

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

กิจกรรมที่ 1 ศึกษาวิธีการแปรรูปและพัฒนาผลิตภัณฑ์กาแฟที่มีอัตลักษณ์ของพื้นที่สูง

เมล็ดกาแฟที่ศึกษาวิธีแปรรูปเป็นเมล็ดกาแฟพันธุ์คาติมอร์ จากในแปลงกาแฟศูนย์ย่อยแม่ะน้อย (สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์) โดยวิธีการแปรรูปแบบต่างๆ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 แปรรูปแบบเปียก ; Wet Process (ปอกเปลือก และมีการล้างขัดเมื่อออก)

กรรมวิธีที่ 2 แปรรูปแบบกึ่งเปียก ; Honey Process (ปอกเปลือกแต่ไม่มีการล้างขัดเมื่อออก)

กรรมวิธีที่ 3 แปรรูปแบบแห้ง ; Dry process (การตากแห้งทั้งผลเชอร์รี่ โดยไม่มีการปอกเปลือก)

กรรมวิธีที่ 4 การแปรรูปแบบหมักด้วยยีสต์ โดยมีการใช้จุลินทรีย์ในการหมักใน 2 ชนิด ได้แก่ การใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (ยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์) และการใช้ยีสต์แป้งข้าวที่ใช้ในการหมักเครื่องดื่มสาโท นำมาใช้หมักร่วมกับการแปรรูปแบบกึ่งเปียก และการแปรรูปแบบแห้ง โดยใช้เวลาในการหมัก 2 ช่วงเวลา ได้แก่ หมัก 24 ชั่วโมง และหมัก 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การแปรรูปแบบเปียก (A), การแปรรูปแบบกึ่งเปียก (B), การแปรรูปแบบแห้ง (C) และการแปรรูปแบบหมักด้วยยีสต์ (D)

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของขนาดเมล็ดกาแฟที่นำมาใช้ในการศึกษาแปรรูปในกระบวนการต่างๆ พบว่าเมล็ดกาแฟส่วนใหญ่อยู่ในช่วงขนาด AA (> 6.9 มม.) และขนาด A ($6.12 - 6.89$ มม.) ซึ่งมีขนาดเมล็ดกาแฟอยู่ใน 2 ช่วงขนาดนี้มากกว่าร้อยละ 80 (ตารางที่ 1-1)

และจากการทดสอบในด้านการชงดื่มของเมล็ดกาแฟที่ได้จากการแปรรูปกาแฟในกรรมวิธีต่างๆ พบว่าการแปรรูปในกรรมวิธีแบบเปียก (ชุดควบคุม) และการแปรรูปแบบแห้ง มีคะแนนการชงดื่มอยู่ที่ 79.25 และ 78 คะแนน ตามลำดับ นับว่าเป็นคะแนนการชงดื่มที่สูง แต่ยังไม่ถือว่าเป็นกาแฟที่มีลักษณะพิเศษ ส่วนการแปรรูปแบบกรรมวิธีกึ่งเปียก และการแปรรูปแบบการหมักด้วยยีสต์ พบว่ามีคะแนนการชงดื่มตั้งแต่ 80 คะแนนขึ้นไป ซึ่งถือว่าเป็นกาแฟที่มีลักษณะพิเศษตามมาตรฐาน Specialty Coffee Association (SCA) โดยการหมักด้วยยีสต์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าสามารถช่วยเพิ่มลักษณะพิเศษของกาแฟได้ในระดับใกล้เคียงกัน และช่วงเวลาในการหมักนั้น พบว่า ในภาพรวมการใช้เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง สามารถช่วยเพิ่มรสชาติของกาแฟได้ดีกว่าการหมัก 24 ชั่วโมง อาจเนื่องด้วยจุลินทรีย์ต้องใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณ ส่งผลให้มีการทำงานที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น (ตารางที่ 1-2)

ตารางที่ 1-1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของขนาดเมล็ดกาแฟแต่ละกรรมวิธี ได้แก่ การแปรรูปแบบเปียก : Wet Process, การแปรรูปแบบกึ่งเปียก : Honey Process, การแปรรูปแบบแห้ง : Dry process และการแปรรูปแบบหมักด้วยยีสต์ : Yeast Process (การแปรรูปแบบหมักด้วยยีสต์มีการใช้ยีสต์ 2 อย่าง คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* : YS และยีสต์แป้งข้าวหมาก : YR)

Coffee Process	Seed size			
	Size.AA (6.90mm.)%	Size.A (6.12mm.)%	Size.B (5.43mm.)%	Size.XY (4.57mm.)%
Wet Process	31	60.21	7.27	1.53
Honey Process	54.66	34.98	7.51	2.85
Dry process	28.83	51.32	15.16	4.69
Yeast Process (Honey) 24 Hr. (YS.)	57.12	35.64	5.56	1.68
Yeast Process (Honey)48 Hr. (YS.)	57.18	32.86	7.55	2.41
Yeast Process (Honey)24 Hr. (YR.)	64.03	30.34	4.54	1.09
Yeast Process (Honey)48 Hr. (YR.)	62.98	31.38	4.84	0.81
Yeast Process (Dry) 24 Hr. (YS.)	42.89	42.9	10.62	3.59
Yeast Process (Dry) 48 Hr. (YS.)	43.49	42.7	11.35	2.46
Yeast Process (Dry) 24 Hr. (YR.)	41.07	44.04	12.53	2.36
Yeast Process (Dry) 48 Hr. (YR.)	40.83	44.97	11.73	2.47

ตารางที่ 1-2 ผลการวิเคราะห์คุณภาพด้านการชงดื่มของกาแฟแต่ละกรรมวิธี ได้แก่ การแปรรูปแบบเปียก : Wet Process, การแปรรูปแบบกึ่งเปียก : Honey Process, การแปรรูปแบบแห้ง : Dry process และการแปรรูปแบบหมักด้วยยีสต์ : Yeast Process (การแปรรูปแบบหมักด้วยยีสต์มีการใช้ยีสต์ 2 อย่าง คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* : YS และยีสต์แป้งข้าวหมาก : YR)

Coffee Process	Score						Final Score	Notes:Wet Aroma
	Fragrance/ Aroma	Flavor	Aftertaste	Acidity	Body	Balance		
Wet Process	7.25	7	7	7	7	7	79.25	Honey / Citrus / Sweet / Green Vegetative / Astringent
Honey Process	7.25	7.25	7	7	7.25	7.25	80.25	Syrupy / Vanilla / Caramel / Jasmine Rice
Dry process	6.75	7	6.75	7	6.75	7	78	Hay / Orange Juice
Yeast Process (Honey) 24 Hr. (YS.)	7.25	7.25	7	7.25	7	7.25	80.25	Citrus / Oat Milk / Sweet / Caramel
Yeast Process (Honey)48 Hr. (YS.)	7.25	7.5	7.25	7.25	7.25	7.25	81	Flowery / tea / Citrus / Caramel
Yeast Process (Honey)24 Hr. (YR.)	7.25	7.25	7	7.25	7	7.25	80.25	Fresh / Syrupy / Tra / Caramel
Yeast Process (Honey)48 Hr. (YR.)	7.25	7	7.25	7.5	7	7	80	Namame / Sweet / Tea
Yeast Process (Dry) 24 Hr. (YS.)	7.5	7.25	7.25	7	7	7	80.25	Vanilla / Syrpy / Sweet / Tea
Yeast Process (Dry) 48 Hr. (YS.)	7.25	7.5	7.25	7.25	7	7.25	81	Hazelnut / Malt / Caramel / Sweet
Yeast Process (Dry) 24 Hr. (YR.)	7.25	7	7	7.25	7	7	79.75	Lime / Caramel / Sweet
Yeast Process (Dry) 48 Hr. (YR.)	7.5	7.5	7.25	7.5	7	7	81.25	Hazelnut / Tea / Sweet / Boiled Sweet Corn

ซึ่งจากการศึกษาการแปรรูปผลผลิตกาแฟในกรรมวิธีต่างๆ พบว่า ในแต่ละกรรมวิธี มีกลิ่น รสชาติ และอัตลักษณ์แตกต่างกันในแต่ละรูปแบบการแปรรูป ซึ่งสามารถใช้ในการพัฒนาต่อยอดเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์กาแฟในอนาคต เป็นทางเลือกในการตีตลาดเพิ่มเติมสำหรับผู้บริโภคกาแฟ และเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการลดการใช้น้ำจากการแปรรูปกาแฟได้ ซึ่งได้พัฒนาออกแบบโลโก้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบของกาแฟที่มาจากการแปรรูปทั้ง 4 รูปแบบ เพื่อเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์แนวทางในการพัฒนาต่อยอดและเพิ่มมูลค่าต่อไป (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ผลิตภัณฑ์กาแฟจากการแปรรูปแบบเปียก (A), ผลิตภัณฑ์กาแฟจากการแปรรูปแบบกึ่งเปียก (B), ผลิตภัณฑ์กาแฟจากการแปรรูปแบบหมักด้วยยีสต์ (C) และผลิตภัณฑ์กาแฟจากการแปรรูปแบบแห้ง (D)

กิจกรรมที่ 2 สํารวจศึกษาการผลิตและการแปรรูปชาอัสสัมที่มีอัตลักษณ์เฉพาะถิ่นบนพื้นที่สูง

จากการสำรวจแหล่งปลูกชา และการศึกษาลักษณะพันธุ์ชาอัสสัมที่มีการปลูกในพื้นที่ โดยการประชุมกลุ่มย่อยกับเกษตรกรผู้ปลูกและแปรรูปใบชาอัสสัม หรือชาเมี่ยง ในพื้นที่โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงทั้ง 4 พื้นที่ (ภาพที่ 3) ได้แก่

1. บ้านปางมะกล้วย โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงป่าแป๋
2. บ้านปางมะโอ โครงการพัฒนาพื้นที่สูงฯ ปางมะโอ
3. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง โครงการพัฒนาพื้นที่สูงฯ โหล่งขอด
4. บ้านดอยช้าง โครงการพัฒนาพื้นที่สูงฯ วาวี



ภาพที่ 3 การร่วมประชุมสอบถามกับกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกชาอัสสัม และการสำรวจชาอัสสัมในแต่ละพื้นที่

ในด้านของสายพันธุ์ชาอัสสัมใน 4 พื้นที่ ที่เข้าสำรวจ พบว่า ทั้ง 4 พื้นที่ที่มีการปลูกชาอัสสัม หรือชาเมี่ยง กันมานานมากกว่า 100 ปี ตั้งแต่รุ่นบรรพบุรุษ จนไม่สามารถระบุแหล่งที่มาของต้นชาได้ สายพันธุ์ชาอัสสัมทั้ง 4 พื้นที่ที่สำรวจ พบว่า มีสายพันธุ์ชาแบ่งได้ 3 ชนิด คือ

- 1) เมี่ยง หรือชาอัสสัม โดยชาวบ้านหรือเกษตรกรในพื้นที่นิยมทำชาขงดืม เนื่องจากมีรสชาติที่ดี
- 2) ชาเมี่ยงก่า มีรสฝาด ไม่นิยมนำมาทำผลิตภัณฑ์
- 3) ชาอีอ่าม หรือชาอัสสัมยอดแดง มีขนอ่อนที่ใบ และมีรสขม ไม่อร่อย

ซึ่งเกษตรกรทั้ง 4 พื้นที่ มีแปรรูปชาอัสสัมออกเป็น 2 รูปแบบหลักๆ ได้แก่

- 1) ชาหมัก หรือเมี่ยง ใช้สำหรับเคี้ยวบริโภคในครัวเรือน
- 2) แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชา เช่น ใบชาแห้ง สำหรับชงดื่ม หรือ จำหน่ายใบชาให้กับโรงงานแปรรูปนอกพื้นที่ เป็นต้น (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ชาเมี่ยง (A) และใบชาแห้ง (B)

ในด้านของการจัดการสวนนั้นเกษตรกรมีการตัดหญ้ากำจัดวัชพืชในช่วงที่วัชพืชโต และมีการตัดแต่งกิ่งในช่วงเดือน ม.ค. – ก.พ. โดยการตัดแต่งนั้นมียู 2 ลักษณะ ได้แก่ 1. การตัดแต่งต้นชาแบบตัดหนักโดยตัดให้เหลือแต่ตอ เพื่อให้มีการแตกกิ่งขึ้นมาใหม่ 2. การตัดแต่งกิ่งแบบเบา โดยตัดแต่งให้มีความโปร่ง เพื่อรองรับการแตกกิ่ง แตกยอดใหม่

ช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวชาเมี่ยง และชาอัสสัมเพื่อให้ได้คุณภาพที่ดี (ภาพที่ 5) พบว่า

1. การเก็บชาเมี่ยง และชาอัสสัม

- ช่วงเดือน ม.ค. – ก.พ. ทำการรูดใบชาที่ต้นทิ้งเพื่อให้เกิดการแตกใบใหม่ขึ้น
- ช่วงเดือน เม.ย. – พ.ค. ใบชาโปร่ง ทำการเริ่มเก็บเมี่ยง หลังจากเก็บเสร็จหยุด 1 เดือน
- ช่วงเดือน ก.ค. – ส.ค. เก็บใบชาครั้งที่ 2 หยุด 1 เดือน
- ช่วงเดือน ต.ค. – พ.ย. เก็บใบชาครั้งที่ 3 (เรียกว่าเมี่ยงเหมย)

2. การเก็บชาให้ได้คุณภาพ

- ช่วงเดือน เม.ย. – พ.ค. เป็นช่วงก่อนเข้าฤดูฝน ใบชาที่ได้จะมีคุณภาพดีที่สุด
- ช่วงเดือน ก.ค. – ส.ค. เป็นช่วงที่คุณภาพชาต่ำ เนื่องจากเป็นช่วงฤดูฝนทำให้ใบชามีปริมาณน้ำเยอะ และใช้เวลาในการนวดแปรรูปที่นาน
- ช่วงเดือน ต.ค. – พ.ย. ใบชามีปริมาณน้ำที่น้อยลง ทำให้คุณภาพระดับปานกลาง

ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวและการจัดการสวนชาอัสสัม

ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
ฤดูใบชา / ตัดแต่งต้นชา			เก็บชา / ชาเมือง รอบที่ 1								
			ชาคุณภาพดีที่สุด								
						เก็บชา / ชาเมือง รอบที่ 2					
						ชาคุณภาพต่ำ					
									เก็บชา / ชาเมือง รอบที่ 3		
									ชาคุณภาพปานกลาง		

ภาพที่ 5 ช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวและการจัดการสวนชาอัสสัม

กิจกรรมที่ 3 ศึกษาแนวทางการพัฒนาต่อยอดสำหรับสร้างมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจชาอัสสัมบนพื้นที่สูง

เก็บตัวอย่างชาอัสสัมในแต่ละพื้นที่แหล่งปลูกชาโดยเก็บตัวอย่างชาจากต้นชาที่มีอายุยาวนาน ซึ่งสามารถแบ่งช่วงอายุของต้นชาอัสสัมได้เป็น 2 ช่วง คือ ต้นที่อายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี และต้นที่อายุมากกว่า 50 ปี เพื่อศึกษาแนวทางการพัฒนาต่อยอดสำหรับสร้างมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจชาอัสสัมบนพื้นที่สูง จำนวนตัวอย่าง 5 พื้นที่ ได้แก่

- 1) บ้านปางมะกล้วย (ป่าแป๋) อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่
- 2) บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ. พร้าวก จ. เชียงใหม่
- 3) บ้านปางมะโอ อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่
- 4) บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ. เชียงราย
- 5) บ้านปางบง ต. เทพเสด็จ อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง)

1. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใบชาอัสสัม

โดยแสดงลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างใบชาอัสสัม แสดงดังตารางที่ 3-1 จากลักษณะทางกายภาพใบชาที่ต้นชาไม่เกิน 50 ปีนั้น พบว่า ใบชามีสีเขียวอ่อน-เข้ม สด ใบมีลักษณะมัน และลักษณะสมบูรณ์ ส่วนใบชาที่ต้นชาอายุมากกว่า 50 ปีนั้น พบว่า ใบชาบางแหล่งมีลักษณะใบเหมือนรอยโรค แมลง สีใบต่าง มีรอยแผล เป็นต้น โดยมีขนาดใบชาโดยเฉลี่ย ยาว 10 – 20 และกว้าง 4 – 8 เซนติเมตร

ตารางที่ 3-1 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างชาอัสสัมจากแหล่งปลูกพื้นที่ต่าง ๆ 5 แห่ง

พื้นที่แหล่งปลูกตัวอย่าง	รหัส (Coding)	ลักษณะทางกายภาพของใบชา	
		อายุไม่เกิน 50 ปี	อายุมากกว่า 50 ปี
1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่	PP		

ตารางที่ 3-1 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างชาอัสสัมจากแหล่งปลูกพื้นที่ต่าง ๆ 5 แห่ง

พื้นที่แหล่งปลูกตัวอย่าง	รหัส (Coding)	ลักษณะทางกายภาพของใบชา	
		อายุไม่เกิน 50 ปี	อายุมากกว่า 50 ปี
2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	MS		
3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ. เชียงใหม่	PMO		
4. บ้านาวี อ. แม่สรวย จ.เชียงราย รอบที่ 1	WWr1		
รอบที่ 2 แม่พริก	WWr2		
5. บ้านป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	PM		

จากการเก็บใบชาเพื่อการสกัดและวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ โดยเก็บที่ตำแหน่งยอด
จำนวน 1 ยอด และใบ จำนวน 2 ใบ และส่งวิเคราะห์ทางพฤกษศาสตร์โดยการส่งตัวอย่างใบชาและก้านใบที่

สมบุรณ์ (Voucher specimens) เพื่อไปจัดทำข้อมูลพืช สมุนไพร โดยเจ้าหน้าที่พฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเก็บทั้งส่วนใบชา และส่วนก้านใบที่ยังสมบุรณ์ แสดงผลการทำข้อมูลพฤกษศาสตร์ อ้างอิง และบันทึกข้อมูล วัน เดือน ปี ที่เก็บ (date/month/year) สถานที่เก็บ (locality) ถิ่นที่อยู่ (habitat) บันทึกข้อมูล (notes) ลักษณะต่างๆ ของพืชที่ไม่สามารถเห็นได้เมื่อตัวอย่างแห้ง เช่น ความสูงทั้งต้น เปลือก กิ่ง สีสองใบ เป็นต้น ชื่อและหมายเลขผู้เก็บ (collector name, collector number) และระบุว่าเป็น voucher specimen ของการวิจัยเรื่องใด ซึ่งผลจากการศึกษาทางพฤกษศาสตร์โดยนักพฤกษศาสตร์ คุณ วรณนรี เจริญทรัพย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งแสดงการอ้างอิงเป็น Voucher number ดังตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 ฐานข้อมูลอ้างอิงทางพฤกษศาสตร์ของใบชาอัสสัมจากแหล่งปลูกพื้นที่ต่าง ๆ 5 แห่ง

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูกตัวอย่าง	อายุต้นชาอัสสัม	Voucher number
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	NI
PP-50		<50 ปี	0023335
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	0023321
MS-50		<50 ปี	0023322
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	0023319
PMO-50		<50 ปี	0023334
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	≥50 ปี รอบที่ 1	0023336
WW-50r1		<50 ปี รอบที่ 1	0023326
WW+50r2		≥50 ปี รอบที่ 2	0023339
WW-50r2		<50 ปี รอบที่ 2	0023338
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง)	≥50 ปี	0023324
PM-50r2		<50 ปี	0023325

หมายเหตุ รหัสตัวอย่างต่อด้วย -50 หมายถึง ใบชาจากต้นอายุน้อยกว่า 50 ปี
รหัสตัวอย่างต่อด้วย +50 หมายถึง ใบชาจากต้นอายุ 50 ปีขึ้นไป

ใบชาที่เก็บจากบ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่ ที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไป (PP+50) มีลักษณะใบพร้อม ก้านใบและองค์ประกอบของใบมีสภาพที่ไม่สมบุรณ์ และใบไหม้ และแห้งกรอบ ไม่มีใบที่ติดพร้อมก้านใบที่มี สภาพสมบุรณ์ในช่วงเวลาการเก็บตัวอย่าง จึงไม่สามารถศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ จึงทำให้ไม่สามารถ เติบโตเลี้ยงทางพฤกษศาสตร์และบันทึก Voucher number ได้

สารสกัดใบชาและค่าร้อยละของสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 3-3 โดยค่าร้อยละ (%yield) ของสารสกัด

การคำนวณหาปริมาณสารสกัดใบชาอัสสัม (% Yield Crude Extract)

สูตร

$$\text{Yield Crude Extract} = \frac{a}{b} \times 100\%$$

a = ปริมาณสารสกัดที่ได้ (กรัม)

b = ปริมาณตัวอย่างแห้งที่ใช้ในการสกัด (กรัม)

ตารางที่ 3-3 ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณ และค่าร้อยละของสารสกัดใบชาอัสสัมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

พื้นที่แหล่งปลูกตัวอย่าง	อายุต้นชาอัสสัม	น้ำหนักใบชาสด (กก.)	น้ำหนักใบชาแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	%yield	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด
1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	1.8	450	3.91	0.87	 สีน้ำตาลปนเหลือง มีตะกอนกระจายตัวและหนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นพืชตระกูลส้ม
	<50 ปี	1.9	450	2.91	0.65	 สีน้ำตาลดำปนเขียว หนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นพืชตระกูลส้ม
2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	2.42	590	8.29	1.40	 สีน้ำตาลปนเหลือง มีตะกอนกระจายตัวและหนืดเล็กน้อย
	<50 ปี	2.22	640	8.39	1.31	 สีน้ำตาลปนเหลือง และหนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่น

ตารางที่ 3-3 ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณ และค่าร้อยละของสารสกัดใบชาอัสสัมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

พื้นที่แหล่งปลูกตัวอย่าง	อายุต้นชาอัสสัม	น้ำหนักใบชาสด (กก.)	น้ำหนักใบชาแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	%yield	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด
						พืชชิตรัส
3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	2.8	600	2.35	0.39	 สีน้ำตาลปนเหลือง และหนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นพืชชิตรัส
	<50 ปี	3.0	680	3.08	0.45	 สีน้ำตาลดำปนเขียว หนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นพืชชิตรัส
4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	≥50 ปี รอบที่ 1	1.0	300	6.03	2.01	 สีน้ำตาลปนเหลืองทอง และหนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นพืชชิตรัส
	<50 ปี รอบที่ 1	1.64	380	4.65	1.22	 สีน้ำตาลปนเขียว มีตะกอนกระจายตัวและหนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นพืชชิตรัส
	≥50 ปี รอบที่ 2	2.5	700	6.49	0.93	 สีน้ำตาลดำปนเขียว หนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นพืชชิตรัส

ตารางที่ 3-3 ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณ และค่าร้อยละของสารสกัดใบชาอัสสัมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

พื้นที่แหล่งปลูกตัวอย่าง	อายุต้นชาอัสสัม	น้ำหนักใบชาสด (กก.)	น้ำหนักใบชาแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	%yield	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด
						ตรัส
	<50 ปี รอบที่ 2	1.5	400	9.43	2.36	 สีน้ำตาลปนเขียว และหนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นพีชชีตรัส
5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง)	≥50 ปี	2.0	450	1.94	0.43	 สีน้ำตาลดำปนเขียว มีตะกอนกระจายตัวและหนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นพีชชีตรัส
	<50 ปี	2.37	570	2.66	0.47	 สีน้ำตาลปนเขียว และหนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นพีชชีตรัส

จากผลการศึกษา ตารางที่ 3-3 พบว่า สารสกัดหยาบของใบชาอัสสัมจากแหล่งต่าง ๆ คือ (1) บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง (2) บ้านแม่สายป่าเมี่ยง อ.พร้าว (3) บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว (4) บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย รอบที่ 1 และ รอบที่ 2 และ (5) บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง) และแต่ละแหล่งเก็บตัวอย่างสองช่วงอายุ คือ ใบชาจากต้นที่อายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี (มีรหัสเป็น -50) และต้นที่อายุมากกว่า 50 ปี (มีรหัสเป็น +50) รวมทั้งหมด 12 ตัวอย่าง และนำมาสกัดหยาบด้วยเอทานอล 95% (w/v) เพื่อศึกษาสมบัติต่าง ๆ โดยจากผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพและค่าร้อยละผลได้ (%Yield) ของสารสกัดหยาบ โดยพบว่า ลักษณะของสารสกัดมีสีน้ำตาลปนเหลือง จนถึงสีน้ำตาลอ่อน และมีกลิ่นหอมอ่อนๆ เฉพาะตัวของกลิ่นสารสกัดใบชาซึ่งคล้ายกลิ่นพีชชีตรัส และสารสกัดมีความหนืดเล็กน้อย และค่าร้อยละผลได้ (%Yield) ของสารสกัดหยาบทั้ง 12 ตัวอย่าง พบมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.39-2.36 ซึ่งค่า %Yield ของสารสกัดใบชาอัสสัมที่มีค่าสูงไม่ได้มีความสัมพันธ์กับอายุของต้นชา และพบว่า สารสกัดจากใบชาที่เก็บจาก

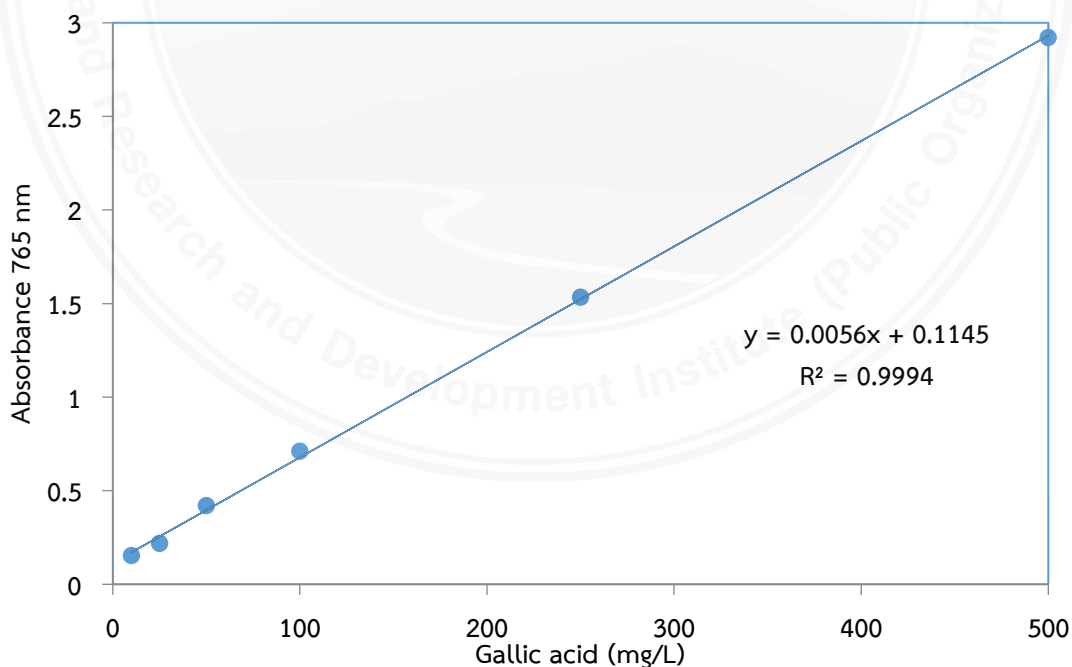
บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ. เชียงราย รอบที่ 2 (WW-50r2) ที่มีอายุต้นชาไม่น้อยกว่า 50 ปี พบค่า %Yield ของสารสกัดสูงที่สุดที่ 2.36% และพบว่า สารสกัดจากใบชาที่เก็บจาก บ้านปางมะโอ อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่ (PMO+50) ที่มีอายุต้นชาสูงกว่า 50 ปี พบค่า %Yield ของสารสกัดต่ำที่สุดที่ 0.39%

2. ศึกษาสมบัติทางเคมีและวิเคราะห์คุณภาพเบื้องต้นของสารสกัดชาอัสสัม ได้แก่

1) วิเคราะห์ปริมาณสารพอลิฟีนอลรวม (Total polyphenol) โดยทำปฏิกิริยากับสาร Folin-Ciocalteu และวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer

โดยการชั่งน้ำหนักสารสกัดชาอัสสัมและละลายในเอทานอล และปั่นตกแยกเฉพาะส่วนน้ำเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกโดยรวมโดยการเตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu ประมาณ 10% สารละลาย อัมตั่วโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ที่ผ่านการกรอง และเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างเพื่อวิเคราะห์เทียบเป็นกราฟของสารมาตรฐาน โดยเตรียมตัวอย่างทดสอบจำนวน 3 ข้ว และวิเคราะห์ปฏิกิริยาด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยการสแกนความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ของการวัดปฏิกิริยา ซึ่งปริมาณฟีนอลิกรวม สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) มีรายงานว่า เป็นสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มหนึ่ง ซึ่งในการศึกษานี้ ได้วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอลในการเปลี่ยนสารละลาย Folin-Ciocalteu (molybdotung-stophosphoric heteropolyanion reagent) ที่มีสีเหลืองในสถานะที่เป็นต่างให้เป็น สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (molybdotungstophosphate blue) และวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับ สารมาตรฐาน Gallic acid เป็น Gallic Acid Equivalence (GAE) ซึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญใน สารสกัด แสดงกราฟของสารมาตรฐานดังรูปที่ 6 และปริมาณฟีนอลิกรวม ดังตารางที่ 3-4 และรูปที่ 7

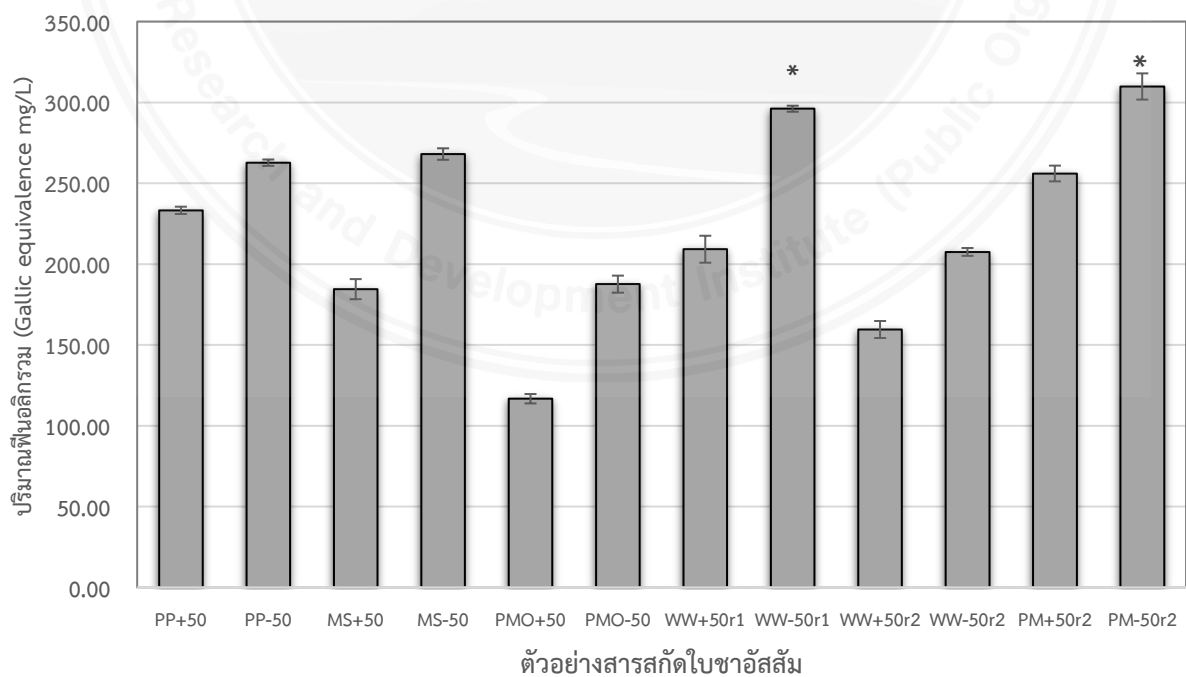
ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ Gallic acid



รูปที่ 6 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 3-4 ปริมาณสารพอลิฟีนอลิกรวม (Total polyphenol content) ของสารสกัดใบชาอัสสัม

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูกตัวอย่าง	อายุต้นชาอัสสัม	Phenolic content (mg GAE/ g sample) (Mean±SD)
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	233.24±2.26
PP-50		<50 ปี	262.71±1.97
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	184.49±6.22
MS-50		<50 ปี	268.07±3.55
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	116.76±2.90
PMO-50		<50 ปี	187.59±5.29
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	≥50 ปี รอบที่ 1	209.20±8.30
WW-50r1		<50 ปี รอบที่ 1	296.10±1.86
WW+50r2		≥50 ปี รอบที่ 2	159.55±5.26
WW-50r2		<50 ปี รอบที่ 2	207.53±2.43
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ. ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (ศูนย์ พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง)	≥50 ปี	256.04±4.88
PM-50r2		<50 ปี	309.85±8.10



รูปที่ 7 ปริมาณสารพอลิฟีนอลิกรวม (Total polyphenol content) ของสารสกัดใบชาอัสสัม

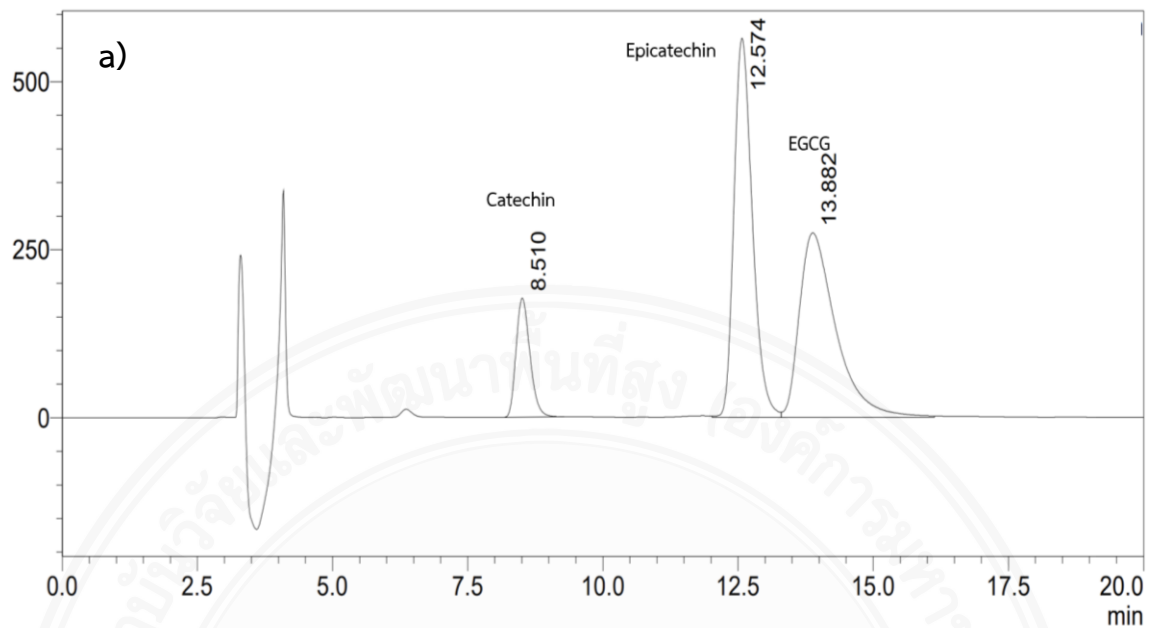
จากผลการศึกษา ปริมาณสารพอลิฟีนอลิกรวม (Total polyphenol content) ของสารสกัดใบชาอัสสัม พบว่า สารสกัดใบชาอัสสัมด้วย 95% ethanol ตัวอย่างละ 1 กรัม มีปริมาณสารพอลิฟีนอลิกเทียบเท่ากับปริมาณสารมาตรฐาน Gallic acid หรือ Gallic acid equivalence (GAE) เท่ากับ 116.76 ± 2.90 ถึง 309.85 ± 8.10 มิลลิกรัม GAE ทั้งนี้ พบว่า ตรวจพบปริมาณพอลิฟีนอลิกสูงสุดในสารสกัดใบชาที่เก็บจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง) ที่มีอายุต้นชาน้อยกว่า 50 ปี และบ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย รอบที่ 1 (WW-50r2) ที่มีอายุต้นชาน้อยกว่า 50 ปี ซึ่งปริมาณพอลิฟีนอลิกสูงสุดที่สกัดได้จากใบชาสองแหล่งนี้ ไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) แต่พบสูงกว่าในตัวอย่างอื่น ๆ ทั้งนี้ จากผลวิเคราะห์ปริมาณพอลิฟีนอลิกรวม พบว่า ใบชาที่เก็บจากทุกแหล่งที่ต้นชาที่อายุน้อยกว่า 50 ปี ตรวจพบปริมาณพอลิฟีนอลิกรวมสูงกว่าในสารสกัดใบชาที่อายุ 50 ปีขึ้นไป เป็นแนวโน้มเดียวกันในสารสกัดใบชาจากทุกแหล่ง ทั้งนี้ สารสำคัญต่าง ๆ ที่พบในสารสกัดพืช ส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มพอลิฟีนอลิก ซึ่งอายุของต้นชาที่มาจากแหล่งเดียวกัน อาจมีกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับปริมาณสารพอลิฟีนอลิกได้ และอาจมีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์หลักหรือสารสำคัญ (Active compounds) แต่ละชนิดที่เป็นสารในกลุ่มพอลิฟีนอลิกแตกต่างกันได้

2) วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญหลัก (major component) หรือสารออกฤทธิ์ (active component) โดยวิธี HPLC โดยศึกษาปริมาณสารสำคัญหลัก คือ ศึกษาปริมาณสาร Catechin Epicatechin และ EGCG ในสารสกัดของชาเมี่ยงหมักด้วยวิธี Reverse phase HPLC

สารสำคัญ องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบชาอัสสัม ซึ่งมีรายงานว่า มีสารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์และสารประกอบพอลิฟีนอล ๆ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ โดยเฉพาะฟลาโวนอยด์ในกลุ่มคาเทชิน (flavanols) ซึ่งพบว่ามีอยู่ในใบชาอัสสัมในปริมาณสูง โดยมีปริมาณร้อยละ 60-70 ของปริมาณพอลิฟีนอลทั้งหมด (Higdon & Frei, 2003) สารกลุ่มคาเทชินที่มีมากในใบชาอัสสัม คือ (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG) and (-)-epicatechin (EC) ปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในใบชาที่เก็บจากแหล่งพื้นที่ต่างกัน มีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ โดยพบคาเทชินชนิด EGC, EGCG, EC และ ECG ในปริมาณมาก ส่วนคาเทชินชนิด GC, GCG, C และ CG พบในปริมาณ น้อย (สายลมและคณะ, 2552) โดยผลการวิเคราะห์สารคาเทชิน Epicatechin และ Epigallocatechin (EGCG) ในสารสกัดใบชาอัสสัม แสดงดังรูป 8 - 11 และตารางที่ 3-5

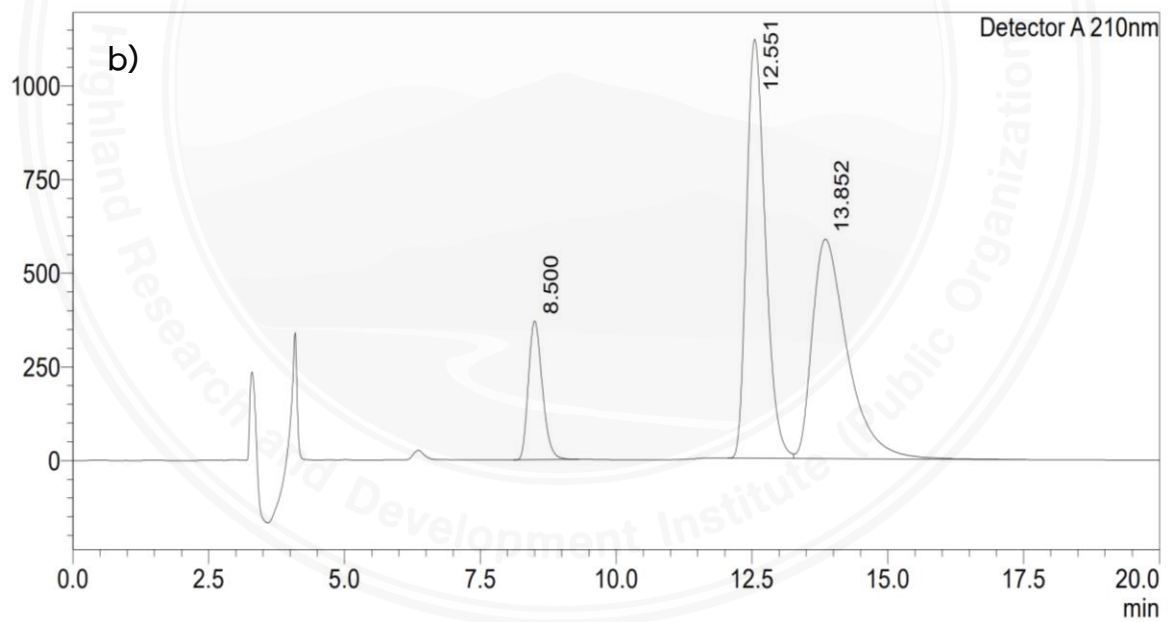
<Chromatogram>

mV

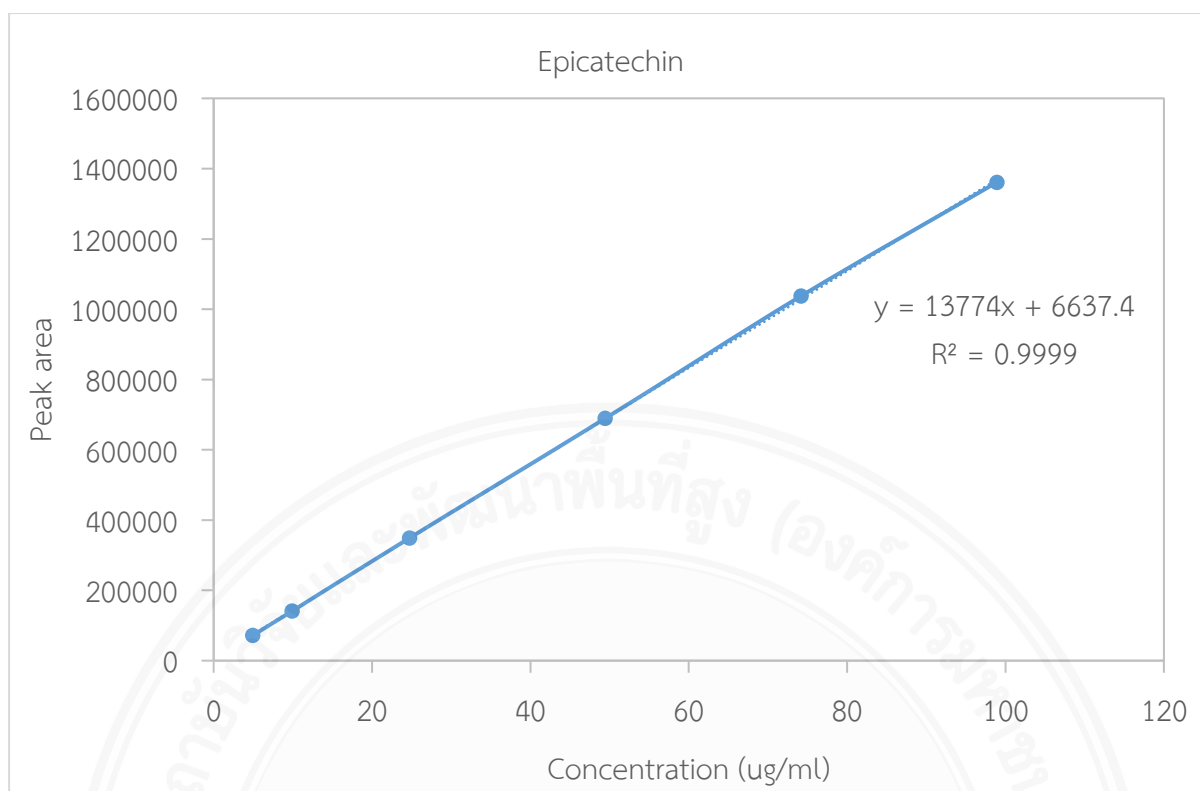


<Chromatogram>

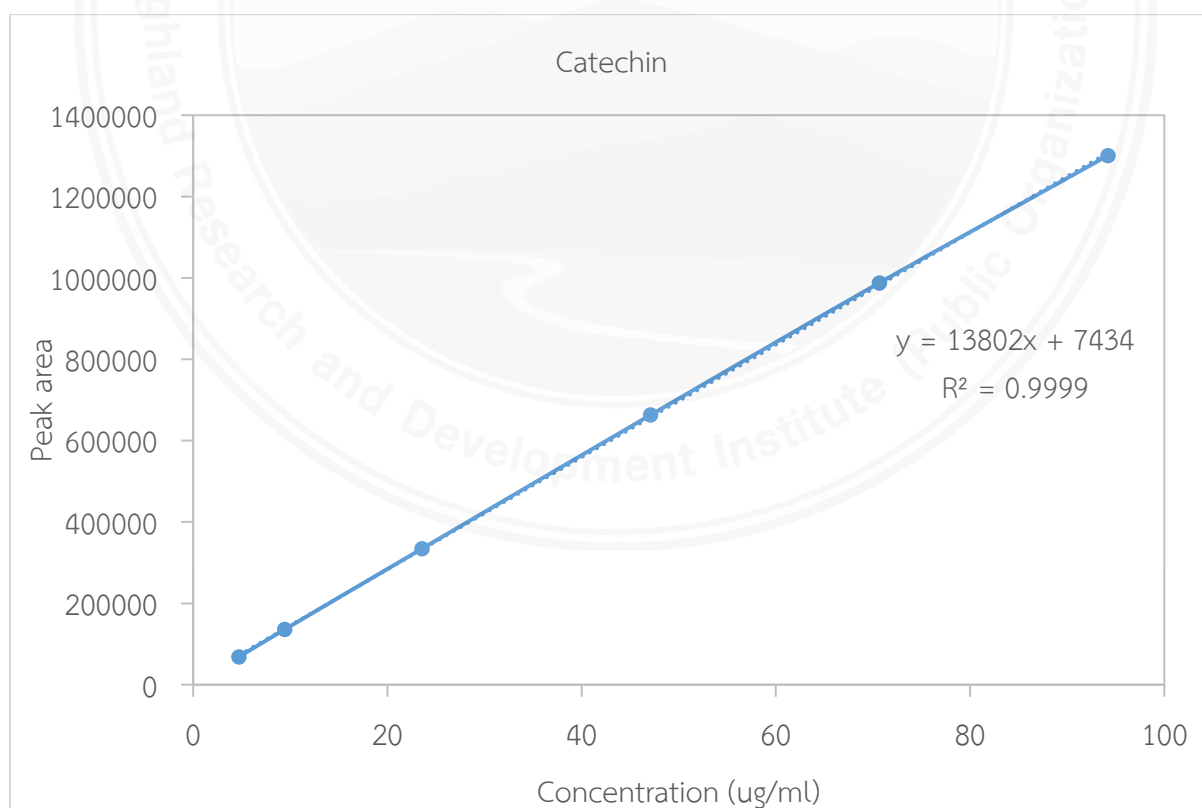
mV



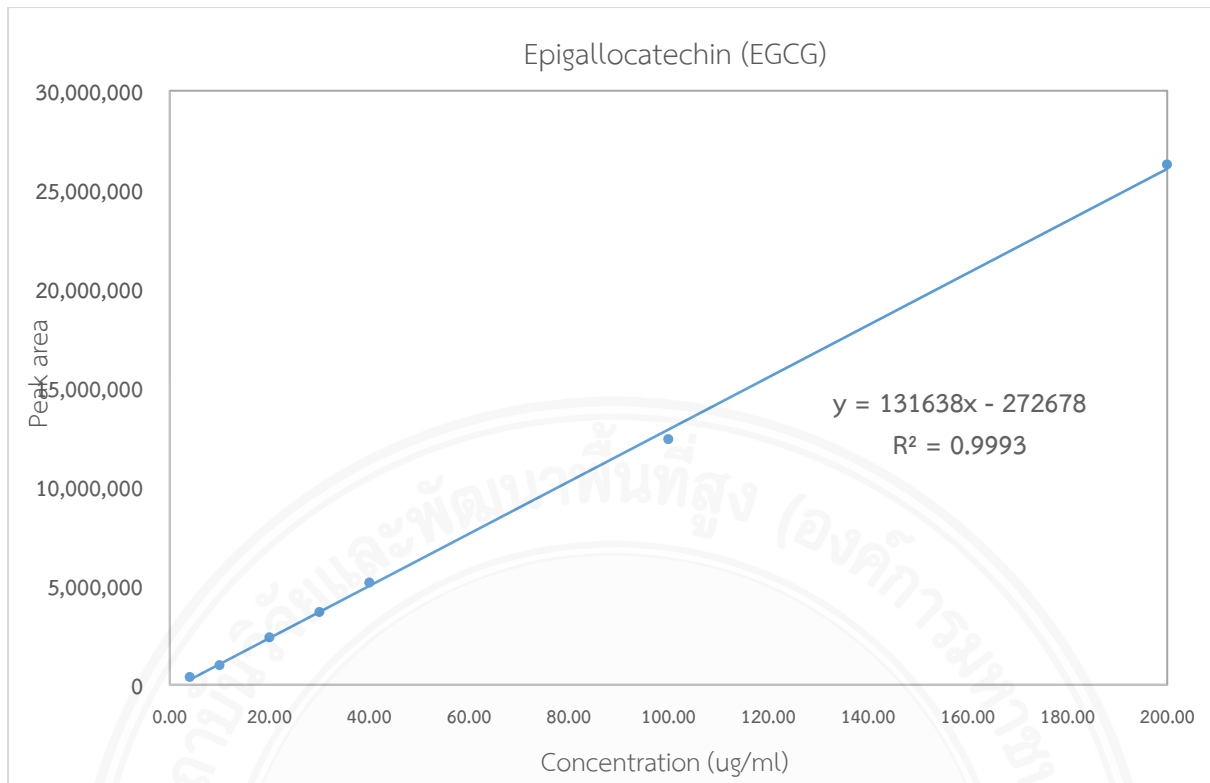
รูปที่ 8 โคมาโทแกรมของ a) สารมาตรฐาน Catechin, Epicatechin และ EGCG และ b) ตัวอย่างสารสกัดใบชาอัสสัม



รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานระหว่าง peak area และ ความเข้มข้นของ Epicatechin



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานระหว่าง peak area และ ความเข้มข้นของ Catechin



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานระหว่าง peak area และ ความเข้มข้นของ Catechin

ตารางที่ 3-5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Catechin, Epicatechin และ Epigallocatechin (EGCG) ในสารสกัดหยาบ ใบชาอัสสัม

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูกตัวอย่าง	อายุต้นชาอัสสัม	สารสำคัญ	Concentration (ug/mL) (Mean±SD)
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	Catechin	6.42±0.19
			Epicatechin	20.30±1.97
			Epigallocatechin (EGCG)	53.75±1.75
PP-50		<50 ปี	Catechin	21.20±1.33
			Epicatechin	69.21±5.76
			Epigallocatechin (EGCG)	70.09±6.62
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	Catechin	8.60±0.00
			Epicatechin	72.98±5.29
			Epigallocatechin (EGCG)	73.71±1.24
MS-50		<50 ปี	Catechin	14.65±0.73
			Epicatechin	87.40±2.28
			Epigallocatechin (EGCG)	79.35±2.15
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	≥50 ปี	Catechin	1.68±0.03
			Epicatechin	38.13±5.19
			Epigallocatechin (EGCG)	38.52±3.05
PMO-50		<50 ปี	Catechin	6.40±0.02
			Epicatechin	42.28±1.93
			Epigallocatechin (EGCG)	44.37±1.17

ตารางที่ 3-5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Catechin, Epicatechin และ Epigallocatechin (EGCG) ในสารสกัดหายาใบชาอัสสัม (ต่อ)

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก ตัวอย่าง	อายุต้น ชาอัสสัม	สารสำคัญ	Concentration (ug/mL) (Mean±SD)
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	≥50 ปี รอบที่ 1	Catechin	11.47±1.52
			Epicatechin	44.75±5.22
			Epigallocatechin (EGCG)	40.59±2.14
WW-50r1		<50 ปี รอบที่ 1	Catechin	18.17±0.05
			Epicatechin	64.18±2.37
			Epigallocatechin (EGCG)	61.37±0.16
WW+50r2		≥50 ปี รอบที่ 2	Catechin	2.58±0.04
			Epicatechin	25.78±2.78
			Epigallocatechin (EGCG)	21.04±1.61
WW-50r2		<50 ปี รอบที่ 2	Catechin	6.19±0.05
			Epicatechin	36.27±0.38
			Epigallocatechin (EGCG)	35.53±1.60
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพ เสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ (ศูนย์พัฒนา โครงการหลวงป่าเมี่ยง)	≥50 ปี	Catechin	18.44±0.01
			Epicatechin	62.43±0.32
			Epigallocatechin (EGCG)	65.19±0.02
PM-50r2		<50 ปี	Catechin	20.92±1.96
			Epicatechin	79.21±1.05
			Epigallocatechin (EGCG)	94.96±3.03

จากผลการทดลอง ตารางที่ 3-5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกที่เป็นสารสำคัญหลักมีรายงานพบในใบชา คือ สาร Catechin, Epicatechin, EGCG ในสารสกัดใบชาอัสสัม พบว่า ใบชาที่เก็บจากทุกแหล่งที่ต้นชาที่อายุน้อยกว่า 50 ปี ตรวจพบปริมาณสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดสูงกว่าในสารสกัดใบชาที่อายุ 50 ปีขึ้นไป เป็นแนวโน้มเดียวกันในสารสกัดใบชาจากทุกแหล่ง ซึ่งการตรวจพบปริมาณสารสำคัญหลักทั้ง Catechin, Epicatechin, EGCG ในใบชาที่มาจากต้นชาอายุ < 50 ปี สูงกว่าใบชาจากต้นชาอายุ ≥50 ปี โดยปริมาณสารสำคัญหลักทั้ง 3 ชนิด สัมพันธ์กับปริมาณพอลิฟีนอลรวมที่พบในใบชาที่มาจากต้นชาอายุ < 50 ปี สูงกว่าใบชาจากต้นชาอายุ ≥50 ปี เช่นกัน

ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาของใบชา พบว่า ตรวจพบปริมาณ Catechin สูงสุดในสารสกัดใบชาที่เก็บจากบ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่ (PP-50) และ ใบชาจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง) รอบที่ 2 (PM-50r2) ซึ่งพบในต้นชาที่มีอายุต้นชาน้อยกว่า 50 ปี และตรวจพบปริมาณ Epicatechin สูงสุดในใบชาที่เก็บจาก บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง) (PM-50r2) และพบในใบชาอายุต้นชาน้อยกว่า 50 ปี นอกจากนี้ ตรวจพบปริมาณสาร EGCG สูงสุดในใบชาที่มาจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) และพบในใบชาอายุต้นชาน้อยกว่า 50 ปี ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญทั้ง Catechin, Epicatechin, EGCG สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ที่พบในใบชาที่เก็บจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง) (PM-50r2) พบในใบชาอายุต้นชาน้อยกว่า 50 ปี นอกจากนี้ ตรวจพบปริมาณสาร EGCG สูงสุดในใบชาที่มาจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) พบในใบชาอายุต้นชาน้อยกว่า 50 ปี

5. ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสำหรับใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ดังนี้

1) ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ เช่น แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร *E. coli*, *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง *Cutibacterium acnes* หรือชื่อเดิม คือ *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) แบคทีเรียก่อโรคช่องปาก เช่น แบคทีเรีย *Streptococcus mutans* สาเหตุฟันผุ ฤทธิ์ต้านยีสต์ *Candida albicans* สาเหตุคราบพลัคที่ฟัน กลิ่นปากและฝ้า ในช่องปาก เป็นต้น โดยทดสอบด้วยวิธี broth dilution เพื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในการยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibitory concentrations, MICs) แสดงผลการทดสอบ ดังตารางที่ 3-6

ตารางที่ 3-6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentrations; MICs) ของสารสกัดใบชา

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibitory concentrations, MICs) ของเชื้อทดสอบ (mg/mL)				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. acnes</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062
PP-50		0.062	0.031	0.062	0.062	0.031
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	0.062	0.031	0.062	0.062	0.062
MS-50		0.031	0.031	0.031	0.031	0.031
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062
PMO-50		0.062	0.062	0.062	0.062	0.062
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031
WW-50r1		0.031	0.015	0.031	0.031	0.015
WW+50r2		0.031	0.031	0.031	0.031	0.031
WW-50r2		0.031	0.031	0.031	0.031	0.031

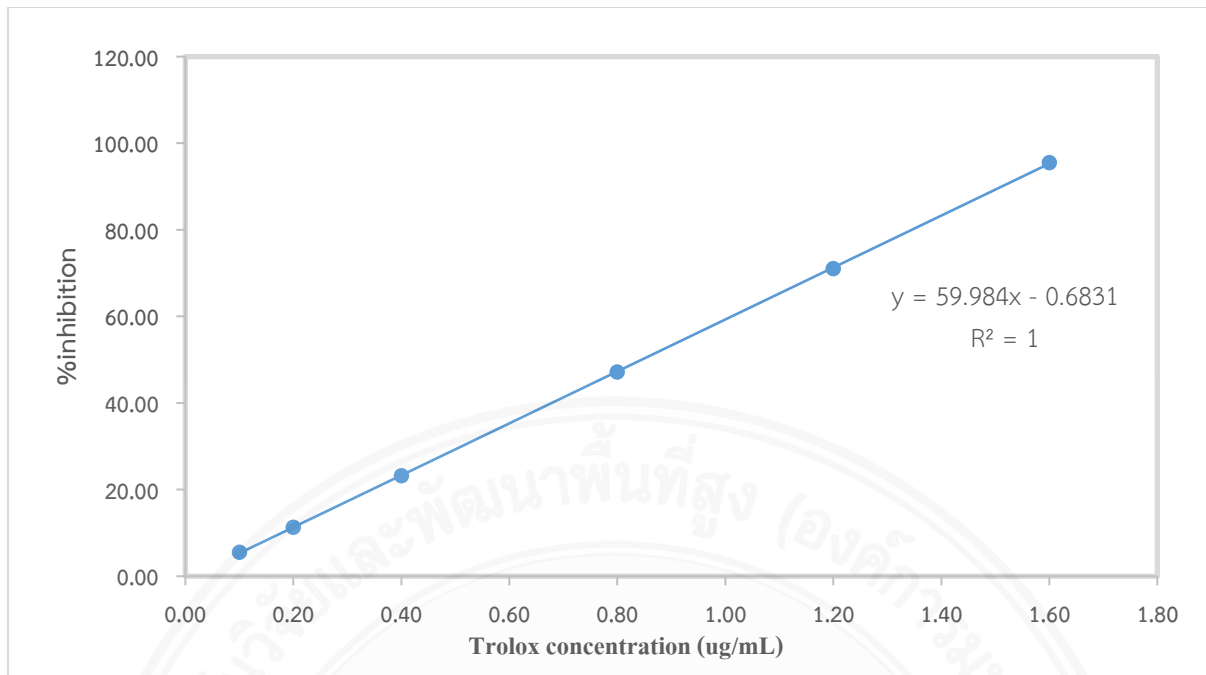
สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibitory concentrations, MICs) ของเชื้อ ทดสอบ (mg/mL)				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. acnes</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ	0.031	0.015	0.031	0.015	0.015
PM-50r2	อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	0.031	0.015	0.031	0.015	0.015
Gentamicin 10 mg/ml	ยาปฏิชีวนะ (positive control)	0.05	0.05	0.05	0.05	Not detected
Cyclopirox olamine 10 mg/ml	ยาปฏิชีวนะ (positive control)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	0.084

จากผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการต้านแบคทีเรียและยีสต์ เชื้อที่เป็นตัวแทนสาเหตุโรคในระบบทางเดินอาหาร ก่อสิว และก่อปัญหาช่องปาก ดังตารางที่ 6 พบว่า สารสกัดทุกตัวอย่างจากทุกแหล่งและทั้ง 2 ช่วงอายุ สามารถต้านจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 5 ชนิด พบว่า มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์ดีใกล้เคียงกับผลของชุดควบคุมยาปฏิชีวนะ และพบว่า ค่า MIC ของสารสกัดใบชาทั้ง 2 ช่วงอายุ ซึ่งทุกตัวอย่างมีฤทธิ์ใกล้เคียงกันโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.015-0.062 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยพบว่า สารสกัดใบชาจากบ้านป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด (PM-50r2) แสดงผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคทดสอบดีที่สุด ทั้งนี้ จากผลการทดสอบ สารสกัดใบชาอัสสัมทุกตัวอย่างสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารสกัดเพื่อต้านจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร แบคทีเรียก่อสิวก่อปัญหาผิว และเชื้อโรคสาเหตุโรคช่องปากได้ จากผลการต้านแบคทีเรียและยีสต์ที่เป็นตัวแทนของปัญหาส่วนต่าง ๆ ได้

2) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหรืออนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) โดยใช้วิธีการที่ศึกษาที่เหมาะสม เช่น ABTS assay, FRAP หรือ Lipid peroxidation assay

- ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธีการ ABTS assay (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid)) free radical decolorization assay (Saenjum et al., 2010)

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสี ABTS^{•+} ของสารสกัดหยาบใบชาอัสสัมโดยวิเคราะห์และแสดงผลเป็นค่า Trolox Equivalent Antioxidant capacity (TEAC) เทียบเท่า Trolox ต่อสารสกัด แสดงกราฟสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 12 และผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ดังตารางที่ 3-7



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้ง (% Inhibition) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

ตารางที่ 3-7ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ของสารสกัดใบชาอัสสัม

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	Antioxidant capacity g TEAC/g sample (Mean±SD)	IC ₅₀ (mg/mL)
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	1.40±0.12	6.29±0.06
PP-50		2.44±0.04*	3.10±0.04*
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	2.57±0.04	2.76±0.05*
MS-50		2.32±0.04	3.47±0.05
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	2.03±0.04*	4.33±0.03*
PMO-50		1.72±0.06	5.26±0.03
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	1.90±0.13	4.47±0.03
WW-50r1		2.40±0.09*	3.23±0.05*
WW+50r2		2.38±0.07	3.28±0.03
WW-50r2		2.39±0.14	3.26±0.02
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	2.24±0.08	3.74±0.02
PM-50r2		2.61±0.01*	2.43±0.03*

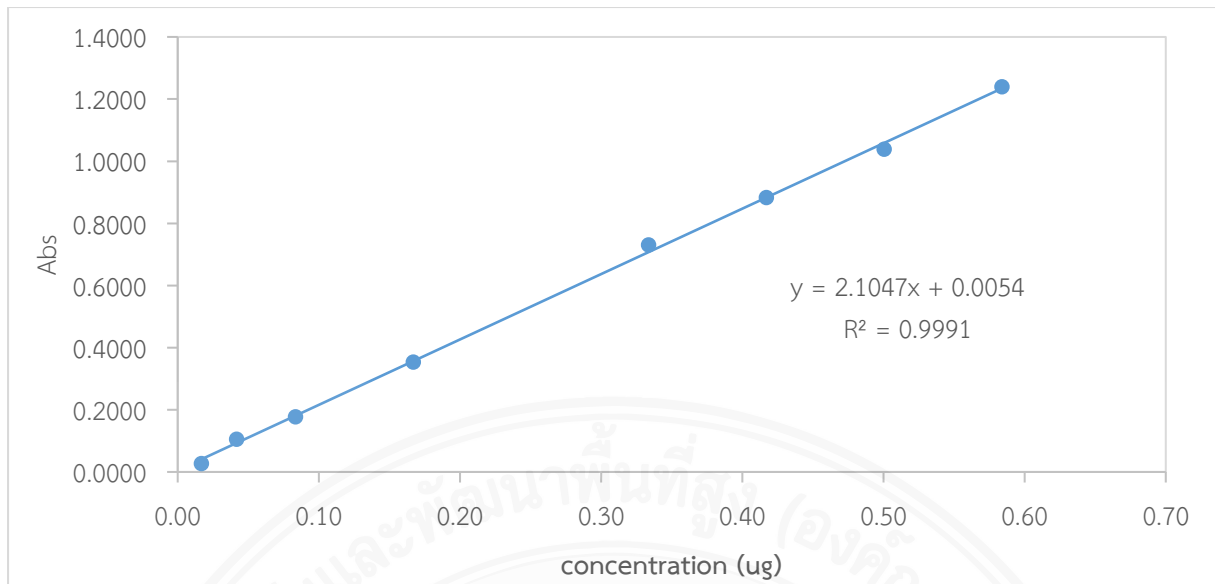
หมายเหตุ * หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกันระหว่างสารสกัดใบชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี (-50) และ 50 ปีขึ้นไป (+50) ที่มาจากแหล่งเดียวกัน

จากผลการทดลอง กราฟสารมาตรฐานรูปที่ 12 ตารางผลการทดลองที่ 3-7 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัดหยาบใบชาอัสสัม จากแหล่งต่าง ๆ แหล่งตัวอย่างละ 2 ช่วงอายุ และสกัดด้วยเอทานอล พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัดหยาบใบชา เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox พบว่า ที่ปริมาณสารสกัด 1 กรัมมีฤทธิ์เทียบเท่าฤทธิ์ของสารมาตรฐาน Trolox ปริมาณ 1.40±0.12 ถึง 2.61±0.01 กรัม และสารสกัดใบชาจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) ตรวจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดใบชาตัวอย่างอื่นๆ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox พบว่า ที่ปริมาณสารสกัด 1 กรัมมีฤทธิ์เทียบเท่าฤทธิ์ของสารมาตรฐาน Trolox ปริมาณ 2.61±0.01 มิลลิกรัม และที่ความเข้มข้นสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ร้อยละ 50 เท่ากับ 2.43±0.03 mg/mL และพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัดใบชาจากบ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่ ที่ใบชาจากต้นที่มีอายุมากกว่า 50 ปี (PP+50) มีฤทธิ์ต่ำที่สุด โดยฤทธิ์สารสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox พบว่า ที่ปริมาณสารสกัด 1 กรัม สารสกัดหยาบด้วย ethanol มีฤทธิ์เทียบเท่าฤทธิ์ของสารมาตรฐาน Trolox ปริมาณเท่ากับ 1.40±0.12 และที่ความเข้มข้นสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ร้อยละ 50 เท่ากับ 6.29±0.06 mg/mL ซึ่งแนวโน้มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ที่พบสูงสุดในสารสกัด ใบชาจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวม และสารสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบปริมาณสูงที่สุดเช่นกัน

ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัดใบชาจาก 2 ช่วงอายุต้นใบชาที่มาจากแหล่งเดียวกัน พบว่า ส่วนใหญ่ใบชาที่มีอายุการปลูกน้อยกว่า 50 ปี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ สูงกว่าใบชาที่มีอายุการปลูก 50 ปีขึ้นไป ยกเว้นใบชาจากบ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว และบ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว ที่ใบชาที่มีอายุการปลูก 50 ปีขึ้นไป มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ สูงกว่าใบชาที่มีอายุการปลูกน้อยกว่า 50 ปี ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ จากทั้ง 2 แหล่งนี้ที่ไม่สัมพันธ์กับปริมาณสารสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบในใบชาอายุน้อยกว่าสูงกว่าใบชาอายุ 50 ปีขึ้นไป อาจเนื่องมาจากผลรวมของสารอื่นๆ ที่ไม่ได้วิเคราะห์ เช่น อัลคาลอยด์ สารฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นๆ สเตียรอยด์ ไตรเทอปีนอยด์ หรือแทนนิน ที่มีรายงานว่ามักพบในใบพืชและเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน (Batubara et al., 2020)

- ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธีการ FRAP (Ferric reducing/antioxidant power) (Benzie and Strain, 1996)

เป็นการตรวจวัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่งมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร และแปลผลความสามารถในการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value โดยเทียบกับกราฟสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ดังรูปที่ 13 และแสดงผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังตารางที่ 3-8



รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน FeSO_4

ตารางที่ 3-8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดใบชาอัสสัม

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	มิลลิกรัมเทียบเท่า FeSO_4 /1 กรัม สารสกัด $\pm$ SD	IC_{50} (mg/mL)
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	112.71 $\pm$ 2.49	7.93 $\pm$ 0.41
PP-50		356.02 $\pm$ 0.01*	4.17 $\pm$ 0.23*
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	273.31 $\pm$ 5.54	3.91 $\pm$ 0.17
MS-50		395.5 $\pm$ 0.94*	4.18 $\pm$ 0.13*
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	121.12 $\pm$ 0.17	7.28 $\pm$ 0.36
PMO-50		179.31 $\pm$ 0.11*	6.77 $\pm$ 0.43*
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	154.28 $\pm$ 3.75	7.15 $\pm$ 0.38
WW-50r1		351.55 $\pm$ 1.95*	4.23 $\pm$ 0.24*
WW+50r2		277.61 $\pm$ 1.25	3.86 $\pm$ 0.61
WW-50r2		311.76 $\pm$ 2.35*	3.74 $\pm$ 0.22*
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	231.67 $\pm$ 0.42	3.96 $\pm$ 0.55
PM-50r2		472.21 $\pm$ 0.22*	3.17 $\pm$ 0.18*

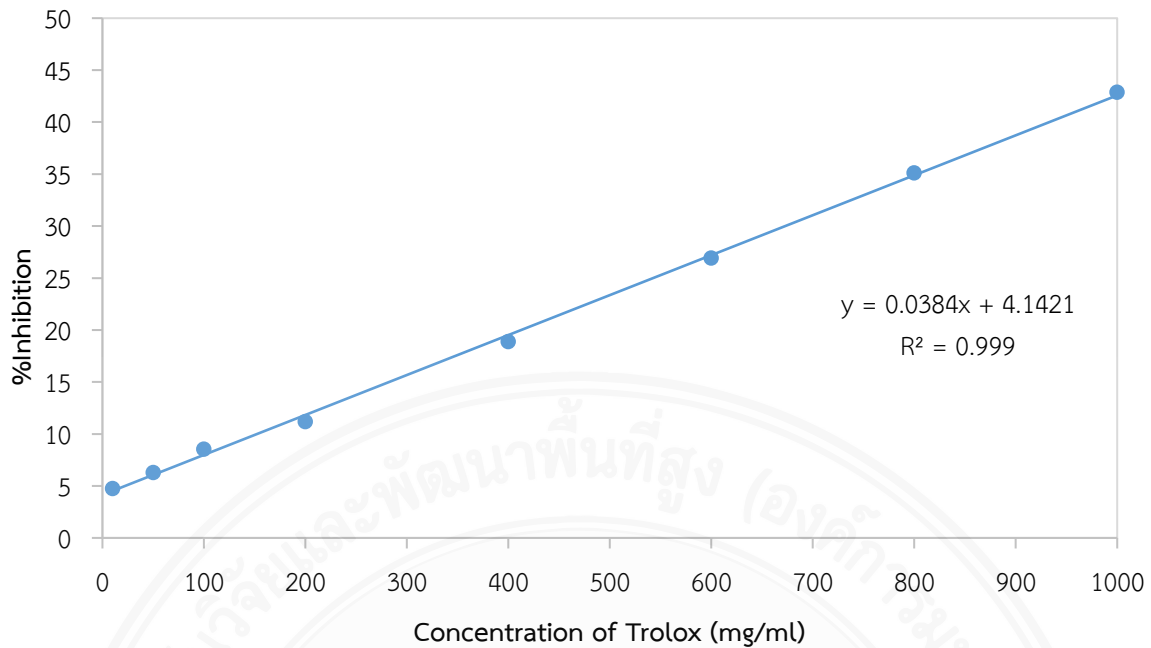
หมายเหตุ * หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกันระหว่างสารสกัดใบชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี (-50) และ 50 ปีขึ้นไป (+50) ที่มาจากแหล่งเดียวกัน

จากผลการทดลอง กราฟสารมาตรฐานรูปที่ 13 ตารางผลการทดลองที่ 3-8 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการ FRAP (Ferric ion reducing/antioxidant power) ของสารสกัดหยาบใบชาอัสสัม จากแหล่งต่างๆ แหล่งตัวอย่างละ 2 ช่วงอายุ และสกัดด้วยเอทานอล พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดหยาบใบชา เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์กับสารมาตรฐาน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) เทียบเท่ากับฤทธิ์ของ FeSO_4 อยู่ในช่วง 112.71 ± 2.49 ถึง 472.21 ± 0.22 มิลลิกรัม FeSO_4 /1 กรัม สารสกัด และสารสกัดใบชาจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) ตรวจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงที่สุด โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) เทียบเท่ากับฤทธิ์ของ FeSO_4 เท่ากับ 472.21 ± 0.22 มิลลิกรัมต่อปริมาณสารสกัด 1 กรัม และที่ความเข้มข้นสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ร้อยละ 50 เท่ากับ 3.17 ± 0.18 mg/mL และพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดใบชาจากบ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่ ที่ใบชาจากต้นที่มีอายุมากกว่า 50 ปี (PP+50) มีฤทธิ์ต่ำที่สุด โดยฤทธิ์สารสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์กับสารมาตรฐาน FeSO_4 เท่ากับ 112.71 ± 2.49 มิลลิกรัมต่อปริมาณสารสกัด 1 กรัม ซึ่งแนวโน้มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ที่พบสูงสุดในสารสกัด ใบชาจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวม และสารสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบปริมาณสูงที่สุดเช่นกัน

ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัดใบชาจาก 2 ช่วงอายุต้นใบชาที่มาจากแหล่งเดียวกัน พบว่า สารสกัดใบชาที่มีอายุการปลูกน้อยกว่า 50 ปี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงกว่าใบชาที่มีอายุการปลูก 50 ปีขึ้นไป ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบในใบชาอายุน้อยกว่าสูงกว่าใบชาอายุ 50 ปีขึ้นไป

- ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation เทียบกับฤทธิ์ของสารมาตรฐาน โดยดัดแปลงตามวิธีของ

เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี Lipid peroxidation ของตัวอย่างสารสกัดใบชาอัสสัม โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณตัวอย่างทดสอบกับค่าร้อยละการยับยั้งโดยเทียบกับความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ของสารมาตรฐาน Trolox (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และแสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้ง Lipid peroxidation กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ผลการยับยั้ง Lipid peroxidation ของสารสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 3-9ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันยับยั้ง Lipid peroxidation (% inhibition) ของสารสกัดใบชาอัสสัม

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (mg TEAC/g sample)	%Inhibition
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	171.32 ± 0.87	49.10±0.60
PP-50		148.50 ± 0.36*	42.28±0.57*
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	142.86±1.38	40.68±0.72
MS-50		160.65 ± 0.79*	46.11±0.58*
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	156.83 ± 2.04	44.79±0.34
PMO-50		150.35± 0.72*	43.82±0.62*
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	171.68 ± 1.42	49.15±0.76
WW-50r1		169.54 ± 0.85	48.84±0.41
WW+50r2		167.80 ± 1.29	48.30±0.38
WW-50r2		172.19 ± 0.62*	49.33±0.64
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	177.46 ± 1.34	49.62±0.37
PM-50r2		181.53 ± 0.92	51.14±0.66

หมายเหตุ * หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกันระหว่าง สารสกัดใบชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี (-50) และ 50 ปีขึ้นไป (+50) ที่มาจากแหล่งเดียวกัน

จากผลการทดลองในตารางที่ 3-9 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง Lipid peroxidation ของสารสกัด ตรวจพบฤทธิ์ยับยั้ง Lipid peroxidation โดยพบฤทธิ์ยับยั้ง Lipid peroxidation ในสารสกัดใบชาจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) สูงที่สุด และ ฤทธิ์ยับยั้ง Lipid peroxidation ของสารสกัด ใบชาจาก 2 ช่วงอายุต้นใบชาที่มาจากแหล่งเดียวกัน พบว่า สารสกัดใบชาที่มีอายุการปลูกน้อยกว่า 50 ปี มีฤทธิ์ยับยั้ง Lipid peroxidation สูงกว่าใบชาที่มีอายุการปลูก 50 ปีขึ้นไป ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบในใบชาอายุน้อยกว่าสูงกว่าใบชาอายุ 50 ปีขึ้นไป ทั้งนี้ สารสกัดใบชา ทุกตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้ง Lipid peroxidation ใกล้เคียงกันไม่ได้มีแนวโน้มของผลทดสอบฤทธิ์แตกต่างกันสูง เช่นเดียวกับแนวโน้มของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ และ FRAP อาจเนื่องจากสารสกัดใบชาอัสสัมเป็นสาร สกัดหยาบด้วยเอทานอล ซึ่งอาจมีสารสำคัญที่เป็นกลุ่มมีขั้วสูงกว่ากลุ่มไม่มีขั้วในสารตัวอย่างทุกตัวอย่าง ใกล้เคียงกัน จึงอาจส่งผลต่อการเข้ากับลิปิดเพื่อส่งผลต่อปฏิกิริยาและการยับยั้ง Lipid peroxidation จึงทำให้พบฤทธิ์ดังกล่าวมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน

3) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase enzyme inhibition) เพื่อประเมินความสามารถในการลดเลือนริ้วรอย (Anti-wrinkle)

โดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสเพื่อประเมินความสามารถในการลดเลือนริ้วรอย (Anti-wrinkle) ด้วยการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและฤทธิ์ผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ และประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดในการลดความชราของผิวหนังจากการถูกเหนี่ยวนำด้วยอนุมูลอิสระ หรือภาวะที่เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระที่จะส่งผลให้ผิวหนังเกิดการอักเสบ เหนี่ยวนำให้โปรตีนเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ ทำให้เกิดพยาธิสภาพได้ เช่น การถูกทำลายของคอลลาเจน อิลาสติน เจลาติน ซึ่งถ้าเกิดบริเวณผิวหนัง จะนำไปสู่การสูญเสียความชุ่มชื้นในชั้น ผิวหนังจนนำไปสู่การเกิดรอยเหี่ยวย่นและการชราของผิวหนัง (skin aging) ได้ โดยการวิเคราะห์ผลการยับยั้ง เอนไซม์ collagenase และ เอนไซม์ Matrix metalloproteinase (MMP) -1 และ MMP-2 collagenase ซึ่ง MMP เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม endopeptidase เช่น collagenase, gelatinase, membrane-bound proteinase สร้างจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue cell) ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนที่เป็นสำคัญ สำหรับ extracellular matrix บริเวณเร่งของเอนไซม์จะประกอบด้วยกรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid) และฮิสติดีน (histidine) และ Zn^{2+} ซึ่งเป็นตำแหน่งเข้าจับกับซับสเตรต (substrate) ตัวยับยั้งเอนไซม์นี้ที่สำคัญ คือ tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) ซึ่งจะเข้าจับกับ MMP เพื่อรักษาสมดุลเมแทบอลิซึมของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ถ้าขาด TIMPs อาจทำให้เกิดพยาธิสภาพได้ MMP มีหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มที่ย่อยคอลลาเจน ประกอบด้วย MMP-1, MMP-8, MMP-13 กลุ่มที่ย่อยเจลาติน (gelatin) ประกอบด้วย MMP-2, MMP-917 ตัวอย่างปฏิกิริยาของ collagenase คือ



จากการวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ collagenase, MMP-1 และ MMP-2 collagenase ของสารสกัดใบชาอัสสัม แสดงผลเป็นค่า IC50 ของการยับยั้ง (IC50 inhibition) แสดงดังตารางที่ 3-10

ตารางที่ 3-10 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-2 collagenase ของสารสกัด

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	IC ₅₀ (mg/ml)	
		MMP-1	MMP-2
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	3.42±0.02	3.49±0.03
PP-50		1.88±0.09	1.90±0.03
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	2.05±0.04	2.06±0.05
MS-50		1.16±0.02	1.20±0.03
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	2.18±0.02	2.17±0.01
PMO-50		1.84±0.02	1.87±0.02
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	2.19±0.02	2.22±0.02
WW-50r1		1.33±0.02*	1.36±0.03*
WW+50r2		2.02±0.04	2.07±0.02
WW-50r2		1.75±0.03*	1.81±0.02*
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	1.18±0.01	1.21±0.02
PM-50r2		0.79±0.01*	0.82±0.02*

หมายเหตุ * หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกันระหว่างสารสกัดใบชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี (-50) และ 50 ปีขึ้นไป (+50) ที่มาจากแหล่งเดียวกัน

จากการทดลองตารางที่ 3-10 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-2 collagenase ของสารสกัดหยาบใบชาอัสสัม จากแหล่งต่างๆ แหล่งตัวอย่างละ 2 ช่วงอายุ และสกัดด้วยเอทานอล พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด คือ MMP-1 และ MMP-2 collagenase สูงสุดในสารสกัดใบชาจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-2 collagenase ของสารสกัดใบชาจาก 2 ช่วงอายุต้นใบชาที่มาจากแหล่งเดียวกัน พบว่า สารสกัดใบชาที่มีอายุการปลูกน้อยกว่า 50 ปี มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-2 collagenase สูงกว่าใบชาที่มีอายุการปลูก 50 ปีขึ้นไป ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลิกรวม และสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบในใบชาอายุน้อยกว่าสูงกว่าใบชาอายุ 50 ปีขึ้นไป โดยมีแนวโน้มเดียวกันในสารสกัดใบชาจากแหล่งเดียวกันในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทั้ง 2 เอนไซม์ดังกล่าว โดยสรุป สารสกัดใบชาอัสสัมมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-2 collagenase ซึ่งเป็นแนวทางประเมินฤทธิ์ลดเลือนริ้วรอย (Anti-wrinkle) ด้วยการมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้สูงสุด ซึ่ง MMPs สามารถจัดแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ตามตำแหน่งที่พบ คือ กลุ่มที่ถูกหลั่งจากเซลล์ (secreted MMPs) และกลุ่มที่ติดบนผิวเซลล์ (membrane type MMPs) ซึ่ง Secreted MMPs เป็นกลุ่ม MMPs ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 6 กลุ่มย่อยตามคุณสมบัติที่คล้ายกันบางประการ ใน

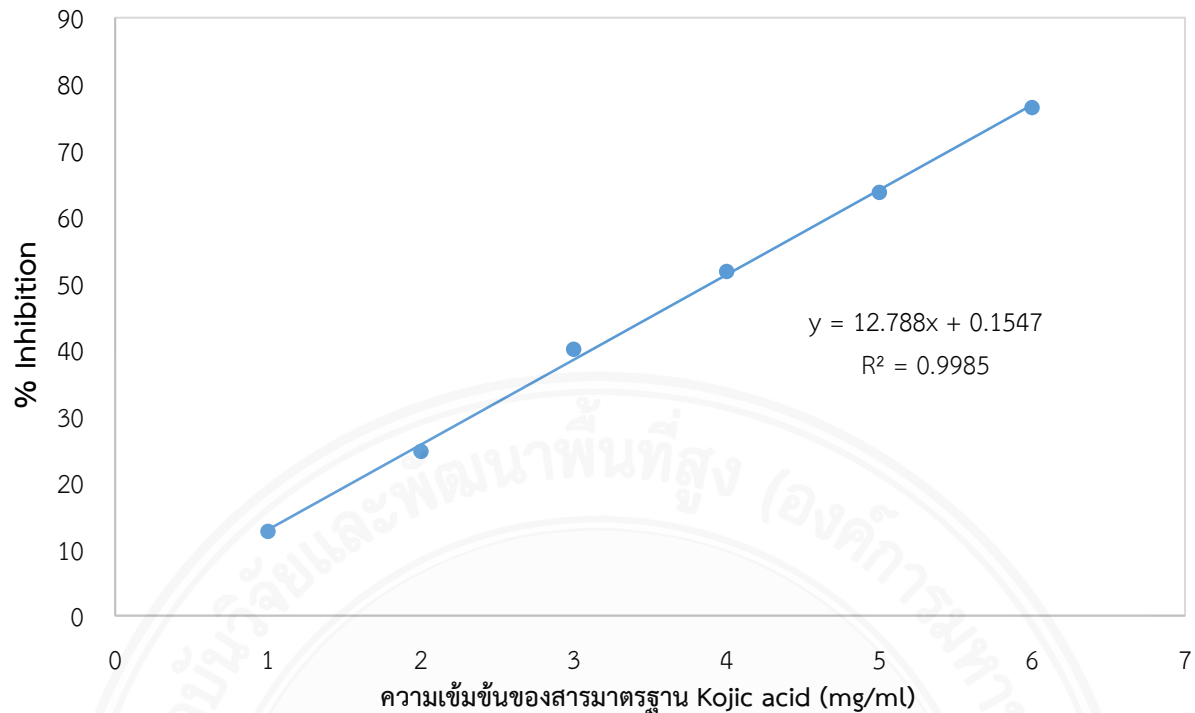
การศึกษาครั้งนี้ วิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MMP-1 จัดอยู่ในกลุ่ม collagenase ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีคุณสมบัติหลักสามารถตัดย่อย collagen I, II, III, V ประกอบด้วย MMP-1 (collagenase-1), MMP-8 (collagenase-2) และ MMP-13 (collagenase-3) MMP-1 (collagenase-1) สร้างจาก basal keratinocytes ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไวต่อการสร้างเซลล์ epithelium จะถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นโดย growth factor และ cytokines ในภาวะปกติ เช่น การพัฒนาของเอ็มบริโอหรือการซ่อมแซมเนื้อเยื่อเมื่อมีภาวะพยาธิ

สภาพ นอกจากนี้ ยังได้วิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม gelatinases ซึ่งเป็น MMPs ที่สามารถย่อย gelatin และ collagen ซึ่งเป็นโปรตีนเมทริกซ์ที่เป็นส่วนประกอบใน basement membrane ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถลุกลามหรือเซลล์ T lymphocyte เคลื่อนตัวเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ง่ายขึ้น ประกอบด้วย MMP-2 (gelatinase-A), MMP-9 (gelatinase-B) MMP-2 (gelatinase-A) สร้างมากขึ้นในระหว่างการซ่อมแซมบาดแผล เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายของ keratinocyte พบสร้างมากขึ้นในเซลล์มะเร็งหลายชนิด ซึ่งในเซลล์ fibroblasts ของผิวหนังปกติ (pre-senescent dermal fibroblasts) สามารถพบเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ (matrix metalloproteinases, MMPs) เช่น เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยคอลลาเจน (collagenase หรือ metalloproteinases -1, MMP-1) และ stromelysin (metalloproteinases-3, MMP-3) โดยเอนไซม์ 2 ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ของผิวหนัง ซึ่งในสภาวะปกติจะพบเอนไซม์ 2 ชนิดนี้ในปริมาณต่ำ ในทางตรงกันข้าม ปริมาณของ tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) ได้แก่ TIMP-1 และ TIMP-3 จะมีปริมาณค่อนข้างสูง ซึ่งมีหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ MMPs ส่วนในเซลล์ fibroblasts ที่เกิดกระบวนการแก่ชราของเซลล์ (senescent dermal fibroblasts) จะมีปริมาณ MMPs ค่อนข้างสูงและมี TIMPs ค่อนข้างต่ำ ซึ่งส่งผลทำให้การสังเคราะห์คอลลาเจนลดลง ทำให้โครงสร้างของผิวหนังเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสาเหตุทำให้เกิดการฝ่อของผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermal atrophy) ได้ ส่วนอีลาสตินจะมีปริมาณลดลงเนื่องจากยีนอีลาสติน (elastin gene) มีการแสดงออกลดลงหลังจากอายุ 40 – 50 ปี ทำให้ความยืดหยุ่นของผิวหนังลดลง

4) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Inhibition of tyrosinase enzyme activity)

โดยการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase ดัดแปลงตามวิธีของ Charles Fox (1995) โดยอาศัยหลักการวัดการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แยกจากเห็ดเป็นสารตั้งต้น เมื่อทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm และแปลผลของสารสกัดที่ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลง ประเมินฤทธิ์ของสารสกัดทดสอบต่อการทำให้ผิวขาว

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสร้างเม็ดสีผิว ดังนั้น ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวจะสามารถเป็นแนวทางในการประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีของสารสกัดได้ โดยในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทดสอบโดยใช้วิธี dopachrome 96 well plate เป็นการอาศัยการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้น คือ L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ซึ่งจะถูเอนไซม์ไทโรซิเนสเปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาลซึ่งสารละลายนี้จะดูดกลืนคลื่นแสงที่ 492 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างสารสกัดทดสอบมีความสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูง ความเข้มข้นของสารละลายสีน้ำตาลก็จะลดลง โดยแสดงค่าเทียบเท่าฤทธิ์ของความเข้มข้นเป็นมิลลิกรัมของสารมาตรฐาน Kojic acid ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเทียบเท่ากับฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัด 1 กรัม รายงานเป็นค่า KAE (mg kojic acid equivalent per gram sample) แสดงดังรูปที่ 15 ซึ่งค่าที่มากแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้มากเช่นกัน จากการนำสารสกัดต่าง ๆ ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี dopachrome method ซึ่งเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยจะเปลี่ยนสารตั้งต้นคือ L-DOPA ไปเป็นรงควัตถุเม็ดสี pheomelanin และ eumelanin ได้ ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบชาอัสสัม แสดงดังตารางที่ 3-



รูปที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐาน Kojic acid กับร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Inhibition of tyrosinase enzyme activity)

ตารางที่ 3-11ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Inhibition of tyrosinase enzyme activity) ของสารสกัดใบชาอัสสัม

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	Tyrosinase inhibition (mg KAE/g crude sample)	IC ₅₀ (mg/ml)
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	307.31±0.55	0.83±0.001
PP-50		308.795±2.18	0.83±0.005
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (ไหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	262.99±1.97	0.94±0.005
MS-50		334.495±3.80*	0.77±0.009*
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	209.325±2.57	1.08±0.006
PMO-50		284.555±8.62*	0.89±0.022*
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	272.45±2.66	0.92±0.007
WW-50r1		361.575±9.41*	0.70±0.024*
WW+50r2		269.045±2.41	0.93±0.006
WW-50r2		302.595±9.27*	0.85±0.023*
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	312.995±3.36	0.82±0.008
PM-50r2		391.755±4.12*	0.62±0.010*

หมายเหตุ * หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกันระหว่าง สารสกัดใบชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี (-50) และ 50 ปีขึ้นไป (+50) ที่มาจากแหล่งเดียวกัน

จากการทดลองรูปที่ 15 และ ตารางที่ 3-11 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบชาอัสสัม จากแหล่งต่าง ๆ แหล่งตัวอย่างละ 2 ช่วงอายุ คือ อายุ 50 ปีขึ้นไป (+50) และอายุน้อยกว่า 50 ปี (-50) ที่สกัดด้วยเอทานอล พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบชา เมื่อเปรียบเทียบกับ ฤทธิ์กับสารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) คิดเป็นค่าเทียบเท่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibition) เป็นมิลลิกรัมสารมาตรฐาน Kojic acid (Kojic acid equivalent; KAE) ต่อกรัมของสารสกัด หยาดใบชาอัสสัม (mg KAE/g crude sample) พบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวสูงที่สุดในสารสกัดใบชาจาก บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) ตรวจพบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด โดยมีฤทธิ์เท่ากับ 391.755 ± 4.12 มิลลิกรัม KAE ต่อปริมาณสารสกัด 1 กรัม และที่ความเข้มข้นสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ร้อยละ 50 เท่ากับ 0.62 ± 0.010 mg/mL และพบว่า ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบชาจากบ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ ที่ใบชาจากต้นที่มีอายุมากกว่า 50 ปี (PMO+50) มีฤทธิ์ต่ำที่สุด โดยฤทธิ์สารสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์กับสารมาตรฐาน Kojic acid เท่ากับ 209.325 ± 2.57 มิลลิกรัมต่อปริมาณสารสกัด 1 กรัม ซึ่งแนวโน้มการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่พบสูงสุดในสารสกัดใบชาจาก บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวม และสารสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบปริมาณสูงที่สุดเช่นกัน และมีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลาจีเนส

ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบชาจาก 2 ช่วงอายุต้นใบชาที่มาจาก แหล่งเดียวกัน พบว่า สารสกัดใบชาที่มีอายุการปลูกน้อยกว่า 50 ปี มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าใบชาที่มีอายุการปลูก 50 ปีขึ้นไป ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบในใบชาอายุน้อยกว่าพบมีปริมาณสูงกว่าในสารสกัดใบชาที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไป ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลาจีเนส

5) ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase ของสารสกัด (ฤทธิ์ลด/ยับยั้งภาวะ เมแทบอลิซึมอินโดรม ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวาน ไขมัน ความดัน) แสดงผลดังตารางที่ 3-12

- ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase ของน้ำมันโดย ดัดแปลงตามวิธีการของ Oyedemi et al. (2017) ดังนี้

วิเคราะห์ α -amylase inhibition assay ของสารสกัดใบชาอัสสัม โดยการวิธี Dinitrosalicylic acid โดยเตรียมเอนไซม์ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของ pancreatic α -amylase และทำปฏิกิริยากับสารสกัดทดสอบด้วย ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0 ± 0.1) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (negative control) ที่มีแต่บัฟเฟอร์แต่ไม่มีสารทดสอบ และทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารตั้งต้น starch solution ความเข้มข้น 1% ที่เตรียมในบัฟเฟอร์เดียวกันกับเตรียมตัวอย่าง แล้วทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย Dinitrosalicylic acid แล้วต้มในน้ำเดือดใน water bath เป็นเวลา 5 นาที รอทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และวิเคราะห์ค่า %inhibition กิจกรรมเอนไซม์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50}) โดยเปรียบเทียบกับยา Acarbose ลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็น amylase inhibitor

วิเคราะห์ α -glucosidase inhibition assay โดยเตรียมเอนไซม์ 1 ยูนิต/มิลลิลิตร ของ α -glucosidase ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0 $\pm$ 0.1) และทำปฏิกิริยากับสารสกัดทดสอบด้วยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (negative control) ที่มีแต่บัฟเฟอร์แต่ไม่มีสารทดสอบ และทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารตั้งต้น 5 mM p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside ที่เตรียมในบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0 $\pm$ 0.1) แล้วทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และวิเคราะห์ค่า %inhibition กิจกรรมเอนไซม์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ 50% (IC₅₀)

ตารางที่ 3-12 ค่า IC₅₀ การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase ของสารสกัดใบชาอัสสัม

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	IC ₅₀ (mg/ml) α -amylase inhibition	IC ₅₀ (mg/ml) α -glucosidase inhibition
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	3.58 $\pm$ 0.02	2.99 $\pm$ 0.02
PP-50		3.40 $\pm$ 0.02*	2.93 $\pm$ 0.01
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	3.76 $\pm$ 0.01	3.04 $\pm$ 0.02
MS-50		3.45 $\pm$ 0.01*	2.97 $\pm$ 0.02
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	3.78 $\pm$ 0.02	3.07 $\pm$ 0.01
PMO-50		3.62 $\pm$ 0.03*	3.02 $\pm$ 0.03
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	3.63 $\pm$ 0.04	3.07 $\pm$ 0.01
WW-50r1		3.43 $\pm$ 0.02*	2.78 $\pm$ 0.01*
WW+50r2		3.71 $\pm$ 0.03	3.10 $\pm$ 0.02
WW-50r2		3.68 $\pm$ 0.02	3.08 $\pm$ 0.02
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	3.54 $\pm$ 0.03	2.91 $\pm$ 0.01
PM-50r2		3.35 $\pm$ 0.01*	2.76 $\pm$ 0.01*

หมายเหตุ * หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกันระหว่างสารสกัดใบชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี (-50) และ 50 ปีขึ้นไป (+50) ที่มาจากแหล่งเดียวกัน

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของสารสกัดใบชา จากตารางที่ 3-12 ผลวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวของสารสกัดใบชาอัสสัม จากแหล่งต่างๆ แหล่งตัวอย่างละ 2 ช่วงอายุ คือ อายุ 50 ปีขึ้นไป (+50) และอายุน้อยกว่า 50 ปี (-50) ที่สกัดด้วยเอทานอล พบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวสูงที่สุดในสารสกัดใบชาจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) ตรวจพบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase สูงที่สุด โดยมีฤทธิ์ที่ความเข้มข้นสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ร้อยละ 50 เท่ากับ 2.76 $\pm$ 0.01 mg/mL และพบว่า ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของสารสกัดใบชาจากบ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ ที่ใบชาจากต้นที่มีอายุมากกว่า 50 ปี (PMO+50) มีฤทธิ์ต่ำที่สุด และผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของสารสกัดใบชาจาก 2 ช่วงอายุต้นใบชาที่มาจากแหล่งเดียวกัน พบว่า สารสกัดใบชาที่มีอายุการ

ปลุกน้อยกว่า 50 ปี มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase สูงกว่าใบชาที่มีอายุการปลูก 50 ปีขึ้นไป ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบและฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ จากผลการทดสอบสารสกัดใบชาอายุน้อยกว่า 50 ปี พบปริมาณและฤทธิ์ที่สูงกว่าในสารสกัดใบชาที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไป

ส่วนผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารสกัดใบชาอัสสัม จากตารางที่ 3-12 แสดงผลวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวของสารสกัดใบชาอัสสัม จากแหล่งต่างๆ แหล่งตัวอย่างละ 2 ช่วงอายุ คือ อายุ 50 ปีขึ้นไป (+50) และอายุน้อยกว่า 50 ปี (-50) ที่สกัดด้วยเอทานอล แสดงผลวิเคราะห์หมีแนวโน้มนั้น เช่นเดียวกับผลของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase โดยตรวจพบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวสูงที่สุดในสารสกัดใบชาจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) ตรวจพบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase สูงที่สุด โดยมีฤทธิ์ที่ความเข้มข้นสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ร้อยละ 50 เท่ากับ 2.76 ± 0.01 mg/mL และพบว่า ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารสกัดใบชาจากบ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ ที่ใบชาจากต้นที่มีอายุมากกว่า 50 ปี (PMO+50) มีฤทธิ์ต่ำที่สุด และผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของสารสกัดใบชาจาก 2 ช่วงอายุต้นใบชาที่มาจากแหล่งเดียวกัน พบว่า สารสกัดใบชาที่มีอายุการปลูกน้อยกว่า 50 ปี มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ส่วนใหญ่ให้ผลที่ใกล้เคียงกันกับฤทธิ์ในสารสกัดใบชาจากต้นที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไป ทั้งนี้ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase อาจเกิดจากฤทธิ์ของสารสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบปริมาณสูง และอาจมีสารอื่นๆ ที่พบได้ในปริมาณใกล้เคียงกันในสารสกัดใบชาทั้ง 2 ช่วงอายุ

ซึ่งผลจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด คือ α -amylase และ α -glucosidase ของสารสกัดใบชาอัสสัมทั้งหมด 12 ตัวอย่างนี้ ตรวจพบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดเบาหวานชนิดที่ 2 จึงเป็นแนวทางในการใช้สารสกัดจากใบชาอัสสัมจากแหล่งต่าง ๆ และทั้ง 2 ช่วงอายุ เพื่อประยุกต์ใช้ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้หรือใช้ร่วมกับยาเคมีได้

6) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดภาวะความดันสูง

ดัดแปลงตามวิธีการของ Oboh et al., 2014 โดยการยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) หรือ ACE Inhibition วิเคราะห์โดยการตรวจวัดปฏิกิริยาของสารสกัดทดสอบในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยการทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเตรียมสารละลายเอนไซม์ ACE ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิยูนิต ผสมสารสกัดทดสอบและทิ้งให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที โดยมีชุดควบคุมทดสอบ (negative control) เป็นปฏิกิริยาเอนไซม์ที่เติมเฉพาะตัวทำละลายสารสกัดแต่ไม่มีสารสกัด หลังจากนั้น จึงเติมสารตั้งต้นอะมิโนสังเคราะห์ Bz-Gly-His-Leu ที่ความเข้มข้น 8.3 mM ปริมาตร 100-150 ไมโครลิตร ที่เตรียมในบัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 8.0 ± 0.2) แล้วทิ้งให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 M แล้วนำไปวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาโดยการสกัด Bz-Gly ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ โดยการสกัดด้วย ethyl acetate แล้วนำไปปั่นแยกชั้น ethyl acetate ออกมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ที่ได้จากการสแกนสเปกตรัม คือ 225 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ ACE (% ACE inhibition) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดทดสอบ โดยวัดการเกิดการเรืองแสงหรือใช้ ELISA kit โดยแสดงผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3-13 ดังนี้

ตารางที่ 3-13 ค่า IC₅₀ การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) ของสารสกัดใบชาอัสสัม

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	IC ₅₀ (mg/ml)
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	8.61 ±0.32
PP-50		8.58 ±0.46
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	9.16 ±0.12
MS-50		8.23 ±0.12*
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	9.67 ±0.38
PMO-50		9.04 ±0.17*
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	8.87 ±0.28
WW-50r1		8.11 ±0.20*
WW+50r2		9.10 ±0.44
WW-50r2		8.85 ±0.20*
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	8.52 ±0.15
PM-50r2		7.83 ±0.34*

หมายเหตุ * หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกันระหว่างสารสกัดใบชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี (-50) และ 50 ปีขึ้นไป (+50) ที่มาจากแหล่งเดียวกัน

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) ของสารสกัดใบชาอัสสัมจากผลแสดงดังตารางที่ 3-13 พบว่า ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบใบชาอัสสัม จากจากบ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (PM-50r2) ตรวจพบฤทธิ์สูงสุด โดยมีค่าฤทธิ์การยับยั้งร้อยละ 50 (IC₅₀) ที่ความเข้มข้น เท่ากับ 7.83 ±0.34 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE นี้ มีผลแนวโน้มผลของสารสกัดใบชาที่มีอายุการปลูกน้อยกว่า 50 ปี มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงกว่าใบชาที่มีอายุการปลูก 50 ปีขึ้นไป ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบและฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ จากผลการทดสอบสารสกัดใบชาอายุน้อยกว่า 50 ปี พบปริมาณและฤทธิ์ที่สูงกว่าในสารสกัดใบชาที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไป เช่นกัน ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) โดยสารสกัดใบชาอัสสัมจากแหล่งต่างๆ แหล่งตัวอย่างละ 2 ช่วงอายุ คือ อายุ 50 ปีขึ้นไป (+50) และอายุน้อยกว่า 50 ปี (-50) ที่สกัดด้วยเอทานอล จำนวน 12 ตัวอย่าง พบมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดภาวะความดันสูง จึงเป็นแนวทางในการใช้สารสกัดจากพืชทั้งจากใบชาอัสสัมช่วยในการดูแลสุขภาพเพื่อการป้องกันภาวะความเสี่ยงต่อโรคเรื้อรังที่ไม่ใช่โรคติดต่อ (Non-communicable diseases; NCDs) และเพื่อประยุกต์ใช้ร่วมกับยาเคมี และ/หรือเพื่อลดยาเคมีโมเลกุลเพื่อใช้สารธรรมชาติที่มีความปลอดภัยสูงมากขึ้นในการลดความดันสูงได้

6. จัดทำแนวทางการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากชาอัสสัมที่มีอัตลักษณ์เฉพาะถิ่นสำหรับนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม เช่น อาหารสุขภาพ ผลิตภัณฑ์สมุนไพร และเครื่องสำอาง เป็นต้น

1) ข้อมูลที่ใช้ประกอบการจัดแจ้ง หรือขอขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ตามบริบทของผลิตภัณฑ์

จากผลการศึกษา สามารถวิเคราะห์แนวทางในการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยสรุปดังตารางที่ 3-14

ตารางที่ 3-14 ข้อมูลประกอบแนวทางการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากชาอัสสัมสำหรับพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	Voucher number	%yield สารสกัด	สมบัติทางเคมีกายภาพและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	NI	0.87	1 / 2 / 3 / 4-6/ 7 / 8 / 9 / 10 /11 😊 /12 😊 / 13 😊
PP-50		0023335	0.65	1 / 2 / 3 / 4-6/ 7 / 8 / 9 / 10 /11 😊 /12 😊 / 13 😊
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	0023321	1.40	1 / 2 / 3 / 4-6/ 7 / 8 / 9 / 10 /11 😊 /12 😊 / 13 😊
MS-50		0023322	1.31	1 / 2 / 3 / 4-6/ 7 / 8 / 9 / 10 /11 😊 /12 😊 / 13 😊
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	0023319	0.39	1 🚫 / 2 🚫 / 3 🚫 / 4 🚫 / 5 🚫 / 6 🚫 / 7 🚫 / 8 🚫 / 9 🚫 / 10 🚫 / 11 😊 / 12 😊 / 13 😊
PMO-50		0023334	0.45	1 / 2 / 3 / 4-6/ 7 / 8 / 9 / 10 /11 😊 /12 😊 / 13 😊
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	0023336	2.01	1 / 2 / 3 / 4-6/ 7 / 8 / 9 / 10 /11 😊 /12 😊 / 13 😊
WW-50r1		0023326	1.22	1 / 2 / 3 / 4-6/ 7 / 8 / 9 / 10 /11 😊 /12 😊 / 13 😊
WW+50r2		0023339	0.93	1 / 2 🚫 / 3 / 4/5 🚫 / 6 / 7 / 8 / 9 / 10 /11 😊 /12 😊 / 13 😊
WW-50r2		0023338	2.36	1 / 2 / 3 / 4-6/ 7 / 8 / 9 🚫 / 10 /11 😊 /12 😊 / 13 😊
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	0023324	0.43	1 / 2 / 3 / 4-6/ 7 / 8 / 9 / 10 /11 😊 /12 😊 / 13 😊

PM-50r2		0023325	0.47	1 ⁺ / 2 ⁺ / 3 ⁺ / 4-6 ⁺ / 7 ⁺ / 8 ⁺ / 9 ⁺ / 10 ⁺ / 11 [😊] / 12 [😊] / 13 [😊]
---------	--	---------	------	---

ตารางที่ 3-15 คำอธิบายผลการวิเคราะห์

รหัส	การวิเคราะห์	ผลวิเคราะห์
1	พอลิฟีนอลรวม (Total polyphenol) /TP	H = สูงที่สุด ⁺
2	สารสำคัญ Catechin, Epicatechin และ Epigallocatechin (EGCG) /CEpEg	L = ต่ำที่สุด ⁻
3	ฤทธิ์ต้านเชื้อก่อสิว เชื้อปัญหาช่องปาก และเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร /AM	S = คงสภาพ/ปลอดภัย [😊]
4	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธีการ ABTS	D = อันตรายพบสารปนเปื้อน เกินค่าการยอมรับ ^{⚠️}
5	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธีการ FRAP	
6	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธีการ Lipid peroxidation	
7	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase enzyme inhibition) MMP-1 และ MMP-2	
8	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Inhibition of tyrosinase enzyme activity)	
9	ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase (ฤทธิ์ลด/ยับยั้งภาวะเมแทบอลิกซินโดรม ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวาน ไขมัน ความดัน)	
10	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดภาวะความดันสูง	
11	ความคงสภาพที่เวลาทดสอบ 4 สัปดาห์สภาวะเร่งสลับอุณหภูมิ 30 และ 4 องศาเซลเซียส	
12	ความปลอดภัย : ไม่พบโลหะหนัก/พบไม่เกินค่าการยอมรับ	
13	ความบริสุทธิ์และสารปนเปื้อน : การเหลือตกค้างของสารตัวทำละลายที่เป็นเอทานอลพบไม่เกินค่าการยอมรับ	

ผลการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อประกอบแนวทางการขึ้นทะเบียน ดังนี้

ศึกษาความคงตัวของสารสกัดหยาบและสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75 \pm 5\%$ RH อ้างอิงตาม ANNEX V: ASEAN Guidelines on stability study and shelf-life of traditional medicines และ Guidelines for Stability Testing of Pharmaceutical Products Containing Well-Established Drug Substances in Conventional Dosage Form (In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations – WHO โดยการทดสอบที่ตู้ควบคุมความชื้นและอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการศึกษา เนื่องจากข้อจำกัดของระยะเวลาการศึกษา จึงปรับสภาวะในการศึกษาในระยะยาว เป็นการศึกษาสภาวะเร่งในระยะเวลาสั้นลง โดยใช้สภาวะการทดสอบที่ อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส สลับกับ 4-8 องศาเซลเซียส ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (1 เดือน) และวิเคราะห์ความคงตัวของสารสำคัญหลัก โดยรวมเพื่อเป็นแนวทางประกอบการวิเคราะห์เทียบมาตรฐาน (Standardization) โดยวิเคราะห์สารฟีนอลิกรวม (Total phenolic compounds) แสดงผลการศึกษา ดังนี้

ตารางที่ 3-16 ผลการวิเคราะห์ปริมาณพอลิฟีนอลรวมในสารสกัดใบชาที่เก็บในภาชนะที่บดแสง ภายใต้สภาวะการทดสอบความคงสภาพโดยวิเคราะห์ด้วย UV-Vis spectrometry

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	Phenolic content (mg GAE/ g sample) (Mean±SD)		การ เปลี่ยนแปลง *
		ก่อน	หลัง	
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่	233.24±2.26	231.76±1.34	X
PP-50		262.71±1.97	260.56±2.10	X
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่ง ขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	184.49±6.22	181.40±1.37	X
MS-50		268.07±3.55	265.50±2.82	X
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	116.76±2.90	113.95±3.11	X
PMO-50		187.59±5.29	185.14±2.40	X
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่ สรวย จ.เชียงราย	209.20±8.30	208.76±4.52	X
WW-50r1		296.10±1.86	293.84±2.70	X
WW+50r2		159.55±5.26	157.65±2.14	X
WW-50r2		207.53±2.43	204.81±5.20	X
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	256.04±4.88	257.18±1.23	X
PM-50r2		309.85±8.10	302.10±3.78	X

*การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงค่าระหว่างก่อน-หลังทดสอบความคงสภาพเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยการทดสอบ unpaired t-test เปรียบเทียบความแตกต่าง โดยแต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ

X หมายถึง ไม่แตกต่าง

✓ หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการวิเคราะห์สารสำคัญหลัก โดยวิเคราะห์สารฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบใบชาอัสสัมที่ผ่านการทดสอบความคงสภาพในสภาวะดังกล่าว โดยจากตารางที่ 15 พบว่า ในสารสกัดหยาบใบชาอัสสัม จากแหล่งต่างๆ แหล่งตัวอย่างละ 2 ช่วงอายุ มีความคงตัวทั้งปริมาณสารสำคัญหลักที่ใช้เทียบมาตรฐานสารสำคัญที่สัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดใบชาอัสสัม และเนื่องจากวิเคราะห์โดยวิธีการทำปฏิกิริยาให้เกิดสีแล้ววัดด้วย UV spectrometer เทียบปริมาณกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทำให้ตรวจพบปริมาณพอลิฟีนอลรวมในสารสกัดก่อน-หลังทดสอบความคงตัวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เนื่องจากการวัดปริมาณรวมโดยทำปฏิกิริยา colorimetry ซึ่งถ้าวิเคราะห์สารสำคัญเทียบสารมาตรฐานแต่ละชนิดด้วยวิธีการทางโครมาโทกราฟี (Chromatography) อาจมีความแตกต่างกันในชนิดและปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีรายงานพบในใบชา

1. วิเคราะห์สารปนเปื้อน (impurities) และ/หรือ contaminants ในสารสกัดด้วยวิธีการที่เหมาะสม (USP-NF: United States Pharmacopeia (USP) and the National Formulary (NF))

โดยวิเคราะห์สารปนเปื้อนชนิดที่เป็นโลหะหนัก (heavy metals) เช่น cadmium, mercury, lead และ arsenic เป็นต้น ด้วยวิธี Inductively coupled plasma (ICP) ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาธาตุต่างๆ ได้พร้อมกันในคราวเดียว เช่น แคลเซียม (Ca), แคดเมียม (Cd), โครเมียม (Cr), ทองแดง (Cu), แมกนีเซียม (Mg), แมงกานีส (Mn), โซเดียม (Na), เหล็ก (Fe), นิกเกิล (Ni), ตะกั่ว (Pb) และสังกะสี (Zn) เป็นต้น โดยการทำงานของเครื่องมือวิเคราะห์จะอาศัยพลังงานจากพลาสมาเหนี่ยวนำคู่ควบ ซึ่งมีอุณหภูมิสูงกว่า 10,000 องศาเซลเซียส ทำให้อะตอมของธาตุต่าง ๆ เปลี่ยนสถานะจากสถานะพื้น (Ground state) มาอยู่ในสถานะกระตุ้น (Excited state) หรือเป็นไอออน และเมื่ออะตอมของธาตุมีการลดระดับพลังงานจากสถานะกระตุ้นกลับมายังสถานะพื้น อะตอมของธาตุจะปล่อยพลังงานออกมา ซึ่งเรียกว่า Emission ซึ่งในแต่ละธาตุมีความยาวคลื่นของพลังงานที่ปล่อยออกมาเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว และมีความเข้ม (Intensity) ที่เป็นสัดส่วนแปรผันตรงกับความเข้มข้นของธาตุนั้นในสารละลายของสารตัวอย่าง และสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณสำหรับธาตุต่าง ๆ (Quantitative analysis) ได้โดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของธาตุต่าง ๆ (Standard Solution) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ซึ่งความเป็นพิษของสารโลหะที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์นั้นมีผลต่อสุขภาพของผู้ใช้ โดยข้อบังคับ ICH Q3D ได้จัดให้ แคดเมียม โปรอท ตะกั่ว และสารหนู จัดอยู่ในสารปนเปื้อนกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นพิษต่อมนุษย์ ดังนั้น ในการวิจัยนี้จึงเล็งเห็นถึงความสำคัญในการตรวจสอบหาปริมาณสารโลหะทั้ง 4 ชนิดข้างต้น โดยส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการทดสอบศูนย์บริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ศวท.มช.) ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการที่มีมาตรฐาน ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าเชื่อถือ โดยวิธีวิเคราะห์โลหะทั้ง 4 ชนิดอ้างอิงตามวิธี EPA 3052 ของ Environmental Protection Agency โดยอาศัยเครื่อง inductively coupled plasma-Mass spectrometry แสดงผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3-17

ตารางที่ 3-17 ปริมาณโลหะหนัก As, Cd, Pb และ Hg ที่ตรวจในสารสกัดใบชาอัสสัม

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	Arsenic (As) สารหนู	Cadmium (Cd) แคดเมียม	Lead (Pb) ตะกั่ว	Mercury (Hg) ปรอท
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่	ND	ND	ND	ND
PP-50		ND	ND	ND	ND
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	<0.13 mg/Kg	ND	ND	ND
MS-50		ND	ND	ND	ND
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	ND	ND	ND	ND
PMO-50		ND	ND	ND	ND
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ.เชียงราย	ND	ND	ND	ND
WW-50r1		ND	ND	ND	ND
WW+50r2		ND	ND	ND	ND
WW-50r2		ND	ND	ND	ND
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	ND	ND	ND	ND
PM-50r2		ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ Limit of detection ของ As, Cd, Pb และ Hg คือ 0.13, 0.075, 0.075 และ 0.18 ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ตารางที่ 3-17 วิเคราะห์โลหะหนักปนเปื้อนทั้ง 4 ชนิด พบว่า สารสกัดใบชาอัสสัมจากบ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ ที่อายุใบชา 50 ปีขึ้นไป (+50) ตรวจพบสารหนูในปริมาณน้อยกว่า 0.13 mg/kg แต่ตรวจไม่พบโลหะหนักทุกชนิดเกินค่า Limit of detection ในทุกตัวอย่าง ซึ่งการตรวจพบปริมาณสารหนูในปริมาณน้อยกว่า 0.13 mg/kg (0.13 µg/g) เมื่อพิจารณาตาม The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) ซึ่งเป็นองค์กรที่รวบรวมมาตรฐานและ guideline สำหรับเทคนิคของวิธีการตรวจสอบยา เพื่อสร้างหลักประกันและใช้เป็นแนวทางในการประเมินคุณภาพความปลอดภัยและประสิทธิผลของยา ได้กำหนดค่าความเข้มข้นของสารปนเปื้อน ซึ่งได้กำหนดค่าความเข้มข้นของสารปนเปื้อนในกลุ่มที่ 1 ที่ยอมรับได้ดังตารางที่ 3-18 ดังนี้: แคดเมียม = 0.5 µg/g, ตะกั่ว = 0.5 µg/g, สารหนู = 1.5 µg/g และปรอท = 3.0 µg/g จากผลจากการศึกษาพบว่า ปริมาณสารหนูที่ตรวจพบนั้นไม่เกินค่าที่ ICH กำหนด อย่างไรก็ตามแม้ว่าปริมาณความเข้มข้นของสารปนเปื้อนที่ตรวจพบในสารสกัดไม่เกินค่าที่มาตรฐานกำหนดไว้ แต่การกำหนดปริมาณสารสกัดที่จะนำมาใช้พัฒนาในอนาคตนั้น ควรพิจารณาค่า Permitted Daily Exposure (PDE) ที่ ICH ได้ระบุไว้สำหรับสารในกลุ่มที่ 1 ดังนี้ แคดเมียม PDE = 5 µg/day, ตะกั่ว PDE = 5 µg/day, สารหนู = 15 µg/day และ ปรอท = 30 µg/day

ตารางที่ 3-18 ความเข้มข้นของสารปนเปื้อนที่ยอมรับได้ ตาม ICH guideline Q3D

Element	Class	Oral concentration µg/g	Parenteral concentration µg/g	Inhalation concentration µg/g
Cd	1	0.5	0.2	0.2
Pb	1	0.5	0.5	0.5
As	1	1.5	1.5	0.2
Hg	1	3	0.3	0.1
Co	2A	5	0.5	0.3
V	2A	10	1	0.1
Ni	2A	20	2	0.5
Tl	2B	0.8	0.8	0.8
Au	2B	10	10	0.1
Pd	2B	10	1	0.1
Ir	2B	10	1	0.1
Os	2B	10	1	0.1
Rh	2B	10	1	0.1
Ru	2B	10	1	0.1
Se	2B	15	8	13
Ag	2B	15	1	0.7
Pt	2B	10	1	0.1
Li	3	55	25	2.5

Sb	3	120	9	2
Ba	3	140	70	30
Mo	3	300	150	1
Cu	3	300	30	3
Sn	3	600	60	6
Cr	3	1100	110	0.3

2. วิเคราะห์สารปนเปื้อนชนิดที่เป็นตัวทำละลายเอทานอล (Ethanol) ที่คงค้างและระเหยได้ (residual solvents) ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีหรือ Loss on drying

ในการตรวจสอบปริมาณความชื้นในสารสกัดครั้งนี้ได้ใช้วิธีการตรวจหา % Loss on drying ตาม general chapter <731> ด้วยเครื่อง moisture analyzer Sartorius MA 50 ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นของตัวทำละลาย Ethanol ที่ใช้สกัดใบชาอัสสัม โดยได้จากค่าน้ำหนักที่สูญหายไป หลังจากการอบแห้งในตู้อบ ในสภาวะอุณหภูมิ และเวลาที่กำหนด โดยผลที่คำนวณได้จากเครื่องจะอยู่ในหน่วยของ % Loss on drying (LOD) แสดงค่าดังตารางที่ 19 ซึ่งได้จากการคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\% \text{LOD} = \frac{(\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนอบ}}$$

ตารางที่ 3-19 ค่า % Loss on drying (LOD) ที่ตรวจพบในสารสกัดชาอัสสัม

สารสกัด	พื้นที่แหล่งปลูก	% LOD
PP+50	1. บ้านป่าแป๋ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่	2.63 ± 1.16
PP-50		1.71 ± 2.34
MS+50	2. บ้านแม่สายป่าเมี่ยง (โหล่งขอด) อ. พร้าวจ. เชียงใหม่	3.21 ± 1.20
MS-50		2.24 ± 1.12
PMO+50	3. บ้านปางมะโอ อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่	2.18 ± 1.07
PMO-50		1.74 ± 0.80
WW+50r1	4. บ้านวาวี (แม่พริก) อ. แม่สรวย จ. เชียงราย	2.22 ± 0.72
WW-50r1		3.14 ± 2.48
WW+50r2		1.76 ± 0.57
WW-50r2		2.14 ± 3.11
PM+50r2	5. บ้านปางบง ต. เทพเสด็จ อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	1.53 ± 0.43
PM-50r2		1.72 ± 0.02

จากผลการศึกษาปริมาณสารตัวทำละลาย Ethanol จากการสกัดใบชาอัสสัม โดยการศึกษาปริมาณสารดังกล่าวโดยอ้อม โดยพิจารณาตัวทำละลายที่หลงเหลือ เป็นค่าร้อยละของสารตกค้างจากการหาค่าสาร

ระเหยได้เมื่อทำแห้ง (% Loss on drying; LOD) จากผลการศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 3-19 พบค่า %LOD ซึ่งไม่หลงเหลือสารละลายที่ใช้ในการสกัดตกค้าง หรือหลงเหลือในสารสกัดอยู่ในระดับที่ปลอดภัย จึงอาจง่ายและลดต้นทุนต่อการกำจัดขยะของเสียที่เกิดจากกระบวนการสกัดอีกด้วย และเมื่อพิจารณาความคงตัวของสารสกัด ดังนั้น จากการศึกษาครั้งนี้ ปริมาณสารตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ เอทานอล พบในปริมาณที่ยอมรับได้ (ดังตารางที่ 3-19) มีความปลอดภัยได้คุณภาพของสารและฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ อีกด้วย และสามารถต่อยอดการพัฒนาเพื่อใช้ในอาหาร ผลิตภัณฑ์สมุนไพร และเครื่องสำอางได้ ถึงแม้ว่าวิธีการสกัดจะเป็นวิธีที่ง่าย และอาจมีการแข่งขันสูงทางการตลาดในเชิงเทคโนโลยีการสกัด แต่ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาถึงคุณลักษณะของสารสกัด ฤทธิ์ทางชีวภาพ และสมบัติต่างๆ ของสารสกัด ต้นทุนต่ำ พบว่า มีความเป็นไปได้สูงในการสกัดด้วยวิธีการมาเซอเรชันด้วยเอทานอลดังกล่าว เพราะถึงแม้ว่าจะใช้วิธีการเดียวกันก็ตาม แต่แหล่งที่มาของพืชวัตถุดิบที่มีความแตกต่างกัน (ดินปลูก สภาพแวดล้อม สภาพอากาศ น้ำ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชและการสร้างสารเมแทบอไลต์ลำดับรองที่ออกฤทธิ์ทางยาของพืช) ก็สามารถให้คุณลักษณะ คุณสมบัติของสารสกัดที่แตกต่างกันได้จากผลการศึกษา พบว่า ใบชาอัสสัมจากแหล่งต่างๆ และช่วงอายุการปลูกทั้งที่ต่ำกว่าและสูงกว่า 50 ปี สามารถสร้างอัตลักษณ์ของสารสกัดพืชที่ได้โดยพิจารณาถึงแหล่งที่มาของพืชได้เช่นกัน

องค์การเภสัชกรรมแห่งประเทศไทยได้แนะนำว่า ในกรณีที่มีการสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายอื่นที่ไม่ใช่แอลกอฮอล์ น้ำหรือส่วนผสมของน้ำและแอลกอฮอล์ ควรมีการวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายที่คงเหลืออยู่ด้วยตามมาตรฐานของ USP 40 (2017) ตามหัวข้อที่ <467> Residual Solvents โดย USP40 ได้ระบุหลักเกณฑ์ปริมาณตัวทำละลายที่อนุญาตให้ผู้บริโภคสัมผัสต่อวัน (Permitted Daily Exposure หรือ PDE) และการควบคุมความเข้มข้นของตัวทำละลายตกค้างในผลิตภัณฑ์ (solvent concentration limit) ดังแสดงในตาราง 3-20 โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดพืชสมุนไพรโดยส่วนมาก มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายอินทรีย์และเป็นสารที่ระเหยง่าย (organic volatile solvent) ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์ตามมาตรฐาน USP40 ได้แนะนำให้ใช้วิธี Gas chromatography (GC) เช่น Gas chromatographs with flame ionization or mass spectrometric detection (GC-MS)

ตารางที่ 3-20 หลักเกณฑ์ USP40 ปริมาณตัวทำละลายที่อนุญาตให้ผู้บริโภคสัมผัสต่อวัน (Permitted Daily Exposure หรือ PDE) และการควบคุมความเข้มข้นของตัวทำละลายตกค้างในผลิตภัณฑ์ (solvent concentration limit)

ตัวทำละลาย	Permitted Daily Exposure (PDE) (mg/day)	Solvent concentration limit (ppm)
Dichloromethane	6.0	600
Hexane	2.9	290
Methanol	30.0	3000
Ethyl acetate	50.0 or more	ไม่ได้ระบุ
Ethanol	50.0 or more	ไม่ได้ระบุ

ข้อเสนอแนะหรือแนวทางในการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากชาอัสสัมที่มีอัตลักษณ์เฉพาะถิ่นสำหรับนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป โดยมีข้อเสนอแนะเพิ่มเติมถึงแนวทางการรวบรวมข้อมูลและเอกสารด้านวิชาการที่ชี้แจงข้อขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สมุนไพร ดังนี้

เอกสารด้านวิชาการที่ใช้ในการประเมินตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพร (ดังรูปที่ 16) ทุกประเภทจะแบ่งเป็น 3 หมวดหลัก ดังนี้

1) เอกสารด้านความปลอดภัย (Safety) ซึ่งได้แสดงผลการวิเคราะห์ทั้งชนิดและปริมาณโลหะหนัก ตัวทำละลายตกค้าง แต่ถ้าจะผลิตต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อการขึ้นทะเบียน ต้องเพิ่มเติมการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง ความเป็นพิษเรื้อรัง เพื่อได้ข้อมูลความปลอดภัยของสารสกัดใบชาต่อการบริโภคต่อไป ซึ่งข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษนั้น ก่อนที่จะนำสารสกัดที่ได้ใช้เพื่อการผลิตอาหารและเครื่องสำอาง ควรศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ก่อนนำไปใช้กับผิวหนังหรือใช้กับร่างกายต่อไป ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ ได้ข้อมูลที่เป็นแนวทางต่อยอดวิธีในการสกัดสารสำคัญจากพืชเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ แต่ถ้าต้องการผลิตเพื่อขยายผลในระดับอุตสาหกรรมที่ต้องการอาศัยเทคโนโลยีขั้นสูงขึ้น เพื่อความคงตัวของสารและฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ รวมทั้งความแม่นยำสูงของคุณภาพคงที่ในแต่ละรุ่นการผลิต รวมทั้งเพิ่มความหลากหลายของรูปแบบผลิตภัณฑ์จากสารสกัด อาจต้องปรับปรุงเรื่องของเทคโนโลยีระบบนำส่ง หรือการเติมสารต้านออกซิเดชัน สารป้องกันการสลายตัวของสาร และรูปแบบบรรจุภัณฑ์มาประยุกต์ใช้ต่อไป

2) เอกสารการควบคุมคุณภาพ เอกสารการศึกษาความคงสภาพ (Quality) ซึ่งผลการศึกษาความคงสภาพต้องตามวิธีปฏิบัติ ASEAN Guideline และการศึกษาความคงสภาพจะอยู่ในก่อนของเอกสารด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร (Herbal Product) ในรูปแบบและบรรจุภัณฑ์ที่วางจำหน่ายจริงในท้องตลาด ซึ่งเอกสารด้านคุณภาพ แบ่งเป็น 3 ส่วน (รูปที่ 16) ประกอบด้วย

- (1) เอกสารด้านคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพร (Herbal Substance)
 - (2) เอกสารด้านคุณภาพของวิธีการผลิต (Herbal Preparation)
 - (3) เอกสารด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร (Herbal Product)
- 3) เอกสารแสดงประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ (Efficacy) โดยมีข้อมูลประกอบจากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ และข้อมูลประกอบแสดงดังรูปเอกสาร ดังนี้



รูปที่ 16 มู่งไพรตามพระราชบัญญัติสมุนไพร การพิจารณาอนุญาตมู่งไพร (ที่มา: วินิต อัสวากิจวิรี. เอกสารประกอบการนำเสนอ เรื่อง สรุปพระราชบัญญัติมู่งไพร พ.ศ.2562. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.)
<https://waa.inter.nstda.or.th/stks/pub/nac/2021/slide/ss36-lec01.pdf> เข้าถึงเมื่อ กรกฎาคม 2566)

ส่วนการพัฒนาเป็นมู่งไพรเครื่องสำอางนั้น ให้เป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การจดทะเบียนการออกใบรับจดทะเบียน การต่ออายุใบรับจดทะเบียน การแก้ไขรายการใบรับจดทะเบียน และการออกใบแทนใบรับจดทะเบียนเครื่องสำอาง พ.ศ. 2561

โดยมีแนวทางการกำหนดคุณลักษณะเฉพาะ (Specification) ของสารสกัดใบชา ดังนี้

คุณลักษณะเฉพาะ (Specification)

คุณลักษณะเฉพาะ หรือ specification ในทางเภสัชกรรมนั้น คือ เอกสารที่แสดงข้อมูลเกี่ยวกับรายละเอียดหัวข้อการทดสอบต่าง ๆ ที่มีผลต่อคุณภาพของตัวยา หรือมู่งไพร โดยแสดงถึงเกณฑ์ที่

ยอมรับได้ของหัวข้อนั้น ๆ พร้อมทั้งวิธีการทดสอบ ซึ่งเป็นมาตรฐานทางคุณภาพที่โรงงาน หรือ ผู้ผลิต จัดทำ ขึ้น เพื่อใช้ประกอบพิจารณาถึงคุณภาพของตัวยา หรือผลิตภัณฑ์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว การทดสอบที่ระบุไว้ใน specification จะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ universal test และ specific test ซึ่ง universal test นั้น หมายถึง การทดสอบที่ควรที่จะต้องทดสอบในทุก ๆ ตัวอย่าง เพื่อบ่งบอกคุณภาพของตัวอย่างนั้น เช่น การ พิสูจน์เอกลักษณ์ของตัวยา การวิเคราะห์หาปริมาณตัวยา การวิเคราะห์ปริมาณสารปนเปื้อน และ ลักษณะ ปรากฏของตัวยา เป็นต้น ในขณะที่ specific test นั้น เป็นการทดสอบที่ไม่จำเป็นต้องระบุในทุกตัวอย่าง แต่ ต้องพิจารณาเป็นกรณีไป โดยจะพิจารณาถึงสิ่งที่มีผลต่อตัวอย่างดังกล่าวเป็นกรณีเฉพาะ เช่น การศึกษาการ แยกตัวของเม็ดยา ซึ่งยาในรูปแบบยาน้ำนั้นไม่จำเป็นต้องทดสอบในหัวข้อนี้ เป็นต้น

รายละเอียดข้อกำหนดเฉพาะ วิธีการทดสอบ และเกณฑ์ที่ใช้พิจารณาในการยอมรับวัตถุดิบตัวยา สำคัญ อ้างอิงตามการขึ้นทะเบียนยา

Certificate of analysis จากผู้ผลิตวัตถุดิบตัวยาสำคัญ และผลการตรวจวัตถุดิบตัวยาสำคัญตาม ข้อกำหนดจากผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ จะต้องเป็นไปตามข้อกำหนด และมีการลงนามและวันที่โดยผู้มีอำนาจในการ ลงนาม (authorized personnel เช่น the person in charge of the Quality Control Department)

ข้อกำหนดมาตรฐานและวิธีวิเคราะห์ควรทำเป็นตารางมีรายละเอียด ได้แก่

1. รายการการทดสอบ (test)
2. ข้อกำหนด (acceptance criteria or limit)
3. วิธีวิเคราะห์ (analytical method)

ในกรณีที่วัตถุดิบตัวยาสำคัญมีปรากฏในตำรายา ต้องมีข้อกำหนดมาตรฐานและวิธีวิเคราะห์เทียบกับตำรา ยาที่รัฐมนตรีประกาศหรือใหม่กว่าและหัวข้อการทดสอบต้องตรงตามตำรายาทุกหัวข้อ โดยที่ผู้ผลิตสามารถใช้ วิธีของผู้ผลิตได้ (in house standard) ทั้งนี้ ต้องเทียบกับตำรายาที่รัฐมนตรีประกาศหรือดีกว่าพร้อมชี้แจง เหตุผลของข้อกำหนดมาตรฐานและวิธีวิเคราะห์ที่ไม่เป็นไปตามตำรายาที่แตกต่าง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการแปรรูปผลผลิตกาแฟในกรรมวิธีต่างๆ 4 กรรมวิธี พบว่า กระบวนการแปรรูปแบบกรรมวิธีกึ่งเปียก และการแปรรูปแบบการหมักด้วยยีสต์สามารถช่วยเพิ่มรสชาติ และกลิ่นที่มีอัตลักษณ์เพิ่มขึ้น สามารถใช้ในการพัฒนาต่อยอดเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์กาแฟในอนาคตได้สำหรับเป็นทางเลือกกับผู้บริโภค และเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการลดการใช้น้ำจากการแปรรูปกาแฟ และได้พัฒนาออกแบบโลโก้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบของกาแฟที่มาจากกรรมวิธีแปรรูป 4 ชนิด เพื่อเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์แนวทางในการพัฒนาต่อยอดและเพิ่มมูลค่าต่อไป

การสำรวจแหล่งปลูกและศึกษาลักษณะพันธุ์ชาอัสสัมที่มีการเจริญเติบโตดีและเหมาะสมกับสภาพพื้นที่สูง พบว่า ชาอัสสัม หรือชาเมี่ยง มีการปลูกกันมานาน มากกว่า 100 ปี บางแห่งไม่สามารถระบุแหล่งที่มาของต้นชาได้ โดยเกษตรกรมีแปรรูปออกเป็น 2 รูปแบบหลักๆ ได้แก่ ชาหมัก หรือเมี่ยง และพบแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชา เช่น ใบชาแห้ง สำหรับชงดื่ม หรือ จำหน่ายใบชาให้กับโรงงานแปรรูปนอกพื้นที่ โดยสายพันธุ์ชาที่พบในพื้นที่แบ่งได้ 3 ชนิด ได้แก่ 1.เมี่ยง หรือชาอัสสัม 2.ชาเมี่ยงเก่า มีรสฝาด และ 3.ชาอ้อดำ ซึ่งช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวชาเมี่ยงและชาอัสสัมที่ทำให้ชามีรสชาติดี และมีคุณภาพที่สุดจะอยู่ในช่วงก่อนเข้าฤดูฝน หรือช่วงเดือนช่วงเดือน เม.ย. – พ.ค. เป็นช่วงก่อนเข้าฤดูฝน

ซึ่งจากการเปรียบเทียบคุณสมบัติของใบชาในแต่ละแหล่งปลูก ด้วยการสำรวจข้อมูลพื้นฐาน การผลิตชาในแหล่งผลิตต่างๆ ของ สวพส. โดยได้เก็บตัวอย่างใบชาอัสสัมที่มีอายุแตกต่างกัน ได้แก่ชาที่มีอายุมากกว่า 50 ปี และมีอายุน้อยกว่า 50 ปี จำนวน 5 พื้นที่ 1) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงป่าแป๋ 2) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงปางมะโอ 3) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงโหล่งขอด 4) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงวาวี (บ้านวาวี) / (บ้านแม่พริก) 5) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของใบชา พบว่า ปริมาณของสารสกัดหยาบของใบชาอยู่ในช่วงร้อยละ 0.39 – 2.36 ซึ่งใบชาที่มาจากพื้นที่บ้านแม่พริก (โครงการพัฒนาพื้นที่สูงฯ วาวี) ในต้นชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี พบสารสกัดสูงสุดอยู่ที่ 2.36 % และการวิเคราะห์คุณสมบัติสารสำคัญทางเภสัชวิทยาในห้องปฏิบัติการ โดยทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและสารสำคัญในชาอัสสัมในแต่ละพื้นที่ พบว่า ปริมาณสารพอลิฟีนอลรวม (Total polyphenol) พบมากที่สุดในพื้นที่ บ้านป่าเมี่ยง และพื้นที่บ้านแม่พริก มีค่าปริมาณสารพอลิฟีนอลรวม อยู่ที่ 309.85 และ 296.10 mg GAE ตามลำดับ ซึ่งมาจากต้นชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี ปริมาณสารสำคัญหลัก ได้แก่ Catechin Epicatechin และ EGCG จากการศึกษาสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดนี้ พบว่า ใบชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี ที่เก็บจากทุกแหล่งปลูกในการศึกษานี้ ตรวจพบปริมาณสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดสูงกว่าต้นชาที่มีอายุมากกว่า 50 ปี และเมื่อจำแนกตามแหล่งปลูกพบว่าพื้นที่ป่าแป๋ต้นชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี มีปริมาณสาร Catechin สูงสุด อยู่ที่ 21.20 ug/mL พบมากที่สุดในพื้นที่บ้านป่าเมี่ยง ส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสำหรับใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ พบว่า ฤทธิ์ในการต้านจุลชีพที่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ เช่น แบคทีเรียทางเดินอาหาร แบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง แบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก จากผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดใบชาอัสสัม พบว่า สารสกัดจากทุกตัวอย่างทั้งจากแหล่งพันธุ์ และช่วงอายุที่แตกต่างกัน สามารถต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และยีสต์ดีใกล้เคียงกับชุดควบคุมยาปฏิชีวนะ พบว่ามีค่าสีกัด MIC อยู่ในช่วง 0.015 – 0.062 mg./ml. ส่วนฤทธิ์ในการออกซิเดชัน หรืออนุมูลอิสระ

(Antioxidant activity) พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ Lipid peroxidation ในทุกตัวอย่างมีฤทธิ์ในการยับยั้งใกล้เคียงกัน ส่วนในด้านของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ พบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในใบชาที่มีอายุต่ำกว่า 50 ปี และมาจากแหล่งปลูกบ้านป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด ได้แก่ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ พบ ปริมาณ 1.40 – 2.61 กรัม ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP (Ferric ion reducing/antioxidant power) พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 112.71 – 472.21 มิลลิกรัม ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส (Collagenase enzyme inhibition) เพื่อประเมินความสามารถในการลดเลือนริ้วรอย (Anti-wrinkle) พบว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด คือ MMP-1 และ MMP-2 collagenase ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส Tyrosinase ซึ่งเป็นสารสำคัญในกระบวนการสร้างเม็ดสี มีฤทธิ์เท่ากับ 391.755 มิลลิกรัม KAE ต่อปริมาณสารสกัด 1 กรัม ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase ของสารสกัด (ฤทธิ์ลด/ยับยั้งภาวะเมแทบอลิกซินโดรม โดยมีฤทธิ์ที่ความเข้มข้นสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ร้อยละ 50 เท่ากับ 2.35 mg/mL ส่วนผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase พบร้อยละ 50 เท่ากับ 2.76 mg/mL ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดภาวะความดันสูง โดยมีค่าฤทธิ์การยับยั้งร้อยละ 50 (IC₅₀) ที่ความเข้มข้น เท่ากับ 7.83 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

โดยภาพรวมแล้วพบว่าใบชาจาก บ้านป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด (ใบชาจากต้นที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี) มีปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดสูงสุด สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวม และสารสำคัญหลัก Catechin, Epicatechin, EGCG ที่พบปริมาณสูงที่สุดเช่นกัน และมีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ และในด้านปริมาณสารจากต้นชาที่มีอายุมากกว่า 50 ปี และน้อยกว่า 50 นั้น พบว่า ต้นชาที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี มีสารสำคัญในใบชามากกว่าต้นชาที่มีอายุมาก