol-2-O-glucuronide เป็นกรดกลูโคซิไดรอนิก โดยเป็นการรวมกันของ Pyrogallol และ glucuronide ซึ่งกลูคูโรนิกต์ หรือเรียกว่า กลูคูโรนไซด์ และจัดอยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ Delphinidin 3,7,3'-triglucoside จัดอยู่ในกลุ่มของสารแอนโทไซยานิน m-Coumaric acid เป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถเรียกได้ว่ากรดไฮดรอกซีซินนามิก และเป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอลที่มาจากกรดคาเฟอิก และ Epigallocatechin gallate จัดอยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอลและเป็นสมาชิกของกลุ่มฟลาแวน (Flavans) ซึ่งมีบทบาทเป็นสารต้านมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ สารปกป้องระบบประสาท และสารเมตาบอไลต์ของพืชต่างๆ (National Center for Biotechnology Information, 2024) แสดงผลดังตารางที่ 4.4

ในขณะที่ชาเขียวมีแนวโน้มที่จะมีปริมาณสารประกอบในระดับสูง (+++) มากที่สุดในบรรดาชาทั้งหมด โดยเฉพาะกลุ่มสารประเภท flavonoids, phenolic acids และ glycosides เช่น (-)-Epicatechin, alpha,beta-Digalactosyl-alpha'-linolenic-glyceride, Kaempferol 3-[2''-(6''-coumaroylglucosyl)-rhamnoside]7-glucoside, Apigenin 7-(3''-acetyl-6''-E-p-coumaroylglucoside), 5-Caffeoylquinic acid, Kaempferol 3-(3''-6''-diacetyl-2'',4''-di-p-coumaroylrhamnoside), Cinnamyl acetate, Delphinidin 3,7,3'-triglucoside, Malvidin 3-(6''-acetylglucoside), 5-O-Caffeoylshikimic acid, peonidin-3-O-glucoside-acetaldehyde, Quercetin 3-(2'',6''-digalloylgalactoside) และ 6''-p-Coumaroylprunin ซึ่งสารเหล่านี้มีรายงานว่ามีความสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และส่งเสริมสุขภาพโดยรวม ซึ่ง Kaempferol 3-(3'',6''-diacetyl-2'',4''-di-p-coumaroylrhamnoside) เป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่เรียกว่าฟลาโวนอยด์-3-O-ไกลโคไซด์ สามารถพบได้ในสมุนไพร เครื่องเทศ ชา และพืชชนิดอื่น ๆ ซึ่งอยู่ใน

กลุ่มของฟลาโวนอยด์เป็นหลัก (Human Metabolome Database, n.d.) Delphinidin 3,7,3'-triglucoside จัดอยู่ในกลุ่มของสารแอนโทไซยานิน Peonidin-3-O-glucoside-acetaldehyde จัดอยู่ในกลุ่มของสารแอนโทไซยานินและมีบทบาทเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ Quercetin 3-(2",6"-diagalloylgalactoside) จัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ (National Center for Biotechnology Information, 2024) และ 6"-p-Coumaroylprunin เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทหนึ่งที่เรียกว่า ฟลาโวนอยด์-7-O-ไกลโคไซด์ และจัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์เป็นหลัก (Human Metabolome Database, n.d.) แสดงผลดังตารางที่ 4.4

ชาอู่หลงมีสารสำคัญหลายชนิดที่พบในระดับสูงเช่นกัน เช่น 6"-Malonylgenistin, peonidin 3-(6"-caffeylglucoside), Quinic acid และ PC(0:18:1(9Z)/0:18:2(9Z,12Z,14Z,17Z)) โดยเฉพาะสารกลุ่ม Ceramides และ Coumarins ที่อาจมีบทบาทในด้านการบำรุงผิวและลดการอักเสบ โดยที่ Peonidin 3-(6"-caffeylglucoside) เป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่เรียกว่า แอนโทไซยานิน-3-O-ไกลโคไซด์ และจัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์เป็นหลัก Quinic acid เป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่เรียกว่า กรดควินิกและอนุพันธ์ ซึ่งกรดควินิกสามารถพบได้ในต้นชา เมล็ดกาแฟ ผัก และอื่นๆอีกมากมาย PC(o-18:1(9Z)/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)) เป็นฟอสฟาติดีลโคลีนที่สามารถพบใน *Saccharomyces cerevisiae* โดยเป็นกลีเซอโรฟอสโฟไลปิดที่มีฟอสโฟริลโคลีนตรงบริเวณที่มีการแทนที่ด้วยกลีเซอรอล และ 6"-Malonylgenistin เป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่เรียกว่า ไอโซฟลาโวนอยด์-O-ไกลโคไซด์ ซึ่งพบได้ในอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น ถั่วเหลือง โยเกิร์ต เต้าหู้ และ มิโซะ (Human Metabolome Database, n.d.) แสดงผลดังตารางที่ 4.4

สำหรับชาขาวแม้โดยรวมจะมีสารประกอบในระดับต่ำถึงปานกลาง แต่พบสารบางชนิดในระดับสูง เช่น 6"-Malonylgenistin, 5-Methyl-2-furancarboxaldehyde และ Naringin ซึ่งจัดเป็นสารฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน โดยที่ 6"-Malonylgenistin เป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่เรียกว่า ไอโซฟลาโวนอยด์-O-ไกลโคไซด์ ซึ่งสามารถพบได้ในอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น ถั่วเหลือง โยเกิร์ต เต้าหู้ และ มิโซะ และ Naringin จัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ เป็นสารเมทาโบไลต์ คือ สารตัวใหม่ที่เกิดจากกระบวนการทางชีวเคมีที่เรียกว่า Metabolism ในเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกาย อีกทั้งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดไขมันในเลือด ฤทธิ์ด้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านมะเร็งอีกด้วย (Human Metabolome Database, n.d.) โดยชาขาวมีแนวโน้มที่จะมีสารประกอบหลากหลายแต่ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชาอื่น ๆ แสดงผลดังตารางที่ 4.4

โดยสรุป ชาแต่ละชนิดมีองค์ประกอบของสารสำคัญที่แตกต่างกัน ซึ่งสะท้อนถึงความหลากหลายของกระบวนการผลิตและระดับการหมักที่ใช้ในแต่ละประเภทชา โดยเฉพาะชาเขียว ซึ่ง

เป็นชาที่ผ่านกระบวนการแปรรูปน้อยที่สุด ส่งผลให้ยังคงรักษาปริมาณและความหลากหลายของสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพไว้ได้ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับชาประเภทอื่น

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในสารสกัดชารูปแบบเดียว

ลำดับ	ชื่อสารประกอบ	ชาดำ	ชาเขียว	ชาอู่หลง	ชาขาว
1	(-)-Epicatechin	++	+++	++	+
2	Biorobin	++	+++	++	+
3	Kaempferol 7-O-glucoside	++	+++	++	+
4	Trehalose	++	+++	+++	+
	alpha,beta-Digalactosyl-alpha'-				
5	linolenic-glyceride	++	+++	++	+
	Kaempferol 3-[2''-(6'''-				
	coumaroylglucosyl)-rhamnoside]7-				
6	glucoside	+	+++	+++	+
7	Rhynchosin	+++	++	++	+
8	(-)-Epiafzelechin 3-gallate	+	+++	++	++
9	Fustin	+	++	+++	+++
	Apigenin 7-(3''-acetyl-6''-E-p-				
10	coumaroylglucoside)	++	+++	+++	+
11	PE(18:2(9Z,12Z)/0:0)	+	+++	++	++
12	Quercetin	+++	++	++	+
13	5-Caffeoylquinic acid	++	+++	++	++
14	D-Chicoric acid	+++	+++	+	++
15	Gingerglycolipid B	+++	+++	++	+
	Kaempferol 3-(3''-6''-diacetyl-2'',4''-di-				
16	p-coumarylrhamnoside)	+	+++	+	+
17	Gingerglycolipid A	++	+++	++	+
18	Cinnamyl acetate	++	+++	++	+
19	Quercetin 3-(2'',6''-digalloylgalactoside)	++	+++	++	+
20	Pyrogallol-2-O-glucuronide	+++	+++	+	+
21	Delphinidin 3,7,3'-triglucoside	+++	+++	+	+
22	PE (Cer(d16:1(4E)/20:0(2OH))	+	++	+++	+++
23	Malvidin 3-(6''-acetylglucoside)	++	+++	++	+
24	m-Coumaric acid	+++	+++	+	+++
25	6''-Malonylgenistin	+	++	+++	+++
26	5-O-Caffeoylshikimic acid	+++	+++	+	+++

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว

ลำดับ	ชื่อสารประกอบ	ชาดำ	ชาเขียว	ชาอู่หลง	ชาขาว
27	peonidin-3-O-glucoside-acetaldehyde	+	+++	+	+
28	Quercetin 3-(2",6"-digalloylgalactoside)	+	+++	+	+
29	Epigallocatechin gallate	+++	+	+++	+
30	PE (Cer(d16:1(4E)/20:0(2OH))	+	++	+++	+++
31	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	+++	+++	+	+++
32	6"-p-Coumaroylprunin	+	+++	+	+
33	Naringin	+++	+	+++	+++
34	peonidin 3-(6"-caffeoylglucoside)	+	+	+++	+
35	Quinic acid	+	++	+++	+
36	PC(0:18:1(9Z)/0:18:2(9Z,12Z,14Z,17Z))	+	+	+++	+

หมายเหตุ สารประกอบมีปริมาณต่ำถึงต่ำมาก แสดงผลเป็น +
 สารประกอบมีปริมาณปานกลาง แสดงผลเป็น ++
 สารประกอบมีปริมาณสูงถึงสูงมาก แสดงผลเป็น +++

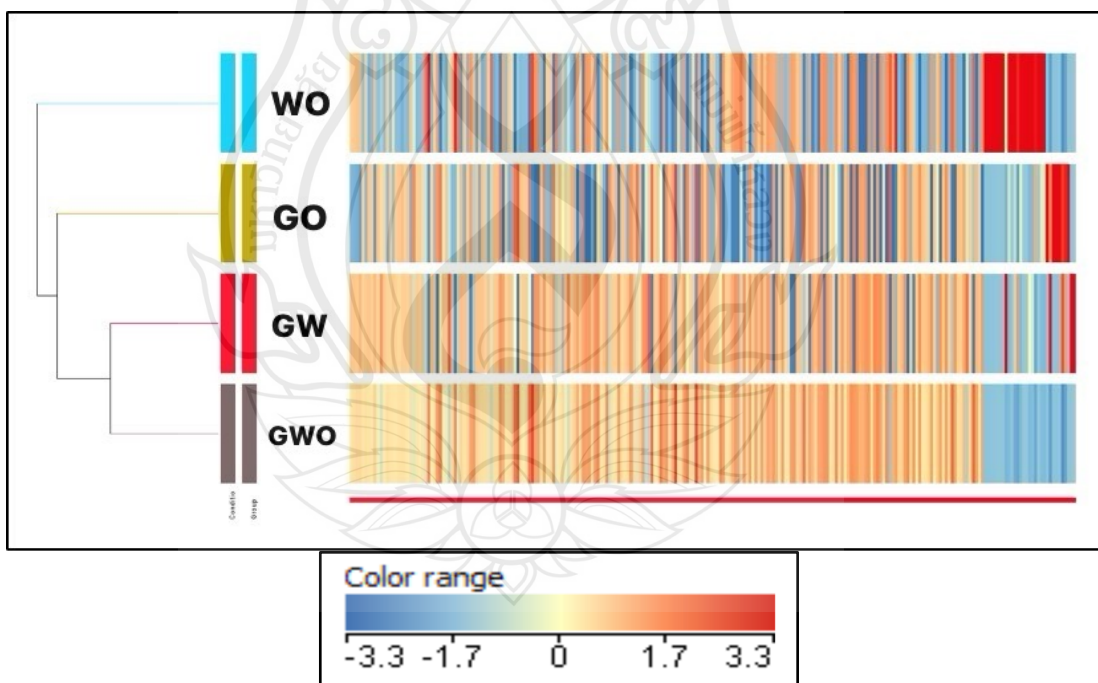
จากการวิเคราะห์และทดสอบสารประกอบในสารสกัดชารูปแบบผสม แสดงผลดังภาพที่ 4.3 พบว่า ปริมาณสารสำคัญมีเพิ่มมากยิ่งขึ้นกว่าสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว แสดงผลดังตารางที่ 4.4

การเปรียบเทียบสูตร GW และ GWO โดย GW เป็นการผสมระหว่างชาเขียวและชาขาว สารประกอบที่สำคัญแสดงเป็นแถบสีแดงเข้มอยู่จำนวนหนึ่ง ซึ่งการแสดงผลแถบสีแดงเข้มหมายความว่า มีปริมาณสารสำคัญมาก และเปรียบเทียบกับสูตร GWO ที่เป็นการผสมระหว่างชาเขียว ชาขาว และ ชาอู่หลง แสดงให้เห็นว่ามีสารสำคัญแสดงเป็นแถบสีส้มถึงสีแดง ซึ่งในสูตร GWO มีปริมาณสารสำคัญที่สูตร GW ไม่มี โดยแสดงผลเป็นแถบสีฟ้าถึงสีน้ำเงิน ซึ่งหมายความว่า มีปริมาณสารสำคัญน้อย ในทางกลับกันสารสำคัญที่พบในสูตร GW ที่เป็นแถบสีฟ้าถึงสีน้ำเงินไปแสดงผลในสูตร GWO ที่มีการเพิ่มชาอู่หลงเข้าไป และแสดงผลเป็นแถบสีส้มถึงสีแดงแทน ทั้งนี้สูตร GWO พบสารสำคัญที่ไม่พบในสูตร GW แสดงผลดังภาพที่ 4.3

การเปรียบเทียบสูตร GW GWO และ GO โดยสูตร GO เป็นการผสมระหว่างชาเขียวและชาอู่หลงพบสารประกอบที่สำคัญแสดงเป็นแถบสีแดงเข้มอยู่จำนวนหนึ่ง ซึ่งการแสดงผลแถบสีแดงเข้มหมายความว่า มีปริมาณสารสำคัญมาก และพบสารสำคัญที่แสดงเป็นแถบสีฟ้าถึงสีน้ำเงินอยู่จำนวนมาก โดยแถบสีฟ้าถึงสีน้ำเงินแสดงถึงการมีปริมาณสารสำคัญน้อย ในทางตรงกันข้ามสูตร GW และ GWO พบปริมาณแถบสีส้มถึงสีแดงมากกว่าสูตร GO ซึ่งหมายความว่า มีปริมาณสารสำคัญที่มาก เนื่องจากการผสมสารสกัดชาขาวในสูตร GW และ GWO แสดงผลดังภาพที่ 4.3

การเปรียบเทียบสูตร GW GWO GO และ WO โดย WO เป็นการผสมระหว่างชาขาวและชาอู่หลงพบสารประกอบที่สำคัญแสดงเป็นแถบสีแดงเข้มอยู่จำนวนมาก โดยการแสดงผลแถบสีแดงเข้มหมายความว่าปริมาณสารสำคัญมาก ซึ่งสารสำคัญแถบสีแดงเข้มในสูตร WO ไม่พบในสูตร GW GWO และ GO ยิ่งไปกว่านั้นสูตร WO พบสารสำคัญที่แสดงเป็นแถบสีฟ้าถึงน้ำเงินจำนวนน้อยกว่าสูตร GO โดยแถบสีฟ้าถึงน้ำเงินแสดงถึงการมีปริมาณสารสำคัญน้อย กล่าวคือปริมาณสารสำคัญในสูตร WO มีมากกว่าในสูตร GO ในทางตรงกันข้ามสูตร GW และ GWO แสดงให้เห็นว่ามีแถบสีส้มถึงสีแดงมากกว่าสูตร WO ซึ่งหมายความว่าพบปริมาณสารสำคัญที่มากกว่าสูตร WO แสดงผลดังภาพที่ 4.3

โดยสรุปสารสกัดชารูปแบบผสมทั้ง 4 สูตร ได้แก่ GW, GWO, GO และ WO พบว่าการผสมชาที่มีส่วนประกอบของชาขาว ไม่ว่าจะร่วมกับชาเขียวหรือชาอู่หลง มีแนวโน้มให้ปริมาณสารสำคัญในระดับสูงมากกว่าการผสมที่ไม่มีชาขาวเป็นส่วนประกอบ โดยเฉพาะในสูตร WO และ GWO ที่พบสารสำคัญเฉพาะบางชนิดในระดับสูงซึ่งไม่ปรากฏในสูตรอื่น นอกจากนี้การเพิ่มชาอู่หลงเข้าไปในสูตร GWO ยังส่งผลให้สารบางชนิดที่พบในระดับต่ำในสูตร GW เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างชัดเจน ดังนั้นองค์ประกอบของชาที่ใช้ในการผสมมีผลโดยตรงต่อปริมาณและความหลากหลายของสารสำคัญ



- หมายเหตุ
- GW คือ การผสมระหว่างชาเขียวและชาขาว
 - GO คือ การผสมระหว่างชาเขียวและชาอู่หลง
 - WO คือ การผสมระหว่างชาขาวและชาอู่หลง
 - GWO คือ การผสมระหว่างชาเขียว ชาขาว และชาอู่หลง

ภาพที่ 4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในสารสกัดชารูปแบบผสม

4.8 การผสมสารสกัดชาและทดสอบการเสริมฤทธิ์

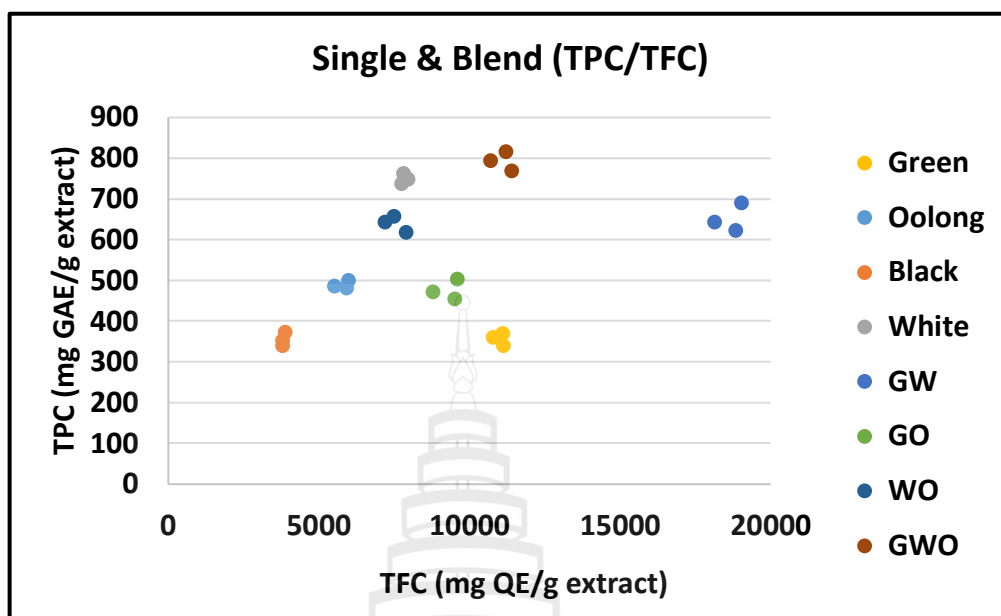
จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดรูปแบบเดี่ยวและรูปแบบผสมพบว่า การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด และ การผสมชาเขียวและชาขาว มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด ซึ่งชาขาว ชาอู่หลง การผสมชาขาวและชาอู่หลง และ การผสมชาเขียวและชาอู่หลง มีปริมาณฟีนอลิกอยู่ระหว่าง 400 – 800 mg GAE/g extract และ มีปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ระหว่าง 5,000 – 10,000 mg QE/g extract ในทางกลับกันชาเขียวยังมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าชาดำ และมีปริมาณฟีนอลิกอยู่ในระดับเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชาดำมีฤทธิ์น้อยที่สุดจากทั้งหมด ทั้งนี้การผสมชาในรูปแบบต่าง ๆ ทำให้มีฤทธิ์และประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นกว่าสารสกัดรูปแบบเดี่ยว แสดงผลดังภาพ 4.4

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสารสกัดรูปแบบเดี่ยวและรูปแบบผสมพบว่า การผสมชาเขียวและชาขาว การผสมชาขาวและชาอู่หลง การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง และ ชาขาวมีปริมาณฟีนอลิกที่สูง และผลของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไปในทางที่ดี ซึ่งการผสมชาเขียวและชาอู่หลง ชาอู่หลง และ ชาเขียวมีปริมาณฟีนอลิกน้อยกว่า แต่ยังพบผลของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไปในทางที่ดีเท่ากับกลุ่มก่อนหน้า โดยค่าของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่าง 40 – 100 $\mu\text{g/mL}$ ในทางกลับกันชาดำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และมีปริมาณฟีนอลิกที่น้อยกว่าสารสกัดเดี่ยวและสารสกัดรูปแบบผสมอื่น ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชาดำมีฤทธิ์น้อยที่สุดจากทั้งหมด ทั้งนี้การผสมชาในรูปแบบต่าง ๆ ทำให้มีฤทธิ์และประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดรูปแบบเดี่ยว แสดงผลดังภาพ 4.5

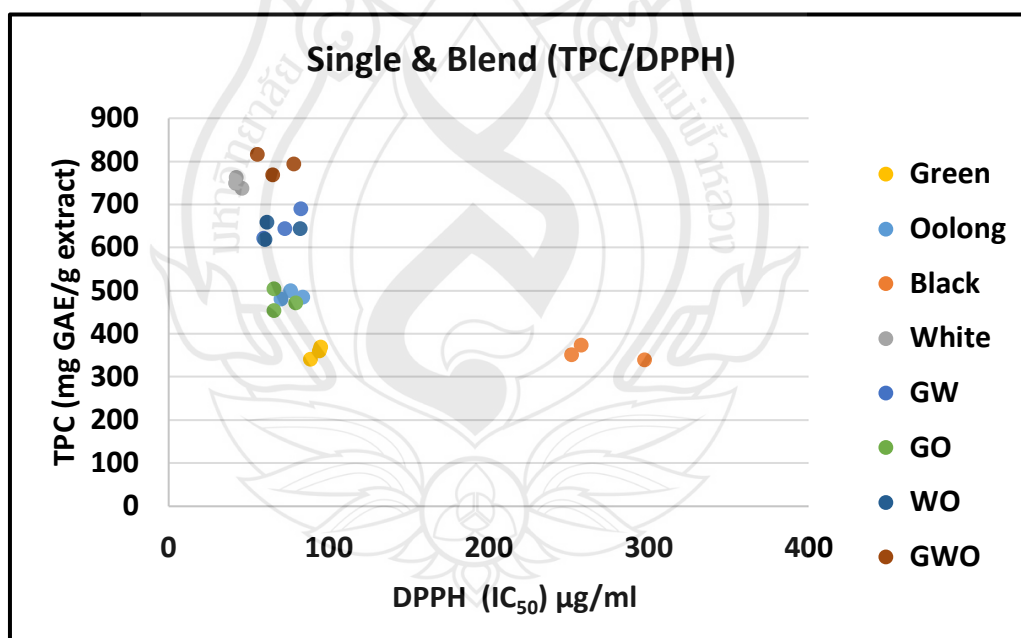
จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ในสารสกัดรูปแบบเดี่ยวและรูปแบบผสมพบว่า การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง และ ชาขาวมีฤทธิ์ดีที่สุดจากทั้งหมด ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ที่สูงมาก การผสมชาเขียวและชาขาว การผสมชาเขียวและชาอู่หลง การผสมชาขาวและชาอู่หลง และ ชาอู่หลงมีปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP อยู่ในระดับปานกลาง โดยทั้งหมดที่กล่าวมามีปริมาณฟีนอลิกอยู่ระหว่าง 400 – 900 mg GAE/g extract และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP มีมากกว่า 7,000 mg TEAC/g extract ทั้งนี้ชาเขียว และ ชาดำมีปริมาณฟีนอลิกในระดับน้อยที่เท่ากัน ซึ่งชาดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP น้อยกว่าชาเขียว จึงแสดงให้เห็นว่าชาดำมีฤทธิ์น้อยที่สุดจากทั้งหมด ทั้งนี้การผสมชาในรูปแบบต่าง ๆ ทำให้มีฤทธิ์และประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดรูปแบบเดี่ยว แสดงผลดังภาพ 4.6

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสารสกัดรูปแบบเดี่ยวและรูปแบบผสมพบว่า การผสมชาเขียวและชาขาว มีปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สูง และผลของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไปในทางที่ดี ซึ่งการผสมชาเขียวและชาอู่หลง การผสมชาขาวและชาอู่หลง การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง ชาอู่หลง ชาเขียว และ ชาขาวนั้นพบว่า มีปริมาณฟลาโวนอยด์น้อยกว่า แต่ยังพบผลของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไปในทางที่ดีเท่ากับการผสมชาเขียวและชาขาว โดยค่าของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่าง 40 – 100 $\mu\text{g/mL}$ ในทางตรงกันข้ามชาดำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ที่น้อยกว่า สารสกัดเดี่ยวและสารสกัดรูปแบบผสมอื่น ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชาดำมีฤทธิ์น้อยที่สุดจากทั้งหมด ทั้งนี้ การผสมชาในรูปแบบต่าง ๆ ทำให้มีฤทธิ์และประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดรูปแบบเดี่ยว แสดงผลดังภาพ 4.7

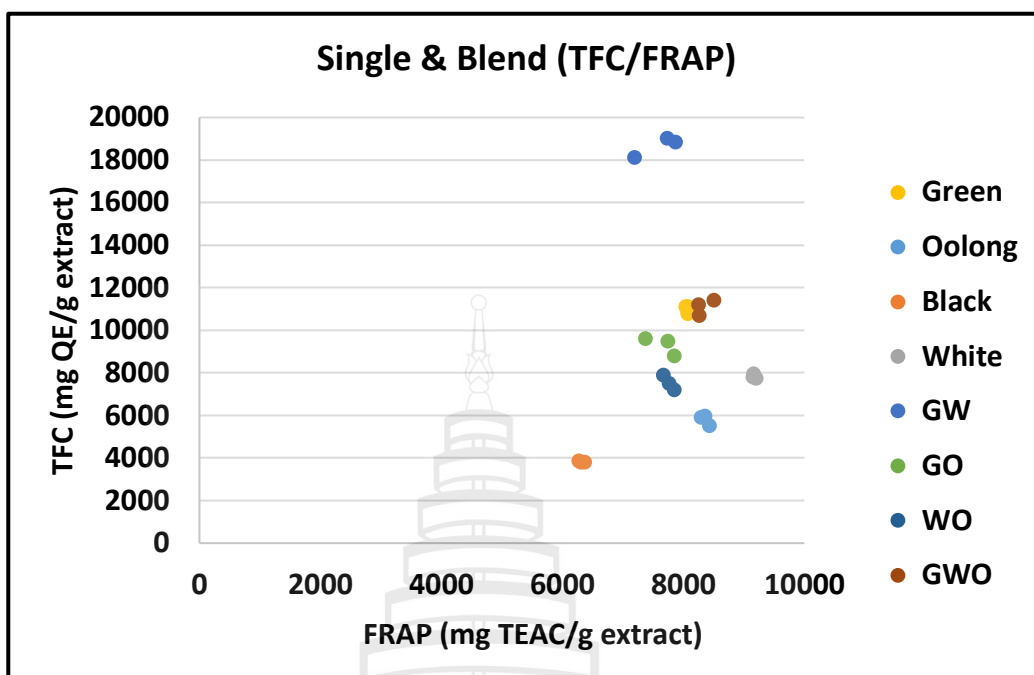
จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ในสารสกัดรูปแบบเดี่ยวและรูปแบบผสมพบว่า การผสมชาเขียวและชาขาว มีปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สูง และ ผลของการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ไปในทางที่ดีเทียบเท่ากับการผสมชาเขียวและชาอู่หลง การผสมชาขาวและชาอู่หลง การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง ชาอู่หลง ชาเขียว และ ชาขาว ซึ่งยังมีปริมาณฟลาโวนอยด์น้อยกว่าการผสมชาเขียวและชาขาว ยิ่งไปกว่านั้นชาขาวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงที่สุด โดยมีค่าเกือบ 10,000 mg TEAC/g extract ซึ่งมีผลลัพธ์ของการต้านอนุมูลอิสระที่ดี ในทางตรงกันข้ามชาดำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ที่น้อยกว่าสารสกัดเดี่ยวและสารสกัดรูปแบบผสมอื่น ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชาดำมีฤทธิ์น้อยที่สุดจากทั้งหมดที่กล่าวมา ทั้งนี้การผสมชาในรูปแบบต่าง ๆ ทำให้มีฤทธิ์และประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดรูปแบบเดี่ยว แสดงผลดังภาพ 4.8



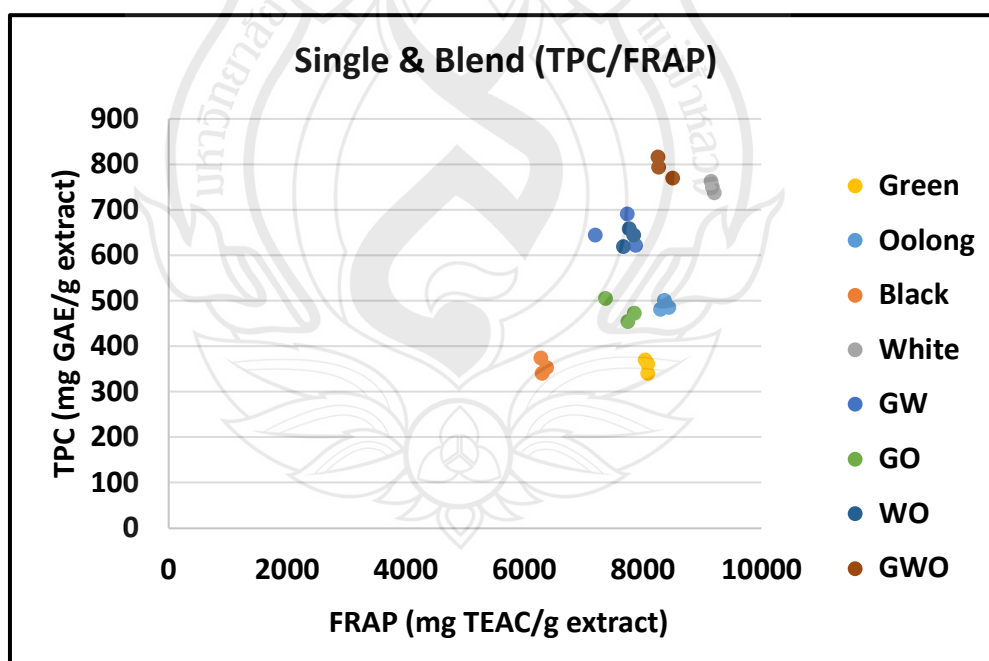
ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TPC และ TFC ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และรูปแบบผสม



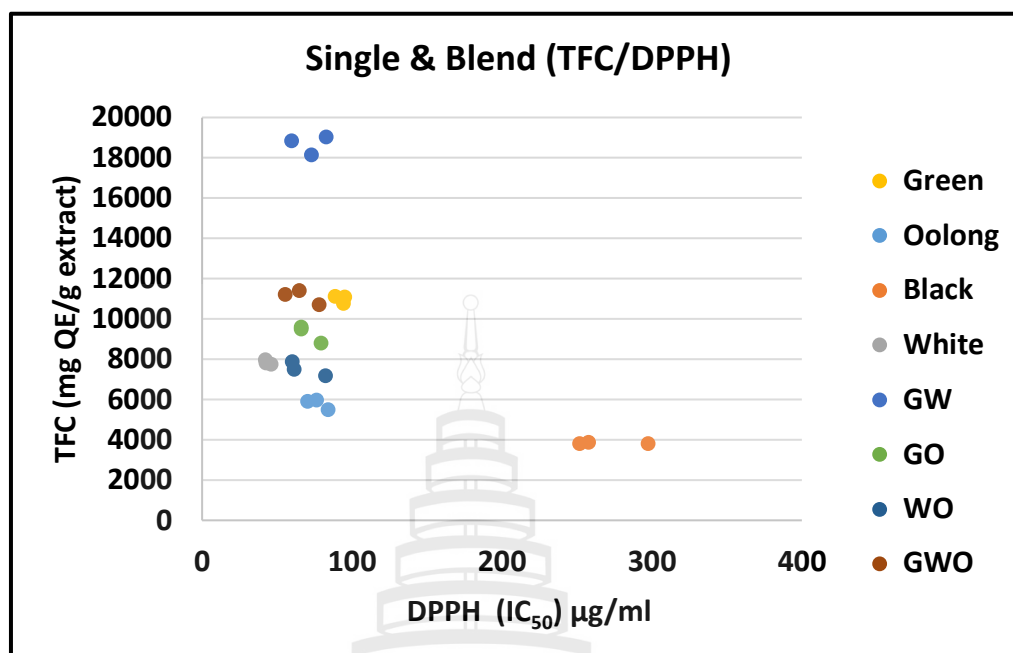
ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TPC และ DPPH ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และรูปแบบผสม



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TPC และ FRAP ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และรูปแบบผสม



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TFC และ DPPH ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และรูปแบบผสม



หมายเหตุ GW คือ การผสมระหว่างชาเขียวและชาขาว
 GO คือ การผสมระหว่างชาเขียวและชาอู่หลง
 WO คือ การผสมระหว่างชาขาวและชาอู่หลง
 GWO คือ การผสมระหว่างชาเขียว ชาขาว และชาอู่หลง

ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TFC และ FRAP ของสารสกัดชารูปแบบเดี่ยว และรูปแบบผสม

จากตารางที่ 4.5 ซึ่งนำเสนอค่าดัชนีการผสม (Combination Index: CI) ของสารสกัดตัวอย่าง พบว่า การผสมสารสกัดจากชาชนิดต่าง ๆ มีผลต่อค่าดัชนีการผสมที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของชาที่นำมาผสมและวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ โดยทั่วไป ค่าดัชนีการผสม (CI) ใช้เพื่อประเมินปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบที่ผสมกัน หากค่า CI น้อยกว่า 1 (<1) บ่งชี้ถึงการเสริมฤทธิ์ (Synergism) หากค่า CI เท่ากับ 1 ($=1$) บ่งชี้ถึงผลรวมของการออกฤทธิ์แต่ละชนิด (Additive effect) และหากค่า CI มากกว่า 1 (>1) บ่งชี้ถึงการต้านฤทธิ์ (Antagonism)

สำหรับการผสมระหว่างสารสกัดชาเขียวและชาขาว (GW) พบว่ามีค่า CI สำหรับ TPC และ TFC เท่ากับ 0.85 และ 0.50 ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ถึงการเสริมฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณสารประกอบทั้งสอง อย่างไรก็ตาม ค่า CI สำหรับ DPPH และ FRAP ที่ 1.05 และ 1.13 ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ถึงแนวโน้มของการต้านฤทธิ์เล็กน้อยในด้านการต้านอนุมูลอิสระ

ในกรณีของการผสมสารสกัดชาเขียวและชาอู่หลง (GO) พบค่า CI สำหรับ TPC, TFC และ DPPH เท่ากับ 0.89, 0.92 และ 0.83 ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงการเสริมฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และรวมถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในขณะที่ค่า CI สำหรับ FRAP เท่ากับ 1.07 สามารถบ่งชี้ถึงการต้านฤทธิ์เล็กน้อย

สำหรับการผสมสารสกัดชาขาวและชาอู่หลง (WO) พบค่า CI สำหรับ TPC และ TFC ที่ 0.97 และ 0.91 ตามลำดับ แสดงถึงการเสริมฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญทั้งสองกลุ่ม อย่างไรก็ตาม ค่า CI สำหรับ DPPH และ FRAP ที่ 1.12 และ 1.13 ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ถึงการต้านฤทธิ์ในด้านการต้านอนุมูลอิสระ

สุดท้าย การผสมสารสกัดทั้งสามชนิด (GWO) ให้ผลที่น่าสนใจ โดยมีค่า CI สำหรับ TPC และ TFC เท่ากับ 0.67 และ 0.74 ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงการเสริมฤทธิ์ที่เด่นชัดในการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้ ยังพบการเสริมฤทธิ์ในด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยมีค่า CI เท่ากับ 0.93 ในขณะที่ค่า CI สำหรับ FRAP เท่ากับ 1.02 ซึ่งบ่งชี้ถึงการต้านฤทธิ์เพียงเล็กน้อย

โดยสรุปผลการศึกษาคำดัชนีการผสมสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ma and Motsinger-Reif (2019) และ งานวิจัยของ Caesar and Cech (2019) ซึ่งให้เห็นว่ารูปแบบการผสมสารสกัดชาที่มีอิทธิพลต่อลักษณะการทำงานร่วมกันในการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่าการผสมสารสกัดมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันไป การผสมระหว่างชาเขียวและชาขาว (GW) และการผสมระหว่างชาขาวและชาอู่หลง (WO) ส่วนใหญ่แสดงการเสริมฤทธิ์การเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ แต่มีแนวโน้มด้านฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่การผสมระหว่างชาเขียวและชาอู่หลง (GO) แสดงการเสริมฤทธิ์ทั้งต่อปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ส่วนการผสมทั้งสามชนิด (GWO) ให้ผลการเสริมฤทธิ์ที่เด่นชัดที่สุดในการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และยังคงแสดงการเสริมฤทธิ์ในด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ตารางที่ 4.5 ค่าดัชนีการผสม (Combination Index: CI) ของสารสกัดตัวอย่าง

Sample	TPC	TFC	DPPH	FRAP
GW : G+W	0.85	0.50	1.05	1.13
GO : G+O	0.89	0.92	0.83	1.07
WO : W+O	0.97	0.91	1.12	1.13
GWO : G+W+O	0.67	0.74	0.93	1.02

หมายเหตุ GW คือ การผสมระหว่างชาเขียวและชาขาว
 GO คือ การผสมระหว่างชาเขียวและชาอู่หลง
 WO คือ การผสมระหว่างชาขาวและชาอู่หลง
 GWO คือ การผสมระหว่างชาเขียว ชาขาว และชาอู่หลง

ค่าดัชนีการผสมของ TPC TFC FRAP คำนวณจากสูตรดังนี้

$$CI = \frac{\frac{A + B}{2}}{\text{Blend}}$$

ค่าดัชนีการผสมของ DPPH คำนวณจากสูตรดังนี้

$$CI = \frac{\text{Blend}}{\frac{A + B}{2}}$$

โดยที่ Blend คือ ค่าการทดสอบของสารสกัดผสมแต่ละชนิด

A คือ ค่าการทดสอบของสารสกัดผสมชนิดที่ 1

B คือ ค่าการทดสอบของสารสกัดผสมชนิดที่ 2

การแปลผล

CI < 1 : แสดงถึงฤทธิ์เสริมกันอย่างมีนัยสำคัญ (Synergism)

CI = 1 : แสดงถึงฤทธิ์รวมกันแบบเพิ่มพูนอย่างมีนัยสำคัญ (Additivity)

CI > 1 : แสดงถึงฤทธิ์ต้านกันอย่างมีนัยสำคัญ (Antagonism)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษาวิจัย

การสกัดองค์ประกอบที่มีประโยชน์จากใบชาโดยใช้สารละลายอินทรีย์ที่มีส่วนผสมของสารเอทานอล 50% ด้วยเครื่องปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultra-sonication) ที่ความถี่ 40 kHz เพื่อส่งเสริมการกระจายตัวของสารอย่างทั่วถึง ด้วยอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สารสกัดถูกนำไปวิเคราะห์เพื่อจำแนกองค์ประกอบสำคัญ เช่น สารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์ พร้อมทั้งตรวจสอบองค์ประกอบด้วยเทคนิค HPLC และประเมินความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ FRAP ชาขาว และการผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง ให้สารสกัดที่มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุดในการทดสอบ โดยมีค่า 750.15 ± 12.54 และ 793.08 ± 23.28 mg GAE/g extract ตามลำดับ สารสกัดจากชาเขียว และสารสกัดจากรูปแบบผสมที่แสดงปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด คือ ชาเขียว และการผสมชาเขียวและชาขาว มีค่าเท่ากับ $11,006.02 \pm 195.94$ และ $18,668.67 \pm 474.24$ mg QE/g extract นอกจากนี้ สารสกัดจากชาขาว และการผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง แสดงศักยภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดดเด่นที่สุดในการทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 43.409 ± 2.209 และ 66.007 ± 11.450 μ g/mL ตามลำดับ และในการทดสอบด้วยวิธี FRAP สารสกัดทั้งสองรูปแบบนี้แสดงศักยภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดดเด่นที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ $9,173.38 \pm 29.47$ และ $8,337.27 \pm 142.11$ mg TEAC/g extract ตามลำดับ ผลลัพธ์จากการศึกษาบ่งชี้ว่า สารสกัดจากชาขาวมีประสิทธิผลสูงสุด โดยมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลทั้งหมดมากที่สุด และแสดงศักยภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดดเด่นที่สุดทั้งในวิธี DPPH และ FRAP ในทางตรงกันข้าม ชาดำแสดงปริมาณสารกลุ่มฟีนอล รวมไปถึงฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับชาชนิดอื่น ๆ ส่งผลให้ไม่ถูกนำมาทดสอบในการสร้างสารสกัดผสมจากชาในการวิจัยนี้ ในการวิจัยดังกล่าวได้มีการนำสารสกัดจากชาเขียว ชาอู่หลง และชาขาวมาผสมกัน ซึ่งผลลัพธ์ของการสร้างสารสกัดผสมจากชาที่น่าสนใจที่สุด คือ การผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง เนื่องจากพบว่า มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลทั้งหมดและศักยภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่โดดเด่นอย่างยิ่งทั้งในวิธี DPPH และ FRAP จากเหตุผลดังกล่าว ชาขาว และการผสมชาเขียว ชาขาวและชาอู่หลง จึงเป็นสารสกัดที่มีความโดดเด่น

เด่นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ โดยมีคุณลักษณะในการด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ยอดเยี่ยม สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานเครื่องสำอางหรือวงการอื่น ๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าแก่ผลิตภัณฑ์ได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความคงตัวของสารสกัดในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เช่น กลีเซอริน และตรวจสอบความสามารถในการละลายของสารสกัด

5.2.2 ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการผสมสารสกัดชาชนิดต่าง ๆ ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด



รายการอ้างอิง

- สถาบันชาและกาแฟ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. (ม.ป.ป.). *กระบวนการผลิตชา*. สืบค้นเมื่อ 29 สิงหาคม 2565, จาก <https://teacoffee.mfu.ac.th/tc-tea-coffeeknowledge/tc-tea/tc-teaproductionprocess.html>
- Akar, Z., Küçük, M., & Doğan, H. (2017). A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 640–647.
- Ali, A. H. (2022). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Ann Adv Chem*, 6, 010-020.
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C.M. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(4), 1326.
- Bakht, M. A., Geesi, M. H., Riadi, Y., Imran, M., Ali, M. I., Ahsan, M. J., & Ajmal, N. (2019). Ultrasound-assisted extraction of some branded tea: Optimization based on polyphenol content, antioxidant potential and thermodynamic study. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(5), 1043-1052.
- Bortolini, D. G., Haminiuk, C. W. I., Pedro, A. C., Fernandes, I. D. A. A., & Maciel, G. M. (2021). Processing, chemical signature and food industry applications of *Camellia sinensis* teas: An overview. *Food Chemistry: X*, 12, 100160.
- Caesar, L. K., & Cech, N. B. (2019). Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1+ 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*, 36(6), 869-888.
- Das, P. R., Kim, Y., Hong, S. J., & Eun, J. B. (2019). Profiling of volatile and non-phenolic metabolites—Amino acids, organic acids, and sugars of green tea extracts obtained by different extraction techniques. *Food Chemistry*, 296, 69–77.

- Das, A., Kalita, A., Raychaiudhuri, U., & Chakraborty, R. (2019). Synergistic effect of herbal plant extract (*Hibiscus sabdariffa*) in maintain the antioxidant activity of decaffeinated green tea from various parts of Assam. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 5009-5016.
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17), 5377.
- Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–32.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
- Hasanaha, M., & Hilmaa, P. S. (2016). Antioxidant activity of extract and fractions from Coffee arabica L. leaves by DPPH radical scavenging method. *Science and Engineering*, 3(4), 162-165.
- Hossain, M. A., Weli, A. M., & Ahmed, S. H. I. (2019). Comparison of total phenols, flavonoids and antioxidant activity of various crude extracts of *Hyoscyamus gallagheri* traditionally used for the treatment of epilepsy. *Clinical Phytoscience*, 5(1), 1-8.
- Hung, Y. C., Hsiao, Y. H., & Hsieh, J. F. (2021). Catechin content and free radical scavenging activity of *Camellia sinensis* twig extracts. *International Food Research Journal*, 28(2).
- Human Metabolome Database. (n.d.). *Summary of Benefits HPLC Compound*. Retrieved October 16, 2024 from <https://hmdb.ca/>
- Imran, A., Arshad, M. U., Sherwani, H., Shabir Ahmad, R., Arshad, M. S., Saeed, F., . . . Anjum, F. M. (2021). Antioxidant capacity and characteristics of theaflavin catechins and ginger freeze-dried extract as affected by extraction techniques. *International Journal of Food Properties*, 24(1), 1097–1116.
- Jiang, H., Yu, F., Qin, L., Zhang, N., Cao, Q., Schwab, W., . . . Song, C. (2019). Dynamic change in amino acids, catechins, alkaloids, and gallic acid in six types of tea processed from the same batch of fresh tea (*Camellia sinensis* L.) leaves. *Journal of Food Composition and Analysis*, 77, 28–38.

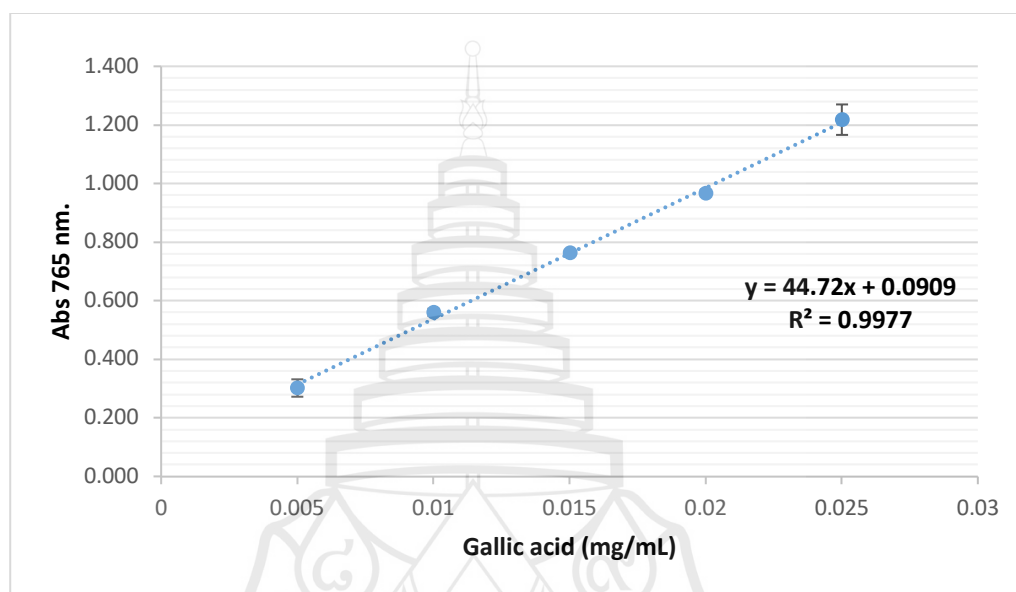
- Jug, U., Naumoska, K., & Vovk, I. (2021). (–)-Epicatechin—An Important Contributor to the Antioxidant Activity of Japanese Knotweed Rhizome Bark Extract as Determined by Antioxidant Activity-Guided Fractionation. *Antioxidants*, 10(1), 133.
- Junsathian, P., Nakamura, S., Katayama, S., & Rawdkuen, S. (2022). Antioxidant and antimicrobial activities of Thai edible plant extracts prepared using different extraction techniques. *Molecules*, 27(19), 6489.
- Koch, W., Zagórska, J., Marzec, Z., & Kukula-Koch, W. (2019). Applications of Tea (*Camellia sinensis*) and its Active Constituents in Cosmetics. *Molecules*, 24(23), 4277.
- Kumari, A., & Kumar, D. (2022). Evaluation of antioxidant and cytotoxic activity of herbal teas from Western Himalayan region: a comparison with green tea (*Camellia sinensis*) and black tea. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 9(1), 33.
- Ma, J., & Motsinger-Reif, A. (2019). Current methods for quantifying drug synergism. *Proteomics & Bioinformatics: Current Research*, 1(2), 43.
- Makanjuola, S. A., Enujiugha, V. N., Omoba, O. S., & Sanni, D. M. (2015). Combination of antioxidants from different sources could offer synergistic benefits: a case study of tea and ginger blend. *Natural Product Communications*, 10(11), 1934578X1501001110.
- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48-78.
- Mao, S., Wang, K., Lei, Y., Yao, S., Lu, B., & Huang, W. (2017). Antioxidant synergistic effects of *Osmanthus fragrans* flowers with green tea and their major contributed antioxidant compounds. *Scientific Reports*, 7(1), 46501.
- Murokore, B. J., Wacoo, A. P., Wangalwa, R., Ajayi, C. O., Gumisiriza, H., & Masawi, A. N. (2023). Effect of Extraction Period on Total Phenolics, Total Flavonoids, and Antioxidant Capacity of Ugandan *Camellia sinensis* (L) Kuntze, Black Primary Grades and Green Tea. *Journal of Food Quality*, 2023.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.

- National Center for Biotechnology Information (2024). *PubChem Compound Summary for CID 23724707*. Retrieved October 16, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>.
- Panyatip, P., Padumanonda, T., Yongram, C., Kasikorn, T., Sungthong, B., & Puthongking, P. (2022). Impact of Tea Processing on Tryptophan, Melatonin, Phenolic and Flavonoid Contents in Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves: Quantitative Analysis by LC-MS/MS. *Molecules*, 27(15).
- Rahman, H., Shah, M., Shinwari, Z. K., Ali, W., Khan, N. Z., Asim, M., . . . Ayaz, M. (2022). Total phenolic-flavonoids contents, anti-leishmanial, antimicrobial and antioxidant potentials of Pakistani tea brands and tea plant *Camellia sinensis*. *Pakistan Journal of Botany*, 54(2).
- Rajapaksha, S., & Shimizu, N. (2022). Pilot-scale extraction of polyphenols from spent black tea by semi-continuous subcritical solvent extraction. *Food Chemistry: X*, 13, 100200.
- Roell, K. R., Reif, D. M., & Motsinger-Reif, A. A. (2017). An introduction to terminology and methodology of chemical synergy—perspectives from across disciplines. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 158.
- Rohadi, D. I., & Putri, A. S. (2019). Antioxidant capacity of white tea (*Camellia sinensis*) extract: compared to green, oolong and black tea. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 292, 012018.
- Rumpf, J., Burger, R., & Schulze, M. (2023). Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123470.
- Shang, A., Li, J., Zhou, D. D., Gan, R. Y., & Li, H. B. (2021). Molecular mechanisms underlying health benefits of tea compounds. *Free Radical Biology and Medicine*, 172, 181-200.
- Tang, H., Zhang, M., Liu, J., & Cai, J. (2022). Metabolomic and Transcriptomic Analyses Reveal the Characteristics of Tea Flavonoids and Caffeine Accumulation and Regulation between Chinese Varieties (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) and Assam Varieties (*C. sinensis* var. *assamica*). *Genes*, 13(11), 1994.

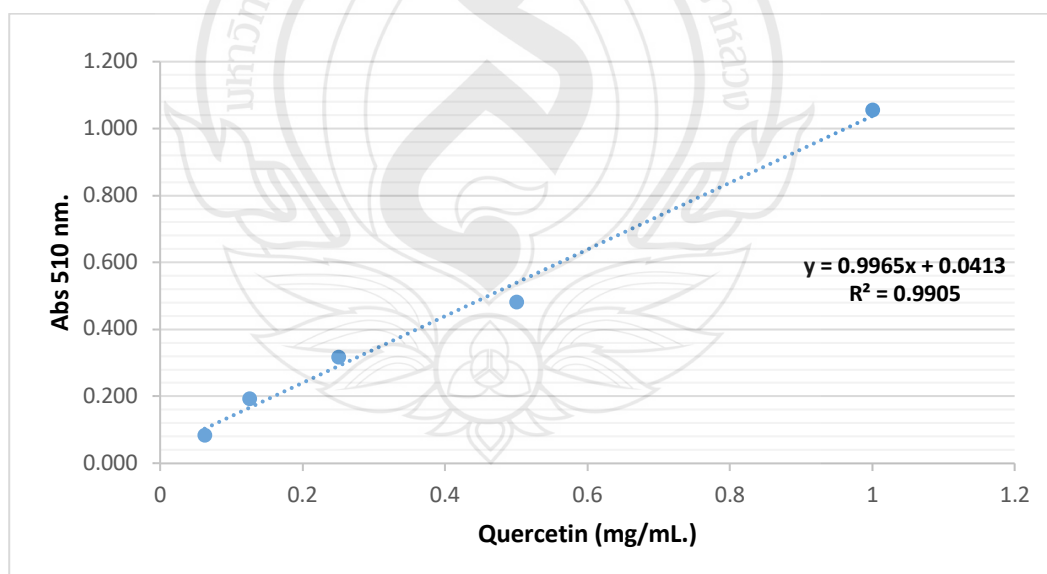
- Tang, G. Y., Zhao, C. N., Xu, X. Y., Gan, R. Y., Cao, S. Y., Liu, Q., . . . Li, H. B. (2019). Phytochemical composition and antioxidant capacity of 30 Chinese teas. *Antioxidants*, 8(6), 180.
- van Vuuren, S., & Viljoen, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies—methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica*, 77(11), 1168-1182
- Vinci, G., D'Ascenzo, F., Maddaloni, L., Prencipe, S. A., & Tiradritti, M. (2022). The influence of green and black tea infusion parameters on total polyphenol content and antioxidant activity by ABTS and DPPH assays. *Beverages*, 8(2), 18.
- Vural, N., Cavuldak, Ö. A., Akay, M., & Anlı, R. E. (2020). Determination of the various extraction solvent effects on polyphenolic profile and antioxidant activities of selected tea samples by chemometric approach. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(3), 1286–1305.
- Xu, J., Wang, M., Zhao, J., Wang, Y. H., Tang, Q., & Khan, I. A. (2018). Yellow tea (*Camellia sinensis* L.), a promising Chinese tea: Processing, chemical constituents and health benefits. *Food Research International*, 107, 567-577.
- Xu, L., Xia, G., Luo, Z., & Liu, S. (2019). UHPLC analysis of major functional components in six types of Chinese teas: Constituent profile and origin consideration. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologies*, 102, 52–57.
- Zhao, C. N., Tang, G. Y., Cao, S. Y., Xu, X. Y., Gan, R. Y., Liu, Q., . . . Li, H. B. (2019). Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions from green, black, oolong, white, yellow and dark teas. *Antioxidants*, 8(7), 215.

ภาคผนวก ก

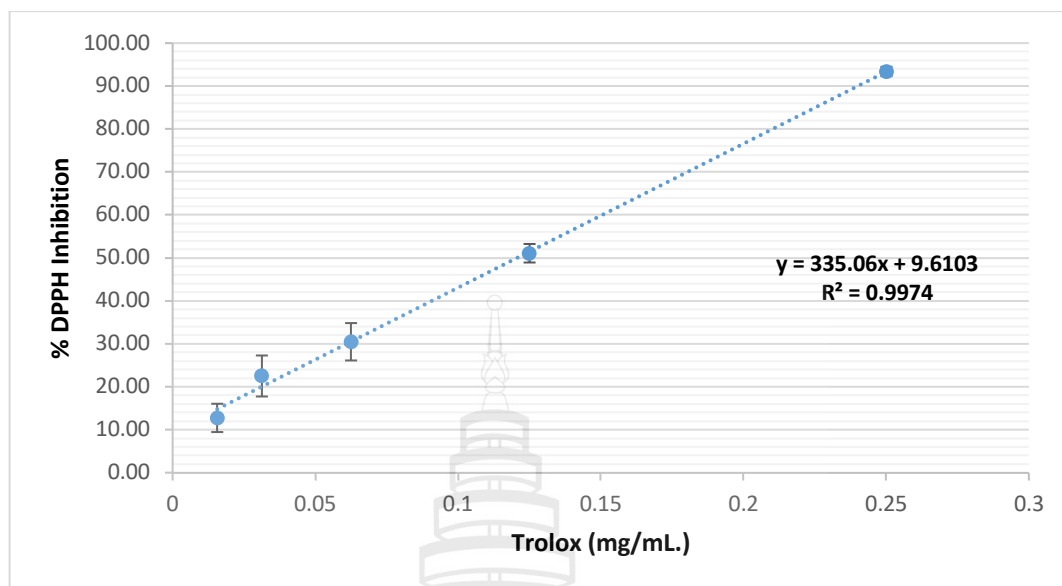
กราฟมาตรฐาน



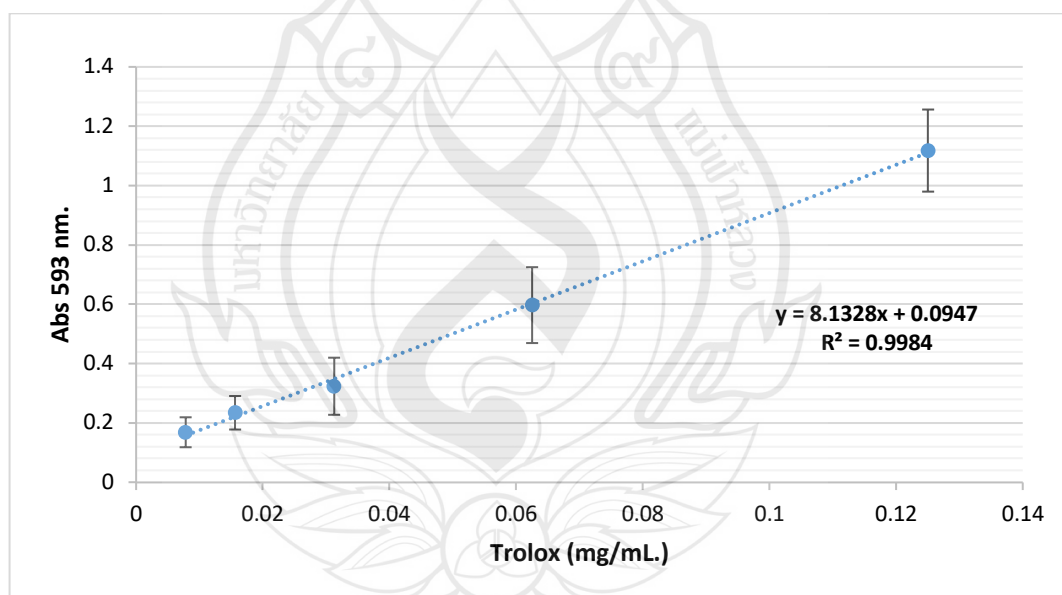
ภาพที่ ก1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม



ภาพที่ ก2 กราฟมาตรฐานของ Quercetin ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

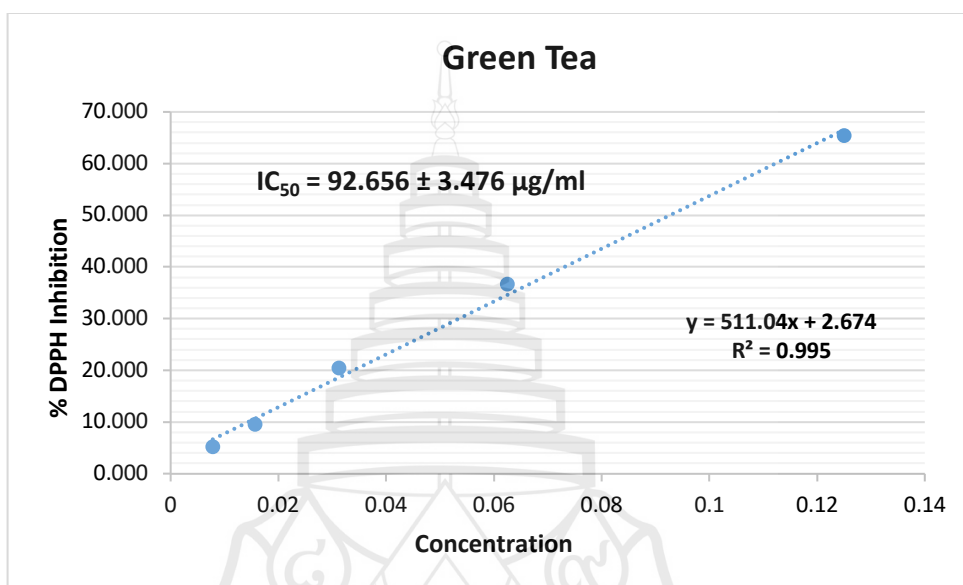
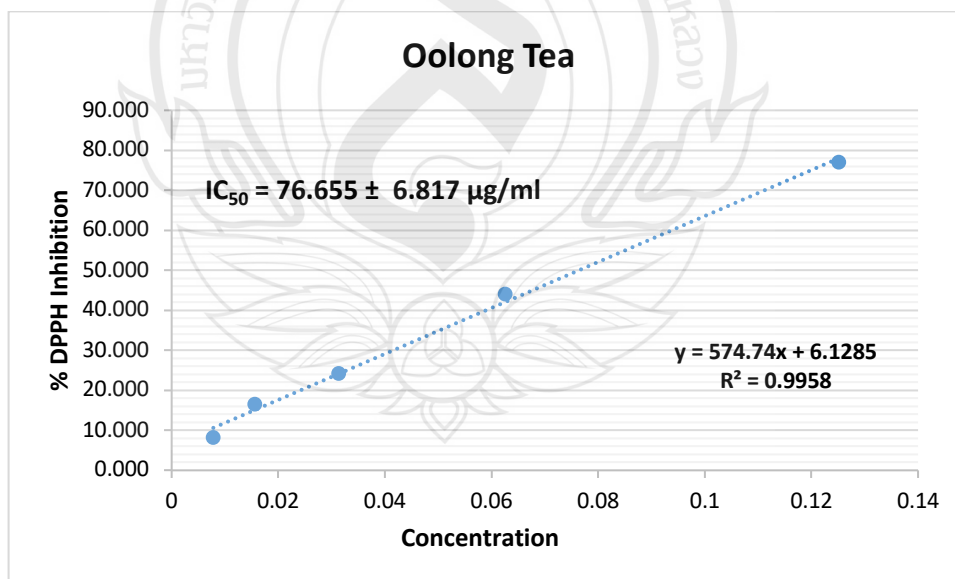


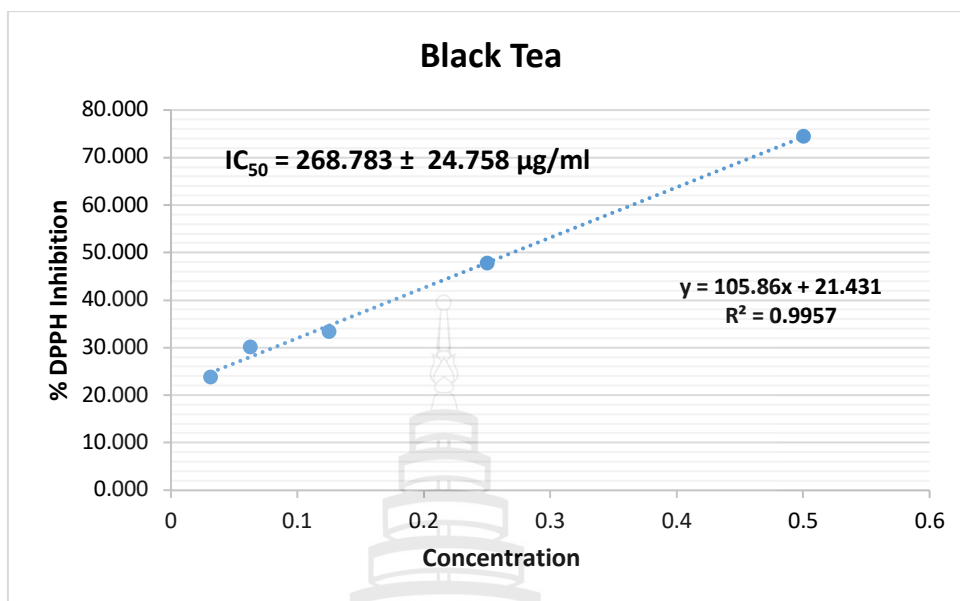
ภาพที่ ก3 กราฟมาตรฐานของ % Inhibition ของสาร Trolox ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH



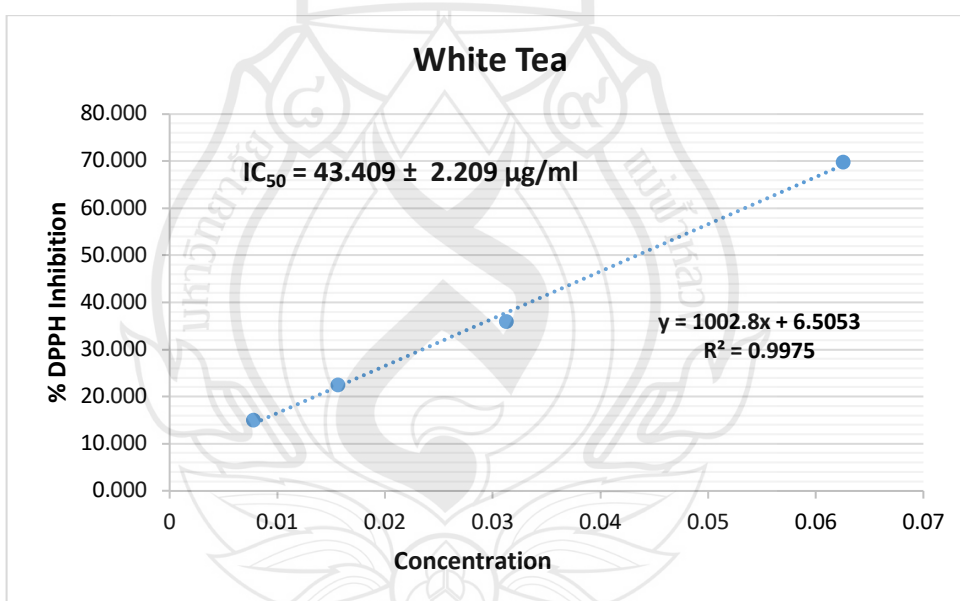
ภาพที่ ก4 กราฟมาตรฐานของ Trolox ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP

ภาคผนวก ข

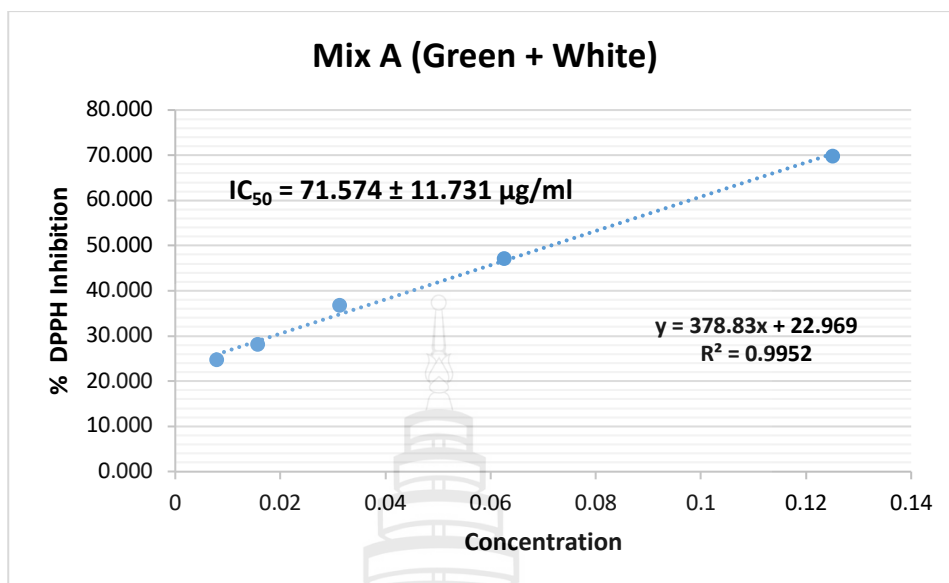
กราฟ IC_{50} ของสารสกัดรูปแบบเดี่ยว และ รูปแบบผสมภาพที่ ข1 กราฟ IC_{50} ของ สารสกัดชาเขียว ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPHภาพที่ ข2 กราฟ IC_{50} ของ สารสกัดชาอู่หลง ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH



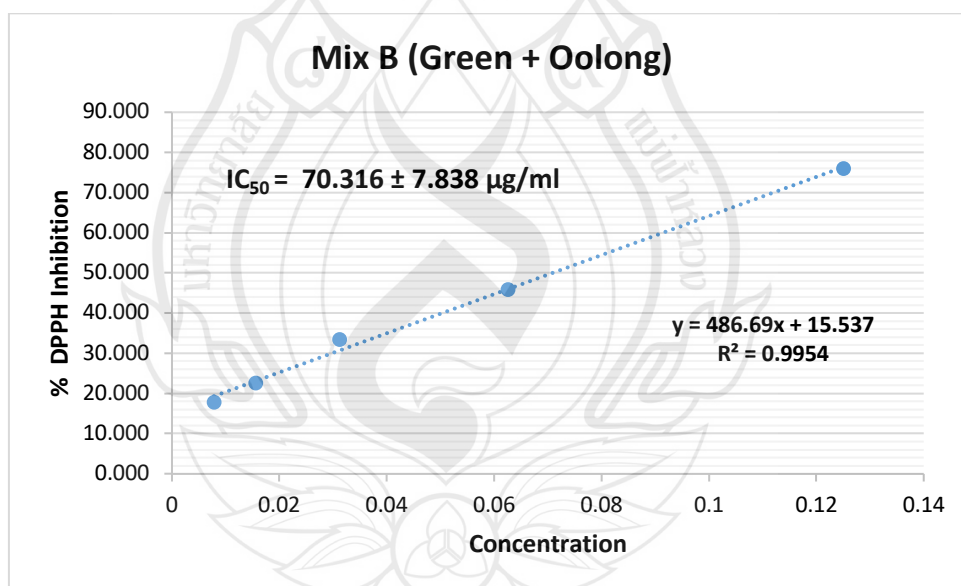
ภาพที่ ข3 กราฟ IC₅₀ ของ สารสกัดชาดำ ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH



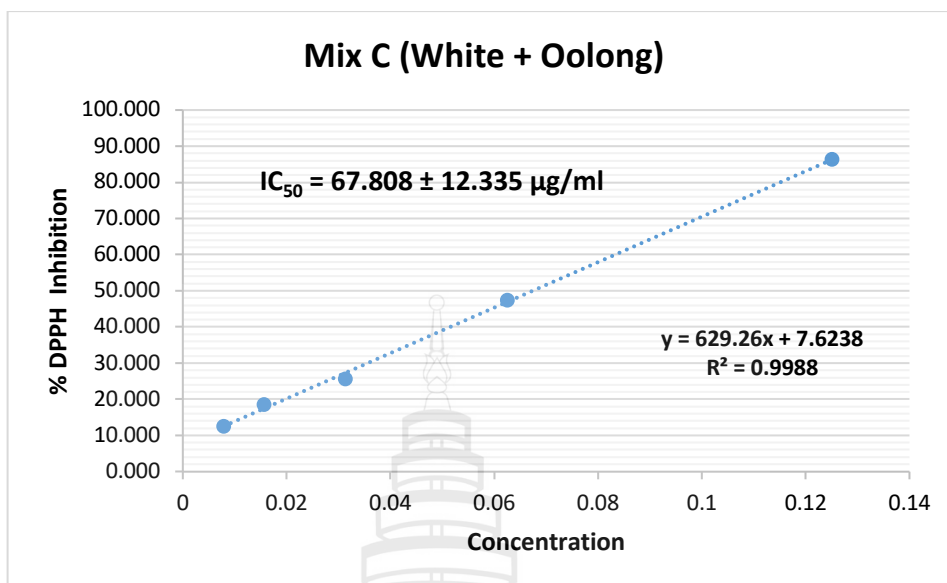
ภาพที่ ข4 กราฟ IC₅₀ ของ สารสกัดชาขาว ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH



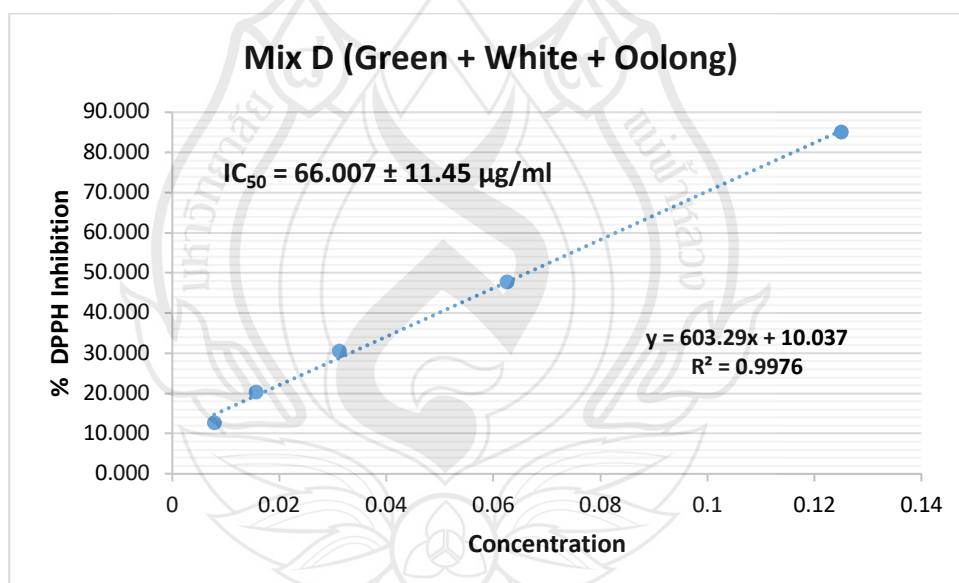
ภาพที่ ข5 กราฟ IC₅₀ ของ สารสกัดชาเขียวผสมชาขาว ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH



ภาพที่ ข6 กราฟ IC₅₀ ของ สารสกัดชาเขียวผสมชาอู่หลง ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH



ภาพที่ ข7 กราฟ IC_{50} ของ สารสกัดชาขาวผสมชาอู่หลง ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH



ภาพที่ ข8 กราฟ IC_{50} ของ สารสกัดชาเขียวผสมชาขาวผสมชาอู่หลง ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH