การสกัดและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากชากฤษณา

Extraction and Antioxidant and Antibacterial Activity Evaluation of Agarwood Tea Extracts

อมราวดี รัตนมา
Amarawadee Rattanama

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering
Prince of Songkla University
2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสกัดและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากชากฤษณา
ผู้เขียน นางสาวอมราวดี รัตนมา
สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุไรวัลย์ รัตนะพิสิฐ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรัสวดี กังสนันท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ .....
(นางสาวอมราวดี รัตนมา)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....
(นางสาวอมราวดี รัตนมา)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสกัดและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากชากฤษณา
ผู้เขียน นางสาวอมราวดี รัตนมา
สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี
ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารจากชากฤษณาที่ผลิตจากใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria subintegra* การสกัดแบบเขย่ามีปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ชนิดของตัวทำละลาย (น้ำ เอทานอล และเอทิลอะซีเตท) อุณหภูมิในการสกัด (30, 55 และ 80 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาการสกัด (1, 2 และ 3 วัน) และความเร็วรอบในการเขย่า (0, 80 และ 160 รอบ/นาที) วิธีการสกัดแบบซอกห์เลตจะทำการศึกษาชนิดของตัวทำละลาย (น้ำ เอทานอล และเอทิลอะซีเตท) และระยะเวลาการสกัด (2, 4 และ 6 ชั่วโมง) สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดแบบเขย่าในแต่ละตัวทำละลายให้ผลได้สูงกว่าการสกัดแบบซอกห์เลต เนื่องจากเวลาการสกัดที่นานกว่า น้ำซึ่งมีความเป็นขั้วสูงสุดเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด นั่นคือสารที่สกัดได้จากชากฤษณาน่าจะประกอบด้วยสารที่มีขั้วในปริมาณที่สูงกว่าสารไม่มีขั้ว สภาวะการสกัดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ ผลได้สารสกัด ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด ปริมาณ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ของตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเอทิลอะซีเตท มีความสอดคล้องและแตกต่างกัน แต่ถ้าพิจารณาในภาพรวม สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยน้ำ คืออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 1 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยเอทานอล คือที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 2 วัน และความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที และสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทคือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 3 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที การสกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเอทิลอะซิเตทที่สภาวะที่เหมาะสม ได้ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดประมาณ 29.80, 7.82 และ 2.80 mg GAE/g agarwood ตามลำดับ และได้ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดประมาณ 15.41, 13.24 และ 3.34 mg QE/ g agarwood ตามลำดับ สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน โดยมีค่า IC_{50} ประมาณ 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบชากฤษณาพบว่าส่วนใหญ่จะเป็นสารจำพวกเทอร์ปีนอยส์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่พบมากในส่วนต่างๆ ของพืช โดยสารบางตัวจะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะในสารสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ซึ่งมีสาร Pentacosane เป็นสารประกอบหลัก ส่วนในสารสกัดของเอทิลอะซิเตทมีสาร Friedelanol เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ และจากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปาก ได้แก่ *Streptococcus mutans (S. mutans)* ATCC 25175, *Streptococcus salivarius (S. salivarius)* ATCC 13419 และ *Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis)* พบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. gingivalis* สารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutan* ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลและสารที่สกัดด้วยวิธีซอกห์เลตไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

Thesis Title Extraction and antioxidant and antibacterial activity evaluation of agarwood tea extracts
Author Miss Amarawadee Rattanama
Major Program Chemical Engineering
Academic Year 2014

ABSTRACT

This research studied the optimum conditions for extraction of agarwood tea leaves from *Aquilaria subintegra*. The shaking extraction conditions were type of solvent (water, ethanol and ethyl acetate), extraction temperature (30, 55 and 80 °C), extraction time (1, 2 and 3 days) and shaking speed (0, 80 and 160 rpm). The Soxhlet extraction conditions were solvent type (water, ethanol and ethyl acetate) and extraction time (2, 4 and 6 hours). Shaking extraction at the optimum conditions of each solvent gave higher extraction yield than Soxhlet extraction because of longer extraction time. Water, which is the most polar solvent was the best solvent. Therefore, the substances from agarwood tea leaves should be polar than non-polar. The optimum conditions to obtain high extraction yield, total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activity were both consistent and different. When considered as a whole the optimum condition of water extraction was temperature of 80 °C, time 1 day and shaking speed 80 rpm. The optimum condition of ethanol extraction was temperature of 80 °C, time 2 day and shaking speed 160 rpm. The optimum condition of ethyl acetate extraction was temperature of 80 °C, time 3 day and shaking speed 80 rpm. Extraction with water, ethanol and ethyl acetate at the optimum conditions yielded total phenolic contents of 29.80, 7.82 and 2.80 mg GAE/g agarwood, respectively and total flavonoid contents of 15.41, 13.24 and 3.34 mg QE/ g agarwood, respectively. Water and ethanol extracts have high antioxidant activities with IC_{50} about 0.02 mg/ml. Extract from ethyl acetate possessed lower antioxidant activity. The components of agarwood tea leaf extracts were mostly terpenoid. Some components had antioxidant activities, especially from water extract that had pentacosane as a major component. Ethyl acetate extract had friedelanol, which exhibits antibacterial activity as a main component. From study of antibacterial activities of the extracts using oral bacteria *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175, *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*) ATCC 13419 and *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) the water extract inhibited growth of *P. gingivalis* and ethyl acetate extract inhibited growth of *S.*

mutans while ethanol extract and Soxhlet extracts did not show antibacterial activities.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(13)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(15)
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 การสำรวจเอกสาร	2
1.2.1 ต้นกฤษณา	2
1.2.2 กรรมวิธีในการผลิตชากฤษณา	5
1.2.3 การสกัดสมุนไพร	6
1.2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)	9
1.2.5 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)	17
1.2.6 เชื้อแบคทีเรียในช่องปาก (Oral bacteria)	20
1.3 งานวิจัย	22
1.4 วัตถุประสงค์	25
1.5 ขอบเขตของงานวิจัย	26
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	26
2. วิธีการวิจัย	27
2.1 วัตถุดิบ	27
2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด	27
2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์	27
2.4 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ	28
2.5 วิธีการทดลอง	30
2.5.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพฤกษเคมีจากชากฤษณา	30
2.5.2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชากฤษณา	32
2.5.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในช่องปากของสารสกัดจากชากฤษณา	34
3. ผลและวิจารณ์การทดลอง	36
3.1 ผลได้สารสกัดจากชากฤษณา	36
3.2 ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด	40
3.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	46
3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	51

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากชากฤษณา	54
3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	59
3.6.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar dilution method	59
3.6.2 การทดสอบหาค่า MIC และ MBC	60
4. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	62
4.1 บทสรุป	62
4.1.1 ผลได้จากการสกัด	62
4.1.2 การสกัดฟีนอลิกส์	62
4.1.3 การสกัดฟลาโวนอยด์	62
4.1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	63
4.1.5 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด	63
4.1.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	63
4.1.7 สภาวะการสกัดที่เหมาะสม	63
4.2 ข้อเสนอแนะ	64
บรรณานุกรม	65
ภาคผนวก	74
ก การออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรม RSM	75
ข การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด	77
ค การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	80
ง การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	83
จ องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากชากฤษณา	86
ฉ การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	94
ช บทความการประชุมทางวิชาการ	97
ประวัติผู้เขียน	109

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1-1 สารละลายแต่ละชนิดที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญชนิดต่างๆ	7
1-2 สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	16
1-3 แสดงการทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบกฤษณา	22
2-1 สมบัติความมีขั้วและจุดเดือดของตัวทำละลายแต่ละชนิด	30
2-2 การออกแบบการทดลองที่สภาวะต่างๆ	31
3-1 สภาวะในการสกัดและเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดแต่ละชนิด	39
3-2 ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดของสารสกัดแต่ละสภาวะ	41
3-3 การวิเคราะห์ ANOVA ของสมการแสดงประสิทธิภาพ ในการสกัดปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดด้วยเอทิลอะซิเตท	44
3-4 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟีนอลิกส์ด้วยเอทิลอะซิเตท	45
3-5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดแต่ละสภาวะ	46
3-6 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยน้ำ	49
3-7 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยเอทานอล	49
3-8 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยเอทิลอะซิเตท	49
3-9 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยน้ำ	50
3-10 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยเอทานอล	51
3-11 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยเอทิลอะซิเตท	51
3-12 ค่า IC_{50} ของสารสกัดแต่ละสภาวะ	52
3-13 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท	53
3-14 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดที่ได้ค่า IC50 ต่ำที่สุด โดยเปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่โปรแกรมทำนายกับสภาวะที่ทดลองจริง	54
3-15 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS	55
3-16 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS	55
3-17 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS	57
3-18 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Agar dilution method	60
3-19 แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดชากฤษณา ที่ใช้น้ำและเอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย	61
จ-1 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณา โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS	88

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
จ-2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณา โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS	89
จ-3 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณา โดยใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS	92

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1-1 เมล็ดพันธุ์และต้นกล้ากฤษณา	2
1-2 a) ใบกฤษณาก่อนนำไปอบ และ b) ชากฤษณา	4
1-3 กระบวนการผลิตชากฤษณาของวิสาหกิจชุมชนแปรรูปไม้กฤษณาไทย รุ่งการเกษตร – ศรีวิชัย (สะเดา)	5
1-4 a) อนุมูลอิสระของลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์ b) วิตามินอีที่ถูกป้อนเข้ามาภายในเยื่อหุ้มเซลล์	10
1-5 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ a) BHA, b) BHT, c) PG และ d) TBHQ	11
1-6 สารต้านอนุมูลอิสระในประเภทของกรดฟีนอลิกส์	12
1-7 สารต้านอนุมูลอิสระในประเภทของฟีนอลิกส์ไดเทอร์พีน	13
1-8 สารต้านอนุมูลอิสระในประเภทของฟลาโวนอยด์	14
1-9 สารต้านอนุมูลอิสระในประเภทน้ำมันหอมระเหย	15
1-10 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์และฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ	18
1-11 แบบจำลองการฟอร์มตัวกันของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก	21
1-12 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกส์ในสารสกัดจากใบกฤษณา *A. sinensis*	23
2-1 ชากฤษณาจากวิสาหกิจชุมชนแปรรูปไม้กฤษณาไทยรุ่งการเกษตร-ศรีวิชัย (สะเดา)	27
2-2 โซนยับยั้งของสารสกัดจากชากฤษณาที่สกัดด้วยน้ำ	34
2-3 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด	35
3-1 ร้อยละผลได้ของการสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยใช้อัตราส่วนของชากฤษณาต่อตัวทำละลายที่ 5 กรัมต่อ 200 มิลลิลิตร	36
3-2 ร้อยละผลได้ของการสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยใช้อัตราส่วนของชากฤษณาต่อตัวทำละลายที่ 10 กรัมต่อ 200 มิลลิลิตร	37
3-3 ร้อยละผลได้ของการสกัดแบบเขย่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	37
3-4 ร้อยละผลได้ของการสกัดแบบเขย่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	38
3-5 ร้อยละผลได้ของการสกัดแบบเขย่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส	38
3-6 ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดของการสกัดแบบเขย่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ (a) ระยะเวลาการสกัด 1 วัน (b) ระยะเวลาการสกัด 2 วัน และ (c) ระยะเวลาการสกัด 3 วัน	42

3-7 กราฟพื้นผิวแสดงปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (a) กราฟพล็อตระหว่างอุณหภูมิและความเร็วรอบในการเขย่า และ (b) กราฟพล็อตระหว่างอุณหภูมิกับเวลา 45
3-8 ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดของการสกัดแบบเขย่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ (a) ระยะเวลาการสกัด 1 วัน (b) ระยะเวลาการสกัด 2 วัน และ (c) ระยะเวลาการสกัด 3 วัน 48
ก-1 ขั้นตอนการออกแบบการทดลอง 76
ข-1 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด 78
ข-2 กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ GAE 79
ค-1 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 81
ค-2 กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ QE 82
ง-1 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 84
ง-2 แสดงกราฟ IC_{50} ของ สารสกัด#1 85
จ-1 โครมาโทแกรมของสารสกัดชากฤษณา (น้ำ) สกัดด้วยวิธีซอกห์เลต 87
จ-2 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากชากฤษณา (น้ำ) สกัดด้วยวิธีเขย่า 87
จ-3 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากชากฤษณา (เอทานอล) สกัดด้วยวิธีซอกห์เลต 88
จ-4 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากชากฤษณา (เอทานอล) สกัดด้วยวิธีเขย่า 89
จ-5 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากชากฤษณา (เอทิลอะซีเตท) สกัดด้วยวิธีซอกห์เลต 91
จ-6 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากชากฤษณา (เอทิลอะซีเตท) สกัดด้วยวิธีเขย่า 91
ฉ-1 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 95

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันพืชหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรค โดยพืชเหล่านี้ได้ถูกนำมาศึกษาเพื่อหาสารออกฤทธิ์และนำมาผลิตเป็นยารักษาโรคชนิดใหม่ พืชจำพวกผักผลไม้ และสมุนไพรจะมีสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) อาทิ วิตามินซี โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และโทโคเฟอรอล ซึ่งเป็นสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อจุดประสงค์บางอย่าง เช่น ให้สีสันกับพืช ป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคและแมลง โดยมีคุณสมบัติที่เป็นสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial) [1] ไม้กฤษณาก็เช่นเดียวกัน ไม้กฤษณาเป็นไม้ที่มีมูลค่า น้ำมันหอมระเหยกฤษณาจัดเป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีราคาสูงที่สุด ประเทศไทยเป็นประเทศแรกที่สามารถส่งผลิตภัณฑ์จากไม้กฤษณาจำหน่ายทั่วโลกอย่างถูกต้องตามกฎหมายและตามอนุสัญญาไซเตส (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: CITES) จากสถิติการขึ้นทะเบียนเกษตรกรในปี 2556 มีการเพาะปลูกต้นกฤษณาถึง 684 ครัวเรือน หรือประมาณ 3,240 ไร่ [2] ต้นกฤษณาใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 7-10 ปี จึงมีการคิดค้นนำใบกฤษณามาผลิตเป็นใบชา เพื่อเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร โดยมีความเชื่อว่าน้ำจากใบกฤษณาสามารถรักษาโรคภูมิแพ้ และโรคเบาหวานได้ [3] Dash และคณะ [4] ศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดจากใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria agallocha Roxb.* โดยทำการสกัดด้วยเทคนิคซอกห์เลต (Soxhlet) โดยใช้น้ำและเมทานอลเป็นตัวทำละลาย พบซาโปนิน (Saponin) ไกลโคไซด์ (Glysosides) คาร์บอไฮเดรต โปรตีน และกรดอะมิโน โดยสารที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอลแสดงการยับยั้งแบคทีเรียบาซิลัสสับทิลิส (*Bacillus Subtilis*) มากที่สุด Huda และคณะ [5] ศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria malaccensis* โดยการสกัดด้วยเทคนิค Maceration ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล พบว่าสารสกัดประกอบด้วย อัลคาลอยด์ (Alkaloids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ไทรเทอร์พินอยด์ (Triterpenoids) สเตอรอยด์ (Steroids) และซาโปนิน โดยฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (Scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับกับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ของมนุษย์ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร ปัจจุบันองค์กรที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้พยายามพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติเช่น สาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อรา และพืชชั้นสูง กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือ เบต้าแคโรทีน (β-carotinoid) รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอลซึ่งเป็นพฤษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วย

เสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น [6]

วิสาหกิจชุมชนแปรรูปไม้กฤษณาไทยรุ่งการเกษตร – ศรีวิชัย (สะเดา) ผลิตชากฤษณาโดยอาศัยภูมิปัญญาของบรรพบุรุษที่สืบทอดกันมาด้วยใบกฤษณาสายพันธุ์เอควิลาเรีย ซับอินทิกรา (*Aquilaria subintegra*) ผลิตภัณฑ์ได้รับความนิยมพอสมควร ทั้งนี้ในการที่จะยกระดับผลิตภัณฑ์ให้เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางมากขึ้น จำเป็นจะต้องมีผลจากงานวิจัยในส่วนขององค์ประกอบทางเคมีของชากฤษณา รวมถึงสรรพคุณขององค์ประกอบดังกล่าว กรรมวิธีการสกัดมีผลเป็นอย่างมากต่อปริมาณและองค์ประกอบของสารสกัดที่ได้ งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการสกัด 2 แบบ คือ การสกัดแบบเขย่าและการสกัดแบบซอกห์เลต โดยศึกษาชนิดของตัวทำละลาย และระยะเวลาในการสกัด นอกจากนี้ในส่วนของการสกัดแบบเขย่า จะศึกษาอุณหภูมิการสกัดและความเร็วรอบของการเขย่า เพื่อให้ได้ปริมาณสารพฤกษเคมีที่สนใจสูงสุด จากนั้นจะนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดที่สภาวะที่เหมาะสมมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเพิ่มเติมและทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในช่องปาก

1.2 การสำรวจเอกสาร

ต้นกฤษณาเป็นไม้หอมมูลค่าสูงที่นิยมเพาะปลูกด้วยเมล็ด หรือนำต้นกล้าที่เจริญเติบโตจากเมล็ดที่ร่วงหล่นรอบๆ ต้นกฤษณามาเพาะชำในโรงเพาะชำดังภาพประกอบที่ 1-1 ก่อนจะนำต้นกล้าที่แข็งแรงมาปลูกในพื้นที่ที่ได้จัดเตรียมไว้ โดยเกษตรกรนิยมปลูกเพื่อนำเนื้อไม้มาสกัดเป็นน้ำมันหอมระเหยซึ่งขายได้ราคาดี และน้ำมันหอมจากไม้กฤษณามีตลาดรองรับชัดเจน ส่วนต่างๆ ที่เหลือจากการสกัดน้ำมันหอมระเหย เช่น กากไม้สามารถนำไปผลิตเป็นธูปหอม ใบกฤษณาสามารถนำไปอบแห้งผลิตเป็นชากฤษณา เพื่อสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรอีกด้วย

1.2.1 ต้นกฤษณา

ภาพประกอบ 1-1 เมล็ดพันธุ์และต้นกล้ากฤษณา [7]

ต้นกฤษณา ในประเทศไทย มีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ [8] ได้แก่

1) *Aquilaria crassa* Pierre ex Lecomte กฤษณา, ไม้หอม (ตะวันออก), Eagle wood

2) *A. hirta* Ridl. จะแน (นราธิวาส)

3) *A. malaccensis* Lam. กายูการู กายูกาฮู (มาเลย์-ปัตตานี), พวมพร้าว (พัทลุง), Wood tree, Lignum aloes, Agarwood, Aloewood, Calambac

4) *A. subintegra* Ding Hou กำแย (ใต้)

ชื่อวงศ์ : *Thymelaeaceae*

องอาจ [9] ได้ศึกษาการกระจายพันธุ์ของไม้กฤษณาในประเทศไทยพบมากตามสถานที่ต่างๆ ดังนี้

1) เอควิลาเรีย คราสน่า (*Aquilaria crassna*) พบในป่าดิบชื้นและป่าดิบแล้งทางภาคเหนือ (เชียงราย แพร่ น่าน) ภาคกลาง (กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ โดยเฉพาะพบมากที่อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ บริเวณดงพญาไฟ)

2) เอควิลาเรีย มาลัคเคนซิส (*Aquilaria malaccensis*) พบบริเวณภาคใต้ที่มีความชุ่มชื้น (เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง กระบี่ ตรัง พัทลุง ยะลา) โดยเฉพาะที่เขาช่อง จังหวัดตรัง มักพบกฤษณาต้นใหญ่ที่สุดถูกโค่นเหลือแต่ตอทิ้งไว้เป็นจำนวนมาก

3) เอควิลาเรีย สับอินทิกร้า (*Aquilaria subintegra*) พบมากทางภาคตะวันออก (ระยอง จันทบุรี ตราด โดยเฉพาะที่เขาสอยดาว)

ณัฐวัฒน์ [10] พบว่าต้นกฤษณามักเจอในป่าดิบชื้นและป่าดิบแล้งหรือที่ราบใกล้แหล่งน้ำ สามารถเจริญเติบโตได้สูงถึง 1,100 เมตร หรือมากกว่าระดับน้ำทะเลปานกลาง พบต้นกฤษณาเป็นจำนวนมากบริเวณอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ โดยต้นกฤษณาจะขึ้นมาแซมกับไม้ชนิดอื่น เช่น ต้นยาง ยมหอม ยมหิน หว้า ก่อเดือย กระโดงแดงและอื่นๆ ปัจจุบันข้อมูลพื้นที่สวนป่าไม้กฤษณาของประเทศไทยยังไม่ชัดเจนเท่าที่ควร สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณะสุข [11] ได้ทำการรวบรวมข้อมูลจากแหล่งข้อมูล 2 แหล่ง ได้แก่

1) ข้อมูลจากชมรมผู้ปลูกไม้กฤษณาจำนวน 5 แห่งทั่วประเทศ ได้แก่ ชมรมกฤษณาตราด กลุ่มอนุรักษ์กฤษณาสตูล กลุ่มผู้ปลูกไม้กฤษณา (ไม้หอม) และสบู่ดำจังหวัดศรีสะเกษ โครงการส่งเสริมการปลูกไม้เศรษฐกิจของกรมป่าไม้ และชมรมไม้กฤษณา (ไม้หอม) แห่งประเทศไทย สาขาอุตรดิตถ์

2) ข้อมูลจากแบบสอบถามนักวิชาการเกษตรหรือเจ้าหน้าที่รัฐที่เกี่ยวข้องจำนวน 66 คน

จากผลการศึกษาจากแหล่งข้อมูลแรกพบว่า มีการปลูกสร้างสวนป่าไม้กฤษณาทั้งหมด 38 จังหวัด คิดเป็นพื้นที่ปลูกทั้งหมดประมาณ 4,031 ไร่ โดยภาคตะวันออกมีพื้นที่ปลูกมากที่สุด จำนวน 1,337 ไร่ โดยเฉพาะจังหวัดตราดมีผู้ปลูกสร้างสวนป่ากฤษณามากที่สุดในประเทศไทย ทั้งสิ้น 119 ราย คิดเป็นพื้นที่ปลูกทั้งหมด 1,097 ไร่ ส่วนภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการปลูกไม้กฤษณาทั้งหมด 17 จังหวัด มีเนื้อที่ประมาณ 1,060 ไร่ สำหรับภาคเหนือมีพื้นที่ปลูกประมาณ 1,300

ไร่ ภาคกลางและภาคใต้มีพื้นที่สวนป่าไม้กฤษณาประมาณ 86 และ 192 ไร่ ตามลำดับ หรือหากคำนวณเป็นจำนวนต้นที่ปลูกพบว่ามีต้นกฤษณาที่ปลูกในประเทศไทยจำนวนทั้งสิ้น 1.6 ล้านต้น (คำนวณจากพื้นที่ 1 ไร่ ปลูกกฤษณา 400 ต้น) สำหรับข้อมูลที่ได้จากแหล่งที่สองพบว่า มีพื้นที่ปลูกสวนป่าไม้กฤษณาในประเทศไทยจำนวน 4,651 ไร่ (ทั้งนี้ข้อมูลพื้นที่สวนป่ากฤษณาจากทั้งสองแหล่งข้อมูลได้นับรวมทั้งปลูกแบบสวนป่า เชิงเดี่ยว และปลูกแบบผสมกับไม้ชนิดอื่นๆ)

สุทธิสินธุ์ [12] ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกใบกฤษณา เมื่อเก็บใบกฤษณามาแล้วจะต้องคัดเลือกใบที่ไม่สมบูรณ์ออกไปก่อน เช่น ใบที่เหี่ยวแห้ง ใบเหลืองหรือยอดอ่อน (เนื่องจากใบกฤษณาเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณเป็นยาไม่ใช่ชาโดยตรง ดังนั้นส่วนที่เป็นยอดจะมีสารออกฤทธิ์ที่ไม่พึงประสงค์อยู่เป็นจำนวนมากจึงต้องคัดออก) ใบที่ใช้ต้องเป็นใบแก่สีเขียวสดเท่านั้นดังภาพประกอบ 1-2 a) จึงจะสมบูรณ์ที่สุด จากนั้นจึงนำส่วนที่สมบูรณ์มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดก่อนนำไปเข้ากระบวนการผลิตชาต่อไป

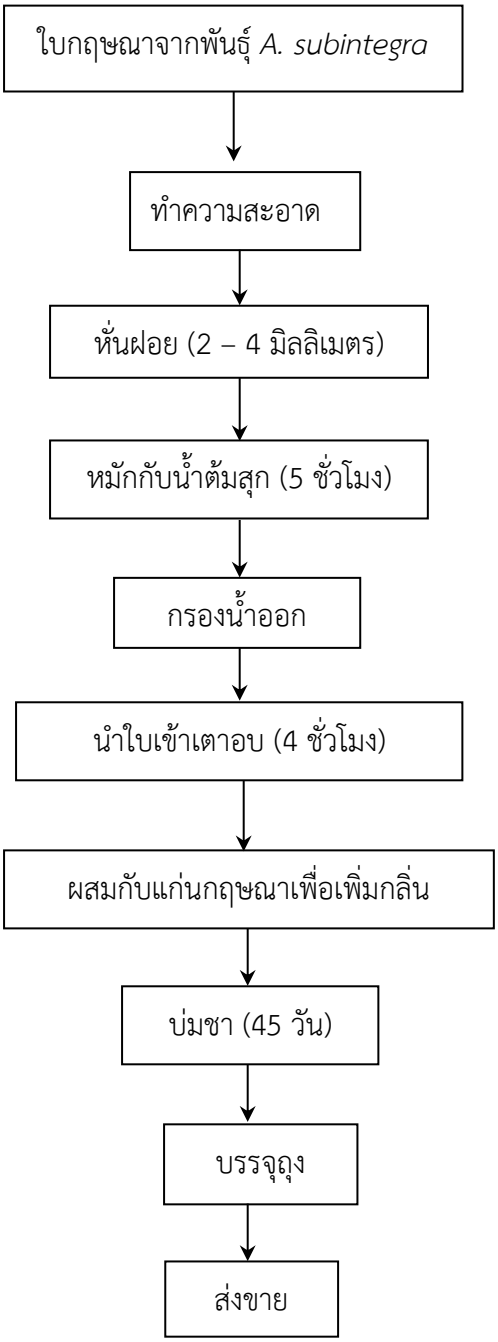
ภาพประกอบ 1-2 a) ใบกฤษณาก่อนนำไปอบ [3] และ b) ชากฤษณา [13]

ภาพประกอบ 1-2 b) คือลักษณะใบชากฤษณาที่ดีซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้ [12]

- ลักษณะใบชาจะเป็นเส้น โดยจะหั่นซอยให้มีขนาด 0.5-1 เซนติเมตร สีของใบจะต้องมีสีเหลืองปนเขียวอ่อนๆ เท่านั้น
- กลิ่น ชากฤษณาที่ดีจะมีกลิ่นหอมที่เป็นธรรมชาติของกลิ่นไม้กฤษณา ซึ่งกลิ่นจะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะไม่เหมือนใคร
- รสชาติ จะไม่มีรสขมหรือหากขมก็จะขมในลำคอเล็กน้อยหลังจากดื่มเข้าไปแล้วเท่านั้น และจะชุ่มคอตลอดเวลา

1.2.2 กรรมวิธีในการผลิตชากฤษณา

กรรมวิธีการผลิตชากฤษณาแสดงดังภาพประกอบ 1-3



ภาพประกอบ 1-3 กระบวนการผลิตชากฤษณาของวิสาหกิจชุมชนแปรรูปไม้กฤษณาไทยรุ่งการเกษตร – ศรีวิชัย (สะเดา) [13]

1.2.3 การสกัดสมุนไพร

พืชที่มีฤทธิ์ทางยาถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคตั้งแต่สมัยโบราณ ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ทางยาเหล่านั้นนำมาจากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เปลือกไม้ ใบ ดอก ราก ผล และเมล็ด เป็นต้น โดยส่วนต่างๆ จะมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคที่แตกต่างกัน การตรวจสอบและคัดกรองพืชในแต่ละสายพันธุ์เพื่อหาสารใหม่ๆ จึงเกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการหลายๆ พื้นที่ โดยนักวิทยาศาสตร์จะวิเคราะห์สารสำคัญในพืชตามแนวโน้มที่คาดว่าจะเป็นไปได้ โดยศึกษาจากการรักษาโรคของหมอพื้นบ้านในพื้นที่ที่พบพืชชนิดนั้น การสกัดพืชสามารถใช้พืชได้ทั้งแบบสดๆ และแบบอบแห้ง ในหลายๆ งานวิจัยได้รายงานผลโดยการสกัดพืชแบบที่ยังไม่ผ่านการอบแห้งเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tay และคณะ [14] ที่นำใบอ่อนกฤษณา *A. crassna* ซึ่งชาวบ้านใช้ในการรักษาโรคเนื่องจากใบกฤษณามีสรรพคุณในการแก้ปวด เป็นยาระบาย และกล่อมประสาท มาสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content) และปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด (Total phenolic content) และในหลายๆ งานวิจัยก็ศึกษาการสกัดจากพืชที่ผ่านการอบแห้งแล้ว เช่นงานวิจัยของ Kakino และคณะ [15] ที่นำสารสกัดใบกฤษณาอบแห้งสายพันธุ์ *A. crassna* มาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของหนูทดลอง พบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ส่งผลให้เกิดสารพิษในลำไส้ เช่น *Staphylococcus aureus, Clostridium difficile* และ *Bacteroides spp* ดังนั้นสารสกัดของพืชแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน โดยผลของสารเคมีตามธรรมชาติ (Phytochemicals) ที่พบในสารสกัดจากพืชขึ้นอยู่กับ [16]

1. สายพันธุ์ของพืชที่ใช้ในการสกัด
2. ถิ่นกำเนิดของพืชที่ใช้ในการสกัด
3. อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด
4. ค่าความชื้น (Moisture content) ของพืชที่ใช้ในการสกัด
5. ขนาดของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการสกัด

วิธีการสกัดที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อปริมาณและสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) โดยจะขึ้นอยู่กับ

1. วิธีการสกัด
2. เวลาที่ใช้ในการสกัด
3. อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด
4. ชนิดของสารละลาย
5. ความเข้มข้นของสารละลาย
6. ความเป็นขั้วของสารละลาย

การหาองค์ประกอบทางเคมีหรือสารสำคัญในพืชแต่ละชนิดส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด คุณสมบัติของตัวทำละลายที่ดีจะต้องมีความเป็นพิษต่ำ สามารถระเหยที่อุณหภูมิต่ำได้ ไม่ละลายสารที่เราไม่ต้องการจะสกัด สามารถสกัดสารที่เราต้องการได้ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเลือกใช้ตัวทำละลายคือปริมาณสารสำคัญที่เราต้องการสกัด อัตราการสกัด ความหลากหลายของสารสำคัญที่สกัดได้ ความหลากหลายในการยับยั้งการสกัดสารสำคัญ และความเป็นพิษของสารละลายในกระบวนการสกัด หลังจากการระเหยเอาตัวทำละลายออก สารสกัดอาจจะหลงเหลือตัวทำละลายอยู่เล็กน้อย ตัวทำละลายที่ใช้จึงไม่ควรจะเป็นสารพิษ ดังนั้นการเลือกสารละลายที่ใช้ในการสกัดจะขึ้นอยู่กับสารสำคัญที่เราต้องการจะสกัด แสดงดังตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 สารละลายแต่ละชนิดที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญชนิดต่างๆ [17]

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

ที่มา : Marjorie Murphy Cowan, 1999.

ชากฤษณานับเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่รู้จักนำใบกฤษณามาผ่านกระบวนการผลิตดังภาพประกอบ 1-3 เพื่อทำให้เก็บรักษาได้นานขึ้น เร่งสารประกอบที่มีประโยชน์ออกมา และความขมลดลงจึงรับประทานง่าย ซึ่งชากฤษณาถือเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่สามารถชงดื่มเพื่อบำรุงสุขภาพได้ โดยจะต้องแช่ใบชาทิ้งไว้ในน้ำร้อนประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้สารสำคัญในใบชากฤษณาแพร่ออกมา จากการสำรวจงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสภาวะและวิธีการสกัดสมุนไพรจะส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ได้ โดยมีการสกัดสารสำคัญในการออกฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาในรูปของสารบริสุทธิ์ หรือสารสกัดที่มีปริมาณสารสำคัญสูง ซึ่งการสกัดสมุนไพรสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่จะสกัด วิธีการสกัดสารแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน โดยแต่ละวิธีจะขึ้นอยู่กับ เวลาที่ใช้ในการสกัด สารละลายที่ใช้ ความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลาย อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ขนาดอนุภาคของพืชที่ใช้ในการสกัด และอัตราส่วนของสารละลายต่อน้ำหนักของพืชที่ใช้ในการสกัด วิธีการสกัดที่นิยมใช้ได้แก่ [18]

1) การสกัดแบบแช่ (Maceration) จากการวิจัยของ Khalil และคณะ [19] สกัดใบกฤษณาที่ยังไม่ผ่านการอบแห้งด้วยวิธีการสกัดแบบแช่โดยมีเมทานอลเป็นตัวทำละลาย ซึ่งสารที่สกัดได้ก็จะถูกนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในใบกฤษณา วิธีการสกัดแบบแช่เป็นวิธีการสกัดสมุนไพรโดยนำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายในภาชนะปิด ทิ้งไว้เป็นเวลา 3-7 วัน อาจจะมีการเขย่าหรือคนบ้าง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดก็นำมากรองเพื่อแยกสารละลายออกจากกาก (Marc) และนำกากมาสกัดซ้ำด้วยวิธีการเดิมอีกหลายๆ รอบ วิธีการนี้มีข้อดีคือเป็นการสกัดที่ไม่ต้องใช้ความร้อน และข้อเสียคือสิ้นเปลืองตัวทำละลายและเวลาที่ใช้ในการสกัด จึงมีการพัฒนามาใช้การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิค (Ultrasonic extraction) โดยใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงเกิน 20,000 Hz แต่การใช้วิธีนี้สกัดอาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำ ซึ่งอาจทำให้มีผลต่อสารสกัดและอาจทำให้เกิดการออกซิเดชัน (Oxidation) ต่อสารโดยตรง เพราะขณะที่ใช้คลื่นความถี่สูง (Ultrasound) จะทำให้เกิดช่องว่างทำให้อากาศแทรกเข้าไปในตัวทำละลาย นอกจากนี้อาจจะมีการเพิ่มอุณหภูมิของ Ultrasonic bath เพื่อลดระยะเวลาในการสกัด แต่อาจจะทำให้สารสำคัญสลายตัวได้

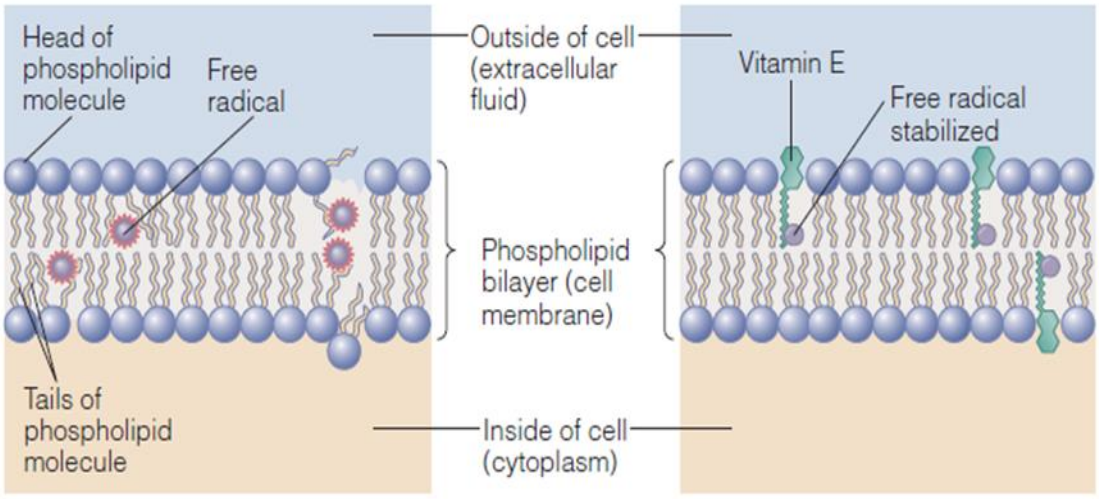
2) การแช่สกัดต่อเนื่อง (Percolation) เป็นการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยเครื่อง Percolator โดยนำสมุนไพรไปบดให้เป็นผง จากนั้นนำมาแช่ในตัวทำละลายให้พอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้สมุนไพรพองตัว แล้วค่อยๆ ใส่ผงสมุนไพรลงใน Percolator ทีละนิด และเติมตัวทำละลายลงไปให้ท่วม หรือให้ระดับของตัวทำละลายสูงกว่าผงสมุนไพรประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออก จะต้องระวังไม่ให้ผงสมุนไพรแห้ง จึงต้องคอยเติมสารละลายลงไปเรื่อยๆ เก็บสารสกัดจนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ ในอุตสาหกรรมการผลิตยาจะนำ Percolator มาต่อกันหลายๆ ตัว เรียกว่า Countercurrent-operated percolator battery เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้ดีขึ้น ข้อเสียของวิธีการสกัดคือ ผงสมุนไพรอาจจะจับตัวกันเป็นก้อนทำให้เกิดการอุดตันและสารละลายไม่สามารถแทรกซึมเข้าไปสกัดได้ และหากบรรจุผงสมุนไพรไม่สม่ำเสมอจนเกิดเป็นช่องอาจจะทำให้สารละลายไหลผ่านช่องออกไปโดยไม่ผ่านผงสมุนไพรทำให้การสกัดไม่สมบูรณ์แบบ

3) การสกัดแบบไหลย้อนกลับ (Reflux extraction) มีการใช้ความร้อนในการสกัดโดยความร้อนที่ใช้มักจะเป็นความร้อนที่จุดเดือดของตัวทำละลาย ทำให้สามารถสกัดสารออกมาได้ภายในระยะเวลาอันสั้น โดยส่วนมากในการสกัดสมุนไพรจะใช้เวลาในการสกัดเพียง 1 ชั่วโมง การสกัดแบบไหลย้อนกลับยังช่วยลดการสูญเสียตัวทำละลายเนื่องจากมีอุปกรณ์หล่อเย็น (Condenser) ช่วยหมุนเวียนตัวทำละลายกลับมายังภาชนะที่ใช้สกัดสมุนไพรอีกครั้ง แต่วิธีการสกัดแบบนี้ไม่เหมาะกับสารสกัดที่ต้องใช้ตัวทำละลายจุดเดือดสูง

4) การสกัดด้วยซอกห์เลต (Soxhlet extraction) จากงานวิจัยของ Dash และคณะ [4] ได้นำใบกฤษณามาบดเป็นผงแล้วนำไปสกัดด้วยซอกห์เลตโดยมีเมทานอลหรือน้ำเป็นตัวทำละลาย ซึ่งวิธีนี้เป็นการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ มีการให้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน Flask ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรเอาไว้ เมื่อตัวทำละลายสูงถึงระดับ สารจะไหลกลับลงไปใน Flask วนเวียนแบบนี้จนกระทั่งได้สารสกัดตามที่ต้องการ

1.2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

ร่างกายของเรามีสารต้านอนุมูลอิสระหลายรูปแบบ ทั้งที่ร่างกายสร้างขึ้นเองและสารต้านอนุมูลอิสระที่รับมาจากภายนอก ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระจะป้องกันและยับยั้งอนุมูลอิสระ (Free radical) ด้วยการสร้างสมดุลของอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อทำให้ความว่องไวในการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆ ในร่างกายลดลง จากงานวิจัยของ Noguchi และ Niki [20] หากสารอนุมูลอิสระเหล่านี้มีมากเกินไปจะก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ของร่างกาย เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ของมนุษย์ สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองก็คือสารต้านอนุมูลอิสระ ภายในร่างกายของเราประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน เป็นสารชีวโมเลกุลที่ถูกอนุมูลอิสระทำลายได้ง่าย เพราะสารชีวโมเลกุลเหล่านี้มีอิเล็กตรอนหรืออะตอมของไฮโดรเจนที่ถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดความเสียหายและทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ และเมื่อใดที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่สารต้านอนุมูลอิสระจะจัดการได้ จะเกิดสภาวะที่เรียกว่า สภาวะความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่างๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของดีเอ็นเอ คาร์โบไฮเดรตโปรตีน และเกิดการทำลายกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์และการทำลายเซลล์แสดงดังภาพประกอบ 1-4 ซึ่งเป็นสาเหตุของริ้วรอยแห่งวัย (Aging) และจากงานวิจัยของเสก [21] กล่าวว่าอนุมูลอิสระอาจก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงถึงชีวิต เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Autoimmune disease) โรคที่เกิดจากการที่เลือดกลับไปเลี้ยงอวัยวะที่เคยมีการตีบตันของเส้นเลือดในระยะสั้นๆ มาก่อน (Reoxyge-nation injury, reperfusion injury) รวมไปถึงโรคมะเร็ง เป็นต้น ดังนั้นเราจึงต้องรับประทานอาหารที่มีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยป้องกันโรคภัยไข้เจ็บที่อาจจะเกิดขึ้นโดยที่เราไม่รู้ตัว สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบเจอได้ง่ายในอาหารทั่วๆ ไป เช่น เนื้อสัตว์ ธัญพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพรต่างๆ ซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี เบต้าแคโรทีน และสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเข้าไปช่วยเสริมสร้างการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น

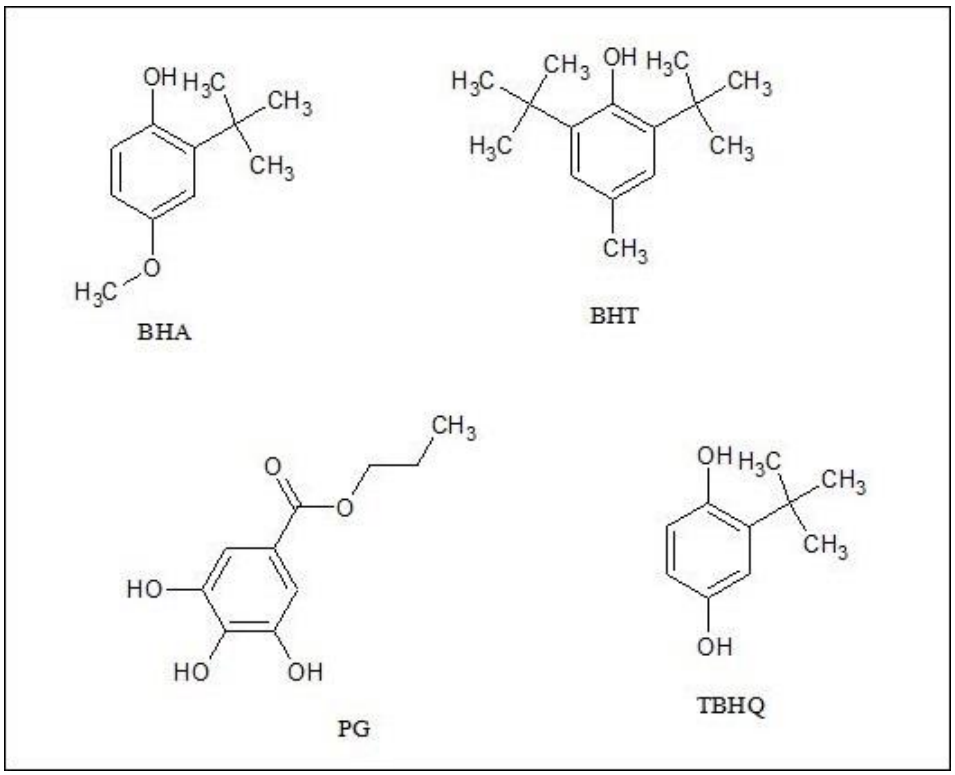


a) b)

ภาพประกอบ 1-4 a) อนุมูลอิสระของลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นอันตรายและก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โดยเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์ตาย b) วิตามินอีที่ถูกป้อนเข้ามาภายในเยื่อหุ้มเซลล์จะให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยวิตามินอีจะเข้าไปออกซิไดซ์และยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่อนุมูลอิสระ [22]

คนไทยให้ความสนใจเกี่ยวกับอาหารที่ดีต่อสุขภาพ เช่น ผักและผลไม้ปลอดสารพิษ ซึ่งในอาหารเหล่านี้ก็มีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบรวมอยู่ด้วย สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งตามแหล่งที่มาได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

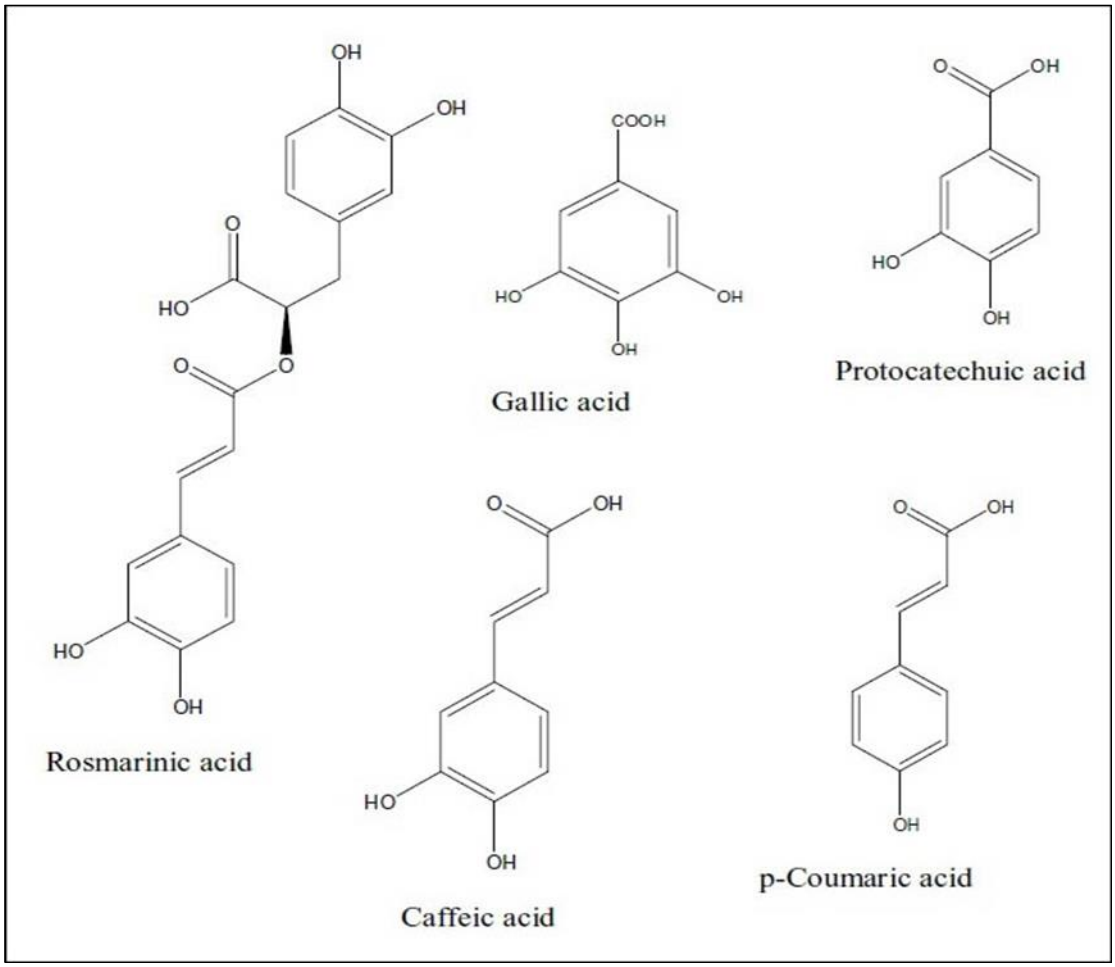
1) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ ซึ่งสารต้านอนุมูลสังเคราะห์นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพราะสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์มีความคงตัวสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ แต่ก็ยังมีปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์มี 4 ชนิด ได้แก่ Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), Propyl gallate (PG), และ Tert-butylhydroquinone (TBHQ) [23] แสดงดังภาพประกอบ 1-5



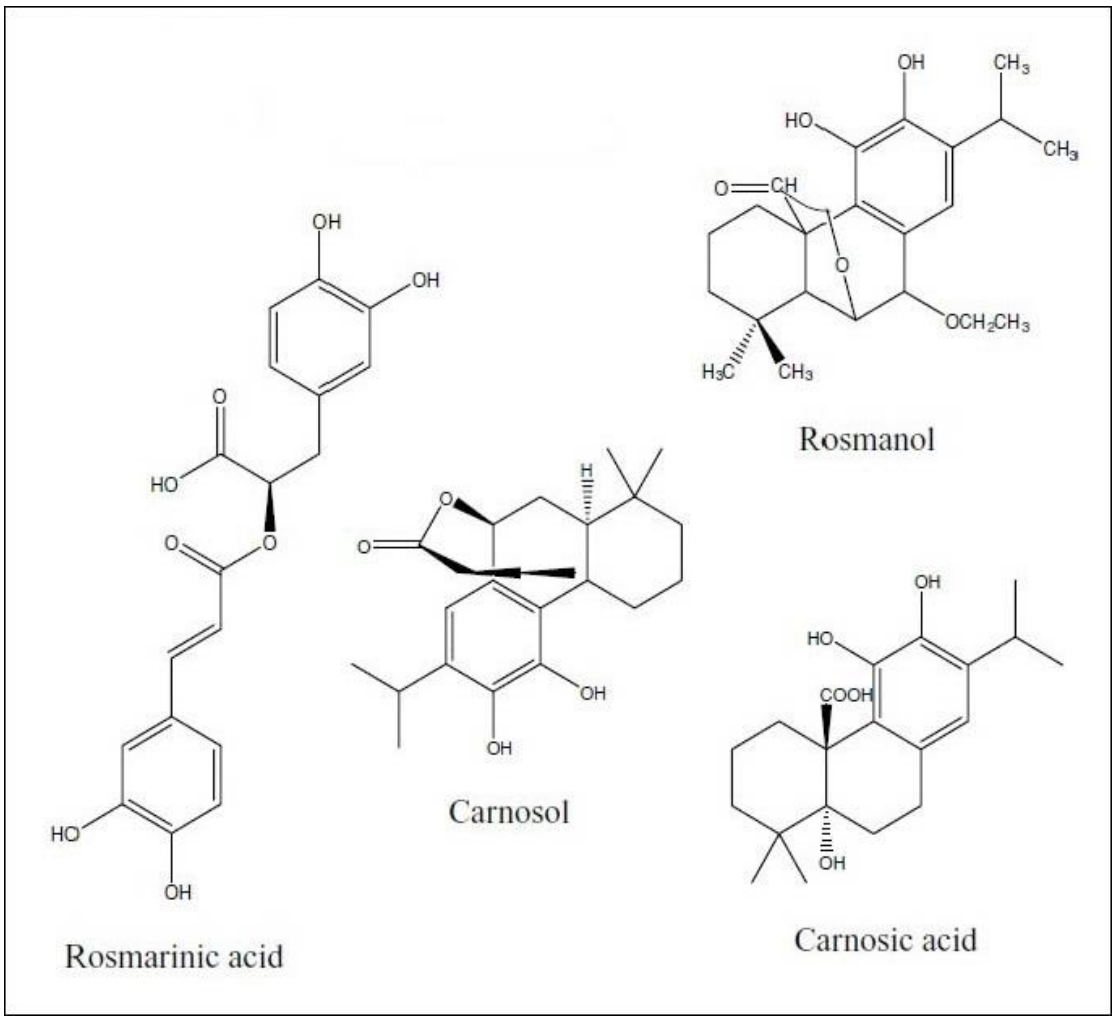
ภาพประกอบ 1-5 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ a) BHA, b) BHT, c) PG และ d) TBHQ [23]

2) สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) เนื้อเยื่อของอาหารสามารถอยู่ภายใต้สภาวะความเครียดออกซิเดชันของสารอนุมูลอิสระที่มีอะตอมออกซิเจนว่องไว (Reactive oxygen species; ROS) รวมไปถึงสารต่อต้านอนุมูลอิสระบางตัวเมื่อถูกใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระไปแล้ว ตัวมันเองก็จะกลายมาเป็นสารอนุมูลอิสระ ซึ่งหลายๆ เนื้อเยื่อถูกพัฒนาให้ระบบต้านอนุมูลอิสระควบคุมอนุมูลอิสระ สารดังกล่าวได้แก่ ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิกส์ แคโรทีนอยด์ และวิตามินอี [24] ซึ่งสารเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ โดยการให้อนุมูล H• แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างเป็นออร์โธไดไฮดรอกซีฟีนอล (Ortho-dihydroxyl phenol) อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล OH ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชั่น [25]

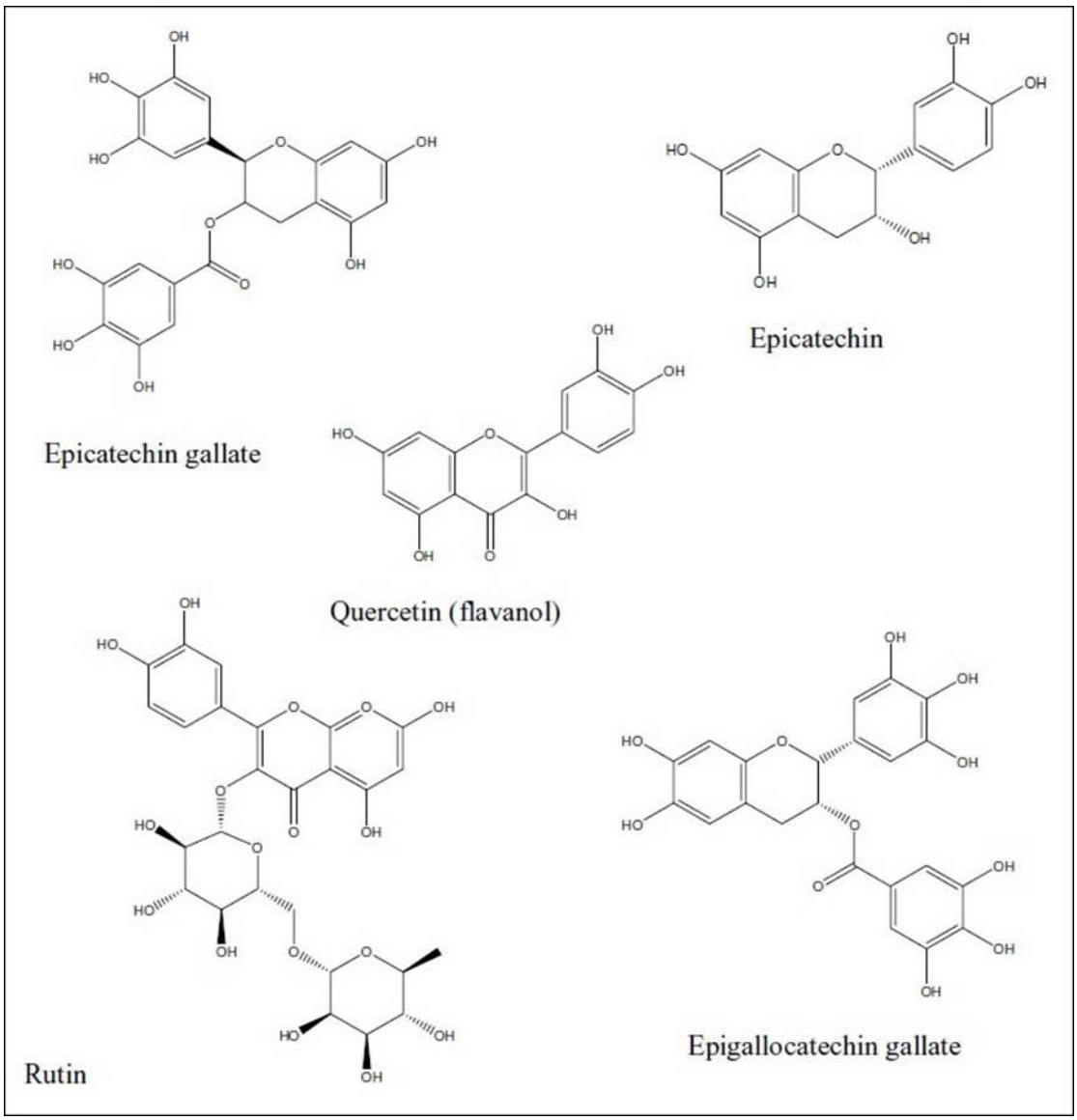
สมุนไพรและเครื่องเทศถูกใช้ในการประกอบอาหารเพื่อให้รสชาติและยังมีสรรพคุณในการรักษาโรค เนื่องจากทั้งสมุนไพรและเครื่องเทศเหล่านี้มีสารประกอบฟีนอลิกส์เข้มข้นเป็นองค์ประกอบ [24] พืชบางชนิดมีสารประกอบ Carnosol, Rosmanol, Rosmariquinone, และ Rosmaridiphenol ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHA [26] สารต้านอนมูลอิสระจากพืชสามารถแบ่งเป็น 4 ชนิด ได้แก่ กรดฟีนอกลิกส์ (Gallic protochatechuic, Caffeic และ Rosmarinic acid แสดงในภาพประกอบ 1-6), ฟีนอลิกส์ไดเทอร์พีน (Carnosol และ Carnosic acid แสดงในภาพประกอบ 1-7), ฟลาโวนอยด์ (Quercetin และ Catechin แสดงในภาพประกอบ 1-8), และน้ำมันหอมระเหย (Eugenol, Carvacrol, Thymol, และ Menthol แสดงในภาพประกอบ 1-9) โดยธรรมชาติของกรดฟีนอลิกส์จะทำหน้าที่ดักจับอนุมูลอิสระ เช่น สารฟลาโวนอยด์สามารถจับอนุมูลอิสระและโลหะได้ดี



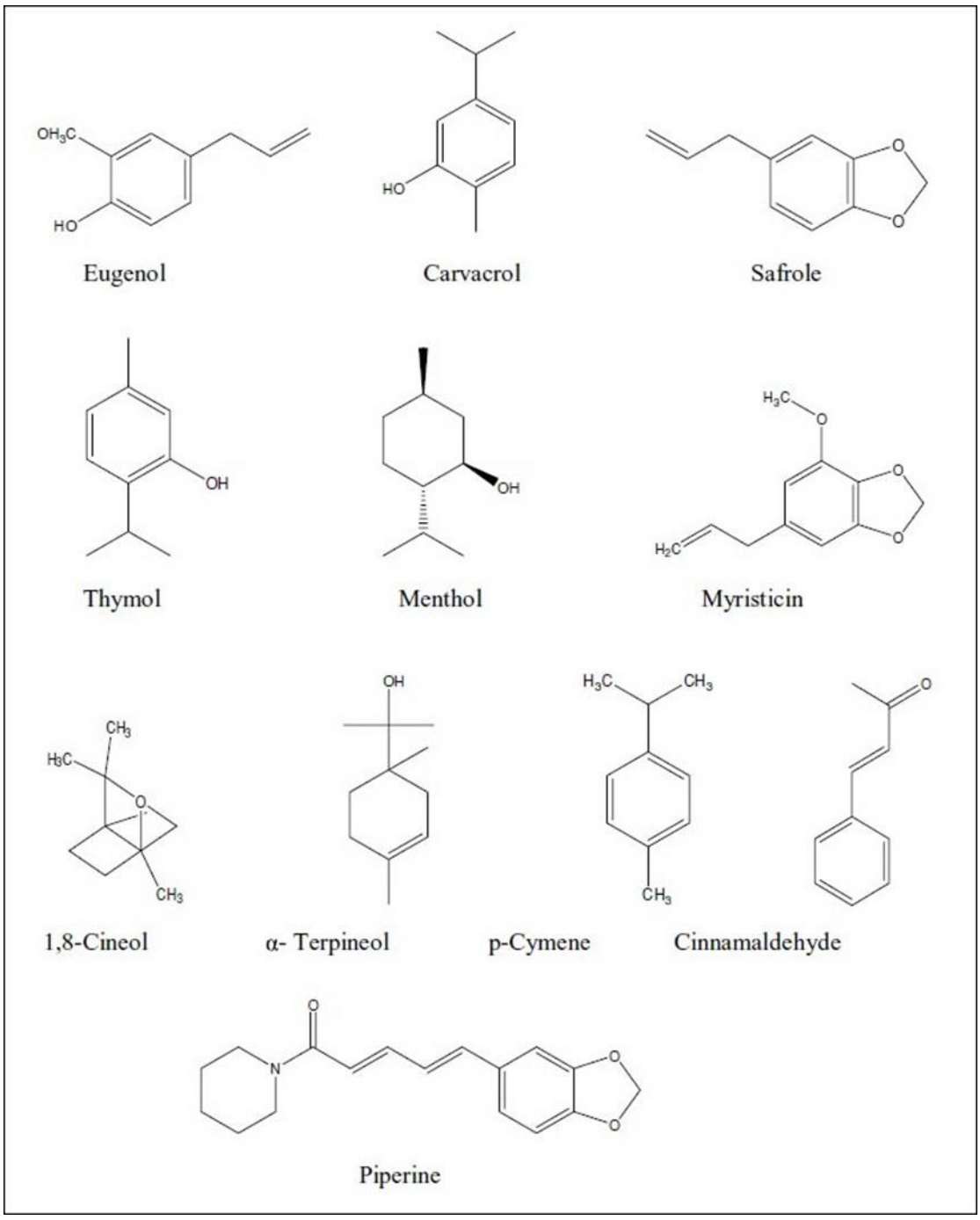
ภาพประกอบ 1-6 สารต้านอนุมูลอิสระในประเภทของกรดฟีนอลิก [Gallic, Protochatechuic, P-coumaric acid, Caffeic, และ Rosmarinic] พบในสารสกัดของพืช [27]



ภาพประกอบ 1-7 สารต้านอนุมูลอิสระในประเภทของฟีนอลิกส์ไดเทอร์พีน (Rosmanol, Rosmarinic acid, Carnosal และ Carnosic acid) พบในสารสกัดของพืช [27]



ภาพประกอบ 1-8 สารต้านอนุมูลอิสระในประเภทของฟลาโวนอยด์ (Epicatechin, Quercetin, Epicatechin gallate, Epigallocatechin gallate และ Rutin) พบในสารสกัดของพืช [27]



ภาพประกอบ 1-9 สารต้านอนุมูลอิสระในประเภทน้ำมันหอมระเหย (Eugenol, Carvarol, Safrole, Thymol, Menthol, 1,8-cineole, α-terpineol, P-cymene, Cinnamaldehyde, Myristicin และ Piperine) พบในสารสกัดของพืช [27]

สารต้านอนุมูลอิสระได้รับความสนใจในวงกว้าง จึงมีการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก ซึ่งโรคภัยต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น เบาหวาน รูมาตอยด์ ความดันโลหิตสูง และโรคมะเร็งก็มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระทั้งสิ้น จากการศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารต้านอนุมูลอิสระทำให้พบว่ามีสารออกฤทธิ์หลายชนิดที่ป้องกันการเกิดโรคในมนุษย์ได้ โดยที่ เจนจิรา และคณะ [6] รวบรวมสารต้านอนุมูลอิสระกับการป้องกันโรคแสดงดังตารางที่ 1-2

ตารางที่ 1-2 สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ [6]

สารต้านอนุมูลอิสระ	การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
β-Carotene, Lutein	Antimutagenic Protective against breast cancer
Bromophenol	α-Glucosidase inhibition
Carraggeenan, Oligosaccharide	Anti-tumor
Fucoidan	Anti-HIV Ameliorales hyperoxaluria Anticancer Protection against neurodegenerative disorder
Fucophlorethols	Chemopreventive effects
Fucoxanthin	Antiangiogenic Protective effects against retinol deficiency
Galactan sulfate	Anti-viral
Phlorotannins	Anti-inflammatory, Bactericide Inhibits H_2O_2 mediated DNA damage Hypertension Photochemopreventive effects
Phycoerythrin	Amelioration of diabetic complications
Polyphenols	Vascular chemoprotection Antiproliferation, Antimicrobial α-Glucosidase inhibition
Porphyran, shinorine	Delays aging process

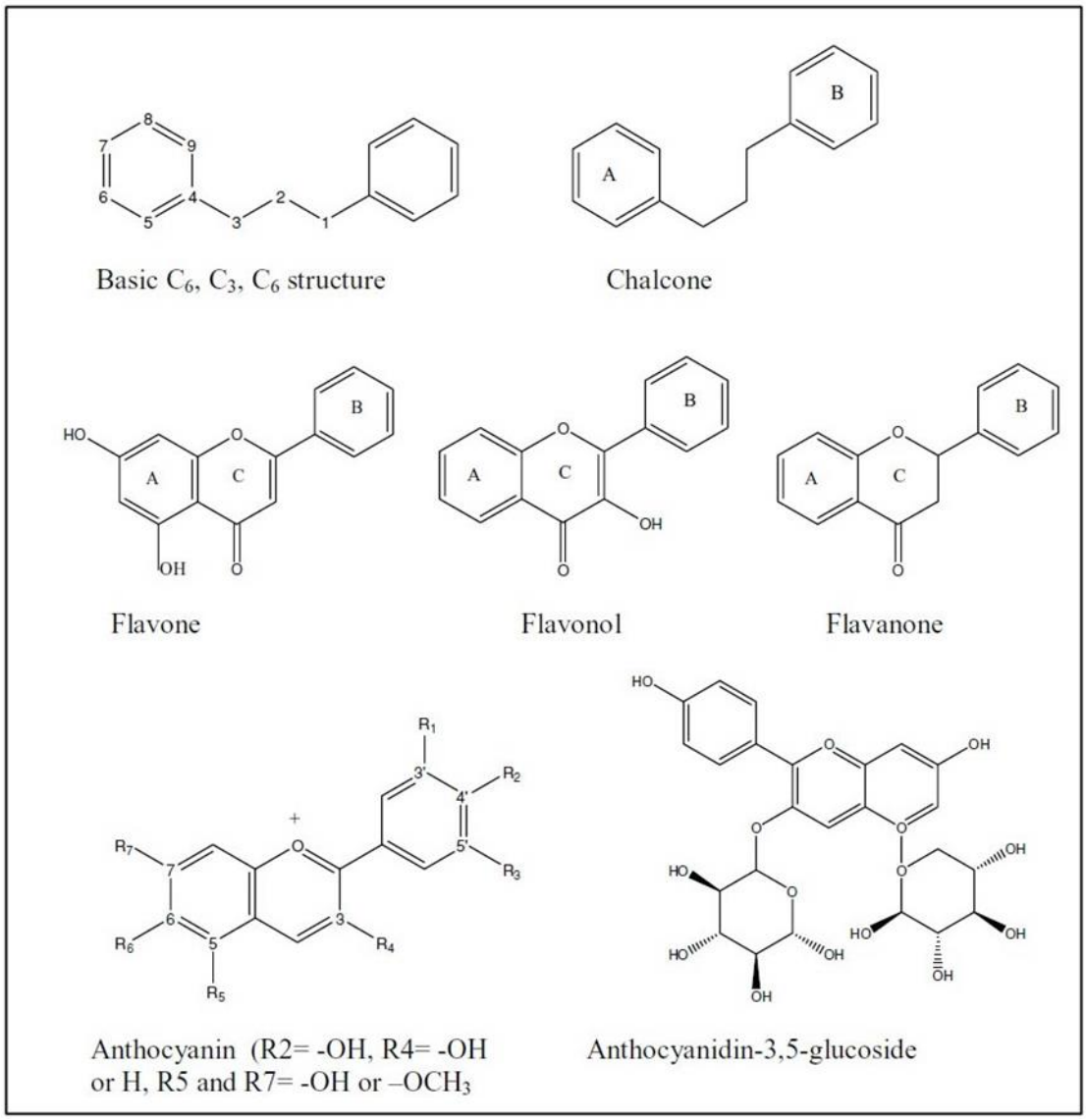
ที่มา : เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม, 2554

1.2.5 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

สารฟลาโวนอยด์เป็นสารสำคัญของกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenol) มีสูตรโครงสร้างหลักคือ ฟลาแวน (Flavan) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม มีสูตรโครงสร้างเป็น C_6-C_3-C_6 ซึ่งจะมีวงเบนซิน (Benzene ring) 3 วง (A, B และ C แสดงดังภาพประกอบ 1-10) เชื่อมต่อกันด้วยโซ่แอลิแฟติก (Aliphatic chain) ของคาร์บอน 3 อะตอม และมีความแตกต่างกันที่สถานะออกซิเดชัน (Oxidation state) ของอะตอมทั้ง 3 อะตอมนี้ ซึ่งสารประกอบแต่ละตัวจะทำให้เกิดการแยกประเภทของฟลาโวนอยด์โดยจะมีวงเบนซิน A และ B เป็นส่วนประกอบหลัก [28] โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันซึ่งแทนที่ในโครงสร้างพื้นฐานได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่

1. ฟลาโวนอล (Flavonols) เช่น quercetin, kaempferol, myricetin
2. ฟลาโวน (Flavones) เช่น luteolin, apigenin, chrysin
3. ฟลาวาโนน (Flavanones) เช่น hesperetin, naringenin, eriodictyol
4. ฟลาวานอล (Flavanols) เช่น catechin, gallocatechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin-3-gallate, epigallocatechin-3-gallate
5. ฟลาวาโนนอล (Flavanonols) เช่น taxifolin
6. ไอโซฟลาโวน (Isoflavones) เช่น daidzein, genistein, glycitein, formononetin
7. แอนโธไซยานิดิน (Anthocyanidins) เช่น cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin

ฟลาโวนอยด์พบได้ในพืชตระกูลถั่ว ธัญพืช ผัก ผลไม้ สมุนไพร เครื่องเทศ รวมถึงเครื่องดื่มบางชนิด เช่น โกโก้ ไวน์ เบียร์ และ ชา เป็นต้น ฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชส่วนใหญ่อยู่ในรูปเบต้าไกลโคไซด์ (β-glycosides) ซึ่งจะถูกย่อยโดยน้ำย่อยและถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก ส่วนฟลาโวนอยด์ที่ไม่ถูกดูดซึมและฟลาโวนอยด์ที่ถูกดูดซึมแล้วถูกขับออกทางน้ำดีจะเข้าสู่ลำไส้ใหญ่และถูกย่อยสลายด้วยจุลชีพบางชนิด ก่อให้เกิดกรดฟีนอลิกส์ซึ่งจะถูกดูดซึมกลับเข้ากระแสเลือดอีกครั้ง โดยฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในกระแสเลือดก็จะถูกส่งไปยังเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกายและสามารถถูกกำจัดได้ที่ไต ฟลาโวนอยด์อาจผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างซึ่งอาจทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพเปลี่ยนแปลงได้ [29] ซึ่งส่งผลต่อกลไกในการต้านอนุมูลอิสระดังนี้



ภาพประกอบ 1-10 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์และฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ (Flavanones: Chalcone, Flavone, Flavanol และ Flavanones; และ Flavans: Anthocyanin และ Anthocyanidin-3,5-glycoside) พบในสารสกัดของพืช [27]

1) อนุมูลอิสระและระบบต้านอนมูลอิสระ อาหารที่มีฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงมักจะพบในผลไม้และผัก ซึ่งฟลาโวนอยด์มีสรรพคุณในการป้องกันโรค เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจและมะเร็งบางชนิด สารต้านอนมูลอิสระและเส้นใยของผักและผลไม้เป็นสารอาหารเบื้องต้นในการป้องกันโรคเหล่านี้ โดย ROS ได้ถูกนำมาทดลองกับสิ่งมีชีวิต ดังนั้นความเสียหายของสารพันธุกรรม (DNA), โปรตีน และไขมัน จึงถูกปล่อยให้เป็นไปตามธรรมชาติ ถึงอย่างไรก็ตามสารต้านอนุมูลอิสระก็จะทำการปกป้องร่างกาย จากหลายงานวิจัยที่วิจัยเกี่ยวกับ ROS บ่งบอกว่า ROS เป็นสาเหตุของการเกิดริ้วรอยแห่งวัย [30] การกลายพันธุ์ (Mutagenesis) [31] การก่อมะเร็ง (Carcinogenesis) [32] และโรค

หลอดเลือดหัวใจ (Coronary heart disease) [33] ความเสียหายของสารพันธุกรรมและการออกซิเดชันของ Low-density lipoprotein (LDL) ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการสะสมของไขมันที่ผนังหลอดเลือดมากขึ้น ทำให้หลอดเลือดตีบส่งผลให้เลือดไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจไม่เพียงพอ และเป็นสาเหตุของหัวใจวาย จากหลายๆ งานวิจัยได้รับการพิสูจน์ว่าฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ซึ่งสามารถยับยั้งออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation) และ LDL ช่วยลดอัตราการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้ [34]

2) สารอนุมูลอิสระที่มีอะตอมไนโตรเจนว่องไวและการแสดงออกของอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเตส สารอนุมูลอิสระที่มีอะตอมไนโตรเจนว่องไว (Reactive nitrogen species; RNS) เป็นสาเหตุของโรคหัวใจและหลอดเลือด เนื่องจาก RNS มีไนตริกออกไซด์เป็นส่วนที่ทำให้เกิดไนตริกออกไซด์ซินเตสในเซลล์บุผิวหลอดเลือด (Endothelial cell) เซลล์ประสาท (Neuron) และเซลล์อื่นๆ ในบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ ส่งผลให้อินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเตส (Inducible nitric oxide synthase; iNOS) เพิ่มมากขึ้น ทำให้ไนตริกออกไซด์สังเคราะห์ถูกกระตุ้น เปอร์ออกซีไนไตรท์เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของไนตริกออกไซด์กับอนุมูลอิสระในเซลล์บุผิวหลอดเลือด (Vascular endothelium) รวมทั้งการออกซิเดชันของ LDL โดยมี Proinflammatory cytokine เป็นตัวกลางที่ทำให้มีความผิดปกติของกล้ามเนื้อหัวใจ (Myocardial dysfunction) [35] ซึ่ง RNS เกิดจากไนไตรท์ของอาหารทำปฏิกิริยากับกรดผลไม้ที่เป็นกรดไนตรัส โดยจะเข้าไปสลายออกไซด์ของไนโตรเจน สารที่สามารถการยับยั้งการเกิดกรดไนตรัสและ DNA deamination ได้ดีคือ สารฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีโนลิกส์รวมทั้งสารจำพวก Epicatechin/Gallate [36]

3) ฟลาโวนอยด์กับการป้องกันโรค ผลการป้องกันของฟลาโวนอยด์ในชีววิทยาระบบ (Systems biology) มาจากปริมาณสูงสุดในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของอนุมูลอิสระ ซึ่งชาเขียวจะมีฟลาโวนอยด์สูงโดยเฉพาะ Catechins และ Flavonols ชาดำก็เช่นเดียวกัน อาจจะแตกต่างกันที่ขั้นตอนการหมักชาแต่ก็มีทั้ง Catechins และ Theaflavins ส่วนทีโพลีฟีนอล (Tea polyphenols) หรือแทนนิน (Tannin) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและมีความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันรวมทั้งไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ อนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล ไนตริกออกไซด์ และ เปอร์ออกซีไนไตรต์ถูกผลิตมาจากกระบวนการทางเคมีและชีววิทยาระบบมักพบอยู่ในชาทุกประเภท จากการทดลองการออกซิเดชันของ LDL ในเรื่องการตอบสนองต่อ Tannins (Gallate esters) พบว่ามีการตอบสนองน้อยมากต่อการยับยั้งการออกซิเดชันด้วย Cu(II) ที่ถูกเร่งปฏิกิริยา โดยจะเปรียบเทียบผลการตอบสนองด้วยสารฟลาโวนอยด์ดังนี้ Epigallocatechin gallate (EGCG) > Epicatechin gallate (ECG) > Catechin (C) > Epicatechin (C) จากการศึกษาของ Anderson และคณะ [37] พบว่ากรีนทีโพลีฟีนอล (Green tea polyphenols) มีฤทธิ์ในการป้องกัน DNA จากการออกซิเดชันของหมู่ OH โดยใช้ผลจากการทดสอบ Pulse radiolysis ที่บ่งบอกว่าการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจาก Catechins ไปยังอนุมูลอิสระของ DNA

1.2.6 เชื้อแบคทีเรียในช่องปาก (Oral bacteria)

จุลินทรีย์บางชนิดเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์ คราบจุลินทรีย์ประกอบด้วยจุลชีพร้อยละ 70 อีกร้อยละ 30 เป็นสารไกลโคโปรตีนของน้ำลายหรือน้ำเหลืองเหงือก เซลล์ตายของเยื่อบุผิวเม็ดเลือดขาวและชีวพิษคายออกของจุลินทรีย์ (Exotoxin) จุลชีพเหนือเหงือกจะยึดกับเคลือบฟัน (Enamel) และเยื่อบุผิวช่องปาก ส่วนจุลชีพใต้เหงือกจะยึดกับเคลือบรากฟันและเยื่อบุผิวร่องลึกปริทันต์หรือลอยตัวอยู่ในน้ำเหลืองเหงือก [38] จากการศึกษาทางจุลชีววิทยาของคราบจุลินทรีย์ในระยะเริ่มแรกไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ในน้ำลายจะเข้ามาเกาะกับผิวหน้าฟันเกิดเป็นแอคไคว์เพลลิเคิล (Acquired pellicle) โดยส่วนประกอบทางเคมีของเพลลิเคิลในแต่ละแห่งมีไม่เหมือนกัน จุลชีพกลุ่มแรกที่เข้ามาเกาะบนผิวเคลือบฟันที่มีเพลลิเคิลเคลือบอยู่เป็นพวกแรกพบเป็นจุลชีพชนิดสเตรปโตคอคคัสดังภาพประกอบ 1-11 เช่น *Streptococus mutans* และ *Streptococus sobrinnus* [39] เชื้อที่เกิดขึ้นในลำดับที่สอง คือ เชื้อในกลุ่ม *Lactobaccillus species* และจุลชีพชนิดสเตรปโตคอคคัสพวกที่สามารถทนกรดได้ เช่น *Streptococus sanguis, Streptococus gordonii,* และ *Streptococus oralis* ต่อมาจุลชีพชนิดสเตรปโตคอคคัสเริ่มลดลงกลายไปเป็นเชื้อที่มีความซับซ้อนมากขึ้น ซึ่งจะเป็นเชื้อแกรมลบและเชื้อรูปร่างเป็นเกลียว [40] เชื้อที่พบบ่อยและเป็นสาเหตุทำให้เกิดฟันผุมีดังนี้

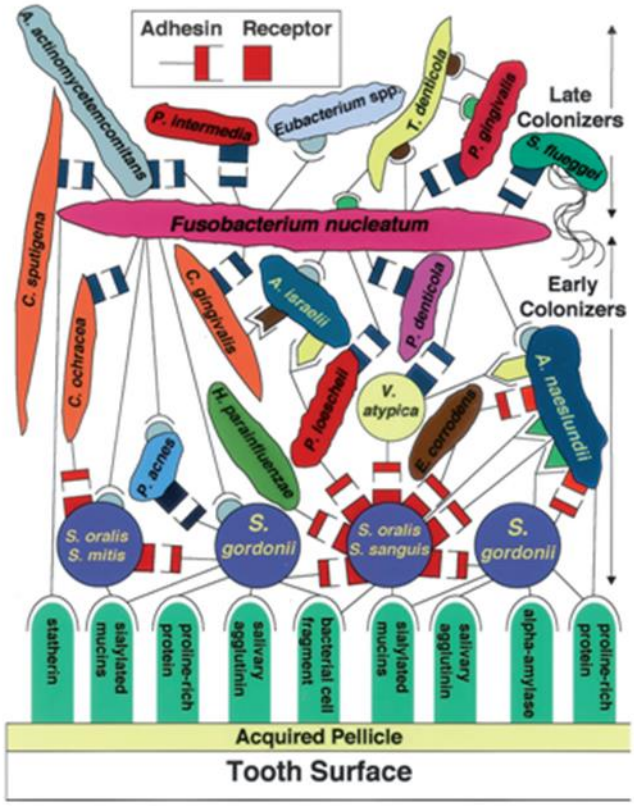
1) *Streptococcus mutans* [38] บนผิวฟันมีเชื้อ *Streptococcus mutans* เกาะติดอยู่และเป็นเชื้อตัวการที่ทำให้เกิดฟันผุ (Dental carries, tooth decay) เชื้อนี้จะสร้างสาร Glucan ในขณะที่มีน้ำตาลทราย (Sucrose, Glucose-1-fructose) โดยใช้เอ็นไซม์ Glucosyl transferase ซึ่งอยู่ที่ผิวของเชื้อดังปฏิกิริยา

n Sucrose (Glucose) n + n (Fructose) -------> glucan

มีน้ำตาลฟรุกโตสถูกปลดปล่อยจากปฏิกิริยานี้เชื้อจุลินทรีย์ก็จะหมักน้ำตาลต่างๆ ได้กรดแลคติคซึ่งสามารถกัดกร่อนผิวฟันได้พบว่าเชื้อ *S. mutans* เป็นตัวเริ่มทำให้เกิดฟันผุแล้วพบเชื้อแบคทีเรียอื่นเป็นตัวทำลายฟันตัวที่สอง เช่น *Lactobacillus* และ *Actinomyces* [41]

2) *Porphyromonas gingivali* [38] เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้น้ำตาล (Asaccharolytic) จัดอยู่ในไฟลัม *Bacteriodates* เช่นเดียวกับ *Pr. Intermedia* เป็นจีนัสหนึ่งในกลุ่มแบคทีเรียที่มีการสร้างสารสีดำ (Black-pigmented anaerobic bacteria) ซึ่งเกิดจากการใช้ฮีมิน (Hemin) เป็นแหล่งของธาตุเหล็กในการเจริญของแบคทีเรียทำให้เกิดการสร้างสารโพรโทฮีม (Protoheme) ขึ้น เชื้อนี้มีความสำคัญก่อให้เกิดโรคปริทันต์หลายรูปแบบรวมทั้งโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง (Chronic periodontitis) การก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้เกิดจาก *P. gingivalis* มีฟิมเบรีย (Fimbria) ซึ่งช่วยในการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อและสารต่างๆ ภายในช่องปากของโฮสต์ [42] เช่น โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำลาย เซลล์เอพิธิเลียล (Epithelial cell) ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถบุกรุกและทำลายเซลล์ดังกล่าวต่อไปได้ นอกจาก *P. gingivalis* ยังสามารถยึดเกาะกับแบคทีเรียอื่นๆ ในช่อง

ปากได้ ได้แก่ *Streptococcus* sp. เป็นต้น นับเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถอยู่รวมกับแบคทีเรียชนิดอื่นในคราบจุลินทรีย์ในช่องปากของโฮสต์ได้



ภาพประกอบ 1-11 แบบจำลองการฟอร์มตัวกันของเชื้อแบคทีเรียในช่องปากซึ่งส่งผลให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ [43] (ที่มา : Paul E. Kolenbrander et al., 2002)

3) *Salivarius group* [44] เป็นกลุ่มเชื้อแอโรบส์รูปร่างกลมติดสีแกรมบวก เชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วย *Streptococcus salivarius* พบได้บ่อยในช่องปากโดยเฉพาะที่ลิ้นและน้ำลาย *Streptococcus vestibularis* แยกได้จากบริเวณเยื่อเมือกช่องปากส่วนหน้า (Vestibular mucosa) และ *Streptococcus thermophilus* มีลักษณะใกล้เคียงกับ *S. salivarius* มาก แต่ไม่พบในช่องปาก ตรวจพบได้จากนมและผลิตภัณฑ์ที่มาจากสัตว์

โคโลนีของ *S. salivarius* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดมีลักษณะกลม แต่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำตาลซูโครสสามารถสร้างสารลีแวนภายนอกเซลล์ (Extracellular levan) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลฟรุกโตสจากการสลายซูโครส ทำให้เชื้อมีลักษณะมันวาว (Mucoid) ขนาดใหญ่

ในงานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการสกัด ตัวทำละลาย อุณหภูมิในการสกัด ระยะเวลาในการสกัดและความเร็วรอบในการเขย่า ที่เหมาะสมในการสกัดชากฤษณา โดยใช้โปรแกรม Response surface methodology (RSM) ในการออกแบบการทดลอง สารสกัดที่ได้จะนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดมาหาองค์ประกอบทางเคมีเพื่อให้ทราบถึงสรรพคุณและส่วนประกอบต่างๆ ที่อยู่ในสารสกัดจากชากฤษณา

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Huda, และคณะ [5] ศึกษาพฤกษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระของใบกฤษณาสายพันธุ์ *A. malaccensis* โดยสกัดใบกฤษณาที่ได้จาก Malaysian Nuclear Agency (MNA) นำมาอบให้แห้งก่อนจะนำไปบดแล้วใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัด แล้วใช้วิธีสกัดด้วยการหมักด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล พบว่าสารสกัดที่ได้มีสารจำพวกอัลคาลอยส์ ฟลาโวนอยส์ ไตรเทอร์ปีนอยส์ สเตียรอยส์ และซาโปนิน แสดงดังตารางที่ 1-3

ตารางที่ 1-3 แสดงการทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบกฤษณา [5]

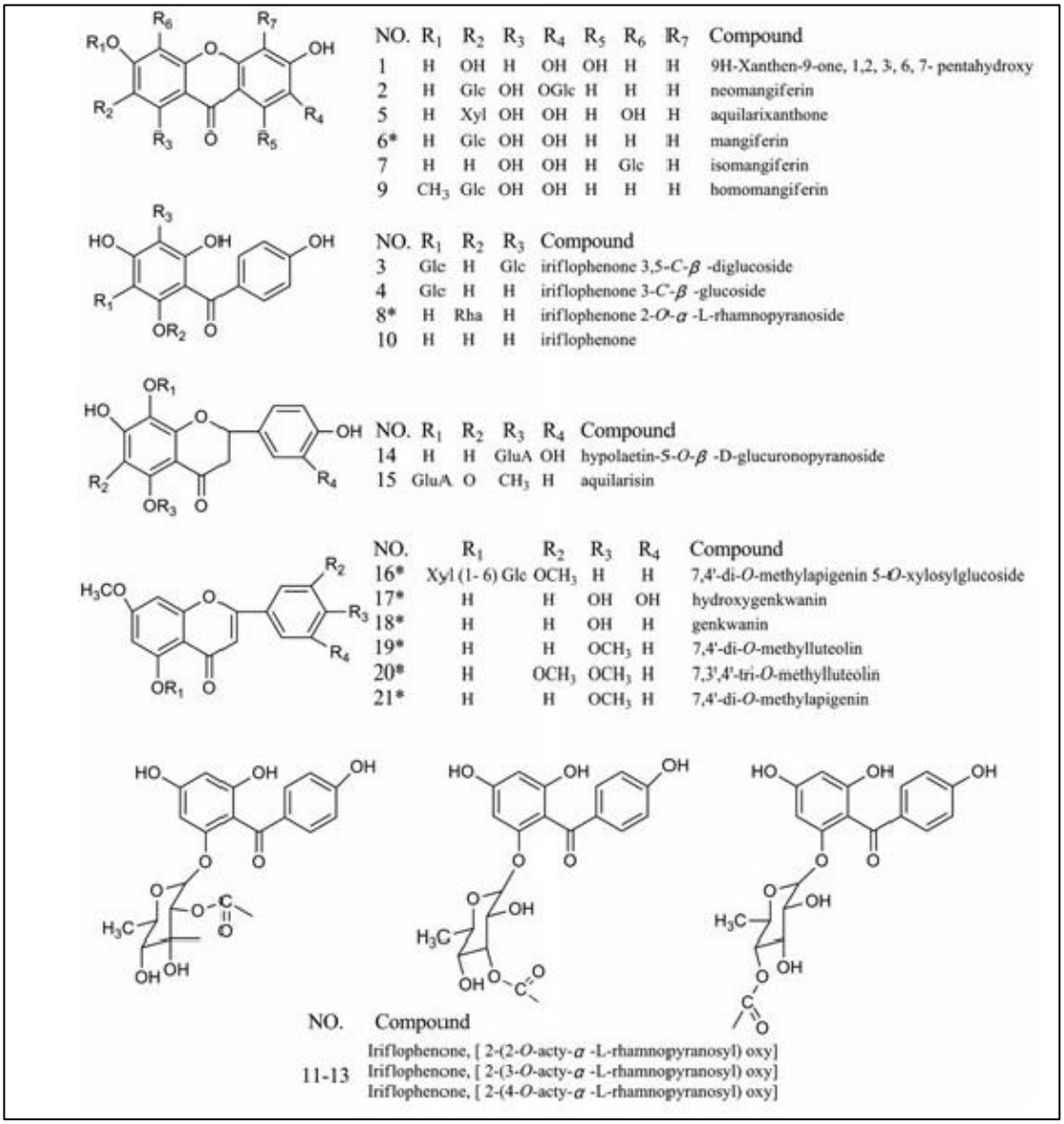
Crude extract	Alkaloid test	Triterpenoid / Steroid test	Saponin test	Flavonoid test
Hexane	-	+S	-	+
Dichloromethane	-	+S	-	+
Ethyl Acetate	+	+S	+	-
Methanol	+	+T	+	+

Indicator: (-) Negative result (+S) Positive results for steroid
(+) Positive result (+T) Positive results for triterpenoid

ที่มา : A.W.N Huda et al., 2009.

จากตารางพบว่าสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทไม่พบสารฟลาโวนอยด์ แต่สารสกัดด้วยตัวทำละลายตัวอื่นล้วนมีสารฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ โดยสารฟลาโวนอยด์ที่พบในใบกฤษณามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง จากการทดสอบโดยให้สารสกัดทำปฏิกิริยากับ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ Quercetin เป็นสารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอททิลอะซีเตต เมทานอล และ Quercetin มีค่าเท่ากับ 800, 1,600, 1,400, 30 และ 3.33 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Yu และคณะ [45] รายงานการนำใบกฤษณาสายพันธ์ *Aquilaria sinensis* จากเมือง Guangdong และ Guangxi ในประเทศจีนมาผลิตชา และนำชากฤษณามาสกัดด้วย 50% เอทานอลด้วยวิธีแบบไหลย้อนกลับและได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกส์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography-Mass spectrometry แสดงดังภาพประกอบ 1-12



ภาพประกอบ 1-12 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกส์ในสารสกัดจากใบกฤษณา *A. sinensis*

สารสกัดใบกฤษณาสายพันธุ์ *A. sinensis* นิยมนำมาผลิตเป็นชาหอมเนื่องจากเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพในภาคใต้ของประเทศจีน นอกจากนั้นชาวจีนยังใช้ใบกฤษณาในการรักษากระดูกหักหรืออาการฟกช้ำ และยังมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและบรรเทาอาการปวดได้ [46] องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบกฤษณาพบว่ามีสารจำพวกแซนโทน (Xanthones) เบนโซฟีโนน (Benzophenones) และฟลาโวน (Flavones) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fenga และคณะ [47] สารทั้งสามชนิดนี้สามารถแยกออกเป็นสารประกอบฟีนอลิกส์ย่อยๆได้อีก 30 ชนิด โดยสารแมงจิเฟอริน (Mangiferin) ที่พบในมะม่วงเป็นสารจำพวกแซนโทนที่สำคัญในพืช มีฤทธิ์ในการป้องกันโรคเบาหวาน (Anti-diabetic) ต้านเอชไอวี (Anti-HIV) ต้านมะเร็ง (Anti-cancer) เสริมระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory property) และต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

[48] ส่วนสารแอริโฟลฟีโนน (Iriflophenone) และสารประกอบจำพวกเบนโซฟีโนน (Benzophenone) มีฤทธิ์ในการรักษาโรคภูมิแพ้ได้ [49]

จุฑารัตน์ และ ผกามาศ [50] ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกส์ที่สกัดจากชากฤษณาด้วยเทคนิคโครมาโตรกราฟฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) โดยมีสารประกอบฟีนอลิกส์มาตรฐาน (+)–Catechins hydrate, 3-Hydroxy flavone และ Gallic acid ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดได้แก่ ปิโตรเลียมอีเทอร์ ไดคลอโรมีเทน เมทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซีเตท พบว่าอะซิโตน ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซีเตทสามารถสกัดสารที่มีค่า Rf เท่ากับสารมาตรฐาน 3-Hydroxy flavone และศึกษาระบบตัวเคลื่อนที่ในการแยกสารสกัด 3 ระบบ คือ Chloroform-Ethyl acetate-Formic acid (5:4:1) Chloroform-Methanol-Acetic acid (90:10:1) และ Chloroform-Ethyl acetate-Acetic acid (50:50:1) พบว่าระบบ Chloroform-Ethyl acetate-Acetic acid (50:50:1) สามารถแยกสารได้ทั้ง 3 กลุ่ม ของสารมาตรฐาน

Hashim และคณะ [51] ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบกฤษณาสายพันธ์ *A. subintegra* โดยใบกฤษณาถูกทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน แล้วจึงนำมาบดและสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท ไดเอทิลอีเทอร์ และเฮกเซน ด้วยอัตราส่วน 1:10 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตามด้วยการพ่นไนโตรเจน ศึกษาการต้านฤทธิ์แบคทีเรียสี่ชนิด *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* โดยใช้ปริมาณสารสกัดที่ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดด้วยตัวทำละลายทุกตัวแสดงการยับยั้งขนาด 9-12 มิลลิเมตร โดย Tetracycline ที่เป็นสารเปรียบเทียบแสดงการยับยั้งขนาด 22-24 มิลลิเมตร การยับยั้งสูงสุดเป็นสารสกัดด้วยอะซิโตนต่อ *B. subtilis* และสารสกัดด้วยเฮกเซนต่อ *S. aureus*

Alimon และคณะ [52] ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบและเปลือกไม้กฤษณาสายพันธ์ *A. crassna* โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล พบว่า *Staphylococcus aureus* ถูกยับยั้งมากที่สุด โดยสารสกัดจากเมทานอลมีฤทธิ์สูงสุด และ *Pseudomonas aeruginosa* ถูกยับยั้งน้อยที่สุด โดยมีเพียงสารสกัดจากเปลือกกฤษณาด้วยเมทานอลเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง

Kakino และคณะ [15] ศึกษาผลของสารสกัดจากใบกฤษณาสายพันธ์ *A. crassna* ต่อการอดอาหารในหนูทดลอง พบว่าสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลสามารถยับยั้งการทำงานของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Clostridium difficile*, และ *Bacteroides spp* ที่ย่อยสลายยูเรีย สามารถลดการเกิดเหม็นเน่าภายในลำไส้ของหนูทดลองได้

Tay และคณะ [14] ศึกษาปริมาณโพลีฟีนอลในสารสกัดจากใบอ่อนกฤษณาโดยมีตัวแปรในการสกัดที่สนใจคือ ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล (0%–100% v/v) สัดส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย (1:10–1:60 w/v) และระยะเวลาในการสกัด (30-180 นาที) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นเอทานอล 40% v/v สัดส่วน 1:60 w/v และเวลาในการสกัด 30 นาที จะให้ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดสูงที่สุด

Hara และคณะ [53] สกัดใบกฤษณา *A. sinensis* ปริมาณ 1.5 กิโลกรัม ด้วยตัวทำละลายอะซิโตน เมทานอล และเอทานอล ด้วยวิธีการหมักใบกฤษณาในสารละลายพบว่าสารสกัดใบกฤษณาที่ใช้อะซีโตนเป็นตัวทำละลายเปรียบเทียบกับยาระบาย (Senna) ทั้งสารสกัดและตัวยาทำให้หนูทดลองเกิดการขับถ่ายได้ดี แต่สารสกัดจะมีฤทธิ์อ่อนกว่ายาระบาย ส่วนสารสกัดใบกฤษณาที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายไม่เกิดผลกับหนูทดลอง

Jin-long และคณะ [54] ศึกษาการแยกเชื้อราออกจากเนื้อเยื่อของต้นกฤษณาเพื่อนำมาหาฤทธิ์ต้านการบวมและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา 28 ชนิด ถูกแยกออกมาจากต้นกฤษณา แบ่งได้เป็น 14 สายพันธุ์ และ 4 คลาสส์ (*Sordariomycetes*, *Dothideomycetes*, *Saccharomycetes* และ *Zygomycetes*) เชื้อราที่แยกออกมาทั้ง 28 ชนิด แบ่งได้เป็น 13 ชนิด (46.4 เปอร์เซ็นต์) ที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ปริมาณน้อยที่สุดในการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion และ 23 ชนิด (82.1 เปอร์เซ็นต์) แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งอย่างน้อย 1 ใน 5 ของเซลล์โดยใช้ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ในการทดสอบ เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (Inhibition zones) ของ YNAS07, YNAS14, HNAS04, HNAS05, HNAS08 และ HNAS11 แทนเชื้อแบคทีเรียแต่ละตัวคือ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, และ *Aspergillus fumigatus* มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 14.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ อัตราการยับยั้ง (Inhibition rates) ของ YNAS06, YNAS08 และ HNAS06 มีค่าไม่ต่ำว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์มะเร็ง 293-T, 293-T และ SKVO3 ตามลำดับ จากผลที่ได้ของเชื้อราที่แยกมาจากต้นกฤษณาสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเกี่ยวกับระบบนิเวศวิทยาระดับไมโครได้โดยเฉพาะการต้านฤทธิ์แบคทีเรียและฤทธิ์ต้านมะเร็ง

Emel และคณะ [55] ศึกษาจุลชีววิทยาด้วยการใช้ 0.2% คลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนต (Chlorhexidine gluconate) บ้วนปากในผู้จัดฟัน 20 คน ที่มีอายุระหว่าง 13-18 ปี โดยใช้เชื้อ *Streptococcus mutan* และแลคโตบาซิลัสในน้ำลายตัวอย่าง แบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ ผู้ที่เริ่มจัดฟัน ผู้ที่ใส่เหล็กดัดฟันอย่างน้อย 2 อาทิตย์ ผู้ที่ใช้ 0.2% คลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตบ้วนปากอย่างน้อย 1 อาทิตย์ และผู้ที่ใช้ 0.2% คลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตบ้วนปากในอาทิตย์ที่ 4 ของการใช้ โดยใช้การวิเคราะห์แบบ Wilcoxon test เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในช่องปาก *S. mutan* และแลคโตบาซิลัส

1.4 วัตถุประสงค์

1.4.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากชากฤษณา

1.4.2 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของชากฤษณาที่สกัดได้จากข้อ 1.4.1

1.4.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียในช่องปากของสารสกัดจากชากฤษณา

1.5 ขอบเขตของงานวิจัย

1.5.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพฤกษเคมีจากชากฤษณา ได้แก่ วิธีการสกัด (การแช่และซอกห์เลต) ชนิดของตัวทำละลาย (เอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ) และระยะเวลาการสกัด (3-7 วัน สำหรับการแช่ และ 2-6 ชั่วโมง สำหรับวิธีซอกห์เลต) สำหรับการแช่จะศึกษาปัจจัยเพิ่มเติมได้แก่ อุณหภูมิการสกัด (อุณหภูมิห้อง-80 องศาเซลเซียส) และความเร็วรอบของการเขย่า (0-160 รอบ/นาที) โดยใช้โปรแกรม RSM ช่วยในการออกแบบการทดลอง พิจารณาสภาวะที่เหมาะสมจากปริมาณสารสกัดที่ได้ และการทดสอบปริมาณสารประกอบฟินอลิกส์ทั้งหมด (Total phenolic content) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

1.5.2 นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดที่สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละตัวทำละลายมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยการวิเคราะห์โดยวิธี Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

1.5.3 นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละตัวทำละลายมาศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่สนใจคือแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในช่องปาก *S. mutans, S. salivarius* และ *P. gingivalis*

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยจะมีประโยชน์ต่อบุคคลที่สนใจและเกษตรกร โดยจะทราบข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากชากฤษณา ทราบสรรพคุณของสารสกัดที่ได้ว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในช่องปากหรือไม่ ทั้งนี้ข้อมูลจากงานวิจัยจะช่วยส่งเสริมการขายผลิตภัณฑ์ชากฤษณา เพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรผู้ปลูกไม้กฤษณา ลดปัญหาสิ่งแวดล้อมเนื่องมาจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร นอกจากนี้ยังเสริมสร้างความมั่นใจให้กับผู้บริโภค ทั้งยังสามารถนำผลวิจัยมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ จากใบกฤษณา เช่น น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากชากฤษณาต่อไปได้

บทที่ 2
วิธีการวิจัย

2.1 วัตถุดิบ

ชากฤษณาได้รับความอนุเคราะห์จากวิสาหกิจชุมชนแปรรูปไม้กฤษณาไทยรุ่งการเกษตร-ศรีวิชัย (สะเดา) อำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา (ภาพประกอบ 2-1)

ภาพประกอบ 2-1 ชากฤษณาจากวิสาหกิจชุมชนแปรรูปไม้กฤษณาไทยรุ่งการเกษตร-ศรีวิชัย (สะเดา)

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด

- น้ำปราศจากไอออน (Deionized Water: DI)
- เอทานอล (Absolute ethanol: EtOH) จากบริษัท อาร์ซีไอ แล็บสแกน จำกัด
- เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate: EA) จากบริษัท อาร์ซีไอ แล็บสแกน จำกัด

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- โฟลิน-ฟีนอล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) จากบริษัท Merck จำกัด
- โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate: Na_2CO_3) จากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด
- แกลลิคแอซิด (Gallic acid) จากบริษัท Merck จำกัด
- เอทานอล (Absolute ethanol: EtOH) จากบริษัท อาร์ซีไอ แล็บสแกน จำกัด
- น้ำปราศจากไอออน (Deionized Water: DI)
- เควอร์ซิติน (Quercetin dihydrate) จากบริษัท Fluka จำกัด

- อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride: Al_2CO_3) จากบริษัท Merck จำกัด
- โพแทสเซียมอะซิเตท (Potassium acetate: CH_3COOK) จากบริษัท Avantor performance materials จำกัด
- สาร 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) จากบริษัท Fluka จำกัด
- อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนฮาร์ดอินฟิวชัน (Brain heart infusion: BHI) จาก Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD
- อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Mueller Hinton Agar: MHA) จาก Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD
- อาหารเลี้ยงเชื้อทริปติกซอยชนิดวุ้น (Tryptic soy agar: TSA) จาก Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD
- อาหารเลี้ยงเชื้อทริปติกซอยชนิดเหลว (Tryptic soy broth: TSB) จาก Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD
- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) จากบริษัท Merck จำกัด
- ผงวุ้น (Agar technical solidifying agent) จาก Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD
- แอลซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (L-cysteine hydrochloride monohydrate) จากบริษัท Ajinomoto จำกัด
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide: NaOH) จากบริษัท Merck จำกัด
- ฮีมิน (Hemin powder) จากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด
- น้ำกลั่นสำหรับฉีด (Sterile water for injection) จากบริษัท A.N.B laboratories จำกัด
- วิตามินเค (Vitamin K1) จากบริษัท Samarth life sciences PVT. LTD.
- กลีเซอรอล (Glycerol) จากบริษัท ไทยโอลีโอเคมี จำกัด
- น้ำเกลือ (Normal saline) จากบริษัท Klean & Kare จำกัด
- คลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนต (Chlorhexidine gluconate) จากคณะเภสัชศาสตร์
- ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide) จากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด
- สารจับออกซิเจน (Anaerocult A) จากบริษัท Merck จำกัด

2.4 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

- ขวดก้นกลม (Round bottom flask) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- เครื่องซอกห์เลต (Soxhlet extractor) ขนาด 200 มิลลิลิตร
- คอนเดนเซอร์ (Condenser)
- เครื่องให้ความร้อน (Heater)

- ที่จับคอนเดนเซอร์ (Condensor clamp)
- สายยางซิลิโคน (Silicon tube)
- เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)
- ขวดลดความดัน (Suction flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- กรวยกรองบุชเนอร์ (Buchner funnel) เส้นผ่านศูนย์กลาง 170 มิลลิเมตร
- กระดาษกรองสาร (Whatman filtering paper) เบอร์ 1 มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 11 ไมครอน
- กระบอกตวง (Cynlinder) ขนาด 25, 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
- ปิเปตต์แบบใช้ตวง (Graduated pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- ลูกยางปิเปตต์ (Pipettes bulb)
- หลอดหยดสาร (Dropper)
- หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 8, 14, 18 และ 20 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองพร้อมฝาเกลียว (Culture tube)
- ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 10, 25, 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
- ขวดเก็บตัวอย่าง (Glass Vials) ขนาด 20 มิลลิลิตร
- เครื่องชั่งสารเคมี (Balance) ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Water baths-shaker)
- โถดูดความชื้น (Desiccator)
- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle and loop)
- แท่งแก้วคน (Stirring rod)
- ช้อนตักสารสแตนเลส (Stainless spatula)
- ถุงมือยาง (Rubber glove)
- คีมคีบ (Forcep)
- ช้อนเขาสำหรับตักสารเคมี (Spoons)
- ขวดน้ำกลั่น (Wash bottle)
- ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
- ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
- หลอดเซนติฟิวพลาสติก (Microcentrifuge tubes)
- คิวเวทท์พลาสติก (Plastic cuvette)
- พาราฟิล์ม M (Parafilm M)
- แผ่นฟอยล์อลูมิเนียม (Aluminium foil)
- สำลีพันก้าน (Cotton swab)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Automatic autoclave)

- หลอดพลาสติกเก็บเชื้อ (Cryogenic vial)
- ตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator)
- ตู้แช่แข็ง (Refrigerator)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- แท่งแก้วงอ (Spreader)
- กระดาษชั่งสาร (Weighing papers)
- ภาชนะเลี้ยงเชื้อในสภาวะไรออกซิเจน (Anaerobic jar)
- แถบตรวจออกซิเจน (Anaerotest)
- เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปคโตรมิเตอร์ (Gas chromatography-mass spectrometry: GC-MS) รุ่น Trace GC ultra / ISQ MS

2.5 วิธีการทดลอง

2.5.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพฤกษเคมีจากชากฤษณา

ศึกษาวิธีการสกัดเบื้องต้นด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลตและแบบเขย่าโดยมีปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาคือ ชนิดของตัวทำละลาย (น้ำ เอทานอล อะซีโตน และเอทิลอะซีเตท) อุณหภูมิในการสกัด (30, 60 และ 100 องศาเซลเซียส สำหรับการสกัดแบบเขย่า) ระยะเวลาในการสกัด (2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง) โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Oil baths-shaker) ที่ความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที และอัตราส่วนของชากฤษณาต่อตัวทำละลาย (5 และ 10 กรัมต่อตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตร) โดยตัวทำละลายแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแสดงดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 สมบัติความมีขั้วและจุดเดือดของตัวทำละลายแต่ละชนิด [56]

Solvent	Boiling point (°C)	Polarity Index
Water	100	9
Ethanol	78.37	5.2
Ethyl acetate	77.2	4.4
Acetone	56	5.1

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองเบื้องต้น จึงนำมากำหนดขอบเขตในการศึกษาการสกัดชากฤษณาแบบเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Water baths-shaker) โดยศึกษาชนิดของตัวทำละลาย (น้ำ เอทานอล และเอทิลอะซีเตท) อุณหภูมิในการสกัด (30, 55 และ 80 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาการสกัด (1, 2 และ 3 วัน) และความเร็วรอบในการเขย่า (0, 80 และ 160 รอบต่อนาที) โดยเตรียมใบชากฤษณาสายพันธุ์เอควิลาเรีย ซับอินทิกรา (*A. subintegra*) ของวิสาหกิจชุมชนแปรรูปไม้กฤษณาไทยรุ่งการเกษตร-ศรีวิชัย (สะเดา) ที่มีขนาด 1 ถึง 2 มิลลิเมตร หาปริมาณความชื้นตามมาตรฐาน AOAC 2006 [57] โดยนำใบชาไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกจากตู้อบมาใส่ไว้ในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกว่าน้ำหนักจะไม่

เกิดการเปลี่ยนแปลง แล้วนำใบชาปริมาณ 10 กรัม ใส่ในขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร และใส่สารละลายปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยสารสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจะได้สารสกัดสีเหมือนน้ำชา สารสกัดที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายจะได้สารสกัดสีเขียว และสารสกัดที่ใช้เอทิลอะซิเตทจะได้สารสกัดสีเขียวเข้ม

สภาวะที่ใช้ในการสกัดได้จากการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี RSM เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรที่สนใจ และหาสภาวะที่เหมาะสมจากความสัมพันธ์ของตัวแปรเหล่านั้น (ภาคผนวก ก) สมการที่ใช้ในการออกแบบคือ Box-Behnken design (BBD) ดังสมการที่ 2.1 โดยค่า y เป็นค่าที่ได้จากการทดลอง ค่า β เป็นค่าคงที่ของสมการ และ x_1, x_2 และ x_3 เป็นค่าตัวแปรอุณหภูมิ เวลาสกัด และความเร็วรอบ ตามลำดับ ส่วนค่า X_1, X_2 และ X_3 เป็นตัวแปรไร้หน่วย ดังสมการที่ 2.2 จะได้สภาวะที่ใช้ในการทดลองดังตารางที่ 2-2

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^{k} \beta_j X_j + \sum_{j=1}^{k} \beta_{jj} X_j^2 + \sum\sum_{i<j} \beta_{ij} X_i X_j \qquad 2.1$$

$$X_{Coded} = \frac{x_{Actual} - (x_{Hi} + x_{Low})/2}{(x_{Hi} - x_{Low})/2} \qquad 2.2$$

จากนั้นนำมากรองและระเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้ส่วนของสารสกัด นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) เพื่อหาร้อยละผลได้ (% Yield) ของสารสกัดแต่ละสภาวะ และทำการสกัดด้วยวิธีซอกห์เลตโดยตัวทำละลายแต่ละชนิดเป็นการเปรียบเทียบกับการสกัดแบบเขย่า

ตารางที่ 2-2 การออกแบบการทดลองที่สภาวะต่างๆ

#	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) : x_1 (X_1)	เวลาสกัด (วัน) : x_2 (X_2)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที) : x_3 (X_3)
1	30 (-1)	1 (-1)	80 (0)
2	30 (-1)	2 (0)	0 (-1)
3	30 (-1)	2 (0)	160 (1)
4	30 (-1)	3 (1)	80 (0)
5	55 (0)	1 (-1)	0 (-1)
6	55 (0)	1 (-1)	160 (1)
7	55 (0)	2 (0)	80 (0)
8	55 (0)	2 (0)	80 (0)
9	55 (0)	2 (0)	80 (0)
10	55 (0)	3 (1)	0 (-1)
11	55 (0)	3 (1)	160 (1)

ตารางที่ 2-2 การออกแบบการทดลองที่สภาวะต่างๆ (ต่อ)

#	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) : x_1 (X_1)	เวลาสกัด (วัน) : x_2 (X_2)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที) : x_3 (X_3)
12	80 (1)	1 (-1)	80 (0)
13	80 (1)	2 (0)	0 (-1)
14	80 (1)	2 (0)	160 (1)
15	80 (1)	3 (1)	80 (0)

2.5.2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชากฤษณา

2.5.2.1 การวิเคราะห์ค่าปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด

การวิเคราะห์ค่าปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดของสารสกัดจากชากฤษณาทำการหาค่าด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent method ซึ่งใช้ Gallic acid equivalents (GAE) เป็นสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) เตรียม 10% Folin-Ciocalteu reagent ได้โดยการนำสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น การทำกราฟสารละลายมาตรฐาน (Standard curve) สามารถทำได้โดยเตรียม GAE ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประมาณ 5 ความเข้มข้น คือ 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำ GAE ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาดำเนินการตามขั้นตอนการทดสอบ [58] เปรียบเทียบกับสารสกัดจากชากฤษณา (แสดงในภาคผนวก ข) โดยค่าที่ได้จากการทดสอบจะอยู่ในรูปของค่า Total phenolic content (mg GAE/g agarwood)

2.5.2.2 การวิเคราะห์ค่าปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์ค่าปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากชากฤษณาทำการหาค่าด้วยวิธีที่นิยมใช้วัดค่าปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดจากพืชคือ $AlCl_3$ colorimetric method โดยใช้ Quercetin equivalent (QE) เป็นสารละลายมาตรฐาน ในการทำกราฟสารละลายมาตรฐานสามารถทำได้โดยเตรียม QE ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประมาณ 5 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำ QE ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาดำเนินการตามขั้นตอนการทดสอบ [58] เปรียบเทียบกับสารสกัดจากชากฤษณา (แสดงในภาคผนวก ค) โดยค่าที่ได้จากการทดสอบจะอยู่ในรูปของค่า Total flavonoid content (mg QE/g agarwood)

2.5.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยให้สารสกัดทำปฏิกิริยากับ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรมีสีม่วง โดยจะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 nm ค่าที่ได้จะอยู่ในรูปของค่าความเข้มของแสง (Optical density: OD) เมื่อแปลงจากกราฟก็จะได้ค่า %inhibition ดังสมการที่ 2.3 โดยค่า control OD คือค่าความเข้มแสงของสารละลาย DPPH ที่ใช้เป็นตัวควบคุม ซึ่งจะรายงานผลเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50% หรือค่า IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration) หมายถึงปริมาณของสาร

ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50% ค่าที่มีค่าน้อยจะแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าค่าที่มีค่ามาก เปรียบเทียบค่าที่ได้กับ Gallic acid ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐาน [59] (แสดงในภาคผนวก ง)

$$\%\text{inhibition} = \left(\frac{\text{control OD} - \text{sample OD}}{\text{control OD}}\right) \times 100 \qquad 2.3$$

2.5.2.4 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากชากฤษณา

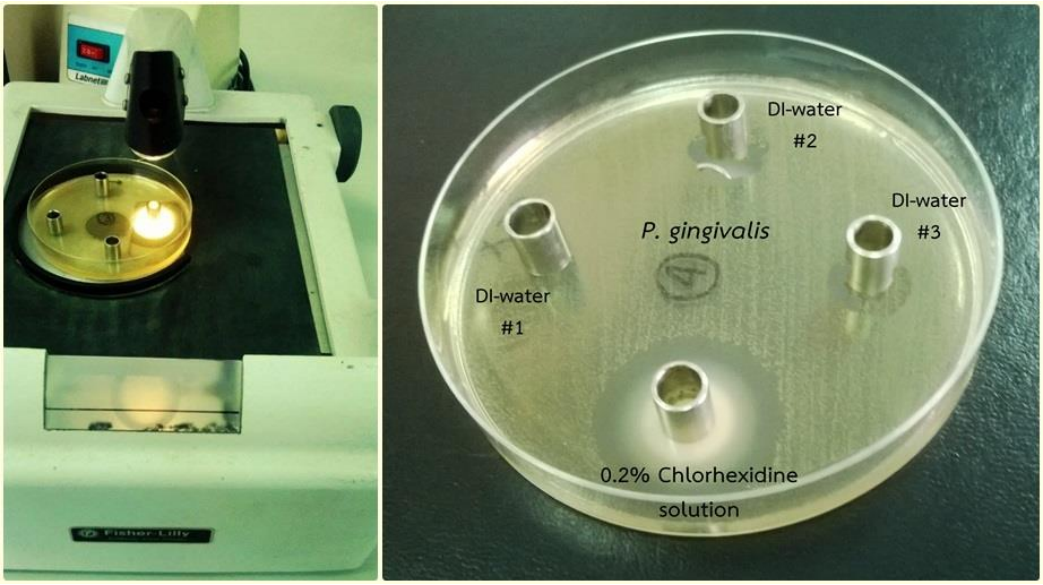
นำสารสกัดจากชากฤษณาจากตัวทำละลายแต่ละชนิดไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปคโตรมิเตอร์ (แสดงในภาคผนวก จ) โดยใช้คอลัมน์ TR-5MS ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่มีช่วงกว้างๆ ในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์จากอาหารและน้ำมันหอมระเหย นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารต้านเชื้อหรือสารกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากคอลัมน์ชนิดนี้จะไม่ทำปฏิกิริยา (No active sites) กับสารเคมีที่ต้องการจะวิเคราะห์ ทำให้สามารถแยกสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ [60] และสารแต่ละชนิดที่ถูกแยกออกมาจากสารสกัดจะขึ้นอยู่กับจุดเดือดของสารนั้นๆ โดยมีสภาวะในการวิคราะห์ดังนี้

Column	:	TR-5MS
	:	Max temperature 300 °C
	:	Nominal length 30 m
	:	Nominal diameter 0.25 mm
	:	Nominal film thickness 0.25 µm
	:	Constant flow 1.0 ml/min
Inlet	:	Mode Split
	:	Inlet temperature 250 °C
	:	Split ratio 1:25
Oven	:	Initial temperature 50 °C (5 min)
	:	Ramp Rate (°C/min) Final temperature (°C)
		1 2.00 260
		2 10.00 300
Ionization mode	:	Electron ionization (EI)
Solvent delay time	:	3 min
Ion source temp.	:	250 °C
Transferline temp.	:	250 °C

2.5.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในช่องปากของสารสกัดจากชากฤษณา

2.5.3.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar dilution method [39]

ทดสอบด้วยเชื้อ *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175 และ *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*) ATCC 13419 ซึ่งเป็นเชื้อแอโรบ (Aerobe) ส่วนเชื้อที่เป็นแอนแอโรบ (Anaerobe) คือ เชื้อ *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) ATCC 33277 วิธี Agar dilution method อาจทำร่วมกับ Diffusion method ตัวยาที่ใช้ทดสอบคือ คลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนต [55] เป็น Positive control ส่วนน้ำปราศจากเชื้อ (Sterile water) ซึ่งได้จากการนำน้ำ DI ไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง จากนั้นก็ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และ 5% DMSO (Dimethyl sulfoxide) เป็น Negative control เริ่มทำการทดสอบโดยทำให้ตัวยาซึมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อแบคทีเรียเอาไว้ อาศัยหลักการแพร่ของยาจากถ้วยทรงกระบอก (Cylinder cup) เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้ออยู่ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโตในขณะที่ยาแพร่เข้าไปในอาหารวุ้น (Agar) แบคทีเรียที่อยู่บนอาหารวุ้นและไม่ถูกยับยั้งโดยยาจะแบ่งตัวจนทำให้เห็นเชื้อขึ้นเต็มพื้นที่ อ่านผลการทดสอบโดยวัดขนาดของโซนยับยั้ง (Zone of inhibition) ลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของถ้วยทรงกระบอกซึ่งมีขนาด 6 มิลลิเมตร วงใสรอบถ้วยทรงกระบอกแสดงถึงบริเวณที่ถูกยับยั้งโดยยาและสารสกัด (ภาพประกอบที่ 2-2) ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของยา (แสดงในภาคผนวก ฉ)



ภาพประกอบ 2-2 โซนยับยั้งของสารสกัดจากชากฤษณาที่สกัดด้วยน้ำ

2.5.3.2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration: MIC) และทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC) [61]

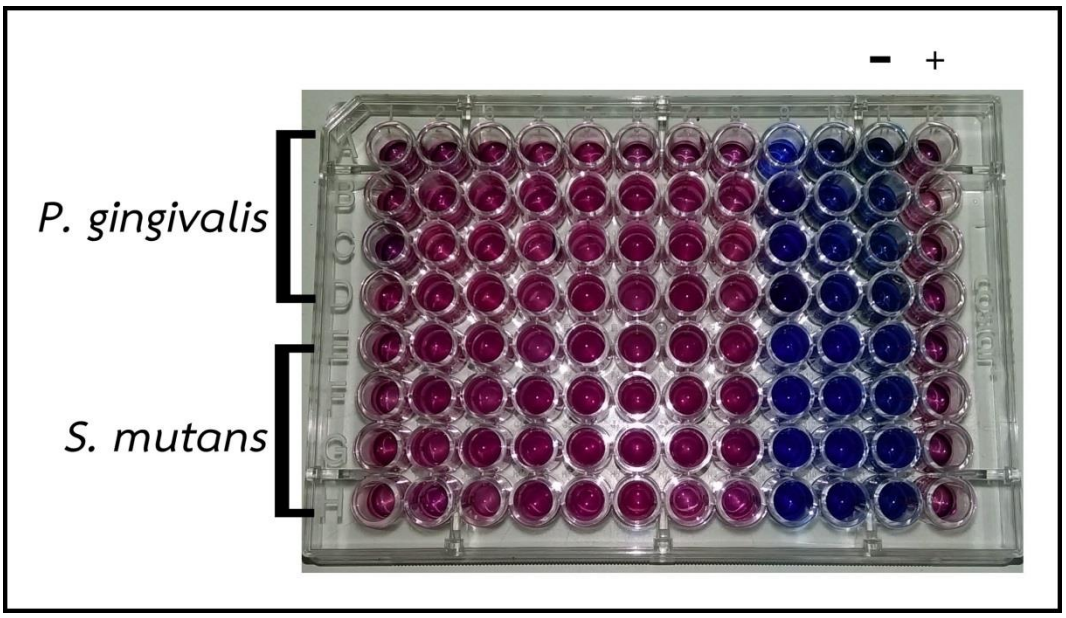
1) นำเชื้อ *S. mutans* และ *P. gingivalis* ที่เตรียมไว้มาละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์โซลูชัน (Phosphate buffer solution: PBS) จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 Mcfarland standard ด้วยสารละลาย PBS ซึ่งได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^7 cfu/ml

2) นำสารละลายตัวอย่างที่ผสมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ เติมลงในถาดเพาะเลี้ยงเชื้อ (96 well plate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อที่เตรียมไว้แล้วลงไปหลุมละ 10 ไมโครลิตร โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อเท่ากับ 10^5 cfu/ml

3) นำถาดเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมสีรีซาซูริน (Resazurin) ที่ความเข้มข้น 0.02 (w/v) ลงในถาดเพาะเลี้ยงปริมาตรหลุมละ 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีรีซาซูริน ในกรณีที่เชื้อเจริญเติบโต สีรีซาซูรินจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู

4) สังเกตค่าการยับยั้งเชื้อจากความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญเติบโต (MIC) ซึ่งสีของรีซาซูรินจะไม่เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู โดยใช้แวนโคมัยซิน (Vancomycin) เป็น Positive control ของเชื้อ *S. mutans* และใช้เมโทรนิดาโซล (Metronidazole) เป็น Positive control ของเชื้อ *P. gingivalis* แสดงดังภาพประกอบ 2-3

5) นำสารละลายจากถาดเพาะเชื้อที่ใช้หาค่า MIC หลุมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของรีซาซูริน (สีน้ำเงิน) มาเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) แล้วนำถาดนั้นไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตผลจากความเข้มข้นต่ำสุดของสารตัวอย่างที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ (MBC)

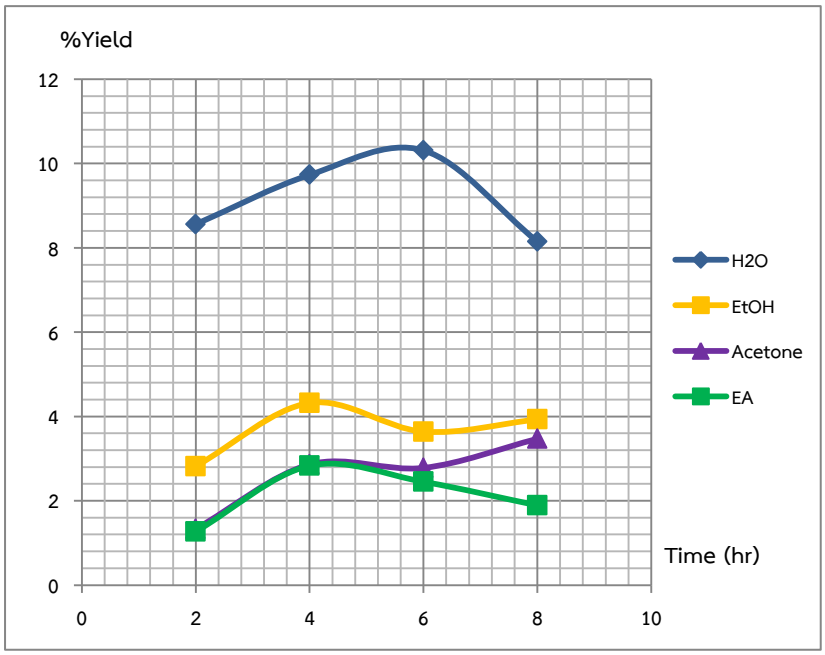


ภาพประกอบ 2-3 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด

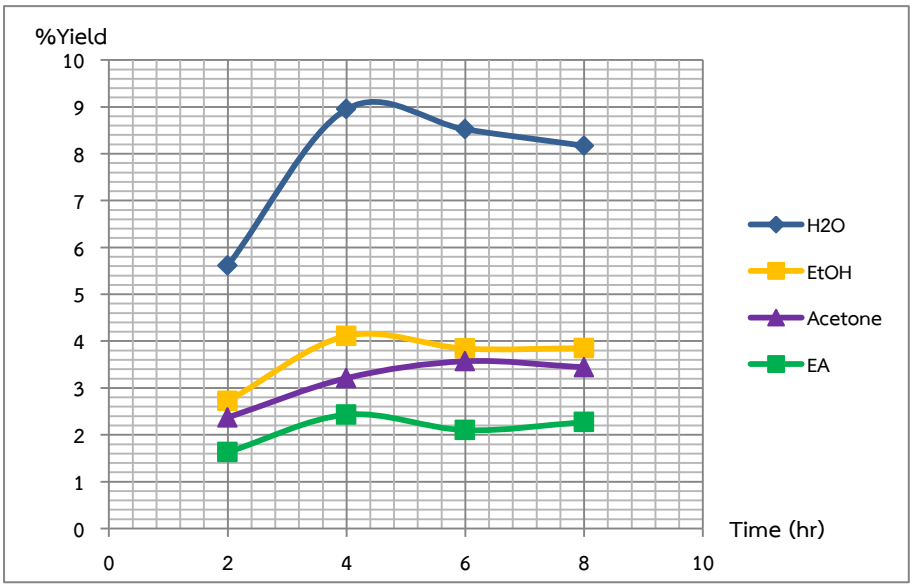
บทที่ 3
ผลและวิจารณ์การทดลอง

3.1 ผลได้สารสกัดจากชากฤษณา

จากการศึกษาสภาวะในการสกัดเบื้องต้นโดยใช้อัตราส่วนของชากฤษณาต่อตัวทำละลายที่ 5 และ 10 กรัมต่อตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตร พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอะซีโตนและเอทานอลได้ร้อยละผลได้ของสารสกัดในปริมาณที่เท่าๆ กัน และอะซีโตนมีจุดเดือดต่ำกว่าเอทานอล จึงเลือกใช้ตัวทำละลายเพียงสามชนิดในการศึกษาปัจจัยด้านชนิดของตัวทำละลาย ส่วนระยะเวลาในการสกัดพบว่า การสกัดแบบซอกห์เลตที่ 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ให้ร้อยละผลได้ไม่ต่างกันมากนัก และการสกัดที่ 4 ชั่วโมง ค่อนข้างจะมีร้อยละผลได้สูงกว่าที่ 6 และ 8 ชั่วโมง จึงเลือกใช้เวลาในการสกัดที่ 4 ชั่วโมง ในการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบเขย่า แสดงดังภาพประกอบที่ 3-1 และ 3-2

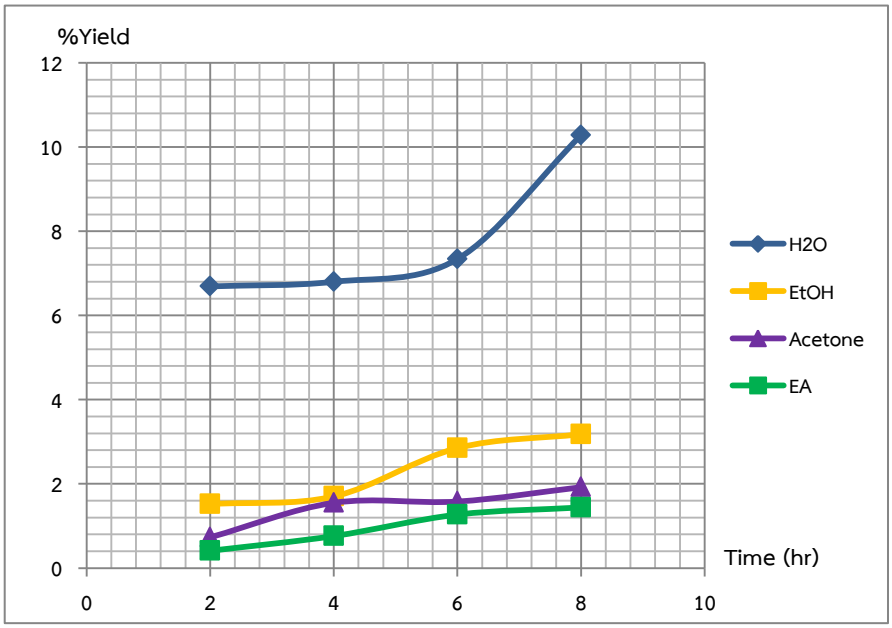


ภาพประกอบที่ 3-1 ร้อยละผลได้ของการสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยใช้อัตราส่วนของชากฤษณาต่อตัวทำละลายที่ 5 กรัมต่อ 200 มิลลิลิตร

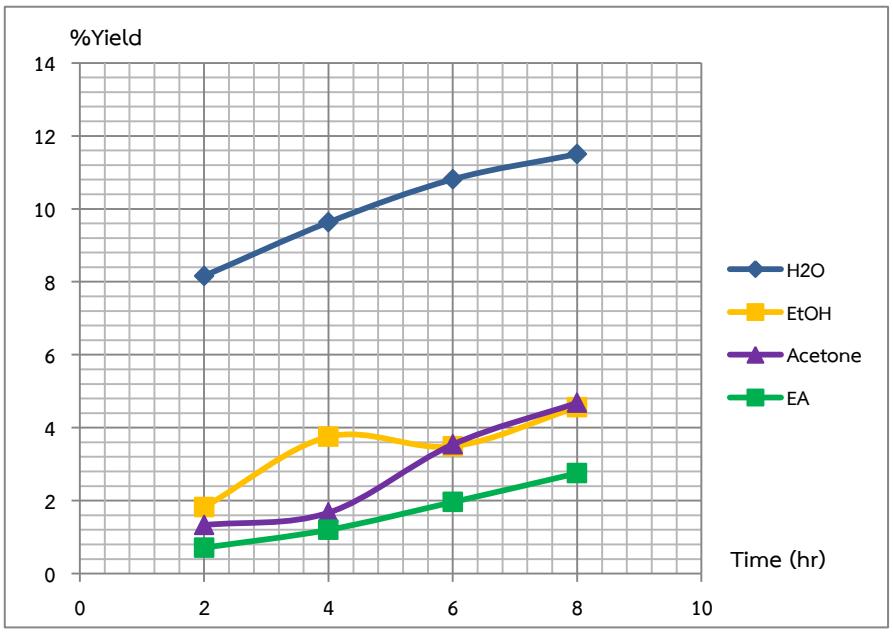


ภาพประกอบที่ 3-2 ร้อยละผลได้ของการสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยใช้อัตราส่วนของชากฤษณาต่อตัวทำละลายที่ 10 กรัมต่อ 200 มิลลิลิตร

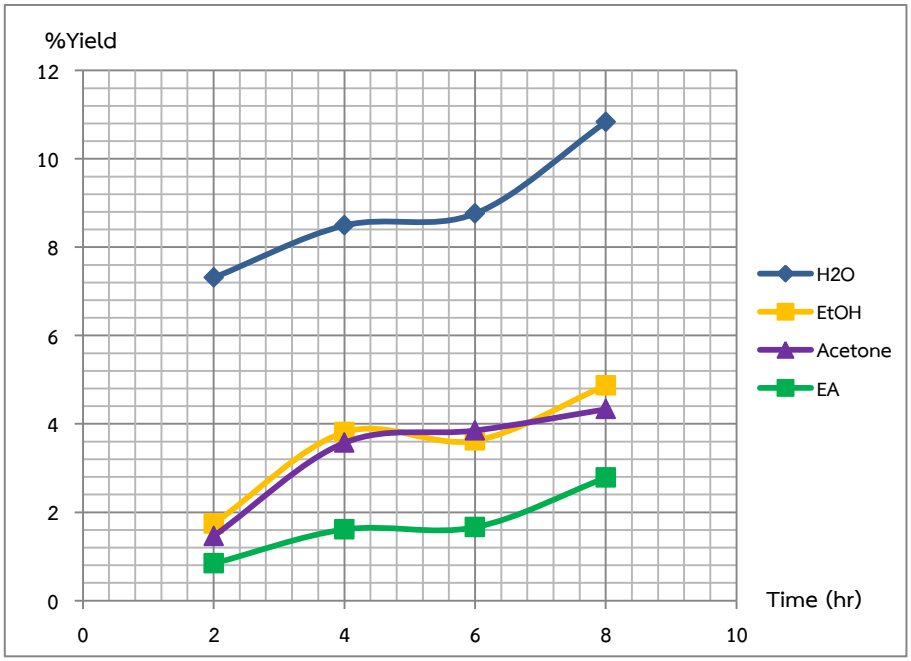
ส่วนการสกัดแบบเขย่าจะต้องใช้เวลาในการสกัดมากกว่านี้ ถึงจะได้สารสกัดที่เพียงพอจะนำไปใช้ในการทดสอบ จึงต้องเพิ่มระยะเวลาในการสกัด การสกัดที่อุณหภูมิสูงและอัตราส่วนของชากฤษณาต่อตัวทำละลายทำให้ร้อยละผลได้เพิ่มขึ้นในแต่ละชนิดของตัวทำละลาย แสดงดังภาพประกอบที่ 3-3, 3-4 และ 3-5



ภาพประกอบที่ 3-3 ร้อยละผลได้ของการสกัดแบบเขย่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพประกอบที่ 3-4 ร้อยละผลได้ของการสกัดแบบเขย่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส



ภาพประกอบที่ 3-5 ร้อยละผลได้ของการสกัดแบบเขย่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาสภาวะในการสกัดเบื้องต้นทำให้สามารถกำหนดปัจจัยที่เหมาะสม ใช้ศึกษาการสกัดชากฤษณาแบบเขย่าได้ โดยอัตราส่วนของชากฤษณาต่อตัวทำละลายจะใช้ที่ 10 กรัมต่อตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตร โดยมีตัวแปรที่สนใจคือ ชนิดของตัวทำละลาย (น้ำ เอทานอล และ

เอทิลอะซีเตท) อุณหภูมิในการสกัด (30, 55 และ 80 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาการสกัด (1, 2 และ 3 วัน) และความเร็วรอบในการเขย่า (0, 80 และ 160 รอบ/นาที) ดังแสดงในตารางที่ 3-1 พบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำมีค่าร้อยละผลได้ของสารสกัด (w/w) สูงสุดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการสกัด 1 วัน ที่ความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที ให้ร้อยละผลได้เท่ากับ 12.85 (w/w) ส่วนสารที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าร้อยละผลได้ของสารสกัด (w/w) สูงสุดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการสกัด 3 วัน ที่ความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที ให้ร้อยละผลได้เท่ากับ 7.82 (w/w) และสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีค่าร้อยละผลได้ของสารสกัด (w/w) สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการสกัด 2 วัน ที่ความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที ให้ร้อยละผลได้เท่ากับ 7.82 (w/w)

ตารางที่ 3-1 สภาวะในการสกัดและเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดแต่ละชนิด

การทดลองที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาสกัด (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	ร้อยละผลได้ของสารสกัด (w/w)		
				น้ำ	เอทานอล	เอทิลอะซิเตท
1	30	1	80	8.61	2.98	1.11
2	30	2	0	8.91	1.16	1.31
3	30	2	160	8.67	3.78	0.82
4	30	3	80	9.32	4.16	1.61
5	55	1	0	7.20	1.26	1.19
6	55	1	160	10.33	3.74	1.97
7	55	2	80	9.81	4.82	3.85
8	55	2	80	11.10	4.68	3.59
9	55	2	80	9.75	4.61	3.63
10	55	3	0	10.12	4.81	2.24
11	55	3	160	10.52	4.52	1.91
12	80	1	80	12.85	7.23	2.90
13	80	2	0	11.86	6.70	1.73
14	80	2	160	10.98	7.52	1.60
15	80	3	80	11.65	7.82	2.70
การสกัดแบบซอกห์เลต 4 ชั่วโมง				10.95	4.47	2.99

จะเห็นว่าการสกัดด้วยน้ำและเอทานอลที่อุณหภูมิสูง (80 องศาเซลเซียส) ด้วยความเร็วรอบในการเขย่าค่ากลาง (80 รอบ/นาที) จะให้ผลได้สูง ในขณะที่การสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทการสกัดที่อุณหภูมิค่ากลาง (55 องศาเซลเซียส) และความเร็วรอบในการเขย่าค่ากลาง (80 รอบ/นาที) ให้ค่าผลได้สูงสุด เวลาการสกัดแสดงอิทธิผลต่อผลได้ไม่ชัดเจน น้ำเป็นตัวทำละลายที่ให้ผลได้การสกัดสูงกว่าเอทานอลและเอทิลอะซีเตท การสกัดแบบซอกห์เลตเป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำมีผลได้ 10.95% สารที่สกัดด้วยเอทานอล 4.47% และสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท 2.99% จะเห็นว่าผลได้สูงสุดจากการสกัดแบบเขย่าทุกตัวทำละลายจะสูงกว่าการสกัดแบบซอกห์เลต ทั้งนี้เนื่องจากการสกัดแบบเขย่าใช้ระยะเวลาสกัดนานกว่าการสกัดแบบซอกห์เลต โดยปกติการสกัดแบบซอกห์เลตมีข้อเด่นกว่าการสกัดแบบเขย่าในเรื่องของตัวทำละลายที่มีความสดใหม่ในทุกรอบของการสกัด ต่างจากการสกัดแบบเขย่าที่ตัวทำละลายจะมีสารสกัดปนอยู่ ทำให้ความสามารถในการสกัดของตัวทำละลายจะลดลงเรื่อยๆ จนถึงจุดอิ่มตัว ในการดำเนินการทดลองครั้งนี้เน้นศึกษาการสกัดแบบเขย่าเนื่องจากสามารถดำเนินการได้หลายๆ การทดลองพร้อมๆ กัน ผลการสกัดแบบซอกห์เลตช่วยยืนยันว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่ให้ผลได้การสกัดสูงกว่าเอทานอลและเอทิลอะซีเตท

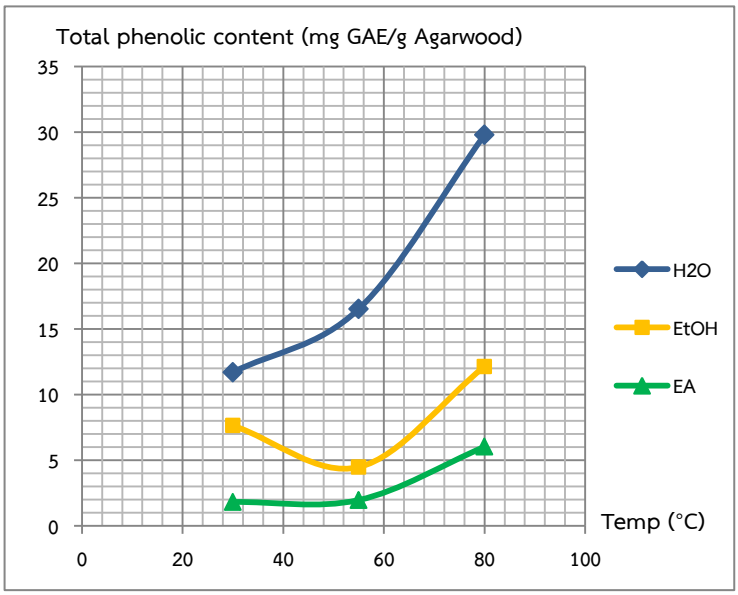
3.2 ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด

สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่พบในผักและผลไม้ที่มีสารประกอบจำพวกฟีนอล (Phenolic compounds) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกส์ที่พบในพืชมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [62] ร่างกายของเราจึงต้องบริโภคผักและผลไม้อย่างน้อยวันละ 400 กรัม [63] เพื่อให้ร่างกายได้รับปริมาณฟีนอลิกส์อย่างเพียงพอ ช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ ได้ จากผลในตารางที่ 3-2 แสดงค่าปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดเทียบกับ GAE ในหน่วย mg GAE/g agarwood สำหรับการสกัดแบบเขย่า สารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.47-6.03 mg GAE/g agarwood สารที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.07-12.15 mg GAE/g agarwood และสารที่สกัดด้วยน้ำพบปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดในปริมาณค่อนข้างสูง 10.26-29.80 mg GAE/g agarwood ส่วนการสกัดแบบซอกห์เลต พบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลมีค่าปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดใกล้เคียงกัน คือ 8.42 mg GAE/g agarwood และ 8.34 mg GAE/g agarwood ตามลำดับ ส่วนสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทเท่ากับ 2.52 mg GAE/g agarwood การสกัดแบบซอกห์เลตได้ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดน้อยกว่าการสกัดแบบเขย่าทุกตัวทำละลาย และน้ำเป็นตัวทำละลายที่สกัดได้ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดสูงสุดทั้งการสกัดแบบเขย่าและแบบซอกห์เลต สอดคล้องกับค่าผลได้ของการสกัดที่น้ำเป็นตัวทำละลายที่ให้ผลได้การสกัดสูงสุดทั้งด้วยการสกัดแบบเขย่าและแบบซอกห์เลต

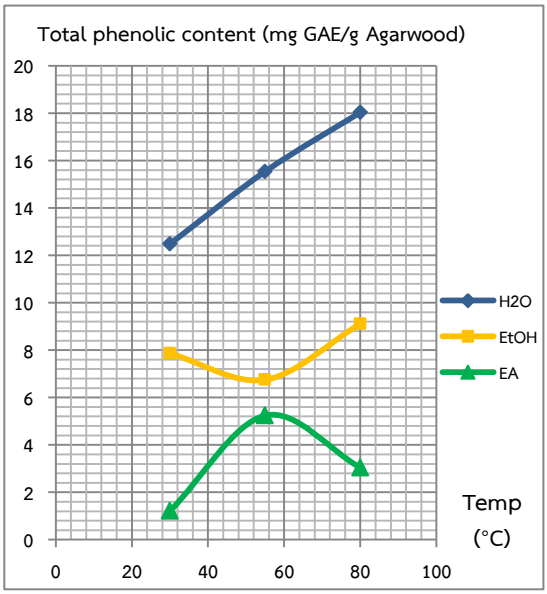
ตารางที่ 3-2 ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดของสารสกัดแต่ละสภาวะ

การทดลองที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาสกัด (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด (mg GAE/g agarwood)		
				น้ำ	เอทานอล	เอทิลอะซิเตท
1	30	1	80	11.71±0.11	7.64±0.02	1.82±0.02
2	30	2	0	12.48±0.15	2.70±0.03	0.47±0.02
3	30	2	160	15.60±0.06	7.86±0.11	1.21±0.03
4	30	3	80	13.05±0.12	3.16±0.09	1.67±0.04
5	55	1	0	10.94±0.20	2.07±0.05	1.34±0.05
6	55	1	160	16.53±0.02	4.48±0.04	1.97±0.18
7	55	2	80	13.73±0.16	6.75±0.03	5.24±0.02
8	55	2	80	15.54±0.03	6.74±0.02	5.02±0.05
9	55	2	80	14.42±0.04	6.45±0.10	5.08±0.05
10	55	3	0	15.78±0.16	6.35±0.05	2.24±0.11
11	55	3	160	13.04±0.06	5.97±0.06	0.61±0.03
12	80	1	80	29.80±0.01	12.15±0.09	6.03±0.05
13	80	2	0	18.03±0.02	9.11±0.06	3.04±0.14
14	80	2	160	14.06±0.10	7.82±0.11	1.79±0.05
15	80	3	80	10.26±0.08	6.57±0.05	2.80±0.03
การสกัดแบบซอกห์เลต 4 ชั่วโมง				8.42±0.05	8.34±0.03	2.52±0.03

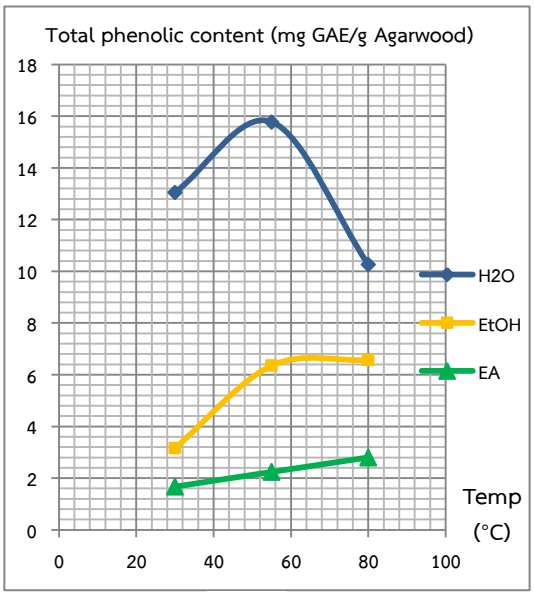
เมื่อนำปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดมาพล็อตกราฟดังภาพประกอบที่ 3-6 เพื่อดูแนวโน้มของอุณหภูมิในการสกัดและเวลาในการสกัดของการสกัดแบบเขย่า พบว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัด โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการสกัด ก็จะทำให้ได้ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับเอทานอลและเอทิลอะซีเตท แต่บางสภาวะ (55 องศาเซลเซียส) ของตัวทำละลายทั้งสอง จะมีแนวโน้มของปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดลดลง



(a)



(b)



(c)

ภาพประกอบที่ 3-6 ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดของการสกัดแบบเขย่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ (a) ระยะเวลาการสกัด 1 วัน (b) ระยะเวลาการสกัด 2 วัน และ (c) ระยะเวลาการสกัด 3 วัน

Nik Wil และคณะ [64] ศึกษาการสกัดฟีนอลิกส์จากใบกฤษณาสายพันธ์ *A. malaccensis* ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือน้ำและเมทานอล ทำการสกัดแบบแช่ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ใบกฤษณาปริมาณ 50 กรัม และตัวทำละลาย 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าประสิทธิภาพในการสกัดใบกฤษณาแห้ง (อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส) ด้วยน้ำดีกว่าการสกัดด้วยเมทานอล สอดคล้องกับงานวิจัยของ Helen และคณะ [65] ที่สกัดสารจากใบกฤษณาที่ปล่อยให้แห้งด้วยอากาศ ด้วยการแช่ในตัวทำละลายเมทานอลที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) ระเหยตัวทำละลายได้สารสกัดเข้มข้น ส่วนนี้เรียกว่า ME (Methanol extract) และนำส่วนสกัดด้วยเมทานอลไปละลายน้ำ กรองและทำแห้ง เรียกสารสกัดส่วนนี้ว่า AE (Aqueous extract) พบว่าปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดของส่วน AE สูงกว่าส่วน ME จากผลวิจัยดังกล่าวและผลการทดลองของการศึกษาครั้งนี้จึงกล่าวได้ว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกส์จากใบกฤษณา

เมื่อนำปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม RSM พบว่าค่า R^2 ของการสกัดด้วยน้ำและเอทานอลมีค่าเท่ากับ 0.64 และ 0.32 ตามลำดับ ทำให้ในส่วนของการวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดฟีนอลิกส์ไม่สามารถใช้โปรแกรม RSM ได้ แต่เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองจะพบว่าการสกัดด้วยน้ำหรือเอทานอลที่สภาวะอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 1 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที จะได้ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดสูงกว่า จึงเลือกใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในงานวิจัยนี้

ส่วนการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีค่า R^2 จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม RSM เท่ากับ 0.91 แสดงว่าค่าที่ได้จากแบบจำลองมีค่าใกล้เคียงกับข้อมูลการทดลองจริง [45] ส่วนค่า R^2adjust มีค่าเท่ากับ 0.83 ใกล้เคียงกับค่า R^2 การใช้แบบจำลองจึงมีความเหมาะสม สมการที่ 3.1 แสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดด้วยเอทิลอะซีเตท

$$Y_1 = -10.93 + 0.275x_1 + 5.460x_2 + 0.06052x_3 - 0.00156x_1^2 - 1.060x_2^2 \quad 3.1$$
$$-0.000393x_3^2 - 0.03085x_1x_2$$

เมื่อ Y_1 คือ ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด (mg GAE/g agarwood)
x_1 คือ อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส)
x_2 คือ เวลาในการสกัด (วัน)
x_3 คือ ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที)

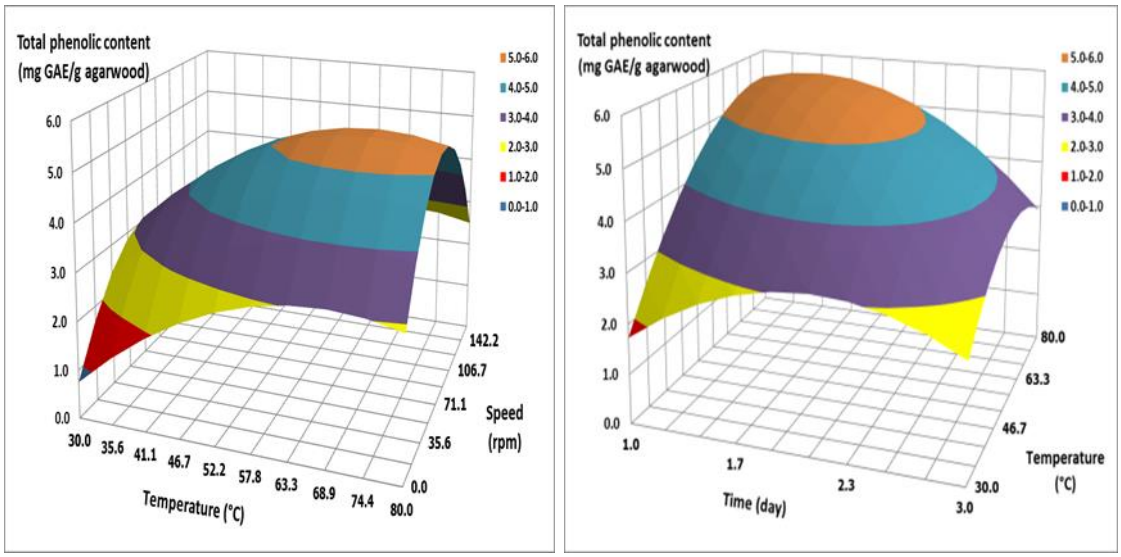
ตารางที่ 3-3 แสดงผลการวิเคราะห์ ANOVA ของสมการกำลังสองซึ่งค่า P-value < 0.05 นอกจากนี้ค่า P-value ของตัวแปรอุณหภูมิในการสกัด ระยะเวลาการสกัด และความเร็วรอบในการเขย่า มีค่าเท่ากับ 0.00853, 0.01879 และ 0.000635 ตามลำดับ ค่า P-value ยิ่งน้อยแสดงว่าตัวแปรนั้นมีอิทธิพลต่อการสกัดมาก

ตารางที่ 3-3 การวิเคราะห์ ANOVA ของสมการแสดงประสิทธิภาพในการสกัดปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดด้วยเอทิลอะซีเตท

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
Regression	41.59	91	5.941	10.46	0.00307
Residual	3.978	9	0.568		
Lack of fit	3.954	9 (99)	0.791	65.2615	0.01516
Pure Error	0.02423	0 (1)	0.01212		
Total	45.57	100			

จากสมการที่ 3.1 สามารถพล็อตกราฟพื้นผิวสามมิติ (Surface plot) แสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ เพื่อดูแนวโน้มของสภาวะที่เหมาะสม โดยในการพล็อตกราฟจะพิจารณาได้ทีละสองตัวแปรและให้อีกตัวแปรหนึ่งเป็นค่าคงที่ ผลของอุณหภูมิในการสกัดและความเร็วรอบในการเขย่าต่อประสิทธิภาพในการสกัดของปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดแสดงในภาพประกอบ 3-7 พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดลดลง เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิและความเร็วรอบในการเขย่าที่แทนค่าด้วยตัวแปร x_1 และ x_3 พบว่าสัมประสิทธิ์ของ x_1 และ x_3 มีค่าเป็นบวก แต่เทอมของตัวแปรเชิงซ้อนเทอมอื่นๆ รวมทั้งเทอมที่ยกกำลังสองล้วนมีเครื่องหมายเป็นลบ ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและลดลงเมื่อความเร็วรอบในการเขย่าเพิ่มขึ้นจาก 80 จนถึง 160 รอบ/นาที หากพิจารณาผลของระยะเวลาในการสกัดที่แทนค่าด้วยตัวแปร x_2 โดยที่สัมประสิทธิ์ของ x_2 มีค่าเป็นบวกเช่นเดียวกับ x_1 และ x_3 ซึ่งระยะเวลาในการสกัดมีผลในช่วงแรก คือ 1 ถึง 2 วัน จากนั้นประสิทธิภาพในการสกัดปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดจะลดลงหากใช้ระยะเวลาในการสกัดนานขึ้น เมื่อความเร็วรอบในการเขย่าและเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นทำให้สารฟีนอลิกส์มีโอกาสเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลให้คุณภาพและปริมาณของปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดลดลง [66]

สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากสมการที่ 3.1 คือ อุณหภูมิในการสกัด 74 องศาเซลเซียส เวลาการสกัด 1.5 วัน และความเร็วรอบในการเขย่า 77 รอบ/นาที จะได้สารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดสูงสุดคือ 5.63 mg GAE/g agarwood ใกล้เคียงกับสภาวะการสกัดที่ทดลองจริงคือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 วัน และความเร็วรอบในการเขย่า 80 รอบ/นาที จะได้สารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดสูงสุดคือ 6.03 mg GAE/g agarwood ดังแสดงในตารางที่ 3-4 ดังนั้นการสกัดฟีนอลิกส์ด้วยตัวทำละลายทั้งสามชนิดมีสภาวะที่เหมาะสมสอดคล้องกันคือที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 วัน และความเร็วรอบในการเขย่า 80 รอบ/นาที



(a) (b)

ภาพประกอบ 3-7 กราฟพื้นผิวแสดงปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท (a) กราฟพล็อตระหว่างอุณหภูมิและความเร็วรอบในการเขย่า และ (b) กราฟพล็อตระหว่างอุณหภูมิกับเวลา

ตารางที่ 3-4 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟีนอลิกส์ด้วยเอทิลอะซิเตท

สภาวะ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาสกัด (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด (mg GAE/g agarwood)
สภาวะที่เหมาะสมจากแบบจำลอง	74	1.5	77	5.63 (Predicted)
สภาวะจากการทดลอง	80	1	80	6.03 (Actual)
สภาวะที่ได้จากการคำนวณ	80	1	80	5.34 (Calculated)

อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิสูงสุดที่ใช้ในการทดลองและเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม การเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดทำให้ความสามารถในการละลายของตัวทำละลายดียิ่งขึ้น แต่การเพิ่มอุณหภูมิสูงเกินไปอาจทำให้สารประกอบฟีนอลิกส์เกิดการสลายตัวได้ [67] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Xu และคณะ [68] ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดปริมาณฟีนอลิกส์จากชาเปลือกผลไม้ พบว่าปริมาณฟีนอลิกส์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจาก 30 เป็น 60 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณฟีนอลิกส์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัดที่เหมาะสมจากการทดลองนี้คือ 1 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาสั้นที่สุดที่ศึกษา Surya Prakash และคณะ [69] ศึกษาการสกัดฟีนอลิกส์จาก *Terminalia chebula* ด้วยการแช่ในตัวทำละลายเมทานอล-น้ำ และเอทานอล-น้ำ เป็นเวลา 1-4 วัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือเวลาสกัด 1 วัน การสกัดแบบที่มีการเขย่าและให้ความร้อนเป็นเวลานานอาจทำให้ฟีนอลิกส์เกิดการสลายตัวได้ [69] ความเร็วรอบในการเขย่าที่

เหมาะสมจากการทดลองนี้คือ 80 รอบ/นาที Sushma และคณะ [67] รายงานว่าการเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจาก 50 เป็น 150 รอบ/นาที ทำให้สกัดโพลีฟีนอลจากราก *Dealepis hamiltonii* ด้วยน้ำได้มากขึ้น แต่การเพิ่มความเร็วรอบสูงขึ้นกว่า 150 รอบ/นาที จะทำให้ประสิทธิภาพลดลง ทั้งนี้เนื่องจากความเร็วรอบสูงทำให้เกิดการหมุนแบบเกลียว (Vortex) ทำให้อนุภาคสัมผัสกับตัวทำละลายได้น้อยลง

3.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากการสกัดแบบเขย่า สารที่สกัดด้วยน้ำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในปริมาณค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับตัวทำละลายตัวอื่นๆ คือ 4.20-15.66 mg QE/g agarwood ส่วนสารที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.93-13.24 mg QE/g agarwood และสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทพบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.57-3.34 mg QE/g agarwood เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยซอกห์เลต พบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลมีค่าใกล้เคียงกันคือ 4.05 mg QE/g agarwood และ 4.07 mg QE/g agarwood ตามลำดับ ส่วนสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีค่า 2.20 mg QE/g agarwood ดังแสดงในตารางที่ 3-5

น้ำเป็นตัวทำละลายที่สกัดฟลาโวนอยด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเอทานอล และเอทิลอะซีเตท โดยน้ำเป็นตัวทำละลายมีขั้วสูงสุด ตามด้วยเอทานอล และเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ Sen และคณะ [70] สกัดฟลาโวนอยด์จากใบ *Meyna spinosa Roxb.* ด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทิลอะซีเตทแบบซอกห์เลต พบว่าเมทานอลมีประสิทธิภาพสูงกว่าเอทิลอะซีเตท เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าเอทิลอะซีเตท แต่ต่ำกว่าเอทานอล ฟลาโวนอยด์ประกอบด้วยสารที่มีขั้ว เช่น Flavonoid glycosides และสารไม่มีขั้วเช่น Flavonoid aglycones [71] ฟลาโวนอยด์ที่พบในชากฤษณาน่าจะประกอบด้วยสารที่มีขั้วมากกว่าสารไม่มีขั้ว น้ำจึงเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูงสุด Seo และคณะ [72] ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกส์จากใบฝรั่ง และพบว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีกว่าเอทานอลและเมทานอล สอดคล้องกับ Nyirenda และคณะ [73] ที่กล่าวว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกส์

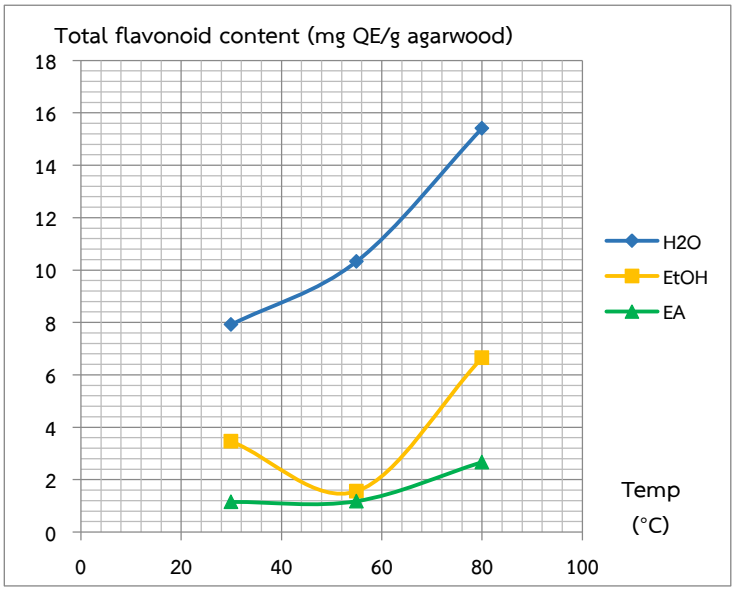
ตารางที่ 3-5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดแต่ละสภาวะ

การทดลองที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาสกัด (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g agarwood)		
				น้ำ	เอทานอล	เอทิลอะซิเตท
1	30	1	80	7.92±0.11	3.46±0.05	1.15±0.08
2	30	2	0	5.35±0.16	0.93±0.02	0.57±0.04
3	30	2	160	12.14±0.08	3.18±0.10	0.88±0.04
4	30	3	80	15.36±0.05	3.16±0.07	0.97±0.02
5	55	1	0	7.20±0.12	1.56±0.05	1.10±0.06

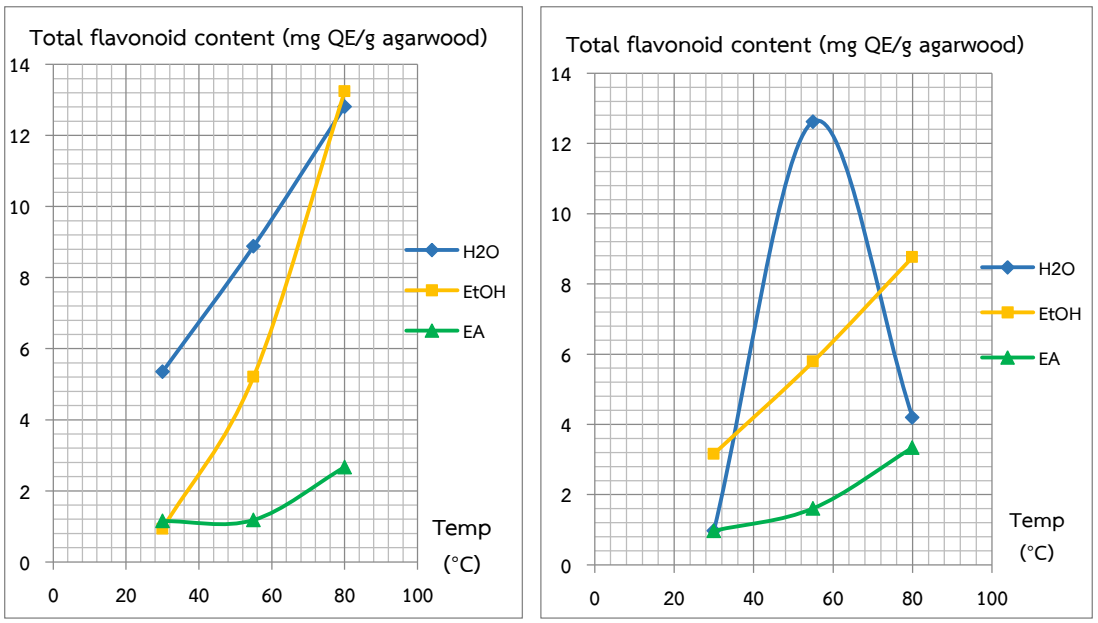
ตารางที่ 3-5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดแต่ละสภาวะ (ต่อ)

การทดลองที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาสกัด (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g agarwood)		
				น้ำ	เอทานอล	เอทิลอะซิเตท
6	55	1	160	10.33±0.14	9.71±0.01	1.18±0.11
7	55	2	80	7.84±0.05	5.21±0.03	3.23±0.05
8	55	2	80	8.88±0.17	5.06±0.04	3.01±0.09
9	55	2	80	7.80±0.05	5.16±0.08	3.05±0.03
10	55	3	0	8.09±0.09	5.20±0.01	1.25±0.03
11	55	3	160	12.62±0.11	5.79±0.06	1.61±0.05
12	80	1	80	15.41±0.12	6.65±0.08	2.67±0.05
13	80	2	0	12.81±0.11	8.57±0.05	1.87±0.03
14	80	2	160	5.71±0.04	13.24±0.03	2.56±0.11
15	80	3	80	4.20±0.06	8.76±0.04	3.34±0.04
การสกัดแบบซอกห์เลต 4 ชั่วโมง				4.05±0.050	4.07±0.10	2.20±0.05

เมื่อนำปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมาพล็อตกราฟดังภาพประกอบที่ 3-8 เพื่อดูแนวโน้มของอุณหภูมิในการสกัดและเวลาในการสกัดของการสกัดแบบเขย่า พบว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัด โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิก็จะทำให้ได้ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเอทานอลและเอทิลอะซีเตท ยกเว้นการสกัดที่ใช้ระยะเวลาในการสกัด 3 วัน ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ได้จากตัวทำละลายน้ำลดลงและค่าสูงสุดที่ได้กลับอยู่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส



(a)



(b) (c)

ภาพประกอบที่ 3-8 ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดของการสกัดแบบเขย่าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ (a) ระยะเวลาการสกัด 1 วัน (b) ระยะเวลาการสกัด 2 วัน และ (c) ระยะเวลาการสกัด 3 วัน

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม RSM พบว่าการสกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเอทิลอะซีเตท ได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.86, 0.89 และ 0.98 ตามลำดับ ซึ่งค่า R^2 ที่ได้มีค่าเข้าใกล้ 1 บ่งบอกถึงความน่าเชื่อถือของแบบจำลอง สมการแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดฟลาโวนอยด์ของตัวทำละลายทั้งสามแสดงในสมการที่ 3.2-3.4

$$Y_2 = -8.916 + 0.47x_1 + 0.107x_3 + 2.345x_2^2 - 0.173x_1x_2 - 0.00174x_1x_3 \quad 3.2$$

$$Y_3 = -1.965 + 0.06785x_3 + 0.000602x_1^2 + 0.0336x_1x_2 - 0.02169x_2x_3 \quad 3.3$$

$$Y_4 = -4.113 + 0.09475x_1 + 2.163x_2 + 0.03196x_3 - 0.000706x_1^2 - 0.626x_2^2 - 0.000186x_3^2 + 0.00861x_1x_2 \quad 3.4$$

เมื่อ Y_2 คือ ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g agarwood) จากการสกัดด้วยน้ำ

Y_3 คือ ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g agarwood) จากการสกัดด้วยเอทานอล

Y_4 คือ ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g agarwood) จากการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

x_1 คือ อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส)

x_2 คือ เวลาในการสกัด (วัน)

x_3 คือ ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที)

ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของแบบจำลองการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยน้ำ เอทานอล และเอทิลอะซีเตทแสดงในตารางที่ 3-6, 3-7 และ 3-8 ตามลำดับ ค่า P-value < 0.05 ทุกแบบจำลอง

ตารางที่ 3-6 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยน้ำ

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
Regression	151.44	86	30.29	10.77	0.00137
Residual	25.31	14	2.812		
Lack of fit	24.56	14 (97)	3.508	9.3595	0.09990
Pure Error	0.750	0 (3)	0.375		
Total	176.75	100			

ตารางที่ 3-7 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยเอทานอล

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
Regression	135.14	90	33.79	22.31	5.70796E-05
Residual	15.14	10	1.514		
Lack of fit	15.13	10 (100)	1.891	320.5173	0.00311
Pure Error	0.01180	0 (0)	0.00590		
Total	150.29	100			

ตารางที่ 3-8 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยเอทิลอะซีเตท

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
Regression	13.11	98	1.872	56.77	1.229E-05
Residual	0.231	2	0.03298		
Lack of fit	0.203	2 (88)	0.04057	2.8948	0.276
Pure Error	0.02803	0 (12)	0.01401		
Total	13.34	100			

จากสมการ 3.2-3.4 จะเห็นว่าตัวแปรทั้งสาม คือ อุณหภูมิ เวลา และความเร็วรอบมีผลต่อการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยตัวทำละลายทั้งสามชนิด สภาวะที่เหมาะสมจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์และสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองจริงของการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ แสดงในตารางที่ 3-9, 3-10 และ 3-11 การเพิ่มอุณหภูมิทำให้ได้ปริมาณฟลาโวนอยด์มากขึ้น จากแบบจำลองอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับทุกตัวทำละลาย เวลา 1 วัน เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยน้ำและเอทานอล ในขณะที่เวลา 2.3 วันเหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ความเร็วรอบที่เหมาะสมมีความแตกต่างกันในระหว่างตัวทำละลาย การสกัดด้วยน้ำไม่ควรมีการเขย่า การสกัดด้วยเอทานอลควรเขย่าด้วยความเร็วสูงสุด ในขณะที่การสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทควรใช้ความเร็วค่ากลาง เมื่อพิจารณาสภาวะจากการทดลองจริง การสกัดด้วยน้ำตามสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดฟีนอลิกส์ คือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 1 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที น่าจะเหมาะสมสำหรับการสกัดฟลาโวนอยด์เช่นกัน ส่วนการสกัดด้วยเอทานอล สภาวะจากการทดลองจริงใกล้เคียงกับสภาวะจากแบบจำลอง แต่เวลาสกัดเป็น 2 วัน เนื่องจากในการทดลองจริงไม่ได้ดำเนินการสกัดตามสภาวะของแบบจำลอง ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยเอทานอลจะใช้ตามสภาวะการทดลองจริง คืออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 2 วัน และความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที สำหรับการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองจริงใกล้เคียงกับสภาวะจากแบบจำลอง ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมจะใช้ตามการทดลองจริงคือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 3 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที สอดคล้องกับ Sathishkumar และคณะ [74] ศึกษาการสกัดฟลาโวนอยด์จากใบของ *Tabernaemontana heyneana* Wall. ด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิจาก 55 เป็น 85 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น แต่ฟลาโวนอยด์อาจถูกทำให้สลายตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส [75] และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Settharaksa และคณะ [76] ที่ทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากเครื่องแกง พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัด จะทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณฟีนอลิกส์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลง เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจะถูกทำลายได้ง่ายเมื่อได้รับความร้อนเป็นเวลานาน โดยที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณฟลาโวนอยด์น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-9 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยน้ำ

	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาสกัด (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g agarwood)
สภาวะที่เหมาะสมจากแบบจำลอง	80	1	0	17.20 (Predicted)
สภาวะจากการทดลอง	80	1	80	15.41 (Actual)
สภาวะที่ได้จากการคำนวณ	80	1	80	14.61 (Calculated)

ตารางที่ 3-10 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยเอทานอล

	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาสกัด (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g agarwood)
สภาวะที่เหมาะสมจากแบบจำลอง	80	1	160	11.96 (Predicted)
สภาวะจากการทดลอง	80	2	160	13.24 (Actual)
สภาวะที่ได้จากการคำนวณ	80	2	160	11.18 (Calculated)

ตารางที่ 3-11 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยเอทิลอะซีเตท

	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาสกัด (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g agarwood)
สภาวะที่เหมาะสมจากแบบจำลอง	80	2.3	86	3.57 (Predicted)
สภาวะจากการทดลอง	80	3	80	3.34 (Actual)
สภาวะที่ได้จากการคำนวณ	80	3	80	3.24 (Calculated)

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสามารถแบ่งเป็น 4 ชนิด ได้แก่ กรดฟีนอลิกส์ (Gallic protochatechuic, Caffeic และ Rosmarinic acid) ฟีนอลิกส์ไดเทอร์พีน (Carnosol และ Carnosic acid) ฟลาโวนอยด์ (Quercetin และ Catechin) และน้ำมันหอมระเหย (Eugenol, Carvacrol, Thymol, และ Menthol) [77] การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay จะรายงานผลอยู่ในค่าของ IC_{50} โดยค่า IC_{50} ยิ่งต่ำจะยิ่งดี เนื่องจากค่า IC_{50} ต่ำหมายการใช้ปริมาณสารสกัดเพียงเล็กน้อยก็สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ จากการวิเคราะห์ค่า IC_{50} เทียบกับ GAE (mg/ml) ของสารสกัดแต่ละชนิดพบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 20-58 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 19-44 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 23-56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การสกัดด้วยซอกห์เลตพบว่าสารที่สกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซีเตทมีค่าใกล้เคียงกันคือ 57 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารที่สกัดด้วยน้ำมีค่า IC_{50} เท่ากับ 38 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3-12 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Nik Wil และคณะ [60] ที่สกัดสารจากใบกฤษณาสายพันธุ์ *A. malaccensis* ด้วยน้ำพบว่ามีค่า IC_{50} ของสารสกัดเท่ากับ 109.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากงานวิจัยของ Zhou และคณะ [46] ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *A. sinensis*

ด้วยเอทานอลได้ค่า IC_{50} สูงถึง 80.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นั่นคือสารสกัดจากการทดลองนี้ด้วยน้ำและเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่างานวิจัยดังกล่าว จากผลการสกัดแบบซอกห์เลต สารสกัดจากน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด สารสกัดจากเอทานอลและเอทิลอะซีเตทมีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 3-12 ค่า IC_{50} ของสารสกัดแต่ละสภาวะ

การทดลองที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาสกัด (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	IC_{50}* (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
				น้ำ	เอทานอล	เอทิลอะซิเตท
1	30	1	80	47±0.001	36±0.002	34±0.002
2	30	2	0	32±0.001	43±0.002	33±0.001
3	30	2	160	58±0.001	25±0.002	41±0.001
4	30	3	80	34±0.003	44±0.002	43±0.001
5	55	1	0	30±0.003	29±0.0022	46±0.001
6	55	1	160	39±0.001	34±0.002	31±0.002
7	55	2	80	32±0.002	39±0.002	56±0.0006
8	55	2	80	34±0.001	41±0.002	55±0.002
9	55	2	80	33±0.002	38±0.003	56±0.001
10	55	3	0	44±0.002	39±0.002	50±0.002
11	55	3	160	20±0.002	39±0.002	38±0.001
12	80	1	80	20±0.004	28±0.002	32±0.001
13	80	2	0	24±0.001	29±0.003	39±0.001
14	80	2	160	56±0.002	19±0.0001	28±0.002
15	80	3	80	47±0.002	25±0.002	23±0.001
การสกัดแบบซอกห์เลต 4 ชั่วโมง				38±0.003	57±0.001	56±0.002

*ค่า IC_{50} เกิดจากการพล็อตกราฟระหว่าง %Inhibition เทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดหรือสารละลายมาตรฐานโดยใช้ 5 ความเข้มข้นคือ 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม RSM พบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลมีค่า R^2 เท่ากับ 0.46 และ 0.54 ตามลำดับ จึงไม่สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมจากโปรแกรม RSM ได้ แต่จากการพิจารณาผลการทดลองพบว่าการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 1 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่สกัดฟีนอลิกส์และฟลาโวนอยด์ได้ปริมาณมากเป็นสภาวะที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำ และการสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 2 วัน และความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที ซึ่งเป็นสภาวะจากการทดลองจริงที่สามารถสกัดฟลาโวนอยด์ได้ปริมาณมากเป็นสภาวะที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำ ส่วนสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีค่า R^2 เท่ากับ 0.92 และค่า

R^2adjust เท่ากับ 0.82 บ่งบอกความน่าเชื่อถือของแบบจำลอง โดยมีสมการผลของความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ ต่อค่า IC_{50} ดังสมการที่ 3.5

$$Y_5 = -0.07440 + 0.00293x_1 + 0.04461x_2 + 0.000236x_3 - 2.29333E^{-5}x_1^2 - 0.00833x_2^2 - 9.50521E^{-7}x_3^2 - 0.000180x_1x_2 - 0.000002375x_1x_3 \quad 3.5$$

เมื่อ Y_5 คือ IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
x_1 คือ อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส)
x_2 คือ เวลาในการสกัด (วัน)
x_3 คือ ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที)

จากตารางที่ 3-13 ค่า P-value < 0.05 นอกจากนี้ตัวแปรอุณหภูมิ เวลา และความเร็วรอบในการเขย่า มีค่า P-value เท่ากับ 0.00068, 0.000555 และ 0.03401 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าทุกตัวแปรมีอิทธิพลต่อค่า IC_{50} และจากตารางที่ 3-14 สภาวะที่เหมาะสมจากโปรแกรม RSM คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 1 วัน และความเร็วรอบ 0 รอบ/นาที ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองมาก แต่สภาวะในการสกัดแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยสภาวะจากการทดลองที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 3 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที ซึ่งสอดคล้องกับสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์ ดังนั้นสภาวะจากการทดลองจริงน่าจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมมากกว่า

ตารางที่ 3-13 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ของค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
Regression	0.00143	92	0.000179	9.084	0.00744
Residual	0.000118	8	1.96944E-05		
Lack of fit	0.000118	8 (99)	0.000029375	88.1250	0.01125
Pure Error	6.66667E-07	0 (1)	3.33333E-07		
Total	0.00155	100			

ตารางที่ 3-14 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดที่ได้ค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทต่ำที่สุดโดยเปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่โปรแกรมทำนายกับสภาวะที่ทดลองจริง

สภาวะ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาสกัด (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	IC50 (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
สภาวะที่เหมาะสมจากแบบจำลอง	30	1	0	24 (Predicted)
สภาวะจากการทดลอง	80	3	80	23 (Actual)
สภาวะที่ได้จากการคำนวณ	80	3	80	26 (Calculated)

3.5 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากชากฤษณา

เทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปคโตรมิเตอร์มีจุดเด่นที่ความสามารถในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณที่ต้องการความแม่นยำ โดยองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจะถูกแยกออกมาในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งเวลาที่สารแยกออกมานั้นสามารถบอกชนิดของสารได้โดยเทียบกับค่ารีเทนชันไทม์ (Retention time: RT) และ แมสสเปคตรัม (Mass spectrum) และนำผลการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (Library) เพื่อความถูกต้องได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารมาตรฐาน โดยฐานข้อมูลที่ใช้ในการทดลองนี้คือ Wiley 9^{th} โดยที่ค่าดัชนีความเหมือน (Similarity index: SI) ที่ยอมรับควรมากกว่าหรือเท่ากับ 900

พิจารณาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากชากฤษณาแต่ละตัวทำละลายพบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีสารที่สำคัญและมีฤทธิ์ทางชีวภาพคือ 2,3-Butanediol, Eucalyptin, 4H-1-Benzopyran-4-one, Pentacosane, Taraxerone และ Lup-20(29)-en-3-one แสดงในตารางที่ 3-15 เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดแบบซอกห์เลตซึ่งมีสารที่เหมือนกันหนึ่งตัวคือ 2,3-Butanediol ส่วนสารสกัดด้วยเอทานอลมีสารที่สำคัญและมีฤทธิ์ทางชีวภาพคือ 2,3-Butanediol, Neophytadiene, 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl, Stigmast-5-en-3-ol, D:A-Friedooleanan-3-one และ Friedelanol แสดงในตารางที่ 3-16 เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยซอกห์เลตพบว่าสารสำคัญได้แก่ Cyclotetradecan, Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl), 1-Hexadecene, Neophytadiene, 2-Hexadecen-1-ol และ 3,7,11,15-Tetramethyl ซึ่งการสกัดทั้งสองวิธีมีสารที่เหมือนกันคือ 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-Tetramethyl และสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีสารที่สำคัญและมีฤทธิ์ทางชีวภาพคือ 1-Tridecanol, Phenol, 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl), 1-Hexadecene, Neophytadiene, Hexadecanoic acid methyl ester, Hexadecanoic acid, 9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-Tetramethyl, Octadecanoic acid, Celidoniol deoxy, Stigmast-5-en-3-ol, D:A-Friedooleanan-3-one และ Friedelanol แสดงในตารางที่ 3-17 เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยซอกห์เลตพบว่าสารสำคัญได้แก่ Cyclotetradecane, Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl), 1-Hexadecene, 1-Octadecene, Neophytadiene, 2-Pentadecanone, 6,10,14-Trimeth, 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione, 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-

Tetramethyl, และ Celidoniol deoxy ซึ่งการสกัดทั้งสองวิธีมีสารที่เหมือนกันคือ Phenol,2,4-bis(1,1-dimethylethyl), 1-Hexadecene, Neophytadiene, และ Celidoniol deoxy

สารสกัดจากชากฤษณาด้วยเอทิลอะซิเตทพบองค์ประกอบทางเคมีจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS มากที่สุด รองลงมาคือตัวทำละลายเอทานอล และน้ำน้อยที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์ GC-MS ที่ใช้เป็นการวิเคราะห์สำหรับตรวจค้นสารประกอบทั่วไป ไม่ได้เฉพาะเจาะจงว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 3-15 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS

Soxhlet extraction (H_2O)				**Maceration extraction (H_2O)**			
SI	RT	Area (%)	Compound	SI	RT	Area (%)	Compound
797	4.21	3.93	2,3-Butanediol	908	4.65	1.56	2,3-Butanediol
658	45.82	3.08	(-)-Loliolide	760	59.42	12.00	Eucalyptin, 4H-1-Benzopyran-4-one
575	46.28	2.16	Bis(cyclohex-3-enylmethyl)amine	870	73.24	27.78	Pentacosane
545	67.11	1.94	Stigmast-5-en-3-ol	769	75.54	1.65	Taraxerone
				763	75.97	1.87	Lup-20(29)-en-3-one

ตารางที่ 3-16 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS

Soxhlet extraction (Ethanol)				**Maceration extraction (Ethanol)**			
SI	**RT**	**Area (%)**	**Compound**	**SI**	**RT**	**Area (%)**	**Compound**
896	4.07	3.10	2,3-Butanediol	924	4.04	0.36	2,3-Butanediol
915	30.42	3.80	Cyclotetradecan	912	47.29	0.44	Neophytadiene
936	35.52	8.58	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	892	51.90	1.12	Hexadecanoic acid
882	36.57	1.74	Dihydroactinidiolide	890	52.62	1.11	Hexadecanoic acid ethyl ester

ตารางที่ 3-16 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS (ต่อ)

Soxhlet extraction (Ethanol)				Maceration extraction (Ethanol)			
SI	RT	Area (%)	Compound	SI	RT	Area (%)	Compound
867	37.84	2.08	Dodecanoic acid	930	56.14	0.79	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl
938	38.53	5.69	1-Hexadecene	809	57.86	0.78	9-Octadecenoic acid (Z)-ethyl ester
822	45.83	7.87	1-Octadecene	901	72.77	5.75	Stigmast-5-en-3-ol
764	46.25	1.26	2-Cyclohexen-1-one, 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)	850	74.44	2.42	Olean-12-en-3-ol
901	47.26	2.85	Neophytadiene	880	75.04	3.94	Triacontane
874	47.58	1.79	2-Pentadecanone, 6,10,14-Trimethyl	768	80.75	1.75	Stigmast-5-en-3-ol, Oleate
887	51.86	6.81	Hexadecanoic acid	873	82.77	12.13	Friedelanol
815	52.59	10.76	Hexadecanoic acid, Ethyl ester	912	83.37	14.39	D:A-Friedooleanan-3-one
925	56.11	7.41	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-Tetramethyl	922	84.78	2.69	Stigmast-5-en-3-ol
826	57.84	4.81	9-Octadecenoic acid (Z)-ethyl ester	716	85.11	2.44	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-Tetramethyl
878	58.63	2.64	Octadecanoic acid, Ethyl ester	824	85.43	2.42	Olean-12-en-3-ol
785	63.00	1.47	4,8,12-Trimethyltridecan-4-olide	854	88.43	2.61	Friedelanol

ตารางที่ 3-17 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS

Soxhlet extraction (EA)				Maceration extraction (EA)			
SI	**RT**	**Area (%)**	**Compound**	**SI**	**RT**	**Area (%)**	**Compound**
930	30.44	6.20	Cyclotetradecane	923	30.43	0.64	1-Tridecanol
942	35.36	11.21	Phenol, 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)	940	35.54	1.69	Phenol, 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)
945	38.56	8.47	1-Hexadecene	937	38.54	0.85	1-Hexadecene
711	41.71	3.04	2,6-Di-tert-butyl-4-nitrophenol	868	45.85	1.14	1-Octadecene
829	42.49	1.06	Acrylic acid, Tetradecanyl ester	916	47.28	1.08	Neophytadiene
925	45.86	8.69	1-Octadecene	898	47.59	0.50	2-Pentadecanone, 6,10,14-Trimethyl
922	47.27	1.97	Neophytadiene	928	50.47	6.65	Hexadecanoic acid methyl ester
907	47.59	1.62	2-Pentadecanone, 6,10,14-Trimeth	903	51.98	2.47	Hexadecanoic acid
908	49.87	1.25	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione	914	55.88	1.68	9-Octadecenoic acid (Z)-, Methyl ester
897	52.04	10.69	Hexadecanoic acid	920	56.13	1.45	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl
901	52.49	8.68	1-Octadecene	925	56.70	0.82	Octadecanoic acid methyl ester
928	56.14	3.03	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl	757	66.45	2.85	9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester

ตารางที่ 3-17 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS (ต่อ)

Soxhlet extraction (EA)				Maceration extraction (EA)			
SI	RT	SI	RT	SI	RT	SI	RT
886	58.56	6.69	1-Eicosanol	874	67.55	1.19	Hexadecanoic acid, 2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester
847	64.13	2.29	Cyclotetracosane	897	76.53	0.70	Celidoniol deoxy
922	76.54	1.81	Celidoniol deoxy	777	78.23	2.27	Eucalyptin, 4H-1-Benzopyran-4-one
				922	81.03	3.43	Celidoniol deoxy
				862	83.78	4.04	Stigmasta-5, 22-dien-3-ol
				914	84.78	7.04	Stigmast-5-en-3-ol
				880	85.43	3.27	Olean-12-en-3-ol
				825	85.74	2.66	Lup-20(29)-en-3-one
				769	86.27	2.38	4,4,6A,6B,8A,11,11, 14B-Octamethyl-1,4,4A,5,6,6A,6B,7,8, 8A,9,10,11,12,12A,14,14A
				874	88.47	14.05	Friedelanol

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ในทุกตัวทำละลาย เพื่อตรวจหาสารประกอบเบื้องต้นพบว่า องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดประกอบด้วยสารที่มีฤทธิ์แตกต่างกันหลายชนิด เช่น 2,3-Butanediol เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีและเครื่องสำอางต่างๆ โดยเป็นสารประกอบแอลกอฮอล์กลิ่นคล้ายเนยหรือครีม [78] Eucalyptin มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย [79] Pentacosane เป็นสารจำพวกโวลาไทล์ออยล์ (Volatile oil) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [80] [81] Taraxerone เป็นสารจำพวกไตรเทอร์ปีนอยส์มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย [82] 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-Tetramethyl หรือ Phytol เป็นสารจำพวกน้ำมันหอมระเหย มีฤทธิ์กระตุ้นประสาทและทำให้ความอยากอาหารลดลง [83] สามารถป้องกันโรคเบาหวานได้ [84] Lup-20(29)-en-3-one หรือ Lupeol เป็นสารจำพวกไตรเทอร์ปีนอยด์เช่นเดียวกัน ซึ่งสาร Lupeol เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ในผักและผลไม้ มีฤทธิ์ในการต้านการ

อักเสบและต้านมะเร็ง [63] เป็นสารป้องกันการก่อมะเร็ง และยังต้านเชื้อแบคทีเรียและโปรโตซัวอีกด้วย [85] Hexadecanoic acid หรือ Palmitic acid เป็นกรดไขมันที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสบู่และเครื่องสำอาง และหากรับประทานเข้าไปในปริมาณมากอาจจะเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด [86] โดยงานวิจัยของ Raman V และคณะ [87] สกัดต้นสาปเสือด้วยน้ำและเมทานอลแล้วนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนมูลอิสระและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS พบว่า สาร Neophytadiene มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและต้านการอักเสบ ส่วน 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-Tetramethyl และ Stigmasterol มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในสารสกัดที่มีค่า IC_{50} ที่ดีที่สุด

มีการนำสารจากกฤษณาใช้เป็นยารักษาโรคมากกว่าสองพันปีมาแล้ว จากการศึกษาของ Yagura และคณะ [88] พบว่าสารกฤษณามีฤทธิ์ต้านมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ สามารถเป็นยาแก้ปวดและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ [89] อีกทั้งยังสามารถป้องกันภาวะซึมเศร้าได้อีกด้วย [24] เอนโดนไฟต์ (Endophytes) จากต้นกฤษณาอาจจะเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยยาต้านจุลชีพและกลไกการต้านเชื้อ

3.6.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar dilution method

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปากด้วยวิธี Agar dilution method ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3-18 โดยใช้คลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตเป็นตัวยาทดสอบ ซึ่งโซนยับยั้งที่ได้จะนำมาลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของถ้วยทรงกระบอกซึ่งมีขนาด 6 มิลลิเมตร พบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. gingivalis* โดยมีโซนยับยั้งเท่ากับ 12 มิลลิเมตร ซึ่งน้อยกว่าตัวยาที่ใช้ในการเปรียบเทียบถึงสองเท่า ส่วนสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทสามารถต้านเชื้อ *S. mutan* ได้โดยมีโซนยับยั้งเท่ากับ 8.9 มิลลิเมตร ซึ่งน้อยกว่าโซนยับยั้งของตัวยาถึงห้าเท่า สารสกัดทั้งสองออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำกว่าตัวยาอยู่มาก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย อาจจะต้องนำสารสกัดจากชากฤษณาไปผ่านการอบฆ่าเชื้อภายใต้ความดันสูงก่อนนำไปทดสอบ [90] เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ ปานตา ตรีสุวรรณและคณะ [91] ที่ศึกษาเรื่องผลของสารสกัดโพลีฟีนอลจากเปลือกมังคุดต่อการยับยั้งเชื้อ *S. mutan* ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า มีโซนยับยั้ง 9.53 มิลลิเมตร ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดจากชากฤษณา ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลและสารที่สกัดด้วยวิธีซอกห์เลตไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อทุกตัวที่ใช้ในการทดสอบนี้

ตารางที่ 3-18 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Agar dilution method

Samples	Inhibition zone (mm)		
	S. mutan	*S. salivarius*	*P. gingivalis*
DI-water (#marceration)	0	0	12
DI-water (#soxhlet)	0	0	0
Ethanol (#marceration)	0	0	0
Ethanol (#soxhlet)	0	0	0
Ethyl acetate (#marceration)	8.9	0	0
Ethyl acetate (#soxhlet)	0	0	0
1% Chlorhexidine solution (300 µl)	39	27	-
1% Chlorhexidine solution (100 µl)	0	0	-
0.2% Chlorhexidine solution (300 µl)	-	-	30
0.2% Chlorhexidine solution (100 µl)	-	-	26
5% DMSO	0	0	0
Sterile water	0	0	0

จากตารางที่ 3-18 พบว่าสารที่สกัดด้วยเอทานอลและสารที่สกัดด้วยวิธีซอกห์เลตไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อทุกตัวที่ใช้ในการทดสอบนี้ เนื่องจากสารละลายเอทานอลอาจจะไม่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปากได้ แต่อาจจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ได้นำมาใช้ในการทดสอบนี้ ส่วนวิธีการสกัดแบบซอกห์เลตไม่สามารถยับยั้งได้ในทุกตัวทำละลาย อาจมีสาเหตุมาจากวิธีการสกัดที่ให้ความร้อนเท่ากับจุดเดือดของตัวทำละลายชนิดนั้นๆ สารละลายที่ผ่านการควบแน่นทำให้อุณหภูมิลดลงก่อนจะหยดลงมาอยู่ในซอกห์เลต ใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่าวิธีการสกัดแบบเขย่า และไม่มีการเขย่า สารสกัดที่ได้จึงไม่มีสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.6.2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration: MIC) และทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

ตารางที่ 3-19 แสดงสารสกัดชากฤษณาที่สกัดด้วยน้ำ พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *P. gingivalis* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) อยู่ที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) เท่ากับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย นั่นก็คือ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกัน โดยใช้เมโทรนิดาโซลที่ความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น Positive control

สำหรับสารสกัดชากฤษณาที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) อยู่ที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) เท่ากับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และเท่ากับค่าทั้งสองข้างต้นของสารสกัดชากฤษณาที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัด โดยใช้แวนโคมัยซินที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น Positive control

ตารางที่ 3-19 แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดชากฤษณาที่ใช้น้ำและเอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย

Sample	MIC (mg/ml)		MBC (mg/ml)	
	S. mutans	*P. gingivalis*	*S. mutans*	*P. gingivalis*
DI-water (#12)	-	0.25	-	0.25
Ethyl acetate (#37)	0.25	-	0.25	-
Vancomycin	0.32×10^{-3}	-	0.28×10^{-3}	-
Metronidazole	-	0.38×10^{-3}	-	0.33×10^{-3}

ค่า MIC และ ค่า MBC ที่เท่ากันของสารสกัดทั้งสองแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของสารสกัดจากชากฤษณาฆ่าเชื้อได้ดีแม้สารจะมีความเข้มข้นต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะเมโทรนิดาโซลและแวนโคมัยซินพบว่า มีค่า MIC และ MBC ต่ำกว่าของสารสกัด แสดงว่าสารสกัดจากชากฤษณามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่ำกว่ายาปฏิชีวนะ ปานตาและคณะ [87] นำสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเอทานอลมาหาค่า MIC ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.mutans* สายพันธุ์ ATCC 25175 พบว่า มีค่า MIC เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับผลการทดลองข้างต้น แต่มีค่า MBC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าค่า MIC ส่วนการทดสอบเชื้อ *P.gingivalis* พบว่างานวิจัยของ Waranyoo และคณะ [92] มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P.gingivalis* ที่ดีกว่าฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดจากชากฤษณา โดยในงานวิจัยจะแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อของสารออกซีเรสเวอราทรอล (Oxyresveratrol) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *P.gingivalis* พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 0.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC เท่ากับ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 4
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 บทสรุป

4.1.1 ผลได้จากการสกัด

ศึกษาการสกัดสารจากชากฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria subintegra* โดยปัจจัยที่ศึกษาคือ ตัวทำละลาย (น้ำ เอทานอล และเอทิลอะซิเตท) อุณหภูมิ (30, 55 และ 80 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาการสกัด (1, 2 และ 3 วัน) และความเร็วรอบในการเขย่า (0, 80 และ 160 รอบ/นาที) ด้วยการสกัดแบบเขย่า โดยใช้โปรแกรม RSM ในการออกแบบการทดลอง และเปรียบเทียบกับการสกัดแบบซอกห์เลต พบว่าการสกัดแบบซอกห์เลตเป็นเวลา 4 ชั่วโมงให้ผลได้การสกัดต่ำกว่าการสกัดแบบเขย่าที่สภาวะที่เหมาะสมด้วยตัวทำละลายทุกชนิดเนื่องจากการใช้เวลาสกัดน้อยกว่ามาก น้ำซึ่งมีความเป็นขั้วสูงสุดเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด นั่นคือสารที่สกัดได้จากชากฤษณาน่าจะประกอบด้วยสารที่มีขั้วในปริมาณที่สูงกว่าสารไม่มีขั้ว สภาวะการสกัดด้วยน้ำที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และใช้ความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที สภาวะการสกัดด้วยเอทานอลที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 3 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที และสภาวะการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 2 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที ความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมมีค่าเท่ากันสำหรับการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสาม อุณหภูมิที่เหมาะสมของน้ำและเอทานอลมีค่าเท่ากันคือ 80 องศาเซลเซียสในขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอทิลอะซิเตทมีค่าต่ำกว่า เวลาการสกัดที่เหมาะสมของทั้งสามตัวทำละลายมีความแตกต่างกัน

4.1.2 การสกัดฟีนอลิกส์

ฟีนอลิกส์เป็นหนึ่งในสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดของสารสกัดมีค่าอยู่ในช่วง 0.47-29.80 mg GAE/g agarwood โดยวิธีการสกัดแบบเขย่าให้ผลดีกว่าการสกัดแบบซอกห์เลต ประสิทธิภาพการสกัดของตัวทำละลายเรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ น้ำ > เอทานอล > เอทิลอะซิเตท การสกัดฟีนอลิกส์ด้วยตัวทำละลายทั้งสามชนิดมีสภาวะที่เหมาะสมสอดคล้องกันคือที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 วัน และความเร็วรอบในการเขย่า 80 รอบ/นาที

4.1.3 การสกัดฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดมีค่าอยู่ในช่วง 0.57-15.66 mg QE/g agarwood โดยน้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดฟลาโวนอยด์เช่นเดียวกับการสกัดฟีนอลิกส์ สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยน้ำ คือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 1 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที เหมือนกับการสกัดฟีนอลิกส์ สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยเอทานอล คืออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 2 วัน และความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที และสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยเอทิลอะซิเตท คือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 3 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที ดังนั้นอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมสำหรับตัวทำละลายทั้งสาม เวลาการสกัดที่เหมาะสมมี

ความแตกต่างกันระหว่างตัวทำละลายทั้งสาม การสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทควรใช้เวลานานที่สุด ความเร็วรอบของการสกัดด้วยน้ำและเอทิลอะซิเตทมีค่าเท่ากันคือ 80 รอบ/นาที ส่วนการสกัดด้วยเอทานอลควรใช้ความเร็วรอบที่สูงขึ้น

4.1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 1 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่สกัดฟีนอลิกส์และฟลาโวนอยด์ได้ปริมาณมากเป็นสภาวะที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง การสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 2 วัน และความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่สกัดฟลาโวนอยด์ได้ปริมาณมากเป็นสภาวะที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทที่สกัดฟลาโวนอยด์ได้ปริมาณมาก คือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 3 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงใกล้เคียงกัน ส่วนสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า

4.1.5 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด

สารประกอบที่ตรวจพบในสารสกัดชากฤษณาที่ใช้ตัวทำละลายทั้งสามชนิดส่วนใหญ่จะเป็นสารจำพวกเทอร์ปีนอยส์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่พบมากในส่วนต่างๆ ของพืช โดยสารบางตัวจะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบได้ทั้งในสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายทั้งสามชนิด โดยเฉพาะในสารสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ได้แก่ Pentacosane, 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl และ Lup-20(29)-en-3-one ส่วนสารที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการอักเสบ ได้แก่ Eucalyptin, Pentacosane, Taraxerone, Lup-20(29)-en-3-one, Neophytadiene และ Friedelanol จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะพบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำให้ผลดีที่สุด ซึ่งมีสาร Pentacosane เป็นสารประกอบหลัก สำหรับฤทธิ์ในการต้านเชื้อจะพบในสารสกัดจากน้ำและเอทิลอะซิเตท ซึ่งในสารสกัดของเอทิลอะซิเตทมีสาร Friedelanol เป็นองค์ประกอบหลัก

4.1.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

สารที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. gingivalis* สารที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทสามารถต้านเชื้อ *S. mutan* ได้ ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลและสารที่สกัดแบบซอกห์เลตไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปากทุกตัวที่ใช้ในการทดสอบนี้ จากนั้นนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อข้างต้นมาทดสอบค่า MIC และ MBC พบว่าสารสกัดทั้งสองมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากัน แสดงว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดก็สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้โดยใช้สารสกัดปริมาณน้อย ดังนั้นควรมีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากน้ำและเอทิลอะซิเตทด้วยวิธีแบบเขย่าเพิ่มเติม

4.1.7 สภาวะการสกัดที่เหมาะสม

พบว่าสภาวะการสกัดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลได้สารสกัด ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ของตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเอทิลอะซิเตท มีความสอดคล้องและแตกต่างกันอยู่บ้าง ถ้าพิจารณาในภาพรวม น้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด โดยมีสภาวะที่เหมาะสมคืออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 1 วัน และความเร็วรอบ 80

รอบ/นาที สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยเอทานอล คือที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 2 วัน และความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที และสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทคือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 3 วัน และความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที

4.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากชากฤษณาด้วยน้ำเพิ่มเติม โดยเพิ่มปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด เช่น เพิ่มอุณหภูมิการสกัด และลดระยะเวลาการสกัด เป็นต้น

2. ควรศึกษาวิจัยต่อยอดในเรื่องของการแยกสารให้บริสุทธิ์และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากชากฤษณาที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

3. ควรศึกษาวิจัยต่อยอดในเรื่องของการแยกสารให้บริสุทธิ์และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากชากฤษณาที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

4. เพิ่มวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) และวิธี Liquid chromatograph mass spectrometer (LCMS) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ marker และ metabolite profile ของสารสกัดที่ได้จากชากฤษณา

บรรณานุกรม

[1] Ahmad.I and Beg.A.I, “Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multidrug resistant human pathogens”, Journal of Ethnopharmacology, vol. 74, pp. 113-123, 2001.

[2] สำนักงานเกษตรอำเภอ, (2556), “สถิติทางการขึ้นทะเบียนเกษตรกร”, สืบค้นจาก http://www.doae.go.th/stat_farmer/stat.html, (18/04/2558).

[3] Homhual S, “กฤษณา สรรพคุณและประโยชน์ของไม้กฤษณา 75 ข้อ”, สืบค้นจาก http://frynn.com/%E0%B9%84%E0%B8%A1%E0%B9%89%E0%B8%81%E0%B8%A4%E0%B8%A9%E0%B8%93%E0%B8%B2/#, (18/04/2558)

[4] Dash M., Jayanta K.P. and Prasanna P.P, “Phytochemical and antimicrobial screening of extracts of *Aquilaria agallocha* Roxb.”, African Journal of Biotechnology, vol. 7, pp. 3531-3534, 2008.

[5] Huda A.W.N., Munira M.A.S., Fitrya S.D. and Salmah M., “Antioxidant activity of *Aquilaria malaccensis (thymelaeaceae)* leaves”, Pharmacognosy Research, vol. 1, pp. 270-273, 2009.

[6] เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม, "อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา," วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์, vol. 1, pp. 59-70, 2554.

[7] Forestry, Agarwood asset sustainable, (2014), “Media”, สืบค้นจาก http://agarwoodasset.com/media/, (11/02/2558)

[8] Tem Smitinand, “Thai plant names”, Royal forest department, 2001.

[9] องอาจ คล้ามไพบูลย์, "กฤษณาไม้หอม ไม้มหาเศรษฐี", สำนักพิมพ์สนิทใจ, กรุงเทพฯ, 2546.

[10] ณัฐวัฒน์ คลังทรัพย์, "ผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการเติบโตและผลผลิตของสวนป่าไม้กฤษณา", สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2550.

[11] กระทรวงสาธารณะสุข สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, "ข้อมูลวิชาการ เรื่อง กฤษณา", กลุ่มคุ้มครองภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทยและสมุนไพร สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณะสุข, กรุงเทพฯ, 2551.

[12] สุทธิสินธุ์ อัครพลโชติ, "สุดยอดนวัตกรรมแห่งภูมิปัญญาไทย ชากฤษณา ชาอัจฉริยะ", เฟิร์สนิวส์แอนมีเดียกรุ๊ป, กรุงเทพฯ, 2008.

[13] สมพร คงภักดี, "ชากฤษณา", วิสาหกิจชุมชนแปรรูปไม้กฤษณาไทยรุ่งการเกษตร-ศรีวิชัย (สะเดา), 2556.

[14] Tay P.Y., Tan C.P., Abas F., Yim H.S. and Ho C.W., “Assessment of extraction parameters on antioxidant capacity, polyphenol content, epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG) and iriflophenone 3-C-β-glucoside of

Agarwood (*Aquilaria crassna*) young leaves", Molecules, vol. 19, pp. 12304-12319, 2014.

[15] Kakino M., Sugiyama T., Kunieda H., Tazawa S., Maruyama H., Tsuruma K., Araki Y., Shimazawa M., Ichihara K., Mori H. and Hara, H., "Agarwood (*Aquilaria crassna*) extracts decrease high-protein high-fat diet-induced intestinal putrefaction toxins in mice", Pharmaceutica Analytica Acta, vol. 3, pp. 1-7, 2012.

[16] Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G. and Kaur H., "Phytochemical screening and Extraction: A Review", Internationale Pharmaceutica Sciencia, vol 1(1), pp. 98-106, 2011.

[17] Cowan M.M., "Plant products as antimicrobial agents", Clinical microbiology reviews, American Society for Microbiology, Department of Microbiology, Miami University, pp. 564–582, 1999.

[18] นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, "เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ", แสงเทียนการพิมพ์, กรุงเทพฯ, 2544.

[19] Khalil AS., Rahim AA., Taha KK. and Abdallah, KB., "Characterization of methanolic extracts of agarwood leaves", Journal of Applied and Industrial Sciences, vol. 1(3), pp. 78-88, 2013.

[20] Noguchi N. and Niki E., "Chemistry of Active Oxygen Spcies and Antioxidants", Antioxidant status, diet, nutrition, and health, American Fisheries Society, pp. 3-20, 1998.

[21] เสก อักษรานุเคราะห์, "อนุมูลอิสระจากการออกกำลังกาย", จุฬาลงกรณ์เวชสาร, vol. 47(3), pp. 139-148, 2546.

[22] Thompson J., Manore M. and Vaughan L., "The science nutrition", Benjamin Cummings, 2005.

[23] Fereidoon S., "Antioxidants in food and food antioxidants", nahrung 44, vol.3, pp. 158-163, 2000.

[24] Brewer M.S., "Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications," Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, vol. 10, pp. 221-247, 2011.

[25] Muchuweti M., Kativu E., Mupure C.H, Chidewe C., Ndhlala A.R. and Benhura M.A.N., "Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Some Spices", American Journal of Food Technology, vol. 2, pp. 414-420, 2007.

[26] Raul N.C.J., Lucinewton S.M., Paulo R. and Meireles M.A.A., "Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global

yield, composition, and antioxidant activity", The Journal of Supercritical Fluids, vol. 35(3), pp. 197-204, 2005.

[27] Shan B., Cai Y.Z., Sun M. and Corke H., "Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents", Journal of Agricultural and food chemistry, vol. 53(20), pp. 7749-7759, 2005.

[28] Wojdyło A., Oszmian J. and Czemerys R., "Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs", Food chemistry, vol. 105, pp. 940-949, 2007.

[29] วิภพ สุทธนะ, "ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์: กลไกการออกฤทธิ์", ศรีนครินทร์เวชสาร, vol. 3(28), pp. 567-582, 2013.

[30] Sastre J., Pallardo F.V. and Vina J., "Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis", International Union of Biochemistry and Molecular Biology, vol. 49(5), pp. 427-435, 2000.

[31] Takabe W., Niki E., Uchida K., Yamada S., Satoh K. and Noguchi N., "Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein", Carcinogenesis, vol. 22(6), pp. 935-941, 2001.

[32] Kawanishi S., Hiraku Y. and Oikawa S., "Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging", Mutation Research, vol. 488(1), pp. 65-75, 2001.

[33] Khan M.A. and Baseer A., "Increased malondialdehyde levels in coronary heart disease", Journal of Pakistan Medical Association, vol. 50, pp. 261-264, 2000.

[34] Lin J.K. and Weng M.S., "Flavonoids as Nutraceuticals", The Science of Flavonoids, Springer New York, pp. 213-238, 2006.

[35] Wang W., Heideman L., Chung C.S., Pelling J.C., Koehler K.J. and Birt D.F., "Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines", Molecular Carcinogenesis, vol. 28, pp. 102-110, 2000.

[36] Oldreive C., Zhao K., Paganga G., Halliwell B. and Rice-Evans C., "Inhibition of Nitrous Acid-Dependent Tyrosine Nitration and DNA Base Deamination by Flavonoids and Other Phenolic Compounds", American Chemical Society, vol. 11(12), pp. 1547-1579, 1998.

[37] Anderson R.F., Fisher L.J., Hara Y., Harris T., Mak W.B., Melton L.D. and Packer J.E., "Green tea catechins partially protect DNA from ·OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals", Carcinogenesis, vol. 22(8), pp. 1189-1193, 2001.

[38] พงษ์พฤกษ์, หทัยรัตน์, "ผลการยับยั้งของสารสกัดจากน้ำยางพาราต่อเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก", วิทยาศาสตร์ ชีวเคมี สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา, 2551.

[39] Houte J.V., "Role of Micro-organisms in Caries Etiology", journal of dental research, vol. 73, pp. 672-681, 1994.

[40] รวี เถียรไพศาล, "จุลชีววิทยาช่องปากพื้นฐาน (Basic Oral Microbiology)", มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ภาควิชาโอษฐวิทยา, สงขลา, 2550.

[41] Lang C., Böttner M., Holz C., Veen M., Ryser M., Reindl A., Pompejus M, and Tanzer J.M., "Specific *lactobacillus/mutans streptococcus* Co-aggregation", Journal of Dental Research, vol. 89, pp.175-179, 2010.

[42] Haraldsson G., (2005) "Oral commensal *Prevotella* species and *Fusobacterium nucleatum*: Identification and potential pathogenic role", Finland, https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/20252/oralcomm.pdf?sequence=1, (22/4/2558)

[43] Kolenbrander P.E., Andersen R.N., Bleher D.S., Egland P.G., Foster J.S. and Palmer R.J., "Communication among Oral Bacteria", Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 66(3), pp. 486-505, 2002.

[44] รวี เถียรไพศาล, "แบคทีเรียและโรคติดเชื้อที่พบบ่อยในช่องปาก", ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา, 2552.

[45] Yu Q., Qi J., Yu H.X., Chen L.L., Kou J.P., Liu S.J. and Yu, B.Y., “Qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds in the leaves of *Aquilaria sinensis* using liquid chromatography-mass spectrometry”, Phytochemical Analysis, vol. 24, pp. 349-356, 2013.

[46] Zhoua M., Wanga H., Suolangjibaa, Koua J. and Yu B., "Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria sinensis (Lour.) Gilg*. leaves extract", Journal of Ethnopharmacology, vol. 117, pp. 345-350, 2008.

[47] Feng J., Yang X.W. and Wang R.F., “Bio-assay guided isolation and identification of a-glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis”*, Phytochemistry, vol. 72, 242–247, 2011.

[48] Yoshimia N., Matsunaga K., Katayama M., Yamada Y., Kuno T., Qiao Z., Hara A., Yamahara J. and Mori H., "The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats", Cancer Letters, vol. 163(2), pp. 163-170, 2001.

[49] Ping K., Boyang Y., Jin Q., Inagaki N. and Danni Z., "Medical use of 2-O-alpha-L-rhamnose-4,6,4'-trihydroxybenzophenone", CN101439040 A, China, 2009.

[50] จุฑารัตน์ ขันทกะพันธ์ และผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์. “การสร้างชุดทดลองเพื่อตรวจสอบสารเชิงคุณภาพด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบางสำหรับการทดสอบสารประกอบฟีนอ

ลิกส์”, การประชุมวิชาการนานาชาติวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 21, หาดใหญ่ สงขลา, 10-11 พฤศจิกายน, 2554.

[51] Hashim Y.Z.H-Y., Abbas P. and Awale, R.J., “Antimicrobial activities of agarwood *A. subintegra* leaves extracts”, UMT 11th International Annual Symposium on Sustainability Science and Management, Terengganu, Malaysia, pp. 394-397, 9-11 July, 2012.

[52] Alimon H., Mohd Arriffin N., Syed Abdul Azziz S.S., Ibrahim R., Mohd Jaafar F. and Mohd Sukari M.A., “Biological activities of leaf and bark from *Aquilaria crassna Pierre (Gaharu)*”, Universiti Malaysia Terengganu 10th International Annual Symposium (UMTAS 2011), Terengganu, Malaysia, pp. 658-664, 11-13 July, 2011.

[53] Hara H., Ise Y., Morimoto N., Shimasawa M., Ichihashi K., Ohyama M. and Iinuma M., “Laxative effect of agarwood leaves and its mechanism”, Biosci. Biotechnol. Biochem, vol. 72, pp. 335-345, 2008.

[54] Jin-long C.U.I, Shun-xing G.U.O and Pei-gen X.I.A.O, "Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*", Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology), vol. 5, pp. 385-392, 2011.

[55] Emel S. and Ilhan B, "Microbiological evaluation of 0.2% chlorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontic patients", Angle Orthodontist, vol. 77, pp. 881-884, 2007.

[56] John A. Byers, (2003) “Solvent polarity chart”, Phenomenex catalog, สืบค้นจาก http://www.chemical-ecology.net/java/solvents.htm, (10/07/2558)

[57] Chemists, Association of Official Analytical, "Determination of moisture content", AOAC International, 2006.

[58] Aslı Ö, Bruce D. and Kadriye S, "Total Phenolic Acid and Total Flavonoid Content of Turkish Pine Honeydew Honey," Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 2010.

[59] Shankar D. Katekhaye, Maheshkumar S. Kale, "Antioxidant and free radical scavenging activity of *Pithecellobium dulce (Roxb.)* Benth wood bark and leaves," Free Radicals and Antioxidants vol. 2, pp. 47-57, 2012.

[60] Thermo electron corporation, “TR-5MS TRACE GC Capillary Column”, Technical Note: 20075, 2004.

[61] พรเทพ เต็มรังษี, "ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อที่แยกจากแผลติดเชื้อ", มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2554.

[62] อรนุช นาคชาติ, วรรณา เอกทอง และ อรนุช คงลัก, “สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผงผักแขยง”, วารสารวิทยาศาสตร์ คชสาส์น ปีที่ 36 ฉบับที่ 2, 2014.

[63] WHO Technical Report Series, “Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation”, No. 916. Geneva: World Health Organization; 2003.

[64] Nik Wil N.N.A, Mhd Omar N.A., Awang@Ibrahim N. and Tajuddin, S.N., “In vitro antioxidant activity and phytochemical screening of *Aquilaria malaccensis* leaf extracts”, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, vol. 6, pp. 688-693, 2014.

[65] Helen L.Y.S, Rahim A.A, Saad B, Saleh M.I. and Bothi Raja P, “*Aquilaria crassna* Leaves Extracts – a Green Corrosion Inhibitor for Mild Steel in 1 M HCl Medium”, International Journal of Electrochemical Science, vol. 9, pp. 830-846, 2014.

[66] Dai J. and Mumper R.J., “Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties”, Molecules 15, pp. 7313-7352, 2010.

[67] Sushma R., Dharini H., Sadiya T., Krishna Murthy T.P., Bhavya S.G. and Manjunath D., “Extraction of polyphenols from *Decalepis hamiltonii* root: Optimization of batch extraction process parameters”, Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, vol. 5, pp. 624-632, 2014.

[68] Xu P., Bao J., Gao J., Zhou T. and Wang Y., “Optimization of extraction of phenolic antioxidants from tea (*Camellia sinesis L.*) fruit peel biomass using response surface methodology”, BioResources, vol. 7, pp. 2431-2443, 2012.

[69] Surya Prakash D.V., Namdam S.S. and Vangalapati M., “Optimization of physico-chemical parameters for the extraction of phenolic components from *Terminalia chebula* species”, Research in Pharmacy, vol. 2, pp. 01-08, 2012.

[70] Sen S., Biplab De, N Devanna and Chakraborty R, “Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa Roxb.*, an Indian medicinal plant”, Chinese Journal of Natural Medicines, vol. 11, pp. 0149–0157, 2013.

[71] Velickovic D.T., Nikolova M.T., Ivancheva S.V., Stojanovic J.B. and Veljkovic V.B., “Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinalis L.*) and glutinous (*Salvia glutinosa L.*) sage by ultrasonic and classical maceration”, J. Serb. Chem. Soc., vol. 72, pp. 73-80, 2007.

[72] Seo J., Lee S., Elam M.L., Johnson S.A., Kang J., Arjmandi B.H., “Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidiun guajava L.*) for

high antioxidant efficacy", Food Science and Nutrition, vol. 2, pp. 174-180, 2014.

[73] Nyirenda K.K., Saka J.D.K., Naidoo D., Maharaj V.J. and Muller C.J.F., "Antidiabetic, anti-oxidant and antimicrobial activities of *Fadogia ancylantha* extracts from Malawi.", J. Ethnopharmacol., vol. 143, pp. 372–376, 2012.

[74] Sathishkumar T., Baskar R., Shanmugam S., Rajesekaran P., Sadasivam S. and Manikandan V., "Optimization of flavonoid extraction from the leaves of *Tabernaemontana heyneana* Wall. using L16 orthogonal design", Nature and Science, vol. 6, pp. 10-21, 2008.

[75] Yaqin X., Rui Z. and Hong F., "Studies on the optimal process to extract flavonoids from red-raspberry fruits", Nature and Science, vol. 3, pp. 43-46, 2005.

[76] Settharaksa, S., Jongjareonrak, A., Hmadhlu, P., Chansuwan, W. and Siripongvutikorn, S. 2012. Flavonoid, phenolic contents and antioxidant properties of Thai hot curry paste extract and its ingredients as affected of pH, solvent types and high temperature. International Food Research Journal. 19:1581-1587.

[77] Moghaddam M.G. and Khajeh M., "Comparison of response surface methodology and artificial neural network in predicting the microwave-assisted extraction procedure to determine Zinc in fish muscles", Food and Nutrition Sciences vol. 2, pp. 803-808, 2011.

[78] ชนัญชิดา แซ่ม้า และ วรรณี จิรภาคย์กุล, "ผลของชนิดตัวทำละลายต่อสารระเหยที่สกัดจากน้ำมะพร้าวน้ำหอมเผา", มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2555.

[79] Tetsunari T., Rinko K. and Makoto S., "Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and", The Society for Applied Microbiology, vol. 39, pp. 60-64, 2004.

[80] Marrufo T., Nazzaro F., Mancini E., Fratianni F. and Coppola R., "Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil from Leaves of *Moringa oleifera Lam*. Cultivated in Mozambique", Molecules, vol. 18, pp. 10989-11000, 2013.

[81] Nesseem D.I. and Michel C.G., "Development and characterization of local anti-inflammatory implantation for the controlled release of the hexane extract of the flower-heads of *Euryops pectinatus L. (Cass.)*", Drug Discoveries & Therapeutics, vol. 5(2), pp. 96-106, 2011.

[82] Setzer W.N., Shen X., Bates R.B., Burns J.R., McClure Ke.J., Zhang P., Moriarity D.M. and Lawton R.O., "A Phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*", Fitoterapia, vol. 71, pp. 195-198, 2000

[83] Hashimoto T., Shimizu N., Kimura T., Takahashi Y. and Ide T., "Polyunsaturated Fats Attenuate the Dietary Phytol–Induced Increase in Hepatic Fatty Acid Oxidation in Mice", Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms, pp. 882-886, 2006.

[84] Mohamed M. Elmazar, Hanan S. El-Abhar, Mona F. Schaalan, Nahla A. Farag, "Phytol/Phytanic Acid and Insulin Resistance: Potential Role of Phytanic Acid Proven by Docking Simulation and Modulation of Biochemical Alterations", PLoS ONE, vol. 1(8), pp. 1-10, 2013.

[85] Mohammad S., "Lupeol, A Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene", Cancer Lett., vol. 285(2), pp. 109-115, 2009.

[86] Tala M.F., Tamokou J.D., Tchakam P.D., Tane P., Kuiate J.R. and Wabo H.K., "Antioxidant xanthones, anthraquinones and semi-synthetic derivatives from *Vismia rubescens* and *Vismia laurentii*", Pharmacologyonline, vol. 3, pp. 1410-1418, 2011.

[87] Raman V., LA S., Saradhi M.P., Rao N., Krishna N. and Radhakrishnan S.M, "Antibacterial, antioxidant activity and GC-MS analysis of *Eupatorium odoratum*", Asian journal of pharmaceutical and clinical research, vol. 5(2), pp. 99-106, 2012.

[88] Yagura T., Ito M., Kiuchi F., Honda G. and Yasuo S., "Four New 2-(2-Phenylethyl) chromone Derivatives from Withered Wood of *Aquilaria sinensis*", Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol. 51(5), pp. 560-564, 2003.

[89] Okugawa H., Ueda R., Matsumoto K., Kawanishi K. and Kato A., "Effect of jinkoh-eremol and agarospirol from agarwood on the central nervous system in mice", Planta medica, vol. 62(1), pp. 2-6, 1996.

[90] ประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง, ศรีสมัย วิริยารัมภะ, สุขสันต์ ฉ่ำสิงห์, สุดธิษา เหล่าเปี่ยม, "ประสิทธิผลของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย", การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50, 2555.

[91] ปานตา ตรีสุวรรณ, อาภา จันทร์เทวี, อาริยา รัตนทองคำ, จอมใจ พีรพัฒนา, นาฏศจี นวลแก้ว และ สุภาภรณ์ ฉัตรชัยวิวัฒนา, "ผลของสารสกัดโพลีฟีนอลจากเปลือกมังคุดต่อการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในห้องปฏิบัติการ", The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 11 – 12 กุมภาพันธ์ 2555 "Pharmacy Profession in Harmony, pp. 233-237

[92] Phoolcharoen W., Sooampon S., Sritularak B., Likhitwitayawuid K., Kuvatanasuchatid J. and Pavasant P., "Anti-periodontal Pathogen and Anti-inflammatory Activities of Oxyresveratrol", Natural Product Communications, vol. 8(5), pp. 613-616, 2013.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก
การออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรม RSM

RSM เป็นเทคนิคทางสถิติ ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรที่สนใจ สามารถหาจุดที่เหมาะสมจากความสัมพันธ์ของตัวแปรเหล่านั้นได้

ตัวแปร (Input variable) ตัวแปรต้นหรือปัจจัยเชิงปริมาณ เช่น อุณหภูมิ เวลา ความดัน ความเข้มข้น และปริมาณสาร เป็นต้น

ค่าผลตอบสนอง (Response Variable) เป็นค่าคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เช่น เปอร์เซ็นต์ผลได้ (Yield) ความหนืด ความแข็ง และระดับความเข้ม (ทางประสาทสัมผัส) เป็นต้น

การใช้โปรแกรม RSM โดยเลือกใช้สมการ BBD ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดชากฤษณา ตัวแปรที่สนใจมี 3 ตัวแปร ได้แก่ อุณหภูมิในการสกัด (X_1) เวลาในการสกัด (X_2) และความเร็วรอบในการเขย่า (X_3) โดยโปรแกรมจะออกแบบการทดลองให้เราทั้งหมด 15 การทดลอง ซึ่งออกแบบด้วย Second-order polynomial model ดังสมการ [47]

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^{k} \beta_j X_j + \sum_{j=1}^{k} \beta_{jj} X_j^2 + \sum\sum_{i<j} \beta_{ij} X_i X_j$$

โดยที่ค่า Y เป็นค่าตอบสนอง

β_0 เป็นสัมประสิทธิ์ค่าคงที่(constant coefficients)ของระยะตัดแกน

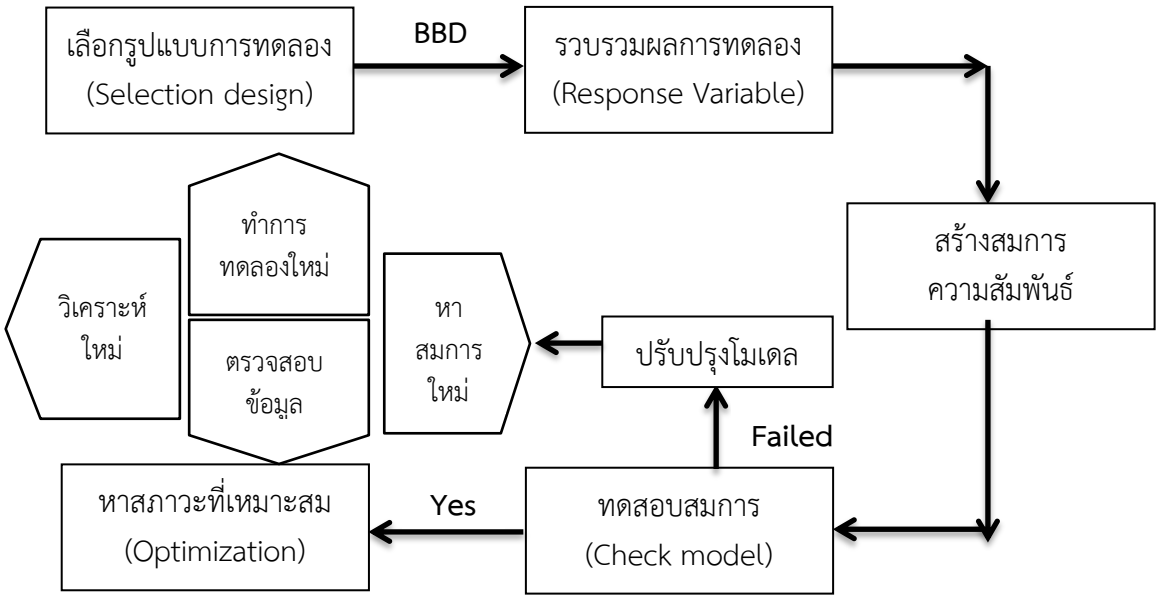
β_j เป็นสัมประสิทธิ์ค่าคงที่เชิงเส้น (linear)

β_{jj} เป็นสัมประสิทธิ์ค่าคงที่กำลังสอง (quadratic)

β_{ij} เป็นสัมประสิทธิ์ค่าคงที่จุดตัด (interaction terms)

X_i, X_j เป็นตัวแปรที่สนใจจะศึกษา (independent variables)

ขั้นตอนการออกแบบการทดลองแสดงดังภาพประกอบที่ ก-1

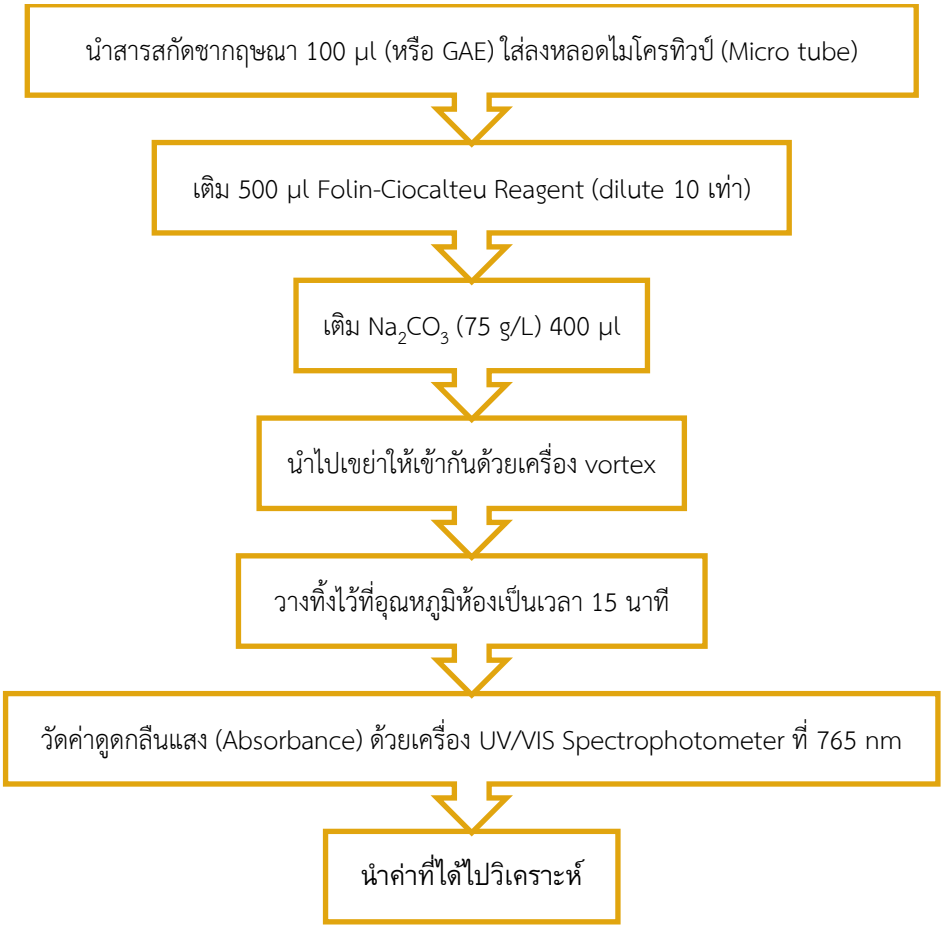


ภาพประกอบที่ ก-1 ขั้นตอนการออกแบบการทดลอง

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดแสดงดังภาพภาพประกอบที่ ข-1



ภาพประกอบที่ ข-1 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมด

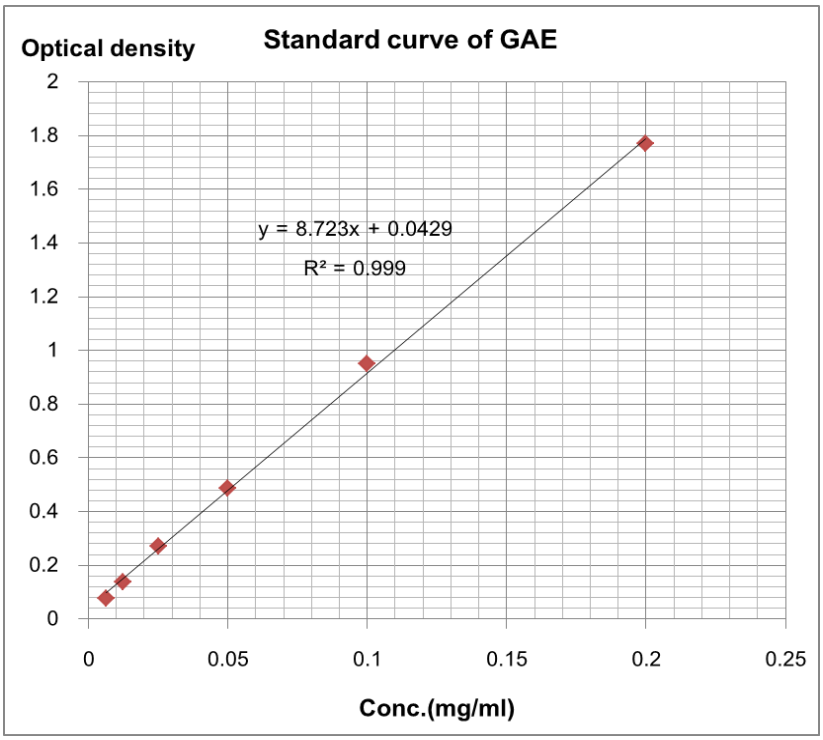
<u>แสดงวิธีคำนวณ</u>

ค่า Total phenolic content เปรียบเทียบกับ Gallic acid คำนวณจากสมการ [50]

$$\text{Total phenolic content} = \frac{\text{GAE mg/ml} \times \text{ปริมาณสารสกัด(ml)} \times \text{dilution factor}}{\text{น้ำหนักสารสกัด(mg)} \times 10^{-3}\ \text{g/mg}}$$

*หมายเหตุ blank = 100 µl DI water + 500 µl Folin-Ciocalteu Reagent + 400 µl Na_2CO_3

กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ GAE แสดงในภาพประกอบที่ ข-2



ภาพประกอบที่ ข-2 กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ GAE

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

จากผลการทดลองของสารสกัดจากชากฤษณาที่สกัดด้วยน้ำพบว่า มีปริมาณฟีนอลิกส์ทั้งหมดเท่ากับ 11.71 mg GAE/g agarwood โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{Total phenolic content (mg GAE/g agarwood)} = \frac{\text{GAE mg/ml} \times \text{ปริมาณสารสกัด(ml)} \times \text{dilution factor}}{\text{น้ำหนักสารสกัด(mg)} \times 10^{-3}\ \text{g/mg}}$$

$$= \frac{(0.034\ \text{mg/ml}) \times (10\ \text{ml}) \times 4}{(10\ \text{mg}) \times (10^{-3}\ \text{g/mg})}$$

$$= 136\ \text{mg GAE/g extracted}$$

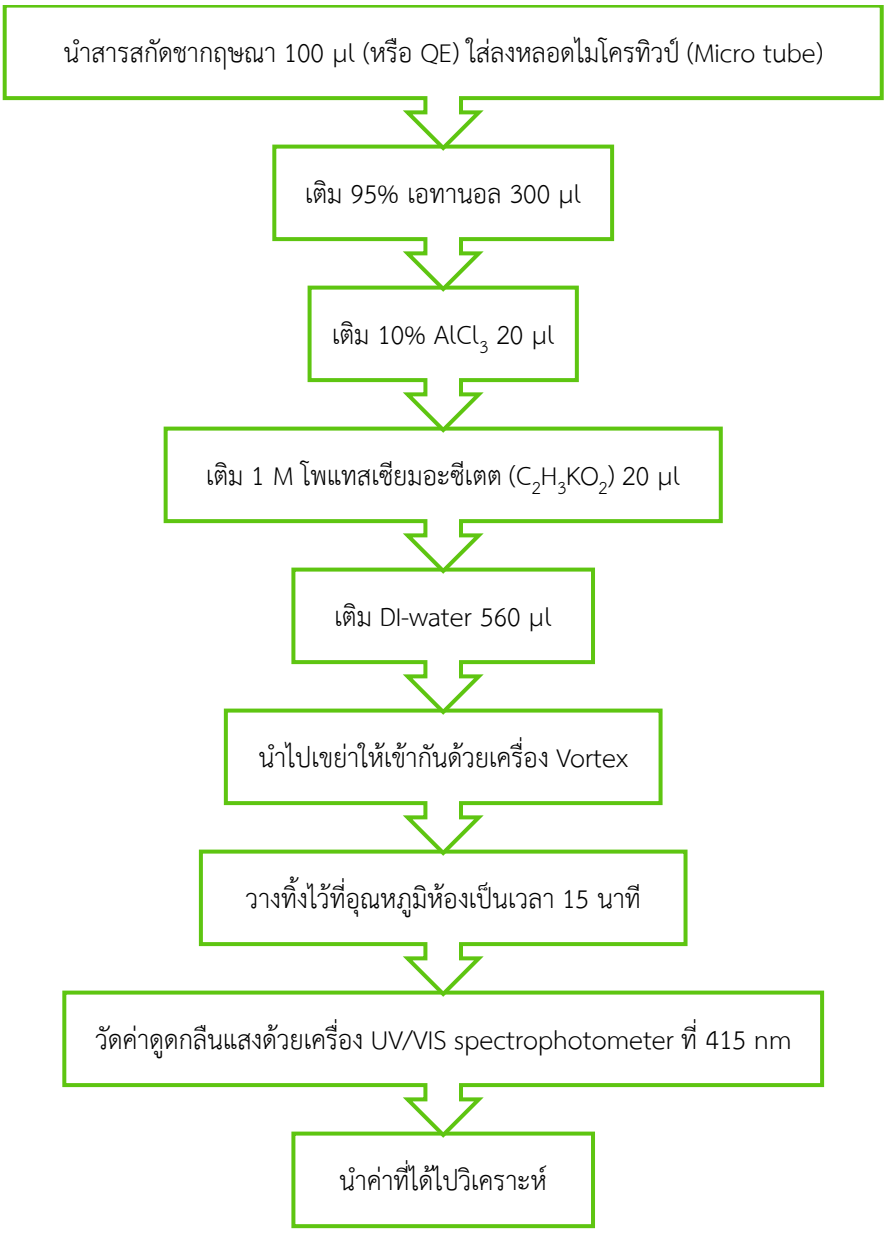
ในชากฤษณา 1 กรัม สกัดได้สารสกัด 0.08608 กรัม

ดังนั้น $136 \times 0.08608 = 11.71\ (\text{mg GAE/g agarwood})$

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดแสดงดังภาพประกอบที่ ค-1



ภาพประกอบที่ ค-1 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

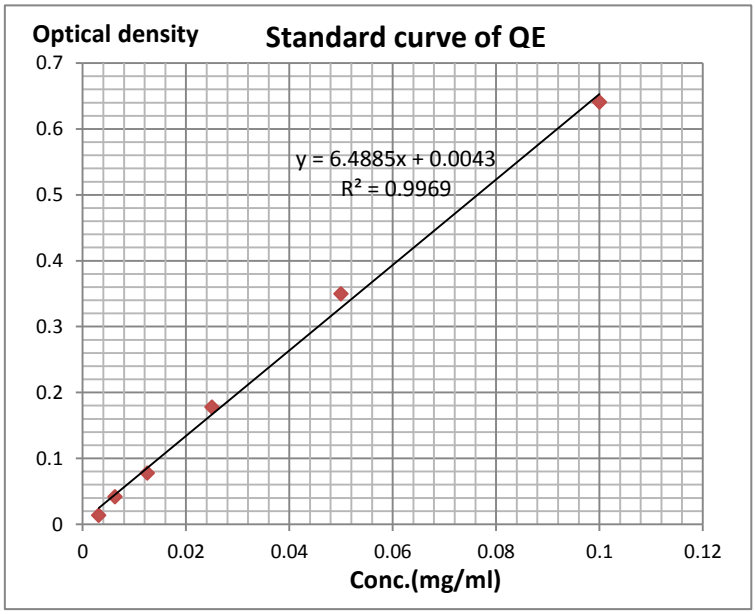
<u>แสดงวิธีคำนวณ</u>

ค่า Total flavonoid content เปรียบเทียบกับ QE โดยคำนวณจากสมการ [8]

$$\text{Total flavonoid content (mg QE/g agarwood)} = \frac{\text{QE mg/ml} \times \text{ปริมาณสารสกัด(ml)} \times \text{dilution factor}}{\text{น้ำหนักสารสกัด(mg)} \times 10^{-3}\ \text{g/mg}}$$

*หมายเหตุ blank = 100 µl DI water + 300 µl 95% เอทานอล + 20 µl 10% AlCl3 + 20 µl 1 M $C_2H_3KO_2$ + DI-water 560 µl

กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ QE แสดงดังภาพประกอบที่ ค-2



ภาพประกอบที่ ค-2 กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ QE

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

จากผลการทดลองของสารสกัดจากชากฤษณาที่สกัดด้วยน้ำพบว่า มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 7.92 mg QE/g agarwood โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{Total flavonoid content (mg QE/g agarwood)} = \frac{\text{QE mg/ml} \times \text{ปริมาณสารสกัด(ml)} \times \text{dilution factor}}{\text{น้ำหนักสารสกัด(mg)} \times 10^{-3}\ \text{g/mg}}$$

$$= \frac{(0.023\ \text{mg/ml}) \times (10\ \text{ml}) \times 4}{(10\ \text{mg}) \times (10^{-3}\text{g/mg})}$$

$$= 92\ \text{mg QE/g extracted}$$

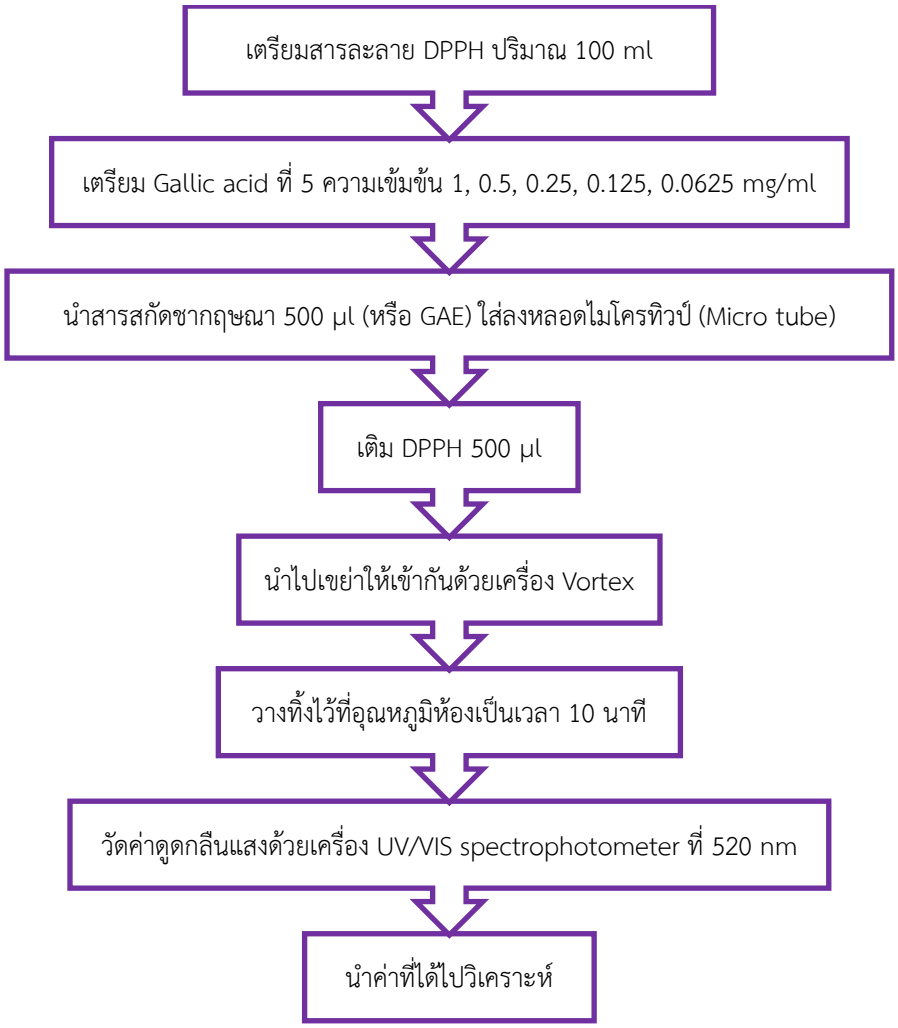
ในชากฤษณา 1 กรัม สกัดได้สารสกัด 0.08608 กรัม

ดังนั้น $92 \times 0.08608 = 7.92\ (\text{mg QE/g agarwood})$

ภาคผนวก ง

ภาคผนวก ง
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงในภาพประกอบที่ ง-1



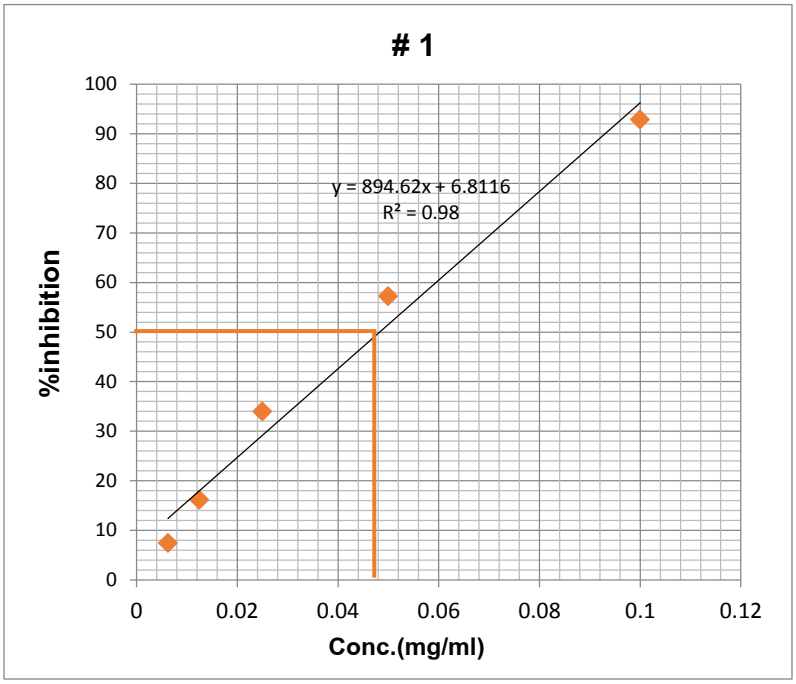
ภาพประกอบที่ ง-1 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

*Blank คือ เอทานอล 500 µl + สารสกัดหรือ Gallic acid 500 µl

**Control คือ เอทานอล 500 µl + สารละลาย DPPH 500 µl

วิธีคำนวณค่า IC_{50}

พล็อตกราฟระหว่าง %inhibition กับ OD สารสกัด เพื่อหาค่า IC_{50} ได้กราฟ IC50 ของสารสกัดดังแสดงในภาพประกอบที่ ง-2



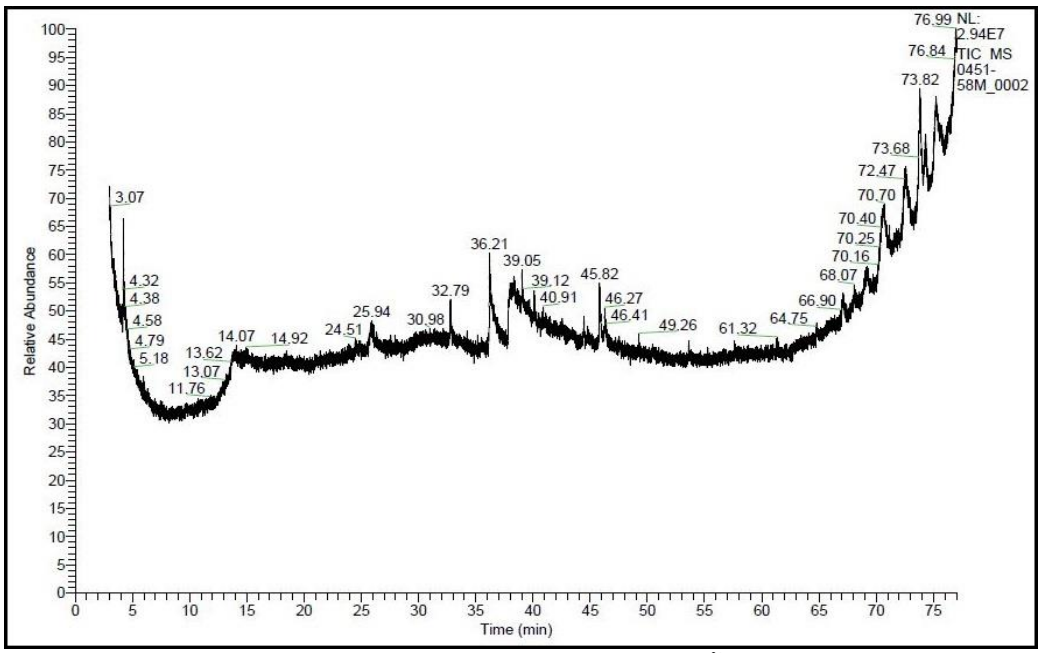
ภาพประกอบที่ ง-2 แสดงกราฟ IC_{50} ของ สารสกัด#1

จากภาพประกอบที่ ง-2 ที่ 50% inhibition หรือ IC_{50} เมื่อลากเส้นลงมาที่ความเข้มข้นของสารสกัดจะได้ 0.047 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

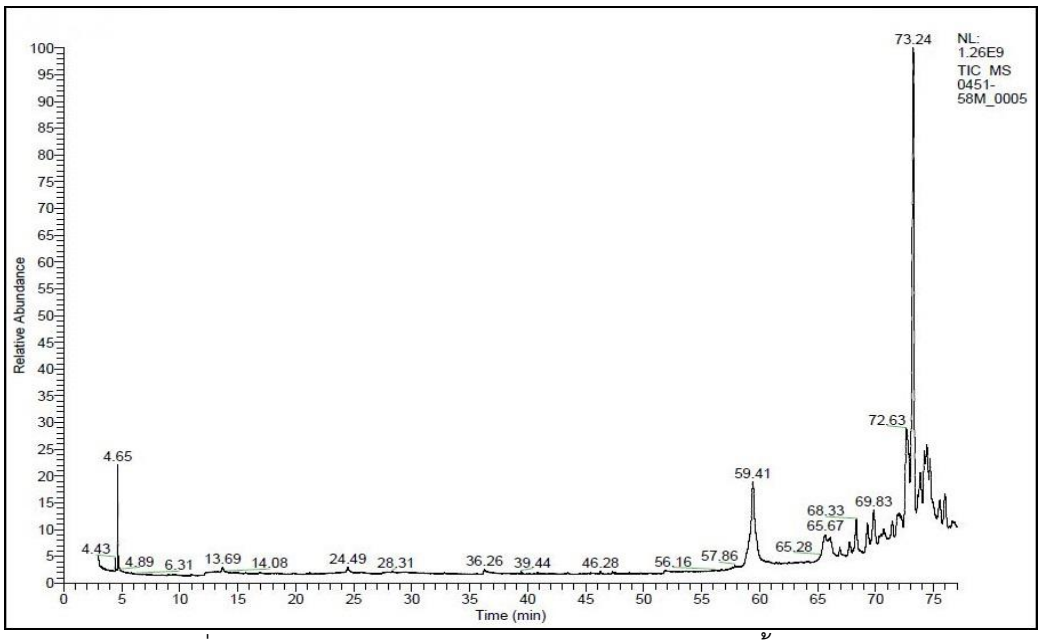
ภาคผนวก จ

ภาคผนวก จ
องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากชากฤษณา

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปคโตรมิเตอร์ แสดงดังภาพประกอบที่ จ-1, ภาพประกอบที่ จ-2 และตารางที่ จ-1



ภาพประกอบที่ จ-1 โครมาโทแกรมของสารสกัดชากฤษณา (น้ำ) สกัดด้วยวิธีซอกห์เลต

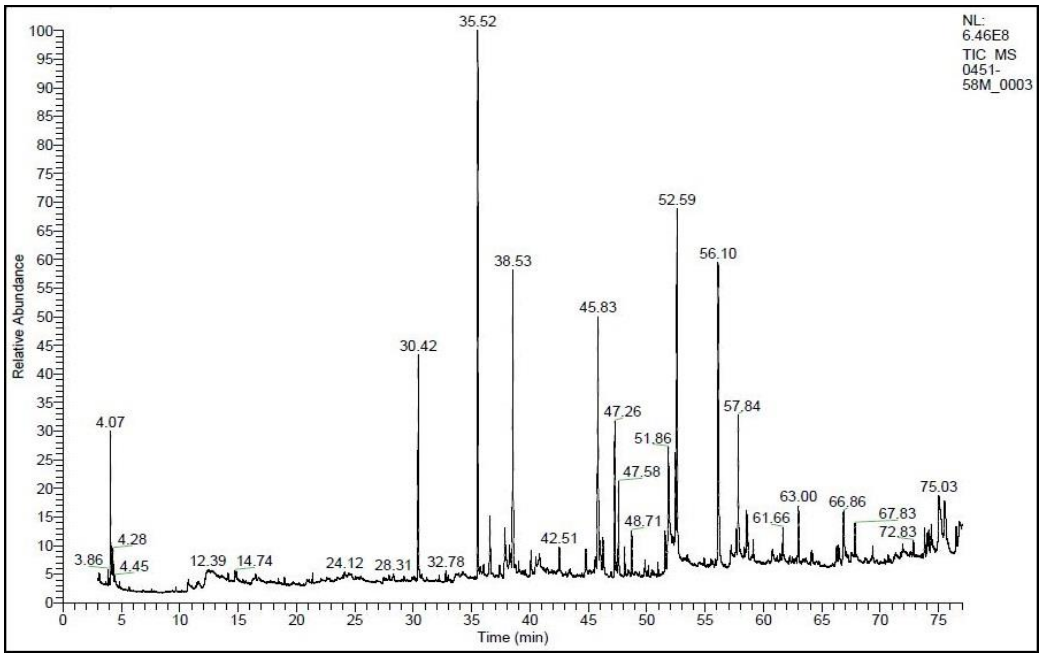


ภาพประกอบที่ จ-2 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากชากฤษณา (น้ำ) สกัดด้วยวิธีเขย่า

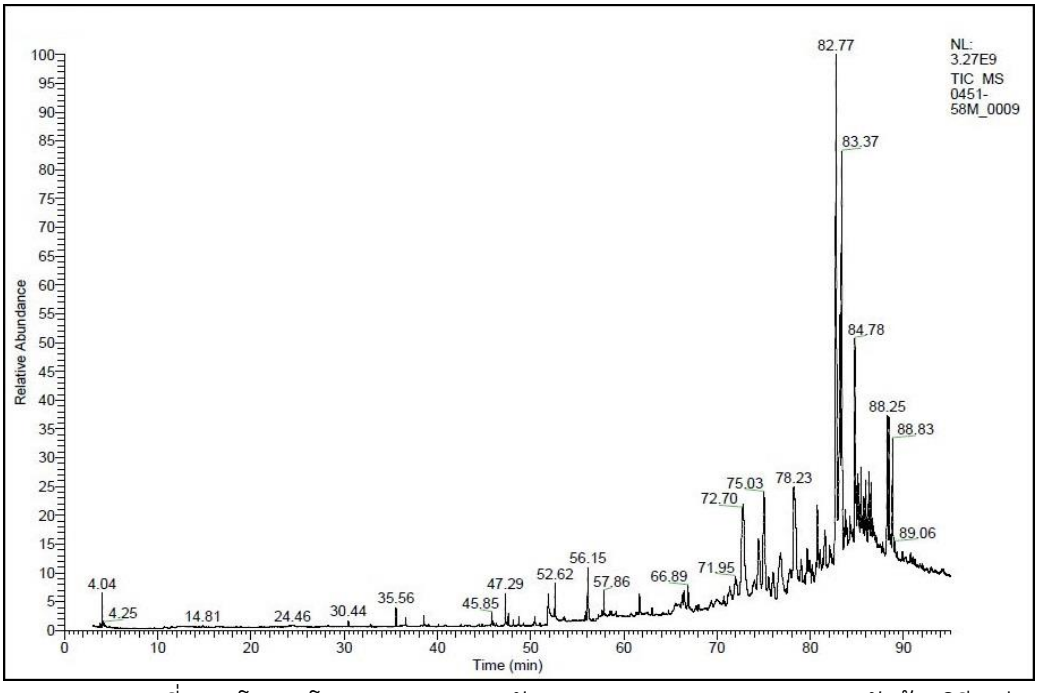
ตารางที่ จ-1 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS

Soxhlet extraction (H_2O)				Maceration extraction (H_2O)			
SI	RT	Area (%)	Compound	SI	RT	Area (%)	Compound
797	4.21	3.93	2,3-Butanediol	908	4.65	1.56	2,3-Butanediol
658	45.82	3.08	(-)-Loliolide	760	59.42	12.00	Eucalyptin, 4H-1-Benzopyran-4-one
575	46.28	2.16	Bis(cyclohex-3-enylmethyl)amine	870	73.24	27.78	Pentacosane
545	67.11	1.94	Stigmast-5-en-3-ol	769	75.54	1.65	Taraxerone
				763	75.97	1.87	Lup-20(29)-en-3-one

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปคโตรมิเตอร์ แสดงดังภาพประกอบที่ จ-3, ภาพประกอบที่ จ-4 และตารางที่ จ-2



ภาพประกอบที่ จ-3 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากชากฤษณา (เอทานอล) สกัดด้วยวิธีซอกห์เลต



ภาพประกอบที่ จ-4 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากชากฤษณา (เอทานอล) สกัดด้วยวิธีเขย่า

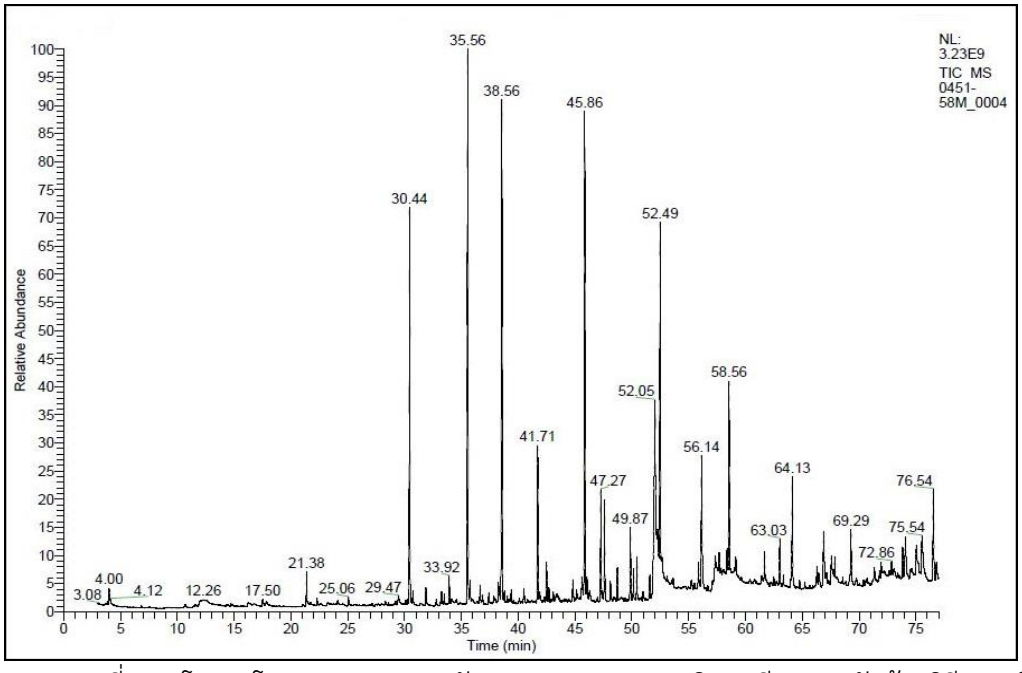
ตารางที่ จ-2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS

Soxhlet extraction (Ethanol)				Maceration extraction (Ethanol)			
SI	RT	SI	RT	SI	RT	SI	RT
896	4.07	896	4.07	896	4.07	896	4.07
915	30.42	915	30.42	915	30.42	915	30.42
936	35.52	936	35.52	936	35.52	936	35.52
882	36.57	882	36.57	882	36.57	882	36.57
867	37.84	2.08	Dodecanoic acid	930	56.14	0.79	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl
938	38.53	5.69	1-Hexadecene	809	57.86	0.78	9-Octadecenoic acid (Z)-ethyl ester
822	45.83	7.87	1-Octadecene	901	72.77	5.75	Stigmast-5-en-3-ol

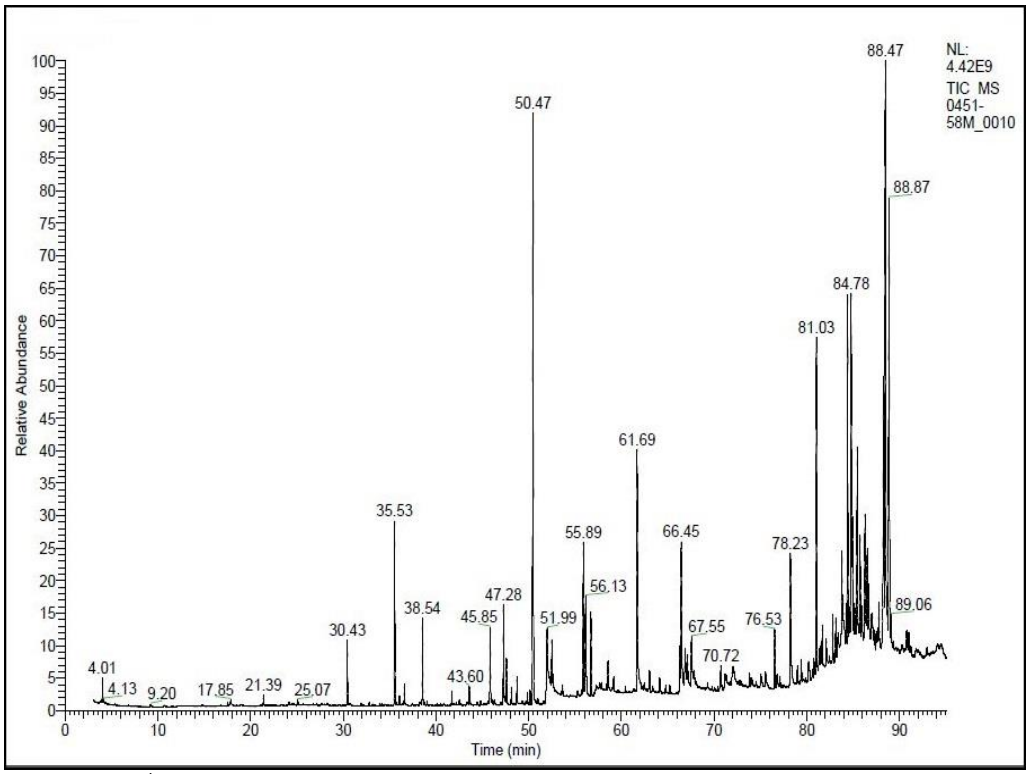
ตารางที่ จ-2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS (ต่อ)

Soxhlet extraction (Ethanol)				Maceration extraction (Ethanol)			
SI	RT	SI	RT	SI	RT	SI	RT
764	46.25	1.26	2-Cyclohexen-1-one, 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)	850	74.44	2.42	Olean-12-en-3-ol
901	47.26	2.85	Neophytadiene	880	75.04	3.94	Triacontane
874	47.58	1.79	2-Pentadecanone, 6,10,14-Trimethyl	768	80.75	1.75	Stigmast-5-en-3-ol, Oleate
887	51.86	6.81	Hexadecanoic acid	873	82.77	12.13	Friedelanol
815	52.59	10.76	Hexadecanoic acid, Ethyl ester	912	83.37	14.39	D:A-Friedooleanan-3-one
925	56.11	7.41	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-Tetramethyl	922	84.78	2.69	Stigmast-5-en-3-ol
826	57.84	4.81	9-Octadecenoic acid (Z)-ethyl ester	716	85.11	2.44	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-Tetramethyl
878	58.63	2.64	Octadecanoic acid, Ethyl ester	824	85.43	2.42	Olean-12-en-3-ol
785	63.00	1.47	4,8,12-Trimethyltridecan-4-olide	854	88.43	2.61	Friedelanol

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปคโตรมิเตอร์ แสดงดังภาพประกอบที่ จ-5, ภาพประกอบที่ จ-6 และตารางที่ จ-3



ภาพประกอบที่ จ-5 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากชากฤษณา (เอทิลอะซีเตท) สกัดด้วยวิธีซอกห์เลต



ภาพประกอบที่ จ-6 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากชากฤษณา (เอทิลอะซีเตท) สกัดด้วยวิธีเขย่า

ตารางที่ จ-3 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS

Soxhlet extraction (EA)				Maceration extraction (EA)			
SI	RT	Area (%)	Compound	SI	RT	Area (%)	Compound
930	30.44	6.20	Cyclotetradecane	923	30.43	0.64	1-Tridecanol
942	35.36	11.21	Phenol, 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)	940	35.54	1.69	Phenol, 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)
945	38.56	8.47	1-Hexadecene	937	38.54	0.85	1-Hexadecene
711	41.71	3.04	2,6-Di-tert-butyl-4-nitrophenol	868	45.85	1.14	1-Octadecene
829	42.49	1.06	Acrylic acid, Tetradecanyl ester	916	47.28	1.08	Neophytadiene
925	45.86	8.69	1-Octadecene	898	47.59	0.50	2-Pentadecanone, 6,10,14-Trimethyl
922	47.27	1.97	Neophytadiene	928	50.47	6.65	Hexadecanoic acid methyl ester
907	47.59	1.62	2-Pentadecanone, 6,10,14-Trimeth	903	51.98	2.47	Hexadecanoic acid
908	49.87	1.25	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione	914	55.88	1.68	9-Octadecenoic acid (Z)-, Methyl ester
897	52.04	10.69	Hexadecanoic acid	920	56.13	1.45	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl
901	52.49	8.68	1-Octadecene	925	56.70	0.82	Octadecanoic acid methyl ester
928	56.14	3.03	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl	757	66.45	2.85	9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester

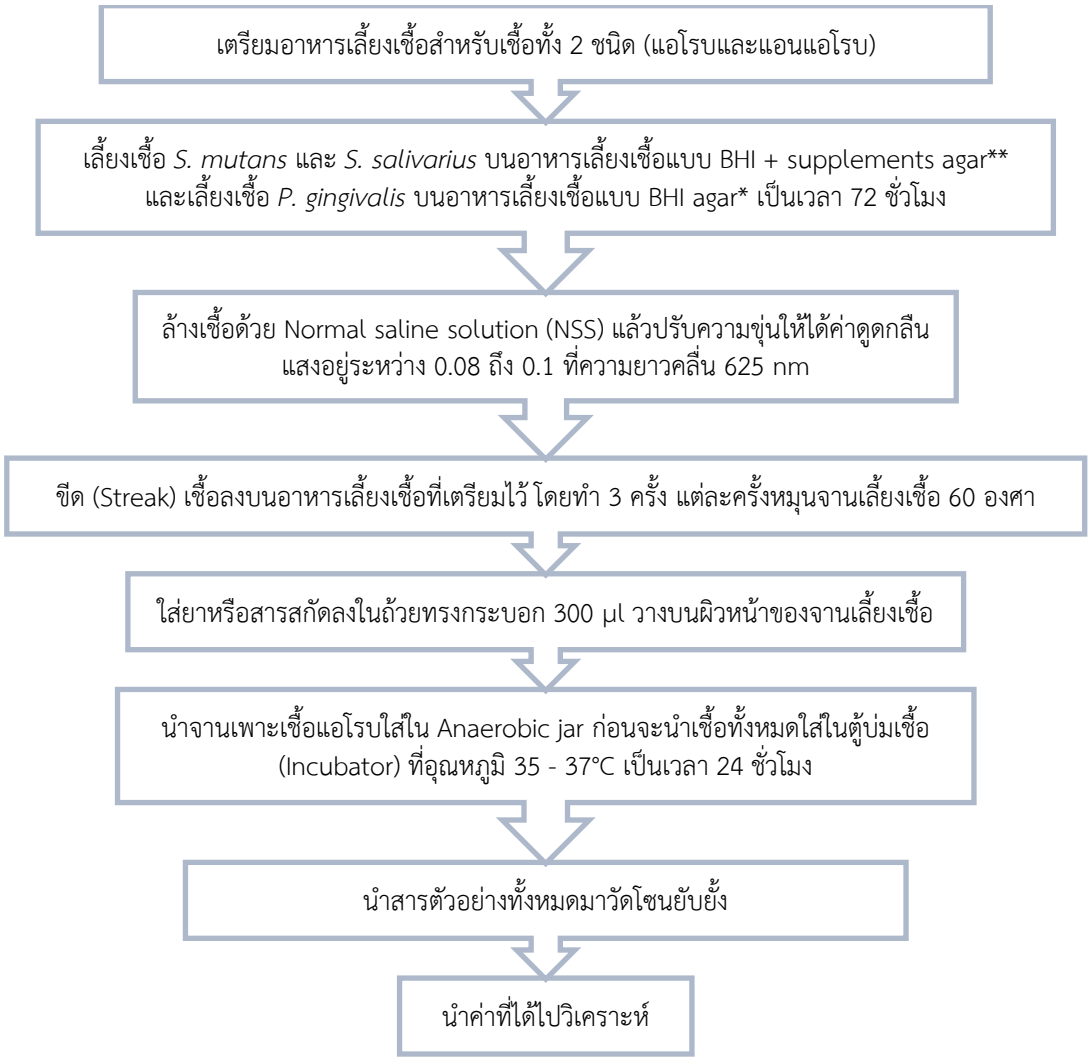
ตารางที่ จ-3 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชากฤษณาโดยใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS (ต่อ)

Soxhlet extraction (EA)				Maceration extraction (EA)			
SI	RT	SI	RT	SI	RT	SI	RT
886	58.56	6.69	1-Eicosanol	874	67.55	1.19	Hexadecanoic acid, 2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester
847	64.13	2.29	Cyclotetracosane	897	76.53	0.70	Celidoniol deoxy
922	76.54	1.81	Celidoniol deoxy	777	78.23	2.27	Eucalyptin, 4H-1-Benzopyran-4-one
				922	81.03	3.43	Celidoniol deoxy
				862	83.78	4.04	Stigmasta-5, 22-dien-3-ol
				914	84.78	7.04	Stigmast-5-en-3-ol
				880	85.43	3.27	Olean-12-en-3-ol
				825	85.74	2.66	Lup-20(29)-en-3-one
				769	86.27	2.38	4,4,6A,6B,8A,11,11, 14B-Octamethyl-1,4,4A,5,6,6A,6B,7,8, 8A,9,10,11,12,12A,14,14 A
				874	88.47	14.05	Friedelanol

ภาคผนวก ฉ

ภาคผนวก ฉ
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแสดงดังภาพประกอบที่ ฉ-1



ภาพประกอบที่ ฉ-1 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

*****BHI agar (Brain heart infusion agar)

******BHI + supplements agar คือ BHI agar + Hemin stock solution + Working vitamin K1 stock solution

*******- เชื้อ *S. mutans* และ *S. salivarius* ใช้ 1%chlorhexidine gluconate 100 µl และ 300 µl เป็น positive control

- เชื้อ *P. gingivalis* ใช้ 0.2% Chlorhexidine gluconate 100 µl และ 300 µl เป็น positive control
- ใช้ 5% DMSO (Dimethyl sulfoxide) เป็น Negative control

วิธีเตรียม Hemin stock solution

ชั่ง Hemin 0.5 กรัม ละลายใน 10 มิลลิลิตร 1 M NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไป ทำให้ปราศจากเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและเก็บสารที่อุณหภูมิ 4 ถึง 8 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียม Working vitamin K1 stock solution

นำวิตามิน K1 1 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 ถึง 8 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียมสารสกัดจากชากฤษณา

ชั่งสารสกัดแต่ละตัวมาอย่างละ 10 มิลลิกรัม สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำก็ใช้น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในการละลาย สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซีเตทก็ใช้ 10 มิลลิลิตร 5% DMSO ในการละลาย จะได้สารแต่ละตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้ในการทดสอบ Agar dilution method

ภาคผนวก ช

ภาคผนวก ช
บทความการประชุมทางวิชาการ

1. The 3rd TIChE International Conference 2013 "Step into a New Era of Renewable Energy Management and Sustainable Environment" Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, October 17-18, 2013

2. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture (AEJSA) Volume 8, Number 11: Special ICMMMM, 2014, “Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity Evaluation of Agarwood Tea Leaves Extracts”