ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

ปริญญา

วิศวกรรมเคมี — **สาขา**

วิศวกรรมเคมี — **ภาควิชา**

เรื่อง การตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากสารสกัดบัวบกด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent โดยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken

Precipitation of Active Ingredients from Extracted *Centella asiatica* via Gas Anti-Solvent Technique Using Box-Behnken Design of Experiments

นามผู้วิจัย นางสาวอรกนิษฐ์ จันทร์เทศ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์มานพ เจริญไชยตระกูล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์ชลิดา เนียมนุ้ย, D.Eng.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์อภิญญา ดวงจันทร์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากสารสกัดบัวบกด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent โดยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken

Precipitation of Active Ingredients from Extracted *Centella asiatica* via Gas Anti-Solvent Technique Using Box-Behnken Design of Experiments

โดย

นางสาวอรกนิษฐ์ จันทร์เทศ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อรกนิษฐ์ จันทร์เทศ 2557: การตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากสารสกัดบัวบกด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent โดยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี) สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์
มานพ เจริญไชยตระกูล, Ph.D. 186 หน้า

งานวิจัยนี้ศึกษาการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบก 4 ชนิดคือ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก ด้วยกระบวนการ GAS โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัวต้านการละลาย และศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อการตกตะกอน ได้แก่ เปอร์เซ็นต์เอทานอลในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและเมทานอล (0-100 เปอร์เซ็นต์) อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ (3-9 ml/min) และอุณหภูมิ (25-45 °C) และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญ โดยออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญด้วยเทคนิค HPLC นอกจากนี้ยังทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์เอทานอลในตัวทำละลายผสมส่งผลต่อปริมาณมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ และกรดอะเซียติกอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ในขณะที่ปริมาณกรดมาเดคาสสิกไม่พบปัจจัยที่มีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่าการใช้ตัวทำละลายผสมที่มีเปอร์เซ็นต์เอทานอลน้อยสามารถตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกได้ปริมาณสูง โดยสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก ด้วยกระบวนการ GAS สามารถตกตะกอนสารได้ 5,733±537, 2,948±249, 1,678±163 และ 436±17 µg/สารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 ml ตามลำดับ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่ามีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงสุดเท่ากับ 5,622±336 และ 10,729±820 µg/สารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 ml ตามลำดับ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 3,653±49 µg/สารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 ml

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ornkanit Chantes 2014: Precipitation of Active Ingredients from Extracted *Centella asiatica* via Gas Anti-Solvent Technique Using Box-Behnken Design of Experiments. Master of Engineering (Chemical Engineering), Major Field: Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Associate Professor Manop Charoenchaitrakool, Ph.D. 186 pages.

The aim of this project was to precipitate active ingredients from *Centella asiatica* using Gas Anti-Solvent (GAS) process. Main compounds, namely, madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid are considered. In this research, active ingredients were extracted from *Centella asiatica* dried powder by maceration method. The extracted solution was used as a starting solution for the GAS precipitation process. The effects of % ethanol in the mixed solvent of ethanol and methanol (0-100%), carbon dioxide flow rate (3-9 mL/min) and temperature (25-45°C) were investigated. The Box–Behnken design of experiment was carried out using the MINITAB 15. The precipitated product was analyzed using HPLC and tested for antioxidant activity (via DPPH and ABTS assays). The amount of total phenolic was also determined. It was found that % ethanol in the mixed solvent was significant at 95% level on madecassoside, asiaticoside and asiatic acid. However, the operating parameters had no significant effect on the madecassic acid. Higher amounts of active ingredients could be precipitated when a lower percentage of ethanol in the mixed solvent was used in the maceration step. At the optimal conditions, the amount of madecassoside, asiaticoside, medecassic acid and asiatic acid were found to be 5,733±537, 2,948±249, 1,678±163 and 436±17 μg/5 mL of extracted solution, respectively. In the antioxidant studies, the highest Trolox equivalent found in the products using DPPH and ABTS assays were 5,622±336 and 10,729±820 μg/5 mL of extracted solution. The highest total phenolic was found to be 3,653±49 μg/5 mL of extracted solution.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. มานพ เจริญไชยตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำวิทยานิพนธ์และช่วยเหลือการวางแผนการทำงานวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร. ชลิดา เนียมนุ้ย ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้คอยให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้อสารเคมีในการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระและการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิทธินันท์ ท่อแก้ว ประธานการสอบและผู้ทรงคุณวุฒิที่เสียสละเวลา เพื่อเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และกรุณาให้คำปรึกษาคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คุณชนาธิป อุทัย และคุณสุพัตรา ศรีจิ๋ว เจ้าหน้าที่ปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ธุรการ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณครอบครัว รุ่นพี่และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจ และสนับสนุนจนประสบความสำเร็จในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

อรกนิษฐ์ จันทร์เทศ

พฤษภาคม 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (1)

สารบัญตาราง (2)

สารบัญภาพ (6)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (9)

คำนำ 1

วัตถุประสงค์ 3

การตรวจเอกสาร 4

อุปกรณ์และวิธีการ 64

อุปกรณ์ 64

วิธีการ 67

ผลและวิจารณ์ 75

สรุปและข้อเสนอแนะ 133

สรุป 133

ข้อเสนอแนะ 136

เอกสารและสิ่งอ้างอิง 137

ภาคผนวก 146

ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานต่าง ๆ 147

ภาคผนวก ข การคำนวณหาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ ปริมาณ Trolox เทียบเท่า และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 160

ภาคผนวก ค พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตรแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญด้วยเทคนิค HPLC 177

ประวัติการศึกษาและการทำงาน 186

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1	คุณค่าทางโภชนาการของบัวบกในสัดส่วน 100 กรัม	7
2	ชนิดของสารเทอร์ปีนและจำนวนหน่วยไอโซพรีนในโมเลกุล	11
3	ชนิดของสารไตรเทอร์ปีนในกลุ่มไตรเทอร์ปีนอะไกลโคนและไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์	11
4	สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนที่พบในบัวบกของประเทศต่าง ๆ	12
5	คุณสมบัติของ กรดอะเซียติก กรดมาเดคาสสิก อะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์	14
6	ผลของตัวทำละลายที่มีต่อปริมาณสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด	24
7	ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนด้วยวิธีเขย่า 24 ชั่วโมงและวิธีการปั่นให้ละเอียด	26
8	ผลของตัวทำละลายที่มีต่อปริมาณสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด	29
9	ข้อมูลคุณสมบัติที่จุดวิกฤตของสารบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ	41
10	คุณสมบัติทางกายภาพของก๊าซ ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต (SCF) และของเหลว	44
11	การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ที่มี 3 ปัจจัย	60
12	สภาวะการทดลองที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยเทคนิค GAS	70
13	ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญจากการสกัดผงบัวบกด้วยวิธีการแช่ด้วยเอทานอล	76
14	ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญจากการตกตะกอนสารสกัดบัวบกด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร)	77
15	ค่าความคลาดเคลื่อนและค่าสัมประสิทธ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วของแต่ละแบบจำลองสำหรับสารมาเดคาสโซไซด์	79
16	ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของสารมาเดคาสโซไซด์	80
17	เปรียบเทียบปริมาณสารมาเดคาสโซไซด์ที่ได้จากการทดลองกับปริมาณสารมาเดคาสโซไซด์ที่ได้จากแบบจำลองแบบ Linear + Square (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร)	83
18	ค่าความคลาดเคลื่อนและค่าสัมประสิทธ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วของแต่ละแบบจำลองสำหรับสารอะเซียติโคไซด์	84
19	ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของสารอะเซียติโคไซด์	85

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

20 เปรียบเทียบปริมาณสารอะเซียติโคไซด์ที่ได้จากการทดลองกับปริมาณสารอะเซียติโคไซด์ที่ได้จากแบบจำลองแบบ Linear+Square (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร) 88

21 ค่าความคลาดเคลื่อนและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วของแต่ละแบบจำลองสำหรับกรดมาเดคาสสิก 89

22 ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของกรดมาเดคาสสิก 90

23 เปรียบเทียบปริมาณกรดมาเดคาสสิกที่ได้จากการทดลองกับปริมาณกรดมาเดคาสสิกที่ได้จากแบบจำลองแบบ Linear (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร) 93

24 ค่าความคลาดเคลื่อนและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วของแต่ละแบบจำลองสำหรับกรดอะเซียติก 94

25 ค่าสัมปะสิทธิ์ถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของกรดอะเซียติก 95

26 เปรียบเทียบปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากการทดลองกับปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากแบบจำลองแบบ Linear+Square (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร) 98

27 ค่าความคลาดเคลื่อนและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วของแต่ละแบบจำลองสำหรับสารไตรเทอร์ปีนรวม 99

28 ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวม 100

29 เปรียบเทียบปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ได้จากการทดลองกับปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ ได้จากแบบจำลองแบบ Linear+Square (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร) 104

30 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทั้ง 4 ชนิดที่สภาวะการทดลองที่เหมาะสม 110

31 เปรียบเทียบปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์กับปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร) 112

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

32 ค่าTrolox Equivalent Antioxidant Capacity ของสารสกัดบัวบกที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay 115

33 ค่าTrolox Equivalent Antioxidant Capacity ของสารสกัดบัวบกที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ ด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging Assay 118

34 ค่า Gallic Acid Equivalent Capacity ของสารสกัดบัวบกที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ ด้วยวิธี Total Phenolic Compound Content 123

35 ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ตกตะกอนได้จากกระบวนการ GAS ในหน่วยไมโครกรัมต่อผงบัวบก 1 กรัม 130

36 ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญจากการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วม 131

ตารางผนวกที่

ก1 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของมาเดคาสโซไซด์ 148

ก2 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของอะเซียติโคไซด์ 149

ก3 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของกรดมาเดคาสสิก 150

ก4 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของกรดอะเซียติกในเอทานอล 151

ก5 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของกรดอะเซียติกในตัวทำละลายผสม 152

ก6 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของกรดอะเซียติกในเมทานอล 153

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ก7 ค่าดูดกลืนแสงและเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยวิธี DPPH Assay 155

ก8 ค่าดูดกลืนแสงและเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยวิธี ABTS Assay 157

ก9 ค่าดูดกลืนแสงของการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 159

ข1 ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญของสารที่ตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ 162

ข2 ปริมาณ Trolox เทียบเท่าของการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารที่ตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร) 166

ข3 ปริมาณ Trolox เทียบเท่าของการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 5 มิลลิลิตร 174

ค1 พื้นที่ใต้กราฟของสารที่ตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ (กลั้วสารที่ตกตะกอนใน Filter และ Jerguson ด้วยเอทานอลอย่างละ 10 ml) 179

ค2 พื้นที่ใต้กราฟของสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ 184

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1	ลักษณะของบัวบก	5
2	โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟลาโวนอยด์	9
3	สูตรโมเลกุลหลักของสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบก	14
4	โครงสร้างหลักของสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบก	16
5	โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ UV เป็นตัวตรวจวัด	23
6	แผนภาพความดันและอุณหภูมิของสารบริสุทธิ์ใด ๆ	42
7	การเปลี่ยนแปลงการแยกสถานะระหว่างของเหลวกับก๊าซบนเส้นการระเหย	43
8	สภาพแพร่ในตัวเอง (Self-Diffusivity) ของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ช่วงความดันและอุณหภูมิต่าง ๆ	45
9	ค่าความหนืดของคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิและความดันต่าง ๆ	46
10	ความสามารถในการละลายของแนพทาลีนในคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความดันและอุณหภูมิต่าง ๆ	48
11	ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นลด (Reduced Density, $\rho_r = \rho/\rho_c$) ของคาร์บอนไดออกไซด์กับอุณหภูมิลด (T_r) และความดันลด (P_r)	48
12	กระบวนการขยายตัวอย่างรวดเร็วของสารละลายเหนือจุดวิกฤต (RESS)	50
13	กระบวนการการตกตะกอนจากสารละลายก๊าซอิ่มตัว (PGSS)	51
14	กระบวนการการตกตะกอนโดยตัวต้านการละลายที่เป็นของไหลบีบอัด (PCA)	53
15	กระบวนการการเพิ่มสมรรถนะการกระจายตัวของสารละลายโดยใช้ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต (SEDS)	54
16	กระบวนการ Gas Anti-Solvent (GAS)	55
17	พื้นที่การตอบสนองแบบ 3 มิติและกราฟเส้นโครงร่าง	56
18	การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (CCD)	59
19	การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken สำหรับ 3 ปัจจัย	61
20	แผนภาพอุปกรณ์ที่ใช้ในการตกตะกอนด้วยเทคนิค GAS	69
21	Contour Plots แสดงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณมาเดคาสโซไซด์	81

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	Contour Plots แสดงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณอะเซียติโคไซด์	86
23	Contour Plots แสดงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณกรดมาเดคาสสิก	91
24	Contour Plots แสดงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณกรดอะเซียติก	96
25	Contour Plots แสดงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวม	101
26	สภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิด	109
27	เปรียบเทียบปริมาณของ Trolox เทียบเท่าของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ จากการวิเคราะห์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay	120
28	เปรียบเทียบปริมาณของ Trolox เทียบเท่าของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ จากการวิเคราะห์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay	121
29	ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (ปริมาณ Trolox) จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH Assay กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Maceration) กับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS	125
30	ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (ปริมาณ Trolox) จากการทดสอบด้วยวิธี ABTS Assay กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Maceration) กับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS	126
31	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับปริมาณสารไกลโคไซด์และปริมาณสารอะไกลโคนที่ได้จากการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยกระบวนการ GAS	128

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ก1	กราฟมาตรฐานของมาเดคาสโซไซด์ในเอทานอล	149
ก2	กราฟมาตรฐานของอะเซียติโคไซด์ในเอทานอล	150
ก3	กราฟมาตรฐานของกรดมาเดคาสสิกในเอทานอล	151
ก4	กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในเอทานอล	152
ก5	กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในตัวทำละลายผสม	153
ก6	กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในเมทานอล	154
ก7	กราฟมาตรฐานของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay	156
ก8	กราฟมาตรฐานของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Assay	157
ก9	กราฟมาตรฐานของการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	159
ค1	โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง	178

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ε	=	ค่าความผิดพลาด
η	=	Response Surface
ρ_r	=	Reduced Density
ABTS	=	2,2-azion-bis-3-ethylbenzothiazo line-6-sulphonic acid
ASES	=	Aerosol Solvent Extraction System
CCD	=	Central Composite Design
CO_2	=	Carbon Dioxide
CP	=	Critical Point
D	=	Desirability Function
DAE	=	Design and Analysis of Experiment
DI	=	De-ionization
DPPH	=	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
F	=	Flow Rate
GAS	=	Gas Anti-Solvent
Glu	=	Glucose
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
IC_{50}	=	Half Maximal Inhibitory Concentration
P_c	=	Critical Pressure
P_r	=	Reduced Pressure
PCA	=	Precipitation with a Compressed Fluid Anti-Solvent
PGSS	=	Precipitation from Gas Saturated Solution
R^2	=	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ
R^2(adj)	=	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว
RESS	=	Rapid Expansion of Supercritical Solution
Rha	=	Rhamnose
RSM	=	Response Surface Methodology
S	=	Solvent (% of Ethanol in the Mixed Solvent of Ethanol and Methanol)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

SAS	=	Supercritical Anti-Solvent
SCF	=	Supercritical Fluid
SE	=	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
SEDS	=	Solution-Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids
SFX	=	Supercritical Fluid Extraction
T	=	Temperature
T_c	=	Critical Temperature
T_r	=	Reduced Temperature
TLC	=	Thin Layer Chromatography
TP	=	Triple Point
Xi	=	Factor
Y	=	Response

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากสารสกัดบัวบกด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent โดยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken

Precipitation of Active Ingredients from Extracted *Centella asiatica* via Gas Anti-Solvent Technique Using Box-Behnken Design of Experiments

คำนำ

บัวบก จัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่ง ที่คนไทยนิยมบริโภคกันมานานแล้วโดยบริโภคในรูปของผักสดหรือเป็นผักเครื่องเคียงกับอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น แกงเหลือง น้ำพริก ผัดไทย ลาบ เป็นต้น นอกจากจะมีประโยชน์ในด้านการเป็นยารักษาโรค ยังสามารถนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม น้ำมันหอมระเหย ตลอดจนทำเครื่องสำอางได้อีกด้วย การนำบัวบกมาใช้โดยตรงต้องใช้ปริมาณมากจึงจะออกฤทธิ์ตามต้องการ เพื่อให้ง่ายต่อการบริโภคจึงมีการนำบัวบกมาสกัดเฉพาะสารสำคัญที่ต้องการ มาทำเป็นยาเม็ดหรือบรรจุในแคปซูล สารออกฤทธิ์ที่สำคัญในบัวบกได้แก่ กลุ่มสารประกอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids Compound) ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบ 2 กลุ่มคือ สารประกอบโมโนและเซสควิเทอร์ปีน (Mono and Sesquiterpene Compounds) และสารประกอบไตรเทอร์ปีน (Triterpene Compound) โดยพบว่าสารประกอบไตรเทอร์ปีนเป็นสารประกอบที่พบมากที่สุดในใบบัวบก ซึ่งสารประกอบหลักของไตรเทอร์ปีนในบัวบกประกอบด้วย มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) อะเซียติโคไซด์ (Asiaticoside) กรดมาเดคาสสิก (Madecassic Acid) และกรดอะเซียติก (Asiatic Acid) นอกจากสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดข้างต้นแล้ว ในบัวบกยังพบสารประกอบไตรเทอร์ปีนชนิดอื่น ๆ อีกได้แก่ 6-เบต้า-ไฮดรอกซีอะเซียติก กรดเทอร์มิโนลิก กรดบรามิก บราโมไซด์ เซ็นเทลโลไซด์ กรดเซ็นโทอิก และบรามิโนไซด์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลไซด์ (Flavonoid Glycosides) กลุ่มกรดอะมิโนอิสระ (Free Amino Acid) และกลุ่มสารประกอบพอลีอะซีติลเลนิค (Polyacetylenic Compounds) อีกด้วย

สารเหล่านี้ทำให้บัวบกมีสรรพคุณต่าง ๆ มากมาย เช่น ฤทธิ์ในการสมานแผล ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ในการลดการอักเสบ ฤทธิ์ในการป้องกันระบบประสาท ฤทธิ์ในการรักษาโรคเรื้อนและวัณโรคที่ผิวหนัง ฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร และฤทธิ์ในการลดความดันโลหิต เป็นต้น ซึ่งในการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกก็สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Conventional Soxhlet Extraction) การสกัดโดยการแช่ในตัวทำละลาย (Maceration) การสกัดโดยใช้คลื่นเหนือเสียงเช่น คลื่นอัลตาโซนิค ช่วยในการสกัด หรือในงานวิจัยนี้ใช้กระบวนการ Gas Anti-Solvent (GAS) ในการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤต เนื่องจากของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตมีคุณสมบัติในการทำละลายที่ดีหลายประการ เช่น มีความหนาแน่นใกล้เคียงกับของเหลว มีความหนืดต่ำเหมือนก๊าซ เป็นต้น โดยที่ของไหลที่ใช้ในกระบวนการนั้นจะต้องเป็นสารที่หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษ และไม่สามารถละลายสารออกฤทธิ์สำคัญที่ต้องการได้ ซึ่งของไหลที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในขณะนี้คือ คาร์บอนไดออกไซด์ เพราะมีจุดวิกฤตต่ำ คือที่สภาวะความดัน 72.8 บรรยากาศ และอุณหภูมิ 31.1 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ใกล้จุดวิกฤตนี้คาร์บอนไดออกไซด์จะมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ดี สามารถละลายตัวทำละลายอินทรีย์และสามารถชะล้างตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ และตัวคาร์บอนไดออกไซด์เองสามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่ายหลังจากสิ้นสุดกระบวนการที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศ ทำให้ไม่มีสารตกค้างในผลิตภัณฑ์

งานวิจัยนี้ เราจะศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากพืชสมุนไพรบัวบกในกลุ่มไตรเทอร์ปีน คือ มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) อะเซียติโคไซด์ (Asiaticoside) กรดมาเดคาสสิก (Madecassic Acid) และกรดอะเซียติก (Asiatic Acid) โดยการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลผสมเมทานอล ซึ่งมีเอทานอลผสมอยู่ 0, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร โดยใช้เวลาในการแช่ 24 ชั่วโมง และนำมาตกตะกอนโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัวต้านการละลาย (Anti-Solvent) ด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent โดยศึกษาผลของอุณหภูมิในช่วง 25-45 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ในช่วง 3-9 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography วิเคราะห์สมบัติการต้านสารออกซิเดชันด้วยเทคนิค DPPH Radical Scavenging Assay และ ABTS Radical Scavenging Assay และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Total Phenolic Compounds Content

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการตกตะกอนของสารออกฤทธิ์สำคัญ 4 ชนิดคือ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิกและกรดอะเซียติก ด้วยกระบวนการ GAS โดยศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ (เอทานอล เมทานอล และตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและเมทานอล) อุณหภูมิ (25-45 องศาเซลเซียส) และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ (3-9 มิลลิลิตรต่อนาที) ที่มีผลต่อปริมาณสารที่ตกตะกอนได้ โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken และทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญ

2. เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay และ ABTS Radical Scavenging Assay และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Total Phenolic Compounds Content ของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS

ขอบเขตของงานวิจัย

เพื่อศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการตกตะกอนมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก โดยในงานวิจัยนี้ ทำการสกัดโดยการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลผสมเมทานอล ซึ่งมีเอทานอลผสมอยู่ 0, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร โดยใช้เวลาในการแช่ 24 ชั่วโมง ปริมาณผงใบบัวบกต่อตัวทำละลายอินทรีย์ เท่ากับ 5 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร และนำสารละลายของสารสกัดที่ได้มาตกตะกอนด้วยเทคนิค Gas Anti-Solvent ซึ่งใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัวต้านการละลาย และศึกษาผลของอุณหภูมิ (25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส) อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ (3, 6 และ 9 มิลลิลิตรต่อนาที) ที่มีต่อปริมาณสารที่ได้จากการตกตะกอน นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

บัวบก

บัวบกเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กที่ขึ้นในเขตร้อน มีลักษณะใบคล้ายกับใบบัว พบตามที่ชื้นแฉะทั่วไป ถิ่นกำเนิดเดิมพบในประเทศอินโดนีเซีย อินเดีย ศรีลังกา ในประเทศไทยสามารถพบได้ทุกภาคของประเทศ (วันดี, 2541) บัวบกจัดเป็นพืชสมุนไพรที่รู้จักกันมานาน หาสามารถหาได้ง่าย นอกจากนี้บัวบกยังมีสรรพคุณมากมาย โดยเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่าน้ำใบบัวบกช่วยแก้อาการช้ำใน แก้ร้อนในกระหายน้ำ ลดอาการปวดศีรษะข้างเดียว บำรุงสุขภาพสมอง แก้ความดันโลหิตสูง แก้อ่อนเพลีย เมื่อยล้า บำรุงธาตุ บำรุงหัวใจ บำรุงสายตา และขับปัสสาวะ ในบัวบกประกอบด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญหลายชนิด อาทิเช่น มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) กรดมาเดคาสสิก (Madecassic Acid) อะเซียติโคไซด์ (Asiaticoside) กรดอะเซียติก (Asiatic Acid) แอสพาเตต (Aspartate) กลูตาเมต (Glutamate) เซอรีน (Serine) ไทโอนีน (Threonine) แมกนีเซียม (Magnesium) แคลเซียม (Calcium) โซเดียม (Sodium) เรตินัล (Retinol, วิตามินเอ) ไทอะมิน (Thiamine, วิตามินบี 1) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin, วิตามินบี 2) ไพริดอกซิน (Pyrudoxine, วิตามินบี 6) เมนาไดโอน (Menadione, วิตามินเค) เป็นต้น และพบว่าส่วนสำคัญของบัวบกที่มีสารสำคัญอยู่มากที่สุด คือส่วนของใบและราก (ดวงจันทร์, 2546)

1. ลักษณะทั่วไปของใบบัวบก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Centella asiatica* (Linn.) Urban

ชื่อวงศ์ : Umbelliferae

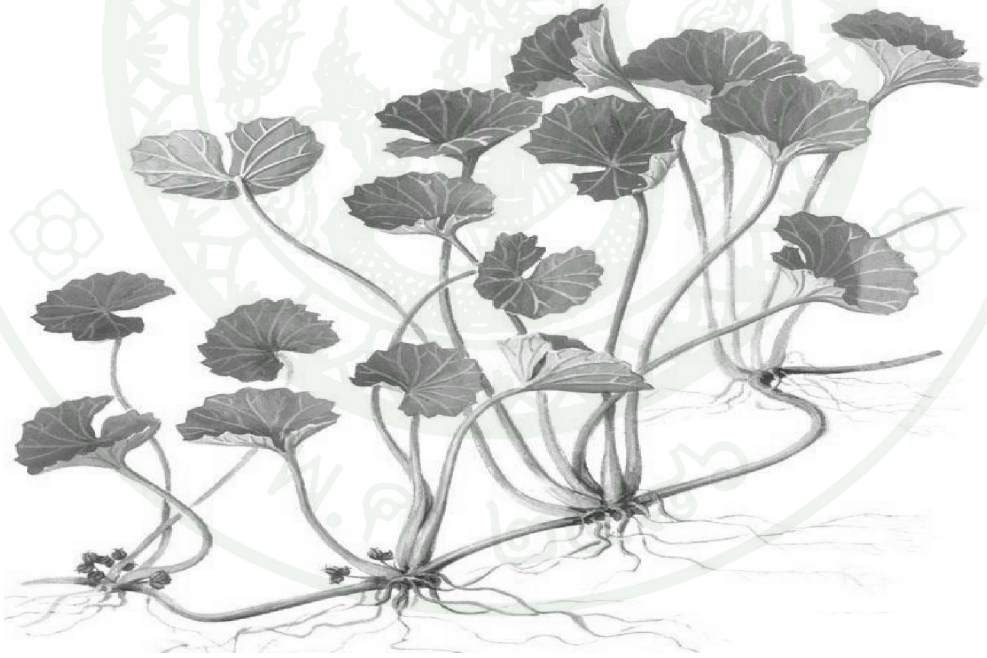
ชื่อภาษาอังกฤษ : Asiatic Pennywort, Indian Pennywort, Gotu Kola และ Tiger Herbal

ชื่อพื้นเมือง : ผักหนอก (ภาคเหนือ) ผักแว่น (จันทบุรี ภาคใต้) จำปาเครือ กะบังนอก (ลำปาง) ปะหนะ เอขาเด๊าะ (กะเหรี่ยง แม่ฮ่องสอน)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้นบัวบกเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กความสูงประมาณ 1 ฝ่ามือ ชอบขึ้นตามพื้นดินที่ชื้นแฉะ ลำต้นจะเลื้อยไปตามพื้นดิน สามารถแตกรากและใบใหม่ออกมาตามข้อของลำต้นได้ ทำให้ขึ้นแผ่ติดต่อกันเป็นบริเวณกว้าง ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยวออกเป็นกระจุกที่ข้อลำต้น ข้อละ 3-5 ใบ ใบมีสีเขียวมีรูปกลมหรือไต ขอบใบหยักเป็นคลื่น ผิวด้านหลังใบเรียบ ด้านท้องใบมีขนสั้นเล็กน้อย มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-5 เซนติเมตร มีก้านชูใบยาว 1.5-7 เซนติเมตร ออกดอกเป็นช่อคล้ายร่ม โดยจะออกอยู่ที่บริเวณโคนต้นที่ผิวดิน ที่ข้อหนึ่งจะมี 2-5 ช่อ ช่อละ 3-4 ดอก แต่ละดอกมีกลีบดอก 5 กลีบ ก้านช่อดอกยาว 0.5-5 เซนติเมตร ดอกมีสีม่วงอมแดง ขาว และเขียว ดอกอ่อนมีลักษณะตั้งตรง เมื่ออายุมากขึ้นจะมีลักษณะโค้งงอ ริ้วประดับมี 2-3 ใบ ผลสีเขียว มีขนาดเล็กเปลือกแข็ง ลักษณะกลมแบนยาวประมาณ 3–3.5 มิลลิเมตร ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของ ใบ ลำต้น ราก ของบัวบก (สมจิตร, 2544)



ภาพที่ 1 ลักษณะของบัวบก

ที่มา: Danielle Levy Nutrition Consulting (2013)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ประโยชน์ของบัวบก

การรับประทานบัวบก ไม่ว่าจะเป็นการทานสด เป็นผักจิ้มน้ำพริก หรือคั้นน้ำ จะช่วยให้ผ่อนคลายจากความกังวล ความเครียด ช่วยบำรุงสายตาได้ดี เนื่องจากในบัวบกประกอบด้วย วิตามินบี1 วิตามินบี2 วิตามินซี โดยเฉพาะวิตามินเอ ซึ่งพบในปริมาณสูง และยังมี คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ฟอสฟอรัส เหล็ก ฯลฯ แสดงดังตารางที่ 1 นอกจากนี้ยังช่วยทำให้ร่างกายหลั่งสารกาบา (Gamma Amino Butyric Acid, GABA) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่งในระบบประสาทส่วนกลางในปริมาณที่มากขึ้นที่ช่วยทำให้สมองผ่อนคลายและนอนหลับสบาย การรับประทานบัวบกยังช่วยกำจัดสารพิษซึ่งสะสมในสมองและระบบประสาท ตลอดจนช่วยกำจัดสารพิษตกค้างในร่างกายประเภทโลหะหนักและยาต่าง ๆ ช่วยบำรุงสมอง รักษาส่วนของสมองที่ถูกทำลายแล้วให้ดีขึ้น ป้องกันไม่ให้สมองที่เป็นปกติอยู่ถูกทำลายหรือเสื่อมลงเร็วขึ้น ทำให้มีสมาธิและความจำมากขึ้น มีความจดจ่อกับสิ่งใดสิ่งหนึ่งได้นานขึ้น (เดลินิวส์, 2553)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของบัวบกในสัดส่วน 100 กรัม

สารอาหาร	ปริมาณที่พบในบัวบก 100 กรัม
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	44.0
โปรตีน (กรัม)	1.8
ไขมัน (กรัม)	0.9
คาร์ไบไฮเดรต (กรัม)	7.1
ใยอาหาร (กรัม)	26.0
แคลเซียม (กรัม)	146.0
เบต้าแคโรทีน (*RE)	238.2
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	30.0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	3.9
วิตามินบี1 (มิลลิกรัม)	0.2
วิตามินบี2 (มิลลิกรัม)	0.0
ไนอะซีน (มิลลิกรัม)	0.8
วิตามินซี (มิลลิกรัม)	4.0
วิตามินเอ (IU)	11,800

หมายเหตุ *RE คือ ไมโครกรัมเทียบหน่วยเรตนัล

ที่มา: พรรณี และ จีระวรรณ (2542)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

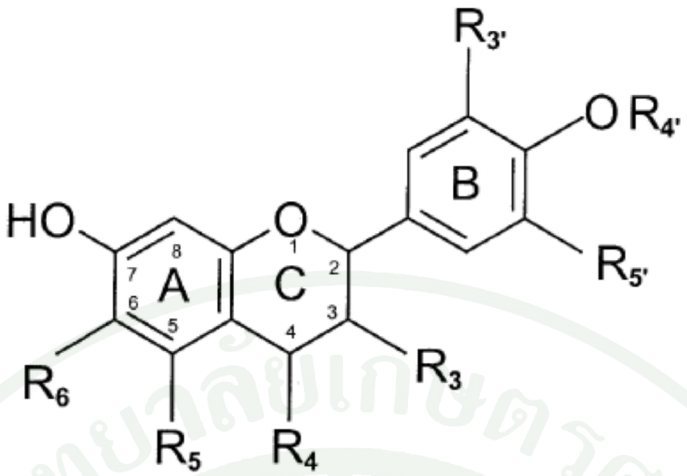
2. องค์ประกอบทางเคมีของบัวบก

บัวบกเป็นพืชที่มีสรรพคุณทางยาและทางเภสัชมากมาย ในบัวบกนั้นมีสารประกอบอยู่หลากหลายชนิด โดยในปี 1941 Bonstem เป็นคนแรกที่สกัดสารสำคัญจากบัวบกและต่อมาได้มีผู้ศึกษาและพบว่าสารที่ Bonstem สกัดได้จากบัวบกนั้นคือ อะเซียติโคไซด์ (Bonstem, 1941) การศึกษาข้างต้นนับเป็นการเริ่มต้นการศึกษาบัวบกตามหลักวิทยาศาสตร์ หลังจากนั้นได้มีการศึกษาสารประกอบทางเคมีของบัวบกและพบสารประกอบอื่นอีกมากมาย โดยสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม 4 กลุ่มหลักได้แก่ 1.ฟลาโวนอยด์ไกลไซด์ (Flavonoid Glycosides) 2.กรดอะมิโนอิสระ (Free Amino Acid) 3.สารประกอบพอลีอะซีติลเลนิค (Polyacetylenic Compounds) และ 4.สารประกอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids Compound) ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบ 2 กลุ่มคือ สารโมโนและเซสควิเทอร์ปีน (Mono and Sesquiterpene Compounds) และสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีน (Triterpene Compound) ซึ่งสารประกอบไตรเทอร์ปีนเป็นสารประกอบที่พบมากที่สุดในบัวบกและเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของบัวบกอีกด้วย

2.1 ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบกลุ่มพอลิฟีนอล ซึ่งประกอบด้วยวงอะโรมาติกตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป แสดงดังภาพที่ 2 สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ชนิดตามโครงสร้างของโมเลกุลหรือหมู่ฟังก์ชั่น (R_{3-6}, $R_{3'-5'}$) ดังนี้ ฟลาโวนนอล (Flavonols) ฟลาโวน (Flavones) แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) ฟลาวาโนน (Flavanones) ไอไซฟลาโวน (Isoflavones) ฟลาวานอล (Flavanols) (Ramos, 2007) โดยในส่วนใบของบัวบกพบสารประกอบของ ควอเซอติน-3-กลูโคไซด์ (Quercetin-3-Glucoside) และ แคมเฟอร์รอล-3-กลูโคไซด์ (Kaempferol-3-Glucoside) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฟลาโวน (นฤมล, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟลาโวนอยด์

ที่มา: Patel (2008)

2.2 กรดอะมิโนอิสระ

การวิจัยบัวบกพบว่ามีกรดอะมิโนอิสระที่สามารถระบุได้ทั้งหมด 25 ชนิด กระจายตามส่วนต่าง ๆ ของบัวบก โดยในส่วนรากของบัวบกจะพบกรดอะมิโน เซอรีน (Aerine) ไทโอนีน (Threonine) อะลานีน (Alanine) ไลซีน (Lysine) ฮีสทีดีน (Histidine) กลูตาเมต (Glutamate) แอสพาเตต (Aspartate) และอะมิโนบิทไทเรต (Amino Butyrate) และส่วนของใบ ก้าน และดอกของบัวบกจะพบปริมาณของกรดอะมิโนเซอรีนและอะลานีน มากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ที่พบในบัวบก (นฤมล, 2551; Muangnoi, 2007)

2.3 สารประกอบพอลีอะซีติลเลนิค

สารประกอบพอลีอะซีติลเลนิคที่สามารถระบุได้ในบัวบก ได้แก่ Pentadeca-2,9-Diene-4,6-Diyn-1-Olacetate, 3,8-Diacetoxypentadeca-1,9-Diene 4,6-Diyne (Sing and Rastogi, 1969), 3-Hydroxy-8-Acetoxy-Pentadeca-1,9-Diene-4,6-Diyne, 3-Hydroxy-10-Acetoxy-Pentadeca-1,8-Diene-4,6- Diyne และ Pentadeca-1,8-Diene-4,6-Diyne-3,10-Diol (นฤมล, 2551; Muangnoi, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.4 สารประกอบเทอร์พีนอยด์

สารประกอบเทอร์พีนอยด์เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยหน่วยของไอโซพรีน (Isoprene Units) หรือเรียกอีกอย่างว่า ไอโซพรีนอยด์ (Isoprenoids) เทอร์พีนอยด์ที่มีหน่วยของไอโซพรีนตั้งแต่ 2 หน่วยขึ้นไปจะเรียก เทอร์ปีน (Terpene) สารประกอบเทอร์ปีนสามารถแบ่งออกได้เป็น 7 กลุ่ม ตามจำนวนของหน่วยไอโซพรีนในโมเลกุล ดังนี้ โมโนเทอร์ปีน (Monoterpenes) เซสควิเทอร์ปีน (Sesquiterpenes) ไดเทอร์ปีน (Diterpenes) เซสเทอร์ปีน (Sesterpenes) ไตรเทอร์ปีน (Triterpenes) แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) และยาง (Rubber) แสดงดังตารางที่ 2 (Leray, 2012) สารประกอบเทอร์พีนอยด์ในบัวบกที่พบมี 2 กลุ่มได้แก่

2.4.1 สารโมโนและเซสควิเทอร์ปีน (Mono and Sesquiterpene Compounds)

สารโมโนและเซสควิเทอร์ปีนที่สามารถสกัดได้จากบัวบกได้แก่ β-Caryophyllene, Trans-β-Farnesene และ Germacrene-D ซึ่งเป็นสารประกอบโมโนและเซสควิเทอร์ปีนหลัก นอกจากนี้ยังพบ α-Copaene, β-Elemene และ Bicycloelemene (นฤมล, 2551; Muangnoi, 2007)

2.4.2 สารประกอบไตรเทอร์ปีน (Triterpene Compounds)

สารประกอบไตรเทอร์ปีนเป็นสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในบัวบก (Pramongkit, 1995; Muangnoi, 2007) มีงายวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาสารไตรเทอร์ปีนในบัวบก โดยพบสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (Triterpene Glycosides) และสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (Triterpene Aglycone) ซึ่งสารประกอบหลักของไตรเทอร์ปีนในบัวบกประกอบด้วย มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก โดยนอกจากสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดข้างต้นแล้ว ในบัวบกยังพบสารประกอบไตรเทอร์ปีนชนิดอื่น ๆ อีกได้แก่ 6-เบต้า-ไฮดรอกซีอะเซียติก กรดเทอร์มิโนลิก กรดบรามิก บราโมไซด์ เซ็นเทลโลไซด์ กรดเซ็นโทอิก บรามิโนไซด์ เป็นต้น (Srivastava *et al.,* 1997) แสดงดังตารางที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ชนิดของสารเทอร์ปีนและจำนวนหน่วยไอโซพรีนในโมเลกุล

เทอร์ปีน	ไอโซพรีน	คาร์บอน (อะตอม)
โมโนเทอร์ปีน	2	10
เซสควิเทอร์ปีน	3	15
ไดเทอร์ปีน	4	20
เซสเทอร์ปีน	5	25
ไตรเทอร์ปีน	6	30
แคโรทีนอยด์	8	40
ยาง	>100	>500

ที่มา: Leray (2012)

ตารางที่ 3 ชนิดของสารไตรเทอร์ปีนในกลุ่มไตรเทอร์ปีนอะไกลโคนและไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์

ไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน	ไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์
กรดอะเซียติก (Asiatic Acid)	อะเซียติโคไซด์ (Asiaticoside)
กรดมาเดคาสสิก (Madasiatic Acid)	มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside)
กรดเซ็นเทลลิก (Centellic Acid)	เซ็นเทลโลไซด์ (Centelloside)
กรดไอโซบรามิก (Isobrahmic Acid)	บราโมไซด์ (Brahmoside)
กรดบรามิก (Brahmic Acid)	บรามิโนไซด์ (Brahminoside)
กรดแทงค์คูนิก (Thankunic Acid)	แทงค์คูนิไซด์ (Thankuniside)
กรดไอโซแทงค์คูนิก (Isothankunic Acid)	ไอโซแทงค์คูนิไซด์ (Isothankuniside)
กรด-6-เบต้าไฮดรอกซีอะเซียติก (6-β-Hydroxyasiatic Acid)	อะเซียติโคไซด์-เอ (Asiaticoside-A)
กรดเทอร์มิโนลิก (Terminolic Acid)	อะเซียติโคไซด์-บี (Asiaticoside-B)
กรดเซ็นโทอิก(Centoic Acid)	

ที่มา: Srivastava *et al*. (1997)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนประกอบของบัวบกที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดสารสำคัญคือ ส่วนใบและก้าน (Muangnoi, 2007; นฤมล, 2551) ซึ่งชนิดและปริมาณสารสำคัญที่พบนั้นขึ้นอยู่กับ แหล่งที่มาของบัวบก ประเภทหรือลักษณะสายพันธุ์ของบัวบก ส่วนของบัวบกที่นำมาวิเคราะห์เช่น ใบ ลำต้น ราก (Pramongkit, 1995) รวมถึงกระบวนการเตรียมตัวอย่างในการสกัดและวิธีการสกัดสารสำคัญจากบัวบกอีกด้วย ตารางที่ 4 แสดงสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนที่พบในบัวบกของประเทศต่าง ๆ

ตารางที่ 4 สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนที่พบในบัวบกของประเทศต่าง ๆ

แหล่งที่ศึกษา	สารประกอบไตรเทอร์ปีน	ส่วนที่นำมาศึกษา	% Yield
จีน	อะเซียติโคไซด์	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ
	มาเดคาสโซไซด์	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ
ศรีลังกา	เซ็นเทลโลไซด์	ทุกส่วน	0.1-0.2%
	กรดเซ็นเทลริก	ทุกส่วน	0.03-0.05%
	กรดเซ็นโทอิก	ทุกส่วน	0.04-0.05%
อินเดีย	อะเซียติโคไซด์ - เอ	ใบ	0.05%
	อะเซียติโคไซด์ - บี	ใบ	0.03%
	กรดเทอร์มิโนริก	ใบ	ไม่ได้ระบุ
	แทงค์คูนิไซด์	ใบ	ไม่ได้ระบุ
	กรดแทงค์คูนิก	ใบ	ไม่ได้ระบุ
	อะเซียติโคไซด์	ทุกส่วน	0.0125%, 0.15%, 0.114%, 0.105%
	กรดอะเซียติก	ทุกส่วน	0.0916%
	กรดบรามิก	ทุกส่วน	0.097%, 0.0164%
	บราโมไซด์	ทุกส่วน	0.02%, 0.37%
	บรามิโนไซด์	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ
	กรดไอโซแทงค์คูนิก	ทุกส่วน	0.40%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

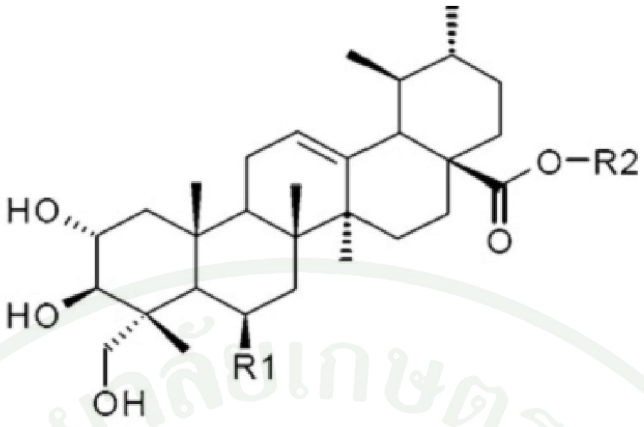
ตารางที่ 4 (ต่อ)

แหล่งที่ศึกษา	สารประกอบไตรเทอร์ปีน	ส่วนที่นำมาศึกษา	% Yield
อินเดีย	อินโดเซ็นเทลโลไซด์	ทุกส่วน	0.67%
	กรดอินโดเซ็นโทอิก	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ
	ไอโซแทงค์คูนิไซด์	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ
เกาะ	อะเซียติโคไซด์	ทุกส่วน	0.0921-0.6%
มาดากัสการ์	กรดอะเซียติก	ทุกส่วน	0.0702%
	กรดมาเดคาสสิก	ทุกส่วน	0.0789%
	มาเดคาสโซไซด์	ทุกส่วน	0.0051%
ไทย	อะเซียติโคไซด์	ใบ	1.07%
	อะเซียติโคไซด์	ก้าน, ราก	0.16%,0.15%

ที่มา: Pramongkit (1995)

สารประกอบไตรเทอร์ปีนพบได้ในพืชทุกชนิด แต่โดยส่วนใหญ่จะสังเคราะห์ในพืชตระกูลชั้นสูง สารประกอบไตรเทอร์ปีนประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวง 5 วง มีอะตอมคาร์บอน 30 อะตอมและมีสารหมู่แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์หรือกรดคาร์บอกซิลิกเชื่อมต่อกับวง ลักษณะโดยทั่วไปของสารประกอบไตรเทอร์ปีน จะไม่มีสี จุดหลอมเหลวสูง อยู่ในรูปของผลึก มีคุณสมบัติเป็นกรดรสชาติเผ็ดร้อนและขม เช่น ลิโมนินในผลไม้ตระกูลส้ม จะให้รสขมและละลายในไขมัน ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบก และ ตารางที่ 5 แสดงสูตรโมเลกุล จุดหลอมเหลว และน้ำหนักโมเลกุลของ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 สูตรโมเลกุลหลักของสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบก

ที่มา: Jia and Lu (2008)

ตารางที่ 5 คุณสมบัติของ กรดอะเซียติก กรดมาเดคาสสิก อะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์

ชื่อ	สูตรโมเลกุล	R1	R2	น้ำหนักโมเลกุล	จุดหลอมเหลว (^{o}C)
มาเดคาสโซไซด์	$C_{48}H_{78}O_{20}$	OH	Glu-Glu-Rha	974	213 - 217
อะเซียติโคไซด์	$C_{48}H_{78}O_{19}$	H	Glu-Glu-Rha	958	230 - 232
กรดมาเดคาสสิก	$C_{30}H_{48}O_{6}$	OH	H	504	262 - 268
กรดอะเซียติก	$C_{30}H_{48}O_{5}$	H	H	488	325 - 330

หมายเหตุ Glu=glucose และ Rha=Rhamnose

ที่มา: Pramongkit (1995)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

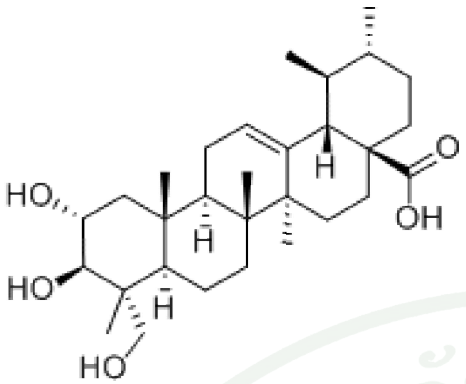
3. **สารออกฤทธิ์สำคัญของบัวบก**

สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีน (Triterpene Compound) ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้มี 4 ชนิด คือ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญที่มีฤทธิ์โดดเด่นทางด้านการสมานบาดแผล โดยสารประกอบไตรเทอร์ปีนเป็นสารประกอบที่พบเป็นจำนวนมากที่สุดในบัวบก ซึ่งจะอยู่ในรูปของสารประกอบไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ ซึ่งจะมีโมเลกุลของน้ำตาลต่อกับโครงสร้างของไตรเทอร์ปีน และ สารประกอบไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน จะไม่มีโมเลกุลของน้ำตาล โดยโมเลกุลของน้ำตาลในโครงสร้างของสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนนี้จะเป็นโมเลกุลที่ทำให้เกิดความเป็นขั้วในสารประกอบไตรเทอร์ปีน (Srivastava *et al*., 1997; Jia and Lu, 2008)

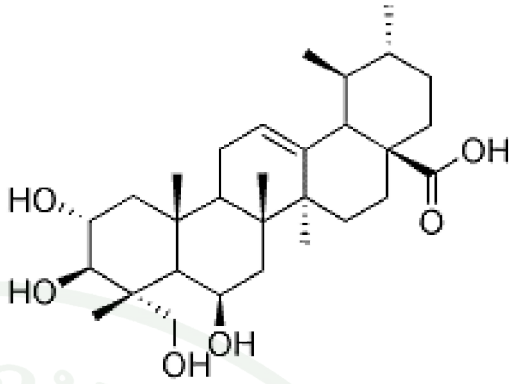
โดยชนิดของน้ำตาลในโครงสร้างของสารประกอบไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จะทำให้เกิดความแตกต่างของจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ (Free Hydroxyl Group) ที่แตกต่างกันออกไปนั่นคือ ถ้าโมเลกุลของไกลโคไซด์ซึ่งมีน้ำตาลที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระหลายหมู่ก็จะแสดงความเป็นขั้วสูง ดังนั้นจะสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว (Polar Solvents) แต่ในทางตรงข้ามกันหากโมเลกุลของน้ำตาลมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระอยู่น้อย การละลายของไกลโคไซด์ในตัวทำละลายชนิดมีขั้วก็จะละลายได้น้อยลงเช่น กันภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างของ ก.กรดอะเซียติก ข.กรดมาเดคาสสิก ค.อะเซียติโคไซด์ ง.มาเดคาสโซไซด์

บัวบกมีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ มากมายได้แก่ มีฤทธิ์ในการสมานแผลและการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดหนอง ฆ่าเชื้อราและลดอาการอักเสบได้และพบว่าสารสกัดจากต้นบัวบกด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร เนื่องจากมีกรดอะเซียติก กรดมาเดคาสสิก อะเซียติโคไซด์ มาเดคาสโซไซด์ สารสำคัญเหล่านี้มีฤทธิ์ในการเร่งสร้างเนื้อเยื่อและคอลลาเจน จึงช่วยสมานแผล นอกจากนี้สารสกัดจากบัวบกมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ดวงจันทร์, 2546)

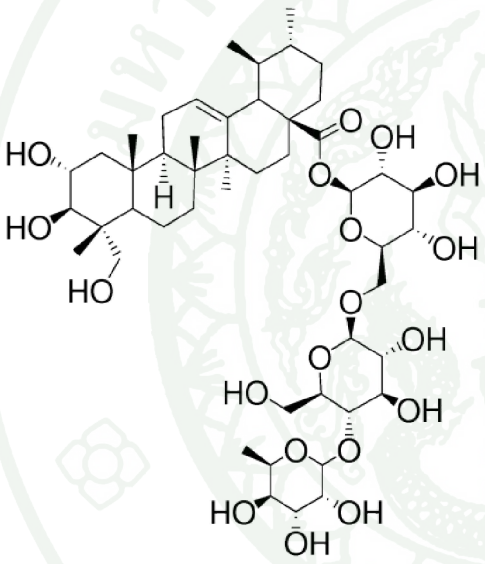
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



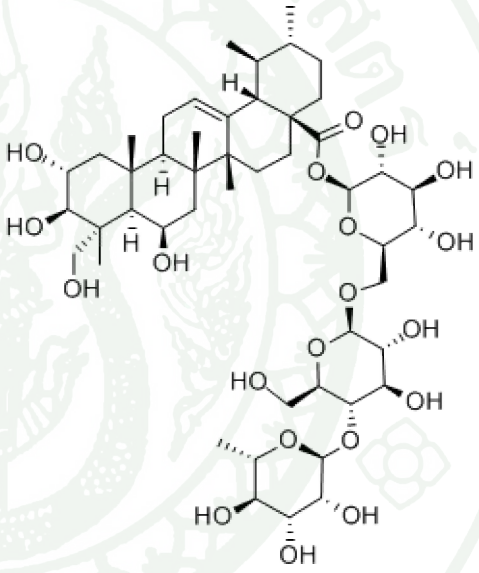
ก) กรดอะเซียติก



ข) กรดมาเดคาสสิก



ค) อะเซียติโคไซด์



ง) มาเดคาสโซไซด์

ภาพที่ 4 โครงสร้างหลักของสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบก

ที่มา: ก) และ ข) Chem Blink (n.d.)

ค) Sigma-Aldrich (n.d.)

ง) Chemical book (n.d.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ประโยชน์ของสารออกฤทธิ์สำคัญกลุ่มไตรเทอร์ปีน

การศึกษาทางเภสัชวิทยาเกี่ยวกับสารสำคัญในบัวบกที่ออกฤทธิ์ต่าง ๆ พบว่า สารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ที่อยู่ในบัวบก ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างคอลลาเจนทำให้ผิวหนังเต่งตึงและมีความยืดหยุ่นมากขึ้น ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่เส้นเลือด เพิ่มการไหลเวียนผ่านเส้นเลือดฝอย เพิ่มการแลกเปลี่ยนออกซิเจนผ่านเส้นเลือดฝอย ตลอดจนช่วยป้องกันการเกิดแผลเป็นและช่วยในกระบวนการหายของแผลได้เร็วขึ้น ดังนั้นจึงนิยมนำสารสกัดจากบัวบกไปใช้ในการรักษาแผลต่าง ๆ อาทิเช่น แผลผ่าตัด การปลูกถ่ายผิวหนัง แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก และแผลเรื้อรัง (ดวงจันทร์, 2546; นฤมล, 2551; ศูนย์รวมข้อมูลสิ่งมีชีวิตในประเทศไทย, 2552)

4.1 ฤทธิ์ในการสมานแผล

ในการวิจัยสารสกัดจากใบบัวบกที่ชื่อ อะเซียติโคไซด์ ในใบบัวบกมาทดสอบความสามารถในการรักษาแผล โดยทาบนผิวหนูขาวที่เป็นแผล จากการทดลองพบว่าอะเซียติโคไซด์สามารถลดการเกิดพังผืด (Fibrosis) ของแผล ช่วยป้องกันการเกิดแผลเป็น เพิ่มการสร้างเส้นใยคอลลาเจน ยับยั้งกระบวนการอักเสบของแผลเป็นที่มีการเจริญเติบโตผิดปกติ และออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Free Radicals) ที่สามารถเกิดขึ้นได้ในขณะที่เกิดแผล ซึ่งอนุมูลอิสระจะทำให้เซลล์ที่มีชีวิตอยู่มีประสิทธิภาพในการซ่อมแซมตัวเองลดลง (Shukla *et al*., 1999)

Sunilkumar *et al.* (1998) ศึกษาผลกระทบของสารสกัดจากบัวบกหลายรูปแบบ (แบบเจล ครีม และน้ำมัน) ต่อบาดแผลเปิดของหนูทดลอง พบว่าเมื่อนำไปทดสอบกับบาดแผลเปิดของหนูเป็นเวลา 24 วัน วันละ 3 ครั้ง สารสกัดจากบัวบกทั้ง 3 แบบช่วยเพิ่มการสังเคราะห์คอลลาเจนและเพิ่มปริมาณของเซลล์ที่บริเวณบาดแผล โดยเปรียบเทียบกับบาดแผลที่ไม่ได้ใช้สารสกัดจากบัวบก จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากบัวบกช่วยรักษาเยื่อบุและช่วยเพิ่มอัตราการหดตัวของบาดแผลเปิด สำหรับสารสกัดจากบัวบกที่อยู่ในรูปของเจลจะมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดในรูปของครีมและน้ำมัน

Tsurumi *et al.* (1973) ทดลองนำสารสกัดของใบบัวบกซึ่งเรียกว่า มาเดคาสโซล (Madecassol) และสารที่สกัดได้จากบัวบกคือ อะเซียติโคไซด์ กรดอะเซียติก และกรดมาเดคาสสิก ซึ่งเป็นสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนมาใช้ทาบริเวณแผลของหนูขาวพบว่า มีผลช่วยให้แผลหายเร็ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื่องมาจากทำให้มีการกระจายตัวของหนองในแผลและทำให้แผลเป็นขนาดเล็กลง Poizot and Dumez (1978) พบว่าเมื่อให้หนูขาวกินสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม จะมีผลในการรักษาแผล โดยการสร้างผิวชั้นนอกจะเร็วขึ้น และบาดแผลมีขนาดเล็กลง

สารสกัดจากบัวบกซึ่งมีสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนเป็นส่วนประกอบหลัก มีฤทธิ์ในการเร่งการสมานแผลเมื่อใช้ทาบริเวณแผล อีกทั้งพบว่าได้ผลทั้งในหนูขาวและคน และการกินสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนก็ให้ผลในการรักษาแผลทั้งในหนูขาวและคนเช่นเดียวกัน (Montecchio *et al.,* 1991)

4.2 ฤทธิ์ในการป้องกันระบบประสาท

อะเซียติโคไซด์มีผลทั้งในด้านป้องกันระบบประสาทและความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเมื่อทดสอบกับเซลล์ประสาทแกรนูลเพาะเลี้ยงจากสมองซีรีเบลลัม อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์ของทั้งสองแบบ (ป้องกันระบบประสาทและความเป็นพิษต่อเซลล์) ที่เกิดจากอะเซียติโคไซด์ซึ่งมีต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงยังไม่ทราบแน่ชัดในปัจจุบัน Supawantanakul (2003) ทดลองฉีดสารสกัดจากใบบัวบกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เข้าช่องท้องหนูขาวพบว่า มีฤทธิ์ในการเป็นยาระงับประสาท นอกจากนี้ยังพบว่าบราโมไซด์ (Brahmoside) จากบัวบกมีฤทธิ์ในการสงบประสาทได้ดีเช่นเดียวกับคลอโพรมาซีน (Chlorpromazine) และเมโทรพาเมท (Meprobamate) (สมจิตร, 2544)

4.3 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

สารสกัดจากบัวบกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตท อีเทอร์ และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S.aureus*, *B.subtilis*, *Klebsiella Aerugenes*, *P.vulgaris* แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *E.coli* และ *P.aerogenase* (Samy and Ignacimuthu, 2000) สารสกัดจากบัวบกด้วยเมทานอลจากใบและลำต้นของบัวบก มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *E.coli*, *B.subtilis* และ *P.aeruginosa* (Hamill *et al.,* 2003) และสารสกัดจากบัวบกด้วยแอลกอฮอล์จากใบของบัวบก มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S.aureus* (ณัฐพันธุ์ และ ตุลาภรณ์, 2543)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.4 ฤทธิ์ในการรักษาโรคเรื้อนและวัณโรคที่ผิวหนัง

อนุพันธ์ของอะเซียติโคไซด์ที่ได้จากใบบัวบก คือ ออกซีอะเซียติโคไซด์ (Oxyasiaticoside) โดยทดลองฉีดสารให้กับหนูตะเภาที่ทำให้เป็นวัณโรค พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคและสามารถลดปริมาณแผลที่เกิดจากเชื้อวัณโรคในตับ ปอด ปม ประสาทและม้ามได้ (สมจิตร, 2544) สารอะเซียติโคไซด์ในใบบัวบกสามารถทำลายสารเคลือบผิวที่หุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งโดยปกติแล้วภูมิคุ้มกันไม่สามารถทำลายสารเคลือบผิวได้ ทำให้เซลล์ภูมิคุ้มกันสามารถเข้าไปจัดการกับเชื้อแบคทีเรียได้โดยตรง

4.5 ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ใบบัวบกที่ผ่านการตำและคั้นเอาน้ำออก เมื่อนำไปป้อนหนูที่ถูกกระตุ้นจนเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่า เซลล์ที่ผิดปกติลดขนาดลง เมื่อนำสารสกัดจากใบบัวบกไปทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง พบว่า สารสำคัญดังกล่าวสามารถทำลายเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (อุษณีย์, 2550)

4.6 ฤทธิ์ในการลดการอักเสบ

สารสกัดเอทานอลจากใบของบัวบก มีฤทธิ์ลดการอักเสบอย่างอ่อนในหนูขาว โดยไปยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase-1 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Prostraglandin (Dunstan *et al.,* 1997) และสารซาโปนิน (Saponin) จากบัวบกสามารถลดอาการอักเสบและอาการบวมในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอาการบวมที่หูด้วย Croton Oil (Bombardelli *et al.,* 1992) สารมาเดคาสโซไซด์จากบัวบก มีฤทธิ์ลดการอักเสบที่เกิดจากการที่ผิวหนังแบ่งตัวผิดปกติ (Lepetit, 2005) และได้ทดลองให้ผู้ป่วยที่ไขข้ออักเสบรับประทานบัวบก พบว่าสามารถลดการอักเสบลง

4.7 ฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร

สารสกัดจากบัวบกด้วยน้ำจากใบของบัวบก มีฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหารในหนูขาวที่ถูกทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยความเครียดและกรดเกลือในเอทานอล (Tan *et al.,* 1997) และเมื่อป้อนสารสกัดจากทั้งต้น และสารอะเซียติโคไซด์ แก่หนูขาวที่ถูกทำให้เกิดแผล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในกระเพาะอาหารด้วยกรดอะซีติก พบว่ามีฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ทำให้ขนาดของแผลเล็กลง (Cheng *et al.,* 2004)

4.8 ฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์

เมื่อฉีดสารสกัดจากใบบัวบกเข้าใต้ผิวหนังของหนูถีบจักร จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนและเมื่อให้น้ำคั้นจากบัวบกทั้งต้น พบว่า มีผลคุมกำเนิดในหนูถีบจักรได้ ส่วนสารซาโปนินที่ได้จากบัวบกเมื่อนำไปทดลองกับเชื้ออสุจิ พบว่าไม่มีผลต่อเชื้ออสุจิ (สมจิตร, 2544)

4.9 ฤทธิ์แก้ปวด

สารไตรเทอร์พีนอยด์ จากบัวบกมีฤทธิ์กล่อมประสาทและสารสกัดแอลกอฮอล์ 70% มีฤทธิ์กดประสาทอย่างอ่อน (วันดี, 2541)

4.10 ฤทธิ์ในการลดความดันโลหิต

ใบบัวบกสามารถลดความดันโลหิตได้เนื่องจากสารประกอบไตรเทอร์ปีนจะช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่เส้นเลือดและสารสกัดจากใบบัวบกด้วยแอลกอฮอล์ผสมน้ำในอัตราส่วน 1:1 เมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำในหนูขาว พบว่ามีผลช่วยลดความดันโลหิตซึ่งเป็นผลมาจากส่วนของสารประกอบกลุ่มของไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (สมจิตร, 2544)

4.11 ฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อเรียบ

สารสกัดจากบัวบกด้วยแอลกอฮอล์ผสมน้ำจากใบของบัวบกในอัตราส่วน 1:1 สามารถลดการเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้ของหนูตะเภาได้ นอกจากนี้สารสกัดจากใบบัวบกด้วยแอลกอฮอล์ยังสามารถทำให้กล้ามเนื้อเรียบของลำไส้กระต่ายตอนบนคลายตัวและยังลดการเกร็งของกล้ามเนื้อมดลูกในหนูขาวซึ่งไม่ได้ตั้งครรภ์ (สมจิตร, 2544)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารไตรเทอร์ปีนในบัวบก

ในปัจจุบันมีการศึกษาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารไตรเทอร์ปีนในบัวบกด้วยวิธีการที่หลากหลายเทคนิค ได้แก่ Titrimetric analysis, TLC (Thin Layer Chromatography), Colorimetric Method, High–Speed Countercurrent Chromatography, HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography), HPLC (High Performance Liquid Chromatography) และ GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) เป็นต้น (สมจิตร, 2544; นฤมล, 2551) โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว อีกทั้งใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อยและมีความแม่นยำสูงสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณคือ สามารถวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของสารที่สกัดได้ในเวลาเดียวกัน

High Performance Liquid Chromatography เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกและวิเคราะห์สารประกอบต่าง ๆ ที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกวิเคราะห์สารประกอบจะเกิดขึ้นระหว่าง 2 เฟสคือ เฟสอยู่กับที่ (Stationary Phase or Column) กับเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) สารประกอบจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน (Retention Time, R_T) ซึ่งสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารกับเฟสเคลื่อนที่ หรือ เฟสอยู่กับที่ โดยที่สารประกอบตัวไหนสามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสเคลื่อนที่ (เข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่) ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง ซึ่งสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด (Detector) สัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งเรียกว่า โครมาโตแกรม (Chromatogram) โดยการทำงานของเครื่อง HPLC จะมีส่วนประกอบหลักอยู่ทั้งหมด 6 ส่วน ดังนี้

1. Mobile Phase / Solvent: ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวละลายเข้าสู่เฟสที่อยู่กับที่ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งกระบวนการแยกจะเกิดขึ้นภายในคอลัมน์

2. ปั๊ม (Pump): ทำหน้าดึงตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ HPLC โดยปั๊มจะแบ่งออกเป็น 2 ระบบคือ 1. Isocratic Pump คือการปั๊มอัตราส่วนของ Mobile Phase ให้คงที่ตลอดไม่ขึ้นกับเวลา 2. Gradient Pump เป็นปั๊มที่สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ Mobile Phase ได้ตามที่เวลากำหนด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. หัวฉีดตัวอย่าง (Injector / Autosampler): ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC

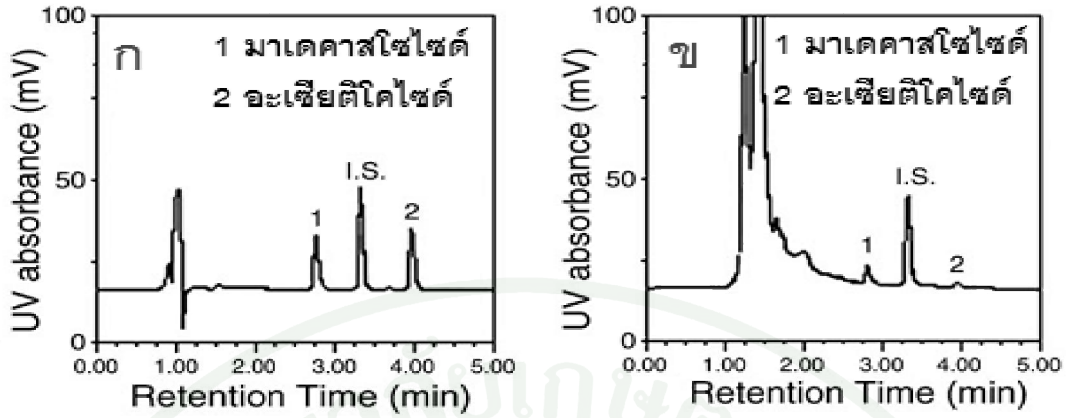
4. เครื่องกำจัดก๊าซ (Degasser): ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศ ที่มีอยู่ใน Mobile Phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ Column และ Detector

5. คอลัมน์ (Column): ภายในบรรจุด้วยเฟสที่อยู่กับที่ มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล ทำให้เกิดกระบวนการแยกองค์ประกอบของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่างเฟสที่เคลื่อนกับเฟสอยู่กับที่ โดยชนิดของ Column ที่ใช้กันโดยทั่วไปจะมี 2 ชนิด คือ Normal Phase Column (NP) และ Reversed Phase Column (RP)

6. ตัวตรวจวัด (Detector): เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้กันมี 3 ชนิดคือ UV, RI และ Fluorescence Detector

Kwon *et al.* (2011) ศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซไซด์จากวิธีการสกัดด้วยการแช่ใบบัวบกแห้งด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล เป็นเวลา 10 นาที ภายใต้การสั่นด้วยคลื่นเสียงและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารสกัดคือ Reverse Phase Kinetex C18 (100 x 2.1 mm, I.D. 2.6 μm) ใช้อะซิโตไนไตรล์และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ซึ่งอัตราส่วนการผสมระหว่างอะซิโตไนไตรล์กับน้ำคงที่ (Isocratic Elution) ที่ 25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและใช้ UV Detector เป็นตัวตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 203 nm ผลจากการวิเคราะห์สารสกัดบัวบกด้วย 50% เอทานอลด้วย HPLC ถูกนำมาเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของมาเดคาสไซด์และอะเซียติโคไซด์ที่มี Retention Time ประมาณ 3 นาที และ 4 นาที ตามลำดับ โดยโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแสดงดังภาพที่ 5ก) ผลการทดลองพบว่าสามารถสกัดอะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซไซด์ได้ 3.14 มิลลิกรัมและ 10.46 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมใบบัวบกแห้งตามลำดับ ซึ่งโครมาโตแกรมของการสกัดบัวบกด้วย 50% เอทานอลแสดงดังภาพที่ 5ข)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ UV เป็นตัวตรวจวัด ก) โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์ ข) โครมาโตแกรมของการสกัดบัวบกด้วย 50% เอทานอล

ที่มา: Kwon *et al.* (2011)

6. ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทางด้านการสกัดสารไตรเทอร์ปีนจากบัวบก

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่สกัดได้จากบัวบกนั้นนอกเหนือจากแหล่งที่ปลูกบัวบก ส่วนของบัวบกที่นำมาวิเคราะห์แล้วนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีกเช่น ลักษณะพันธุ์ของบัวบกที่แตกต่างกัน พื้นที่ที่เพาะปลูก อุณหภูมิในการสกัด ตัวทำละลาย เป็นต้น ซึ่งนฤมล (2551) ได้ศึกษาปริมาณสารสกัดสำคัญจากบัวบกจากปัจจัยต่อไปนี้คือ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เช่น เมทานอล เอทานอล เป็นต้น วิธีการสกัดที่แตกต่างกัน ความร้อนจากกระบวนการแปรรูปตัวอย่าง และผลของเอนไซม์ที่มีอยู่ในบัวบก ผลการทดลองได้ที่แสดงดังต่อไปนี้

6.1 ตัวทำละลายที่ใช้สกัด

นฤมล (2551) ศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัด (80% เมทานอล 80% เอทานอล น้ำ ปิโตรเลียมอีเทอร์ และเฮกเซน) ที่มีผลต่อสารประกอบไตรเทอร์ปีนในบัวบก และวิเคราะห์ปริมาณไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดโดยใช้เมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสารประกอบไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดสูงที่สุด (กรดอะเซียติก กรดมาเดคาสสิก อะเซียติโคไซด์ มาเดคาสโซไซด์) อย่างไรก็ตามไม่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พบปริมาณของอะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซไซด์ในสารสกัดโดยใช้น้ำ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดเฮกเซน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลของตัวทำละลายที่มีต่อปริมาณสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด

ตัวอย่างสารสกัดบัวบก	ปริมาณไตรเทอร์ปีนหลัก 4 ชนิด (มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)			
	อะเซียติโคไซด์	มาเดคาสโซไซด์	กรดอะเซียติก	กรดมาเคคาสสิก
80% เมทานอล	127.0±6.2*	220.1±11.5*	113.8±17.4*	160.9±9.1*
80% เอทานอล	124.4±3.3	178.9±10.0	55.9±11.1	115.5±9.0
น้ำ	N/A	N/A	4.2±0.4	4.5±0.3
ปิโตรเลียมอีเทอร์	N/A	N/A	2.8±0.2	3.1±0.3
เฮกเซน	N/A	N/A	1.8±0.7	2.1±0.2

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)
N/A = ไม่สามารถหาได้

ที่มา: นฤมล (2551)

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ มีน้ำหนักมวลโมเลกุลที่สูง ประกอบด้วยวงเบนซีน 5 วงมีหมู่ไฮดรอกซิล (หมู่ OH) ที่มีความเป็นขั้วและมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (Sribusarakum, 1997) ดังตารางที่ 5 ทำให้สารทั้ง 2 แสดงความเป็นขั้ว จึงละลายได้ดีในตัวทำละลาย 80% เมทานอล และ 80% เอทานอล ที่มีความเป็นขั้วปานกลาง แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์และเฮกเซนที่ไม่มีขั้วหรือความเป็นขั้วต่ำ แต่สำหรับน้ำที่มีความเป็นขั้วสูงแต่ไม่พบปริมาณอะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซไซด์เนื่องจากสารทั้งสองชนิดมีความเป็นขั้วที่ไม่สูงมากจึงไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายได้ดีในเมทานอลและเอทานอล (นฤมล, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 วิธีในการสกัด

นฤมล (2551) ศึกษาผลของวิธีในการสกัด (การสกัดแบบเขย่า 24 ชั่วโมงและการปั่นละเอียด) ที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบไตรเทอร์ปีน ผลการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณไตรเทอร์ปีนของตัวทำละลาย (80% เมทานอล 80% เอทานอล และน้ำ) โดยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน พบว่าการสกัดแบบปั่นให้ละเอียด (Homogenize) จะได้ปริมาณไตรเทอร์ปีนที่สูงกว่าการสกัดจากวิธีเขย่า 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ไม่พบปริมาณของอะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซไซด์ในสารสกัดโดยใช้น้ำทั้งในการสกัดวิธีปั่นละเอียดและการสกัดแบบเขย่า 24 ชั่วโมง

ผลจากการทดลองพบว่าการสกัดทั้ง 2 แบบ (การสกัดแบบเขย่า 24 ชั่วโมงและการปั่นละเอียด) ด้วยตัวทำละลาย 80% เมทานอลจะได้ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดสูงสุด รองลงมาคือ ตัวทำละลาย 80 % เอทานอล และตัวทำละลายน้ำตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารไตรเทอร์ปีนที่พบมากสุดของตัวทำละลายเมทานอล โดยวิธีการสกัดแบบเขย่า 24 ชั่วโมงและแบบปั่นให้ละเอียดคือ มาเดคาสโซไซด์ ปริมาณที่สกัดได้คือ 301.81±2.71 มิลลิกรัมและ 383.12±1.20 มิลลิกรัม ตามลำดับ รองลงมาคือ อะเซียติโคไซด์ปริมาณที่สกัดได้คือ 247.45±8.32 มิลลิกรัมและ 318.97±2.25 มิลลิกรัม ตามลำดับ และตัวทำละลายเอทานอล คือ มาเดคาสโซไซด์ ปริมาณที่สกัดได้คือ 246.18±15.77 มิลลิกรัมและ 327.27±13.51 มิลลิกรัม ตามลำดับ รองลงมาคือ อะเซียติโคไซด์ปริมาณที่สกัดได้คือ 207.75±19.15 มิลลิกรัมและ 252.94±6.68 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลของตัวทำละลายที่สรุปไว้ว่า เมทานอล เอทานอล และน้ำ เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดในบัวบกได้ปริมาณสูงที่สุด ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 7

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนด้วยวิธีเขย่า 24 ชั่วโมงและวิธีการปั่นให้ละเอียด

สารไตรเทอร์ปีน	สารสกัด	วิธีสกัดแบบเขย่า 24 ชั่วโมง	วิธีสกัดแบบปั่นให้ละเอียด
		มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักแห้ง	
อะเซียติโคไซด์	80% เมทานอล	247.45±8.32*	318.97±2.25
	80% เอทานอล	207.75±19.15	252.94±6.68
	น้ำ	N/A	N/A
กรดอะเซียติก	80% เมทานอล	21.56±2.16	38.89±5.82
	80% เอทานอล	14.54±2.39	22.96±2.35
	น้ำ	3.55±0.58	6.05±1.89
มาเดคาสโซไซด์	80% เมทานอล	301.81±2.71	383.12±1.20
	80% เอทานอล	246.18±15.77	327.27±13.51
	น้ำ	N/A	N/A
กรดมาเคคาสสิก	80% เมทานอล	127.61±5.24*	187.15±18.18
	80% เอทานอล	102.03±5.15	150.03±3.96
	น้ำ	7.08±2.82	21.55±2.28
ไตรเทอร์ปีนรวม	80% เมทานอล	720.85±12.99	928.13±6.58
	80% เอทานอล	570.51±39.67	744.94±16.34
	น้ำ	10.63±3.43	27.6±4.14

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

N/A = ไม่สามารถหาได้

ที่มา: นฤมล (2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.3 ความร้อนจากกระบวนการแปรรูป

เมื่อบัวบกผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธีการต่าง ๆ คือ บัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dried) และบัวบกทำแห้งแบบถาด (Tray Dried) พบว่าความร้อนมีผลต่อปริมาณไตรเทอร์ปีนที่สกัดได้ โดยผู้วิจัยทำการตรวจสอบปริมาณไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค HPTLC พบว่าตัวอย่างบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งซึ่งเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้รับความร้อนในกระบวนการแปรรูป มีปริมาณไตรเทอร์ปีนสูงกว่าบัวบกทำแห้งแบบถาดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอะเซียติโคไซด์เป็นกรดอะเซียติก นอกจากนี้ยังพิจารณาปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดในแต่ละผลิตภัณฑ์ (น้ำบัวบกผง น้ำบัวบก และน้ำชาบัวบก) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความร้อนสูง มีปริมาณไตรเทอร์ปีนรวมลดลง โดยน้ำบัวบกผง น้ำบัวบกและน้ำชาบัวบก ผ่านการแปรรูปโดยใช้ความร้อนอยู่ในช่วง 80–180 องศาเซลเซียส ทำให้สารไตรเทอร์ปีนเสื่อมสลาย (นฤมล, 2551) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 8

Kormin (2005) ได้ศึกษาผลของความร้อนในขั้นตอนการเตรียมเครื่องดื่มสมุนไพรต่อองค์ประกอบทางเคมีของบัวบก ได้แก่ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก พบว่าการให้ความร้อนที่ 65, 80 และ 100 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้งหมดลดลง นอกจากนี้ Choi *et al.* (1982) พบว่าปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนลดลงหลังจากการให้ความร้อนในการสกัดที่ 80 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ He *et al.* (2006) ศึกษาปริมาณสารไตรเทอร์ปีนที่สกัดจากแบลคโคฮอช (Cimicifuga Racemosa หรือ Black Cohosh) ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าเมื่อให้ความร้อนกับสารสกัดจากแบลคโคฮอชที่ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าปริมาณสารไตรเทอร์ปีนลดลง และเกิดการเปลี่ยนรูปจากสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ เป็นสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน

6.4 เอนไซม์ที่มีอยู่ในบัวบก

นฤมล (2551) ศึกษาผลของเอนไซม์ต่อการไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างน้ำชาบัวบก และน้ำชาบัวบกปั่นผสมกับบัวบกสด จากการศึกษาไม่พบสารไตรเทอร์ปีนไกลโคโซด์ (อะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซไซด์) ในตัวอย่างน้ำชาบัวบกปั่นผสมกับบัวบกสด แต่พบสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดอะเซียติก และกรดมาเดคาสสิก) เพิ่มสูงขึ้นซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ในบัวบกสดสามารถไฮโดรไลซิสอะเซียติโคไซด์และมาเดคาสโซ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไซด์ไปเป็นกรดอะเซียติกและกรดมาเดคาสสิก ตารางที่ 8 แสดงปริมาณกรดอะเซียติก กรดมาเดคาสสิก อะเซียติโคไซด์ มาเดคาสโซไซด์ที่สกัดจากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ

Muangnoi (2007) ได้รายงานผลการศึกษาปริมาณไตรเทอร์ปีน หลังจากการเก็บบัวบกสดไว้ 5 และ 7 วัน พบว่าปริมาณมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์ลดลง แต่ปริมาณกรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องมาจากมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์เปลี่ยนรูปไปเป็นกรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติกซึ่งเป็นผลมาจากเอนไซม์ที่มีอยู่ในบัวบก นอกจากนี้ยังศึกษาปริมาณไตรเทอร์ปีนจากบัวบกสดและบัวบกที่เติมไนโตรเจนเหลว พบว่าบัวบกที่เติมไนโตรเจนเหลวมีปริมาณมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์มากกว่าในบัวบกสด (Bader *et al.* 1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ผลของตัวทำละลายที่มีต่อปริมาณสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด

ตัวอย่าง	ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด				
	กรดอะเซียติก	กรดมาเคคาสิก	อะเซียติโคไซด์	มาเดคาสโซไซด์	ไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด
บัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง[1]	38.89±5.82*	187.15±11.18*	318.97±2.25*	383.12±1.20*	928.13±6.58*
บัวบกทำแห้งแบบถาด[1]	119.8±3.4	139.9±19.2	157.9±43.6	165.3±1.1	583.0±63.6
น้ำชาบัวบก[2]	0.6±0.2	0.8±0.1	5.9±0.2	7.1±0.2	14.4±0.1
น้ำบัวบก[2]	0.6±0.1	1.2±0.2	N/A	N/A	1.8±0.1
น้ำบัวบกผง[2]	0.2±0.1	0.9±0.2	N/A	N/A	1.1±0.3

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

N/A = ไม่สามารถหาได้

[1] มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

[2] มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร

ที่มา: นฤมล (2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แคทรียา และคณะ (2542) ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณของอะเซียติโคไซด์ในบัวบกจากแหล่งที่มาต่าง ๆ จำนวน 10 จังหวัด โดยนำใบบัวบกสดมาอบแห้ง แล้วสกัดด้วยวิธีการแช่ด้วย 80% อะซิโตน (ปริมาตรต่อปริมาตร) และทำการวิเคราะห์โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟีเดนซิโทมิเตอร์ (TLC-Densitometer) พบว่าบัวบกจากจังหวัดพิษณุโลกมีปริมาณอะเซียติโคไซด์มากที่สุดเท่ากับ 10.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และบัวบกจากจังหวัดอื่น ๆ มีปริมาณอะเซียติโคไซด์ที่น้อยกว่าดังนี้ นครนายก 9.90 เปอร์เซ็นต์ นนทบุรี 5.78 เปอร์เซ็นต์ ภูเก็ต 5.12 เปอร์เซ็นต์ กาฬสินธุ์ 4.58 เปอร์เซ็นต์ กรุงเทพมหานคร 4.40 เปอร์เซ็นต์ อยุธยา 2.95 เปอร์เซ็นต์ ตรัง 0.98 เปอร์เซ็นต์ บุรีรัมย์ 0.90 เปอร์เซ็นต์ และจังหวัดเลยมีน้อยที่สุดเท่ากับ 0.22 เปอร์เซ็นต์

ศิริรัตน์ และคณะ (2552) ได้ทดลองศึกษาหาวิธีการสกัดสารจากบัวบกเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีสารสำคัญในปริมาณสูง โดยสกัดด้วยวิธีการแช่บัวบกสดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ น้ำ และ 70% เอทานอล และแช่บัวบกแห้งด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดดังต่อไปนี้ น้ำ 70% เอทานอล และ 100% เอทานอล เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) พบว่าการสกัดบัวบกสดและบัวบกแห้งด้วย 70% เอทานอล และการสกัดบัวบกแห้งด้วย 100% เอทานอล จะพบสารอะเซียติโคไซด์ มาเดคาสโซไซด์ และกรดอะเซียติกเป็นองค์ประกอบ แต่สารสกัดบัวบกสดและบัวบกแห้งด้วยน้ำไม่มีสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดเป็นองค์ประกอบ และเมื่อเปรียบเทียบผลจาก TLC Chromatogram ของสารสกัดที่ได้ทั้งหมด พบว่าการสกัดบัวบกแห้งด้วย 100% เอทานอลให้ปริมาณสารสำคัญสูงที่สุด แต่ยังมีข้อด้อยเนื่องจากสารสกัดที่ได้มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์

สมใจ และคณะ (2530) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารสำคัญและปริมาณของสารอะเซียติโคไซด์ในส่วนต่าง ๆ ของบัวบกได้แก่ ส่วนของใบ ก้านใบ และลำต้นพร้อมราก โดยสกัดสารสำคัญจากบัวบกด้วยวิธีการแช่บัวบกแห้งด้วยสารละลายเมทานอลพร้อมกับมีการกวน แล้ววิเคราะห์ชนิดของสารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารสำคัญที่ถูกทำให้เกิดสีด้วยสารละลายแอนโทรน (Anthrone Reagent) ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง TLC Scanner เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน พบว่าส่วนต่าง ๆ ของบัวบกมีส่วนประกอบของสารสำคัญประเภทเดียวกัน โดยสารที่พบปริมาณมากได้แก่ อะเซียติโคไซด์ กรดอะเซียติก กรดมาเดคาสซิก ส่วนสารสำคัญอื่น ๆ จะพบในปริมาณที่น้อยซึ่งค่าเฉลี่ยของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณอะเซียติโคไซด์ที่ตรวจพบในตัวอย่างจากส่วนใบ ก้านใบ และลำต้นพร้อมรากมีปริมาณ 1.07 เปอร์เซ็นต์ 0.16 เปอร์เซ็นต์ 0.15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักบัวบกแห้งตามลำดับ

รัชดาวรรณ และ พรเพ็ญ (2542) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารอะเซียติโคไซด์จากผงของใบบัวบกแห้งด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ น้ำ 80% เอทานอล 50% เอทานอล 100% อะซิโตน 80% อะซิโตน และ 50% อะซิโตน โดยวิธีการแช่ผงใบบัวบกแห้งในสารละลายทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นกรองและนำไประเหยแห้ง แล้ววิเคราะห์ปริมาณของอะเซียติโคไซด์ด้วยเครื่อง TLC Scanner ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร พบว่า 80% อะซิโตนจะให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงที่สุด โดยได้ปริมาณอะเซียติโคไซด์ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบบัวบกแห้ง ในขณะที่ใช้เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายจะได้ปริมาณ อะเซียติโคไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และถ้าใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจะได้ปริมาณอะเซียติโคไซด์เพียง 0.56 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักใบบัวบกแห้ง

Kim *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารอะเซียติโคไซด์และกรดอะเซียติกจากผงบัวบกอบแห้งด้วยวิธีการสกัดด้วย Subcritical Water ซึ่งทำการทดลองที่ช่วงอุณหภูมิ 100–250 องศาเซลเซียส และความดัน 10–40 เมกกะพาสคาล (MPa) และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดสารทั้ง 2 ชนิดคือที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ความดัน 40 เมกกะพาสคาล โดยปริมาณของสารอะเซียติโคไซด์และกรดอะเซียติกที่สกัดได้คือ 100 มิลลิกรัม และ 7.8 มิลลิกรัมต่อ 3 กรัมของผงบัวบกอบแห้งตามลำดับ ซึ่งการสกัดด้วย Subcritical Water สามารถสกัดสารสำคัญออกมาได้ในปริมาณมากกว่าการสกัดแบบดั้งเดิมที่ใช้เมทานอลหรือเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง แต่ปริมาณสารที่สกัดได้น้อยกว่าการสกัดแบบดั้งเดิมที่สกัดด้วยเมทานอลหรือเอทานอลที่อุณหภูมิจุดเดือด

7. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

7.1 อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก (Outer Orbital) เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทาง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain Reaction) ต่อไปเรื่อย ๆ ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) การเปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านั้นผิดปกติ (เจนจิรา และประสงค์, 2554) เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว Alzheimer's disease หรือโรคความจำเสื่อม โรคไขข้ออักเสบ โรคความแก่ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งบางชนิด เป็นต้น (วันเซ็ง และ ดวงฤดี, 2554)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น แบ่งได้เป็น 2 ประเภทดังนี้

1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมตามปกติในร่างกาย หรือเกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อสู้กับเชื้อโรคบางชนิด

2. อนุมูลอิสระที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งได้แก่ สารเคมีและสิ่งปนเปื้อนที่มากับอากาศที่เราหายใจเข้าไป สารเติมแต่งอาหาร สีผสมอาหาร สารเคมีปนเปื้อนในอาหาร สารกันบูดหรือสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการเกษตรเป็นต้น

จากที่กล่าวมาแล้วว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่นภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นที่ร่างกายจะต้องหาทางป้องกัน สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองก็คือ ระบบแอนตี้ออกซิแดนท์ (Antioxidant) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบ Antioxidant จะสามารถจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า Oxidative Stress ขึ้นมา ซึ่งส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตและรุนแรงไปถึงการเกิดโรค ด้วยเหตุนี้มนุษย์เราจึงจำเป็นต้องรับประทานอาหารที่เป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันได้แก่ วิตามินเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิตามินซี วิตามินอี หรือสารสกัดจากพืชต่าง ๆ เช่น สารสกัดจากบัวบก สารสกัดจากมะขาม สารสกัดจากโรสแมรี่ เป็นต้น

7.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระโดยตรง (Radical Scavenging) ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับกับโลหะ (Chelate) เพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบไนโตรเจน (Nitrogen Compounds) วิตามินเอ (Vitamin A) วิตามินซี (Vitamin C) วิตามินอี (Vitamin E) แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) และสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds) โดยเฉพาะกลุ่มพอลีฟีนอล (Polyphenols) เช่น แซนโธน (Xanthone) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นต้น บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ (เจนจิรา และ ประสงค์, 2554) โดยมีกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยการดักจับอนุมูลอิสระแสดงดังสมการที่ (1) และ(2) ดังนี้

$$R^{\bullet} + AH \rightarrow RH + A^{\bullet} \quad (1)$$

$$RO^{\bullet} + AH \rightarrow ROH + A^{\bullet} \quad (2)$$

โดยที่ $R^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ คืออนุมูลอิสระ

AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

$A^{\bullet}$ คือ อนุมูลของสาร A

สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติและสารที่มาจากการสังเคราะห์ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ได้แก่ Propyl Gallate, 2-Butylated Hydroxyanisole, 3-Butylate Hydroxyanisole, BHT (Butylated Hydroxytoluene) และ Tertiary Butylhydroquinone วิตามินอีสังเคราะห์ได้แก่ โทรล็อกซ์ (Trolox) เป็นต้น (เจนจิรา และ ประสงค์, 2554) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์นิยม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (วราภรณ์, 2556)

7.3 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds)

สารประกอบฟีนอลิกจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอก และพบได้มากในธรรมชาติ ได้แก่ พืชผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ และไวน์แดง เป็นต้น ในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติตั้งแต่โมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโพรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างพอลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลจะเกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไป รวมกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) โดยน้ำตาลดังกล่าวอาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) ก็ได้ (อินทรา, 2522) แต่น้ำตาลที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ กลูโคส (Glucose) ซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (Glycoside) (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, ม.ป.ป.) คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอล คือ การเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วดังสมการที่ (3) และ (4) ต่อไปนี้

$$ROO^{\bullet} + PPH \rightarrow ROOH + PP^{\bullet} \quad (3)$$

$$RO^{\bullet} + PPH \rightarrow ROH + PP^{\bullet} \quad (4)$$

โดยที่ $ROO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ คือ อนุมูลอิสระ

PPH คือ Polyphenolic Compound

$PP^{\bullet}$ คือ อนุมูลอิสระของพอลีฟีนอลิก

เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังสมการที่ (5) และ (6) ต่อไปนี้

$$ROO^{\bullet} + PP^{\bullet} \rightarrow ROOPP \quad (5)$$

$$RO^{\bullet} + PP^{\bullet} \rightarrow ROPP \quad (6)$$

สารประกอบฟีนอลถูกพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันนั้นสามารถพบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เมล็ด (ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย ข้าวและงา) ผล (องุ่น ส้ม และพริกไทยดำ) ใบ (ใบชาและใบบัวบก) และส่วนอื่น ๆ (มันเทศและหัวหอม) และหนึ่งในสารประกอบฟีนอลที่เป็นที่รู้จักกันดีก็คือ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ได้แก่ ฟลาโวน (Flavones) ฟลาโวนอล (Flavonols) ไอโซฟลาโวน (Isoflavones) คาเทชิน (Catechins) ฟลาโวโนน (Flavonones) และชาลโคน (Chalcones) โดยสามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืช แต่จะมีความแตกต่างกันออกไปในด้านของชนิดและปริมาณ (จิราพร, 2554)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Total Phenolic Compounds Content เป็นการวัดการทำปฏิกิริยาของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับสารโฟลิน-ซีโอเคาทู (Folin-Ciocalteu Reagent) วัดการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตรในสภาวะที่เป็นเบสโดยการปรับด้วยโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 %w/v โดยที่ความเป็นกรด-เบสประมาณ 10 ฟีนอลิกจะแตกตัวให้โปรตอนกับสารโฟลิน-ซีโอเคาทู ซึ่งมีโมลิบดินัมเป็นองค์ประกอบ ซึ่งโมลิบดินัมเป็นสารที่ง่ายต่อการรับอิเล็กตรอน (นฤมล, 2551)

7.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการยับยั้ง หรือกำจัดอนุมูลอิสระในสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าดูดกลืนแสง วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ DPPH Radical Scavenging Assay และ ABTS Radical Scavenging Assay (วราภรณ์, 2556)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.4.1 DPPH Radical Scavenging Assay หรือวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay วิธีนี้จะวัดความสามารถในการยับยั้ง 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ในตัวทำละลายเมทานอลโดย DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระที่คงตัว (Stable Radical) มีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) หรือ Radical Species ($R^{\bullet}$) แสดงดังสมการที่ (7) และ (8)

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \quad (7)$$

$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow DPPH\text{-}R \quad (8)$$

โดยสามารถหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่ทำให้ความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง 50% (Inhibition Concentration: IC_{50}) ได้จากการคำนวณค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่สารตัวอย่างลงในสารละลาย DPPH เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ดังสมการที่ (9)

$$\text{DPPH Radical Scavenging Activity (\%)} = \left[\frac{\text{Absorbance control} - \text{Absorbance Sample}}{\text{Absorbance control}}\right] \times 100 \quad (9)$$

หมายเหตุ - Absorbance Control คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

- Absorbance Sample คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ผสมกับสารละลาย Trolox หรือสารสกัดที่เจือจางแล้ว

ข้อดีของการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay คือ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว มีความแม่นยำ ใช้เครื่องมือแค่เครื่องวัดการดูดกลืนแสงเท่านั้น และมีความสามารถในการวัดให้ได้ผลใกล้เคียงกันทุกครั้ง (Reproducibility) สูง เหมาะสำหรับการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชันในน้ำผักและน้ำผลไม้หรือในสารสกัดผักและผลไม้ แต่ไม่เหมาะสำหรับการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชันในพลาสมา เนื่องจากสาร DPPH ต้องละลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในเมทานอล จึงส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน ส่วนข้อเสียคือ อนุมูลอิสระ DPPH เป็นอนุมูลที่ค่อนข้างเสถียร ไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้าทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง (นฤมล, 2551; วราภรณ์, 2556)

7.4.2 ABTS Radical Scavenging Assay หรือวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging Assay เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation, $ABTS^{\bullet+}$) ซึ่ง Reagent ที่ใช้คือ 2,2-azonobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) หรือ ABTS นำมาทำเป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น $ABTS^{\bullet+}$ มีสีฟ้าปนเขียว ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น $ABTS^{\bullet+}$ ให้เป็น 0.7±0.02 เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลงไป จะทำให้ $ABTS^{\bullet+}$ มีสีจางลง โดยอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) แสดงดังสมการที่ (10)

$$ABTS^{\bullet+} + AH \rightarrow ABTS\,(\text{สีจางลง}) + A^{\bullet} \qquad (10)$$

โดยสามารถหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่ทำให้ความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระ ABTS ลดลง 50% (Inhibition Concentration: IC_{50}) ได้จากการคำนวณค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่สารตัวอย่างลงในสารละลาย ABTS เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ดังสมการที่ (11)

ABTS Radical Scavenging Activity (%)

$$= \left[\frac{\text{Absorbance control} - \text{Absorbance Sample}}{\text{Absorbance control}}\right] \times 100 \qquad (11)$$

หมายเหตุ - Absorbance Control คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- Absorbance Sample คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่ผสมกับสารละลาย Trolox หรือสารสกัดที่เจือจางแล้ว

ข้อดีของการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging Assay คือ ทำได้ง่าย สะดวก ทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านออกซิเดชัน อนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ดีทั้งในน้ำและสารละลายอินทรีย์จึงทำให้ศึกษาได้ทั้งในสารที่ละลายในน้ำหรือละลายในไขมัน ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จึงจำเป็นต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (วราภรณ์, 2556)

ในงานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay และวิธี ABTS Radical Scavenging Assay เนื่องจากทั้งสองวิธีนี้มีขั้นตอนในการทดสอบไม่ยุ่งยาก ทำให้สามารถทดสอบได้ง่าย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต

ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต (Supercritical Fluid, SCF) คือ สารใด ๆ ที่มีอุณหภูมิและความดันสูงกว่าอุณหภูมิวิกฤต (Critical Temperature, T_c) และความดันวิกฤต (Critical Pressure, P_c) ของสารนั้น ๆ ซึ่งโดยทั่วไปนั้นในสภาวะปกติสารบริสุทธิ์สามารถแบ่งได้เป็น 3 สถานะคือ ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ แต่ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตนั้นจะอยู่ในสภาวะที่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นของเหลวหรือก๊าซ โดยจะมีคุณสมบัติก้ำกึ่งระหว่างของเหลวและก๊าซ ยกตัวอย่างเช่น ความหนาแน่นของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตจะมีค่าใกล้เคียงกับของเหลว ไม่มีแรงตึงผิวเช่นเดียวกับก๊าซ เป็นต้น (มานพ, 2553) จากคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย ในกระบวนการสกัดสาร (Supercritical Fluid Extraction, SFE) แทนการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic Solvents)

ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตนั้นมีหลายชนิดที่สามารถนำมาเป็นตัวทำละลายที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตได้ โดยของไหลที่นำมาใช้ควรมีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำ เพราะน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำจะส่งผลให้จุดวิกฤตของของไหลนั้นต่ำ สามารถนำไปใช้กับกระบวนการที่มีสารประกอบที่ว่องไวกับความร้อน เช่น กระบวนการที่เกี่ยวกับยาหรือสารออกฤทธิ์สำคัญในพืชสมุนไพร นอกจากนี้ยังทำให้ประหยัดพลังงานอีกด้วยเพราะไม่จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูงที่กระบวนการ ซึ่งส่วนใหญ่สารที่ถูกนำมาใช้เป็นของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ เพราะเป็นสารที่ไม่อันตราย ไม่กัดกร่อน สามารถหาได้ง่ายและราคาถูก

1. จุดวิกฤตและของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต

จุดวิกฤต (Critical Point, CP) คือ จุดที่สารมีอุณหภูมิและความดันสูงที่สุดที่สารจะสามารถอยู่ร่วมกันในสภาวะสมดุลระหว่างเฟสของของเหลวและเฟสของก๊าซ โดยอุณหภูมิและความดันที่จุดวิกฤตนี้เรียกว่า อุณหภูมิวิกฤต (T_c) และความดันวิกฤต (P_c) แสดงดังภาพที่ 6 ซึ่งจุดวิกฤตของสารใด ๆ จะมีค่า P_c และ T_c ที่แตกต่างกันและเป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารนั้น ๆ ตารางที่ 9 แสดงตัวอย่างคุณสมบัติของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตของสารบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ

จากภาพที่ 6 เป็นแผนภาพความดันและอุณหภูมิ (Pressure - Temperature Phase Diagram) ของสารบริสุทธิ์ใด ๆ ซึ่งสามารถแบ่งได้ 3 สถานะ คือ ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ โดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เส้นทึบที่อยู่ในกราฟจะเป็นเส้นที่สารอยู่ในสภาวะสมดุลระหว่าง 2 เฟส ประกอบด้วยเส้นทั้งหมด 3 เส้นได้แก่ เส้นที่อยู่ระหว่างบริเวณที่สารอยู่ในสถานะของแข็งกับก๊าซเรียกว่า เส้นการระเหิด (Sublimation Line) เส้นที่อยู่ระหว่างบริเวณที่สารอยู่ในสถานะของแข็งกับของเหลวเรียกว่า เส้นการหลอมเหลว (Fusion Line) และสุดท้ายคือ เส้นที่อยู่ระหว่างบริเวณที่สารอยู่ในสถานะของเหลวและก๊าซเรียกว่า เส้นการระเหย (Vaporization Line) หรือเส้นการเดือด (Boiling Line) และจุดที่สารทั้งสามสถานะอยู่ร่วมกันที่สภาวะสมดุลเรียกว่า จุดร่วมสาม (Triple Point, TP) (เกศินี, 2549)

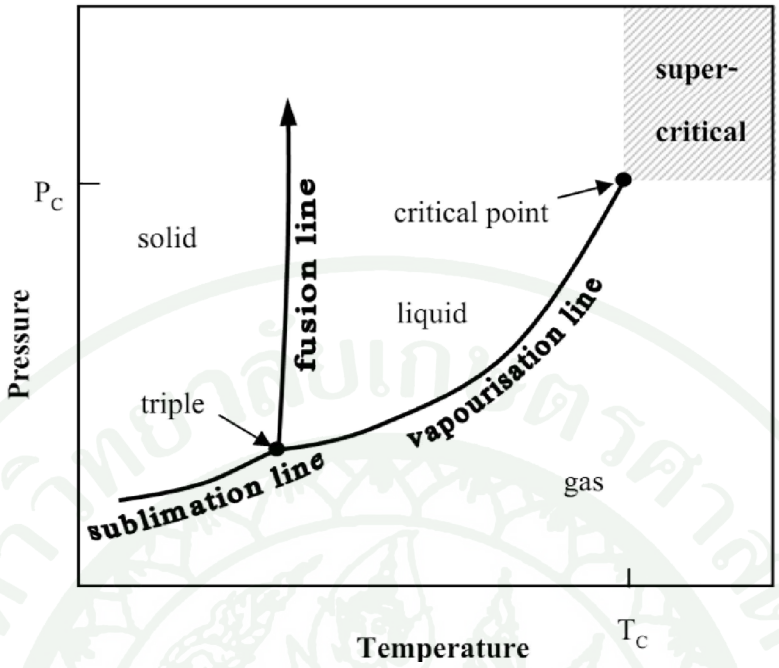
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ข้อมูลคุณสมบัติที่จุดวิกฤตของสารบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ

สาร	อุณหภูมิวิกฤต	ความดันวิกฤต	ความหนาแน่นวิกฤต
	(K)	(MPa)	(g/cm^3)
ไนโตรเจน	126.2	3.40	0.314
คาร์บอนมอนออกไซด์	132.9	3.50	0.300
ออกซิเจน	154.6	5.04	0.436
มีเทน	190.6	4.60	0.162
เอทิลีน	282.4	5.03	0.218
คลอโรไตรฟลูออโรมีเทน	302.0	3.92	0.579
คาร์บอนไดออกไซด์	304.2	7.38	0.468
อีเทน	305.4	4.88	0.203
โพรไพลีน	365.0	4.62	0.233
โพรเพน	369.8	4.24	0.217
แอมโมเนีย	405.6	11.30	0.235
ไดเอทิล อีเทอร์	467.7	3.64	0.265
อะซิโตน	508.1	4.70	0.278
เมทานอล	512.6	8.09	0.272
อะซิโตไนไตรล์	545.5	4.83	0.237
เบนซีน	562.1	4.89	0.302
โทลูอีน	591.7	4.11	0.292
ไพริดีน	620.0	5.63	0.312
น้ำ	647.3	22.00	0.322
อาร์กอน	150.9	4.90	0.535
คริปตรอน	209.4	5.50	0.919
ซีนอน	289.7	5.84	1.113

ที่มา: Rizvi *et al.* (1986); Smith *et al.* (2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

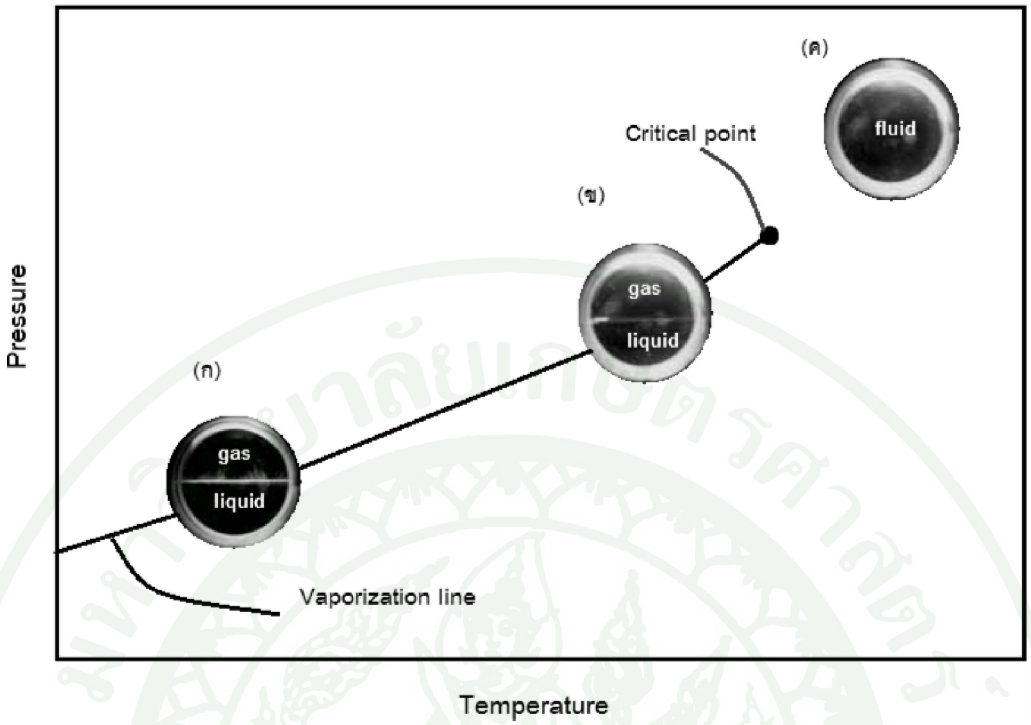


ภาพที่ 6 แผนภาพความดันและอุณหภูมิของสารบริสุทธิ์ใด ๆ

ที่มา: มานพ (2553)

เมื่อพิจารณาไปตามเส้นการระเหย (Vaporization Line) ดังภาพที่ 7 พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและความดันขึ้นเรื่อย ๆ เส้นการระเหยจะสิ้นสุดลงที่จุดวิกฤต ที่ความดันและอุณหภูมิต่ำกว่าจุดวิกฤตมาก ๆ จะสามารถสังเกตเห็นเส้นแบ่งสารทั้ง 2 สถานะคือ ของเหลว และก๊าซได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 7(ก)) และเมื่อเพิ่มความดันและอุณหภูมิให้เข้าใกล้จุดวิกฤตยิ่งขึ้น ส่งผลให้ความแตกต่างระหว่างสารทั้ง 2 สถานะลดน้อยลง จะสังเกตเห็นว่าเส้นการแบ่งแยกระหว่างของเหลวและก๊าซเริ่มไม่ชัดเจน (ภาพที่ 7(ข)) และเมื่ออุณหภูมิและความดันเลยจุดวิกฤตไปแล้วจะเป็นสภาวะที่เรียกว่าสภาวะเหนือจุดวิกฤต จะสังเกตเห็นว่าเส้นการแบ่งแยกระหว่าง 2 สถานะจะหมดไป ซึ่งในสภาวะนี้จะไม่สามารถจำแนกได้ว่าสารที่อยู่ในบริเวณนี้มีสถานะเป็นของเหลวหรือก๊าซ จึงเรียกสารที่อยู่ในบริเวณนี้ว่าของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต (Supercritical Fluid) (ภาพที่ 7(ค))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงการแยกสถานะระหว่างของเหลวกับก๊าซบนเส้นการระเหย

ที่มา: Critical Processes (n.d.) and Royal Society of Chemistry (2008)

ในทางทฤษฎี “ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต” คือของไหลที่มีอุณหภูมิและความดันสูงกว่าจุดวิกฤต แต่ในทางปฏิบัติแล้วของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตจะใช้สำหรับของไหลที่มีอุณหภูมิลด (Reduced Temperature, $T_r = T/T_c$) อยู่ในช่วง 1.01 ถึง 1.1 และความดันลด (Reduced Pressure, $P_r = P/P_c$) อยู่ในช่วง 1.01 ถึง 1.5 (Brennecke and Eckert, 1989) และ “ของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤต (Dense Gas)” คือของไหลที่อยู่ในบริเวณต่ำกว่าจุดวิกฤตเล็กน้อย (Sub-Critical Region) รวมไปถึง ของไหลที่อยู่ในบริเวณเหนือจุดวิกฤต (Supercritical Region) (มานพ, 2553)

2. คุณสมบัติของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต

ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตจะมีคุณสมบัติทางกายภาพ อยู่ระหว่างของเหลวกับก๊าซ แสดงดังตารางที่ 10 ความหนาแน่นของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตจะมีค่าใกล้เคียงกับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของเหลว เมื่อนำมาใช้เป็นตัวทำละลาย โมเลกุลของสารที่ต้องการละลายจะถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต เกิดอันตรกิริยากัน (Interaction) ทำให้พลังงานหรือเอนทาลปี (Enthalpy) ลดลง จึงเกิดการละลายได้ดี และขณะเดียวกันของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตมีความหนืด (Viscosity) ที่ใกล้เคียงกับก๊าซ และความสามารถในการแพร่กระจาย (Diffusivity) ดีกว่าของเหลว ทำให้สามารถแทรกซึมผ่านเมทริกซ์ที่เป็นของแข็งได้ดี ด้วยคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้นเหล่านี้ ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตจึงถูกนำมาใช้เป็นตัวทำละลาย ซึ่งมีข้อเหนือกว่าตัวทำละลายที่เป็นของเหลวคือ มีอัตราการถ่ายเทมวล (Mass Transfer) เร็วกว่า และมีความสามารถในการทำละลาย (Solvating Power) ที่ดีกว่า บางครั้งจึงมีการเรียกของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตว่า Super Solvent (เกศินี, 2549; มานพ, 2553)

ตารางที่ 10 คุณสมบัติทางกายภาพของก๊าซ ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต (SCF) และของเหลว

สถานะ	ความหนาแน่น	การแพร่	ความหนืด	แรงตึงผิว
	(g/cm^3)	(cm^2/s)	(cp)	(dynes/cm)
ก๊าซ	$(0.6 - 2) \times 10^{-3}$	0.1 - 0.4	0.01 - 0.03	0
SCF	0.2 - 0.1	$(2 - 7) \times 10^{-4}$	0.01 0.09	0
ของเหลว	0.6 - 1.6	$(0.2 - 2) \times 10^{-5}$	0.2 - 3.0	30 - 60

ที่มา: Raynie (1997)

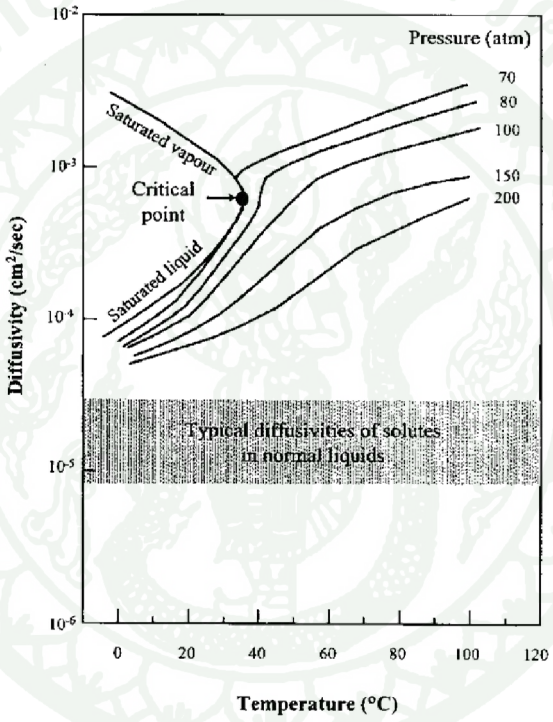
2.1 คุณสมบัติของการถ่ายเท (Transportation Property)

เนื่องจากของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตมีความหนืดต่ำ และมีความสามารถในการแพร่กระจายที่สูงกว่าของเหลว ทำให้สามารถแทรกซึมเข้าสู่โครงสร้างของตัวถูกละลายได้ดี และทำให้ตัวถูกละลายที่ละลายเข้าไปในของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตกระจายออกจากบริเวณสกัด (Extraction Zone) ไปยังบริเวณอื่นได้ง่าย ซึ่งส่งผลให้อัตราการถ่ายเทมวล (Mass Transfer Rate) ดี แต่ทั้งนี้ ค่าความหนืดและความสามารถในการแพร่กระจายของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตจะมีความสัมพันธ์กับปัจจัยต่าง ๆ หลายประการ อาทิเช่น อุณหภูมิ ความดัน และชนิดของของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต จึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาวะให้เหมาะสมเพื่อที่จะทำให้สามารถสกัดสารที่ต้องการได้ดีที่สุด (เกศินี, 2549)

ภาพที่ 8 แสดงสภาพแพร่ในตัวเอง (Self-Diffusivity) ของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ช่วงความดันและอุณหภูมิต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสภาพแพร่ของตัวถูกละลายในของเหลวอินทรีย์ จะเห็นได้ว่าค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ในตัวเองของคาร์บอนไดออกไซด์ มีค่าสูงกว่าการแพร่ของตัวถูกละลายในของเหลว อย่างน้อย 1-2 อันดับของขนาด (Order of Magnitude) (มานพ, 2553)



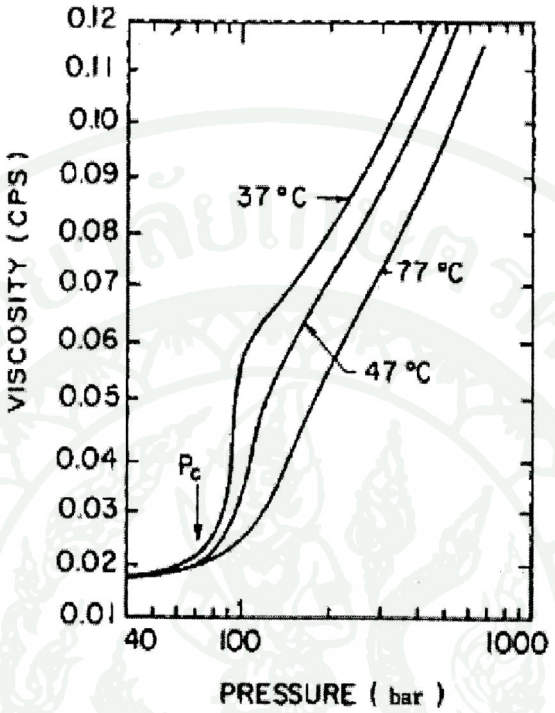
ภาพที่ 8 สภาพแพร่ในตัวเอง (Self-Diffusivity) ของคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ช่วงความดันและอุณหภูมิต่าง ๆ

ที่มา: McHugh and Krukonis (1986)

การเปลี่ยนคุณสมบัติทางกายภาพต่าง ๆ ของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤติสามารถเปลี่ยนแปลงไปได้เป็นอย่างมากเพียงแค่ทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือความดันเพียงเล็กน้อยในบริเวณที่ใกล้กับจุดวิกฤต ดังเช่นความหนืดของคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเพิ่มความดัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มากขึ้น ความหนืดของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตจะเพิ่มขึ้นเข้าใกล้ความหนืดของของเหลว และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ ค่าความหนืดของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตจะลดลง แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ค่าความหนืดของคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิและความดันต่าง ๆ

ที่มา: McHugh and Krukonis (1986)

2.2 ความสามารถในการทำละลาย (Solvating Power)

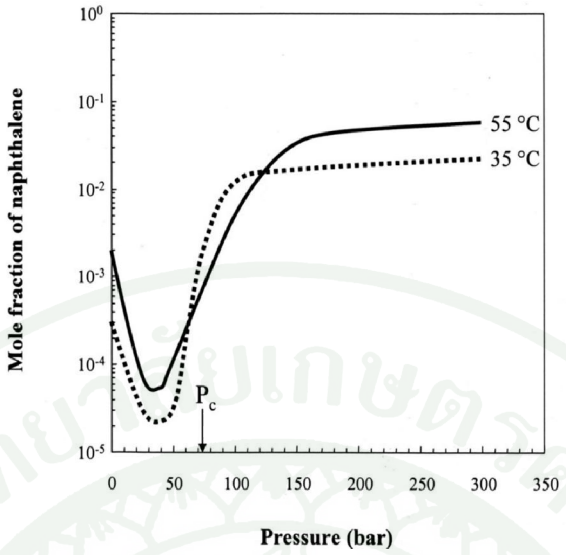
ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตมีความสามารถในการทำละลายดีกว่าตัวทำละลายที่เป็นของเหลวทั่วไป เนื่องจากสามารถปรับค่าสภาวะของตัวทำละลายได้ง่ายกว่า ซึ่งตัวแปรที่มีผลสำคัญคือ อุณหภูมิและความดัน โดยการเพิ่มความดันจะส่งผลให้ความสามารถในการทำละลายของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตมีค่าเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากความดันส่งผลให้ความหนาแน่นของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตมากขึ้น ทำให้มีการละลายเพิ่มมากขึ้น ประสิทธิภาพของการสกัดจึงสูงขึ้น สำหรับปัจจัยด้านอุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วการเพิ่มอุณหภูมิให้กับตัวทำละลายที่เป็นของเหลวทั่วไป จะส่งผลให้สามารถสกัดสารได้ดีขึ้น แต่การเพิ่มอุณหภูมิให้กับของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต จะส่งผลต่อความสามารถในการละลาย 2 ประการที่มีความขัดแย้งกัน คือ การเพิ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุณหภูมิจะเป็นการเพิ่มความดันไอของตัวถูกละลาย (Solute) ทำให้ความสามารถในการละลายของตัวถูกละลายจะเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการสกัดสารจะเพิ่มขึ้น และการเพิ่มอุณหภูมิจะเป็นการลดความหนาแน่นของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต ทำให้โมเลกุลของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตกับตัวถูกละลายอยู่ห่างกัน ความสามารถในการละลายของตัวถูกละลายจึงลดลง ดังนั้นประสิทธิภาพของการสกัดสารจะลดลง (เกศินี, 2549) จะเห็นได้จากความสามารถในการละลายของแนพทาลีนดังภาพที่ 10 พบว่าที่ความดันต่ำกว่า 60 บาร์ และสูงกว่า 120 บาร์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ความสามารถในการละลายของแนพทาลีนจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากความดันไอของตัวถูกละลายที่มากขึ้น มีผลต่อความสามารถในการละลายมากกว่าความหนาแน่นที่ลดลง และเมื่อพิจารณาความดันที่อยู่ระหว่าง 60–120 บาร์ พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ความสามารถในการละลายของแนพทาลีนจะลดลง เพราะผลของความหนาแน่นที่ลดลง มีผลมากกว่าความดันไอของตัวถูกละลายที่เพิ่มขึ้น ส่วนจุดที่กราฟทั้ง 2 อุณหภูมิตัดกันที่ความดันเท่ากับ 60 บาร์ และ 120 บาร์ นั้นคือ จุดที่ความดันไอที่เพิ่มขึ้นของตัวถูกละลายและความหนาแน่นที่ลดลงของของไหลมีผลต่อการละลายเท่ากัน เรียกจุดดังกล่าวว่า Cross Over Pressure (มานพ, 2553)

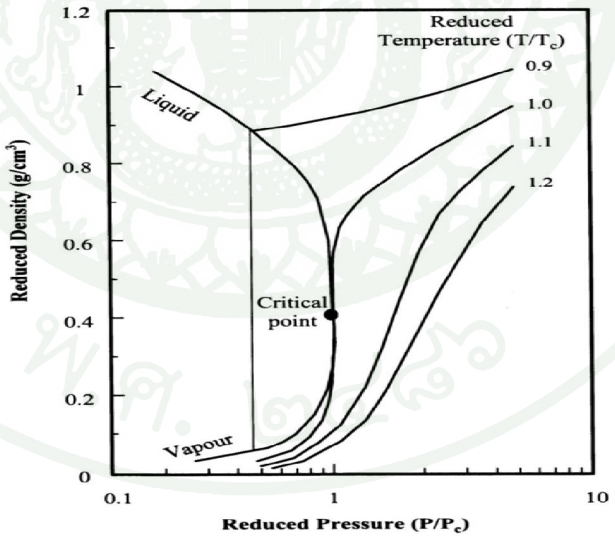
สมบัติทางกายภาพของของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตสามารถเปลี่ยนแปลงไปได้เป็นอย่างมากเพียงแค่ทำการเปลี่ยนแปลงความดันหรืออุณหภูมิเพียงเล็กน้อย เนื่องจากของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตจะมีความสามารถในการอัดตัวสูง (High Compressibility) (ชินนทัต, 2549) ดังเช่นภาพที่ 11 เมื่อเปลี่ยนแปลงความดันเพียงเล็กน้อยที่อุณหภูมิคงที่ จะส่งผลให้ความหนาแน่นของคาร์บอนไดออกไซด์เปลี่ยนแปลงอย่างมาก เนื่องจากความสามารถในการทำละลายของของไหลใกล้จุดวิกฤตแปรผันตรงกับความหนาแน่น ดังนั้น อุณหภูมิและความดันจึงเป็นตัวแปรที่สามารถใช้ในการปรับความสามารถในการทำละลายของของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตได้ (มานพ, 2553)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 ความสามารถในการละลายของแนพทาลีนในคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความดันและอุณหภูมิต่าง ๆ

ที่มา: มานพ (2553)



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นลด (Reduced Density, $\rho_r = \rho/\rho_c$) ของคาร์บอนไดออกไซด์กับอุณหภูมิลด (T_r) และความดันลด (P_r)

ที่มา: มานพ (2553)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 ความสามารถในการเลือกสกัด (Selectivity Property)

ความสามารถในการเลือกสกัดของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต สามารถปรับให้มีค่าต่าง ๆ เพื่อให้ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตมีความสามารถในการทำละลายที่จำเพาะเจาะจงหรือเหมาะสมเฉพาะกับสารที่ต้องการสกัดมากยิ่งขึ้น โดยการปรับอุณหภูมิและความดัน เพื่อให้ได้สารสกัดออกมาในปริมาณมากที่สุดและมีการเจือปนของสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด

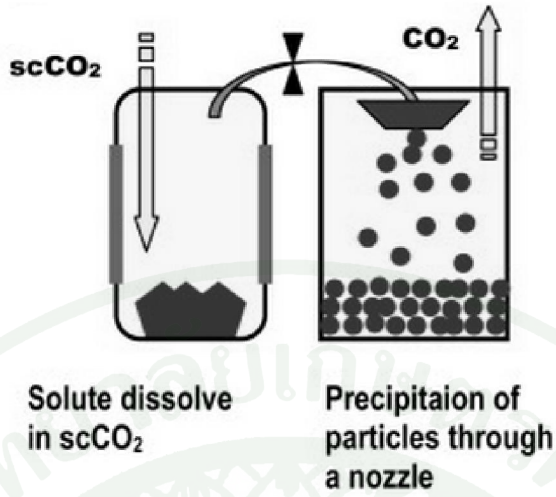
3. เทคโนโลยีของของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤต

กระบวนการที่ใช้ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตในการผลิตอนุภาคยา สามารถแบ่งออกเป็นเทคนิคต่าง ๆ ได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

3.1 การตกตะกอนของตัวถูกละลายจากสารละลายที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต

การตกตะกอนของตัวถูกละลายจากสารละลายที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต เทคนิคที่นิยมใช้คือ กระบวนการขยายตัวอย่างรวดเร็วของสารละลายเหนือจุดวิกฤต (Rapid Expansion of Supercritical Solution, RESS) กระบวนการนี้ได้ถูกพัฒนาสำหรับการลดขนาดอนุภาค การสร้างแผ่นฟิล์มเส้นใย และการผสมของผง ในการลดขนาดของอนุภาคนั้น สารที่ต้องการลดขนาดจะต้องละลายได้ดีในของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต ซึ่งความสามารถในการละลายของตัวถูกละลายในของไหลเหนือจุดวิกฤตจะสูงกว่าการละลายในก๊าซอุดมคติ 10^{12} เท่า จากนั้นทำการลดความดันอย่างรวดเร็วโดยการสเปรย์สารละลายที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตผ่านหัวฉีดที่มีขนาดเล็ก ซึ่งจะทำให้เกิดการขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้ตัวถูกละลายตกตะกอนออกมา การลดความดันอย่างรวดเร็วนี้จะส่งผลให้เกิดการอิ่มตัวยิ่งยวด (Supersaturating) สูงมาก และมีอัตราการเกิดนิวเคลียส (Nucleation Rate) สูง ซึ่งตะกอนหรืออนุภาคที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็กและมีช่วงการกระจายตัวของขนาดที่แคบ (มานพ, 2553; วุฒิชัย, 2549) โดยกระบวนการ RESS แสดงได้ดังภาพที่ 12

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



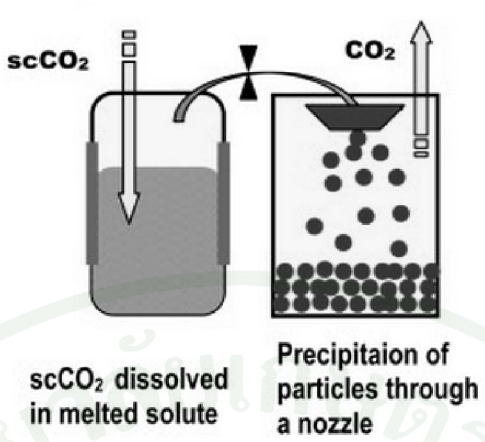
ภาพที่ 12 กระบวนการขยายตัวอย่างรวดเร็วของสารละลายเหนือจุดวิกฤต (RESS)

ที่มา: Domingo and Suarina (2012)

3.2 การตกตะกอนจากสารละลายก๊าซอิ่มตัว

การตกตะกอนจากสารละลายก๊าซอิ่มตัว (Precipitation from Gas Saturated Solutions, PGSS) โดยวิธีนี้ ของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตจะไม่ทำหน้าที่เป็นตัวทำละลาย หรือตัวต้านการละลาย แต่ของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตจะละลายในตัวถูกละลายที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิและความดันระดับหนึ่ง ซึ่งส่งผลให้ความหนืดและจุดหลอมเหลวของตัวถูกละลายลดลง เมื่อทำการขยายตัวสารละลายที่อิ่มตัวไปด้วยก๊าซ (Gas Saturated Solution) ผ่านหัวฉีดสเปรย์ จะทำให้สารละลายเย็นตัวอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการระเหยของของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤต ทำให้ตัวยาที่ได้แข็งตัวและมีลักษณะเป็นผงละเอียด ซึ่งขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคจะขึ้นกับอุณหภูมิ ขนาดและรูปร่างของหัวฉีด และปริมาณของของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตที่ละลายในตัวยาที่หลอมเหลว (วุฒิชัย, 2549; มานพ, 2553) โดยกระบวนการ PGSS แสดงดังภาพที่ 13

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 กระบวนการการตกตะกอนจากสารละลายก๊าซอิ่มตัว (PGSS)

ที่มา: Domingo and Suarina (2012)

3.3 การตกตะกอนของตัวถูกละลายจากสารละลายโดยมีของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัวต้านการละลาย

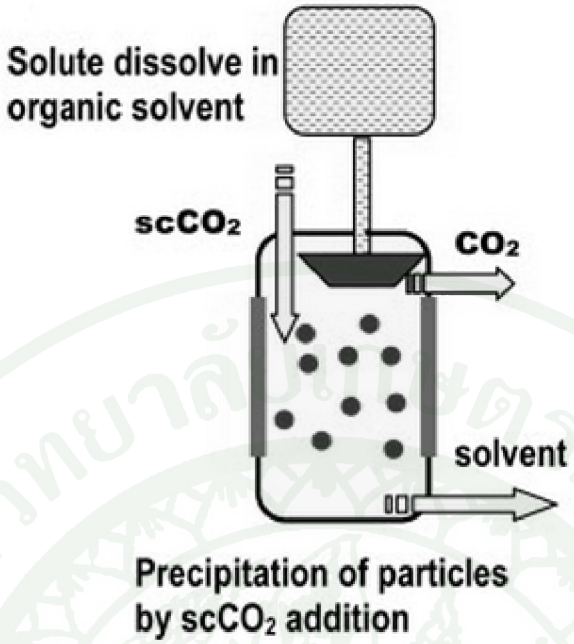
การตกตะกอนของตัวถูกละลายจากสารละลายโดยมีของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัวต้านการละลายโดยวิธีการนี้จะสามารถลดขนาดของของแข็งที่ไม่ละลายในของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤต หรือมีความสามารถในการละลายในของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตต่ำ โดยมีหลักการคือการให้สารละลายที่ประกอบด้วยตัวถูกละลายที่สนใจสัมผัสกับของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤต ทำให้เกิดการถ่ายเทมวลสารระหว่างของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตกับตัวทำละลายอินทรีย์จะส่งผลให้เกิดการอิ่มตัวยิ่งยวดและเกิดการตกตะกอนของตัวถูกละลาย โดยเทคนิคนี้ได้ถูกพัฒนาไปหลายรูปแบบที่แตกต่างกันโดยการเปลี่ยนทิศทางการไหลของสารในแต่ละเฟส วิธีการสัมผัสกันระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์กับตัวต้านการละลาย วิธีปฏิบัติการแบบกะ (Batch) หรือแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Batch) เช่น การตกตะกอนโดยตัวต้านการละลายที่เป็นของไหลบีบอัด (Precipitation with a Compressed fluid Anti-solvent, PCA); ตัวต้านการละลายที่เป็นของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต (Supercritical Anti-Solvent, SAS); Aerosol Solvent Extraction System (ASES); การเพิ่มสมรรถนะการกระจายตัวของสารละลายโดยใช้ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต (Solution-Enhanced Dispersion by Supercritical fluids, SEDS) และตัวต้านการละลายที่เป็นก๊าซ (Gas Anti-Solvent, GAS) เทคนิคเหล่านี้จึงเป็นทางเลือกที่ดีอีกทางเลือกหนึ่ง เพราะยาส่วน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใหญ่มีความสามารถในการละลายในของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตต่ำ (มานพ, 2553) กระบวนการการตกตะกอนของตัวถูกละลายจากสารลายที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัวต้านการละลายสามารถแบ่งได้เป็น 3 รูปแบบตามวิธีปฏิบัติการที่แตกต่างกัน ดังนี้

3.3.1 กระบวนการการตกตะกอนโดยตัวต้านการละลายที่เป็นของไหลบีบอัด (Precipitation with a Compressed fluid Anti-solvent, PCA); กระบวนการตัวต้านการละลายที่เป็นของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต (Supercritical Anti-Solvent, SAS) และกระบวนการ Aerosol Solvent Extraction System (ASES) เป็นเทคนิคที่มีการตกตะกอนอย่างต่อเนื่อง เมื่อพ่นสารละลายที่ประกอบด้วยตัวถูกละลายที่สนใจกับตัวทำละลายอินทรีย์ผ่านหัวฉีดเข้าสู่ห้องตกตะกอน (Precipitator Chamber) ซึ่งมีของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตบรรจุอยู่ ความสามารถในการละลายของตัวทำละลายนั้นจะลดลงเมื่อผสมกับของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤต ส่งผลให้เกิดการขยายตัวเชิงปริมาตร เมื่อปริมาตรขยายตัวถึงค่าวิกฤตแล้ว สารละลายจะเกิดการอิ่มตัว ตัวถูกละลายก็จะตกตะกอนออกมาจากสารละลาย จากนั้นทำการล้างผลิตภัณฑ์ โดยทำการป้อนของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเข้าสู่เวสเซล เพื่อกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากระบบ และระบบจะถูกลดความดันลงสู่ความดันบรรยากาศ แล้วจึงทำการเก็บตะกอนผลิตภัณฑ์ ทั้งสามกระบวนการนี้มีหลักการคล้าย ๆ กันแต่รายละเอียดของกระบวนการอาจจะแตกต่างกันแล้วแต่ผู้วิจัย เช่น ระยะเวลาของแต่ละขั้นตอน รูปแบบกระบวนการ หัวฉีด เป็นต้น และขนาดของอนุภาคจะขึ้นกับขนาดของหัวฉีด ความดัน อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารละลาย ซึ่งลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจจะเป็นทรงกลม เส้นใย เส้นใยกลวงหรือเป็นแผ่นฟิล์ม (วุฒิชัย, 2549; มานพ, 2553) โดยกระบวนการ PCA แสดงได้ดังภาพที่ 14

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

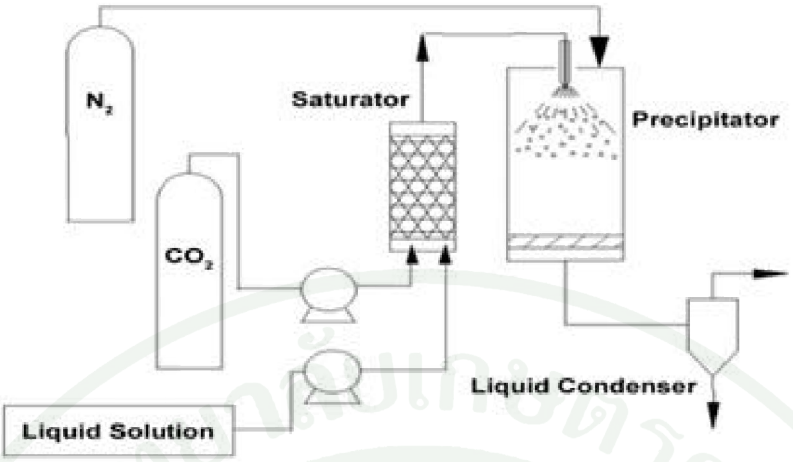


ภาพที่ 14 กระบวนการการตกตะกอนโดยตัวต้านการละลายที่เป็นของไหลบีบอัด (PCA)

ที่มา: Domingo and Suarina (2012)

3.3.2 กระบวนการการเพิ่มสมรรถนะการกระจายตัวของสารละลายโดยใช้ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต (Solution-Enhanced Dispersion by Supercritical fluids, SEDS) ในกระบวนการจะใช้หัวฉีดร่วมแกน (Coaxial Nozzle) โดยสารละลายของเหลวจะไหลอยู่ในช่องด้านใน ส่วนของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตอยู่ในท่อด้านนอก หรืออาจจะสลับสารกันได้ การใช้หัวฉีดร่วมแกนนี้จะช่วยให้เกิดการผสมกันระหว่างของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตกับสารละลายยาก่อนที่จะสเปรย์สารออกมา โดยการผสมนี้จะทำให้เกิดความปั่นป่วน (Turbulence) ทำให้สารละลายอินทรีย์สามารถแพร่เข้าไปในเฟสของของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตได้ง่าย ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการถ่ายโอนมวลสาร และเทคนิคนี้ยังสามารถผลิตอนุภาคขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร หรือไมโครเมตรได้ (มานพ, 2553) โดยกระบวนการ SEDS แสดงได้ดังภาพที่ 15

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



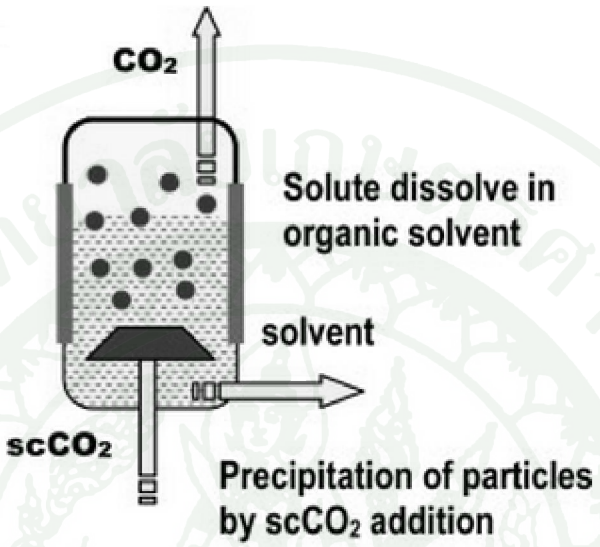
ภาพที่ 15 กระบวนการการเพิ่มสมรรถนะการกระจายตัวของสารละลายโดยใช้ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต (SEDS)

ที่มา: Malpani (2009)

3.3.3 กระบวนการ Gas Anti-Solvent (GAS) เป็นกระบวนการแบบ Batch ใช้ของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็น Anti-Solvent เพื่อทำให้เกิดการตกตะกอนของสารที่ต้องการออกจากสารละลายและสามารถลดขนาดอนุภาคได้โดยใช้อุณหภูมิที่ไม่สูงมากนัก จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับลดขนาดสารที่มีสมบัติเป็นวัตถุระเบิด (Explosive) โดยตะกอนของสารที่สนใจจะต้องไม่ละลายในของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤต หรือมีความสามารถในการละลายในของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตต่ำ แต่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดี โดยกระบวนการนี้จะเริ่มต้นด้วยการเติมของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตอย่างช้า ๆ เข้าสู่สารละลายที่ประกอบด้วยตัวถูกละลายที่สนใจละลายอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่อยู่ใน Vessel สารละลายจะเกิดการขยายตัวเชิงปริมาตร (Volumetric Expansion) ซึ่งการขยายตัวนี้จะทำให้ความแข็งแรงของตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvent Srength) ลดลง ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการละลายของตัวทำละลายอินทรีย์ต่ำลง เมื่อเพิ่มความดันของของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตให้สูงขึ้นจนถึงค่า ๆ หนึ่ง จะทำให้สารละลายเกิดการอิ่มตัวยิ่งยวดและเกิดการตกตะกอนของอนุภาคของตัวถูกละลายออกมา โดยจะเรียกความดันของระบบช่วงนี้ว่า Threshold Pressure หลังจากนั้นทำการแยกผลิตภัณฑ์หรือตะกอนที่ได้ออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ โดยการล้างด้วย Anti-Solvent ที่มีความบริสุทธิ์ (วุฒิชัย, 2549; มานพ, 2553) โดยกระบวนการ GAS แสดงได้ดังภาพที่ 16 สำหรับขนาดและสัณฐานวิทยา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ GAS จะขึ้นกับระดับความอิ่มตัวยิ่งยวด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความดัน สภาวะการผสม ความเข้มข้นของตัวถูกละลาย ล้วนแต่เป็นตัวแปรที่สำคัญที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคทั้งสิ้น



ภาพที่ 16 กระบวนการ Gas Anti-Solvent (GAS)

ที่มา: Domingo and Suarina (2012)

4. ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับของไหลที่สภาวะใกล้จุดวิกฤต

วุฒิชัย (2549) ได้ศึกษาสารสกัดแอนโดรกราโฟไลด์ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในฟ้าทลายโจร ด้วยกระบวนการ GAS โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวต้านการละลาย โดยศึกษาผลของอุณหภูมิ 25 ถึง 45 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 1, 3, 5, 10 และ 15 มิลลิลิตรต่อนาที และชนิดของตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน และไดเมทิลฟอร์มาไมด์ วิเคราะห์ปริมาณและชนิดของสารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) พบว่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 มิลลิลิตร/นาที และใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถสกัดสารแอนโดรกราโฟไลด์ได้ 1.24 กรัมต่อ 100 กรัมผงฟ้าทลายโจร นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดและรูปร่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของสารสกัดแอนโดรกราโฟไลด์ ที่ตกตะกอนได้มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ อัตราการไหลและชนิดตัวทำละลายอินทรีย์

Yildiz *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาการลดขนาดอนุภาคกรดซาลิไซลิค (Salicylic Acid) และทาซอล (Taxol) ในยา Paclitaxal โดยใช้กระบวนการขยายตัวอย่างรวดเร็วของสารละลายเหนือจุดวิกฤต หรือ RESS โดยศึกษาการใช้ของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต 2 ชนิด คือ คาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์และตัวทำละลายร่วมระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์กับเอทานอล และยังศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (318-333K) ความดัน (15-25 MPa) อุณหภูมิการขยายตัวเริ่มแรก (353-413 K) อุณหภูมิของห้องขยาย (Expansion Chamber) (273-293 K) ระยะทางของสเปรย์ที่ฉีด (6-13 cm) ตัวทำละลายร่วมในอัตราส่วนเอทานอล 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และใช้หัวฉีด 2 ชนิด คือ แบบคาปิลารี่กับแบบออริฟิค ในการผลิตอนุภาคของกรดซาลิไซลิค สำหรับทาซอลจะศึกษาที่ ความดัน (25, 30, 35 MPa) และตัวทำละลายร่วมในอัตราส่วนเอทานอล 2, 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และวิเคราะห์คุณลักษณะของอนุภาคที่ได้ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscopy (SEM), Optical Microscopy และ LC–MS Analysis

Boonnoun *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารลูทีนซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในดอกดาวเรือง ด้วยกระบวนการ SAS โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวต้านการละลาย โดยศึกษาผลของความดันที่ 8, 10 และ 12 เมกะปาสคาล อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 20 และ 25 มิลลิลิตรต่อนาที ชนิดของตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ ไดคลอโรมีเทนและเอทานอล และควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 55 องศาเซลเซียส วิเคราะห์สัณฐานวิทยา (Morphology) ของอนุภาค ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง SEM (Scanning Electron Microscopy) พบว่า สำหรับตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด การเพิ่มความดันและการเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและสัณฐานของอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตาม การเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์สามารถลดขนาดเฉลี่ยของอนุภาคลงได้ สำหรับผลของความดัน พบว่าในตัวทำละลายไดคลอโรมีนเทน การเพิ่มความดันส่งผลให้ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคใหญ่ขึ้นและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคกว้างขึ้น แต่หากใช้ตัวทำละลายเอทานอลจะได้ผลตรงข้ามกับไดคลอโรมีเทน นอกจากนี้ พบว่าที่ความดัน 8 เมกะปาสคาล อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ทั้ง 2 อัตรา และตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด ไม่พบการเกิดผลึกของอนุภาค เนื่องจากสภาวะนี้เป็นสภาวะที่ต่ำกว่าจุดวิกฤตของของไหล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การออกแบบและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

การออกแบบและการวิเคราะห์การทดลอง (Design and Analysis of Experiment: DAE) เป็นเทคนิคทางสถิติขั้นสูงที่ใช้ในการปรับค่าสภาวะของกระบวนการให้เป็นไปตามสภาพที่เราต้องการ ซึ่งข้อแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดระหว่างวิธีการโดยทั่วไปกับเทคนิคของการออกแบบการทดลองคือ วิธีโดยทั่วไปมักเป็นการทดลองแบบลองผิดลองถูก หรือใช้การทดลองปรับตั้งค่ากระบวนการทีละค่า (One Factor at a Time) ซึ่งวิธีการนี้จะให้ผลตอบสนองเข้าสู่จุดมุ่งหมายที่เราต้องการได้ช้ามาก และสิ้นเปลืองทรัพยากรในการวิเคราะห์รวมถึงต้องเก็บข้อมูลมากและยังไม่เหมาะสมอย่างยิ่งกับกระบวนการที่มีผลของความสัมพันธ์ร่วม (Interaction Effect) ระหว่างตัวแปรของกระบวนการด้วยกันเอง (วราภรณ์, 2556) ข้อดีของการออกแบบการทดลอง คือ ให้ผลของความแม่นยำและความถูกต้องในการวิเคราะห์ข้อมูลได้อย่างสูง โดยสามารถระบุออกมาเป็นตัวเลขทางสถิติที่แสดงถึงค่าระดับความสำคัญของตัวแปรที่ส่งผลต่อกระบวนการ นอกจากนี้ยังมีความรวดเร็วในการดำเนินการตรวจสอบสาเหตุของปัญหา

1. การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Design)

วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (Response Surface Methodology: RSM) เป็นการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์และทางสถิติที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหา โดยที่ผลที่สนใจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ที่ทำให้ผลตอบสนองมีค่าเหมาะสมที่สุด ยกตัวอย่างเช่น ผลตอบสนอง Y เป็นฟังก์ชันของปัจจัย X_1 และ X_2 ดังนั้นจะสามารถเขียนในรูปสมการดังนี้

$$Y = f(X_1, X_2) + \square \qquad (12)$$

โดยที่ คือ ค่าความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในกระบวนการและมีผลกระทบต่อผลตอบสนอง Y ส่วนค่าความคาดหวังของผลตอบสนองสามารถเขียนเป็นสมการแสดงดังนี้

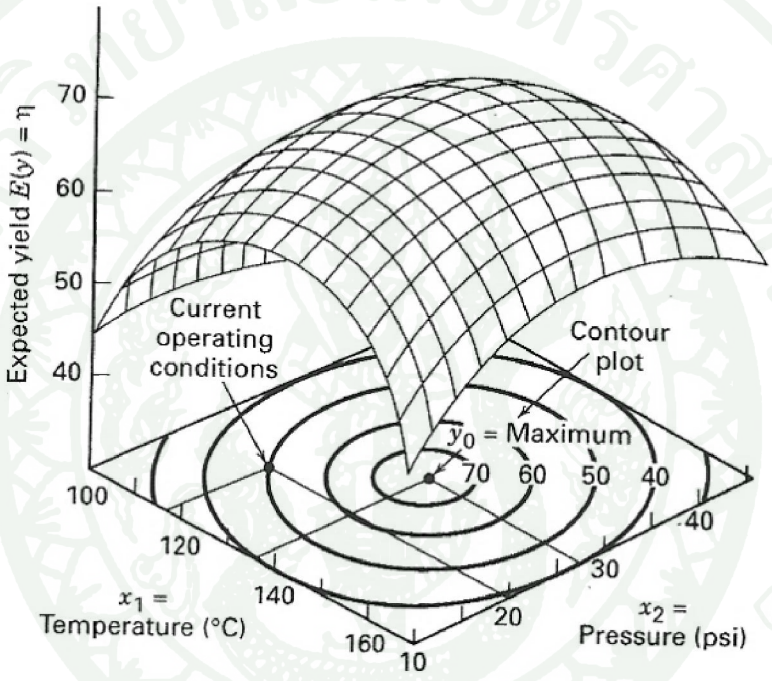
$$E(Y) = f(X_1, X_2) \qquad (13)$$

ดังนั้นพื้นที่ตอบสนอง (Response Surface) สำหรับระบบที่มีจำนวน 2 ปัจจัย สามารถเขียนแทนด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\eta = f(X_1, X_2) \quad (14)$$

พื้นที่การตอบสนองสามารถแสดงในรูปแบบของกราฟ แสดงดังภาพที่ 17 โดยที่ η จะถูกพล็อตกับระดับของปัจจัย X_1 และ X_2 ซึ่งจะพล็อตเส้นระดับของพื้นที่ตอบสนองที่เรียกว่ากราฟโครงร่าง (Contour Plot) โดยเส้นระดับที่มีค่าของผลตอบสนองคงที่จะถูกพล็อตลงในแนวระนาบ X_1 – X_2 แต่ละเส้นระดับจะสอดคล้องกับความสูงของพื้นที่การตอบสนอง



ภาพที่ 17 พื้นที่การตอบสนองแบบ 3 มิติและกราฟเส้นโครงร่าง

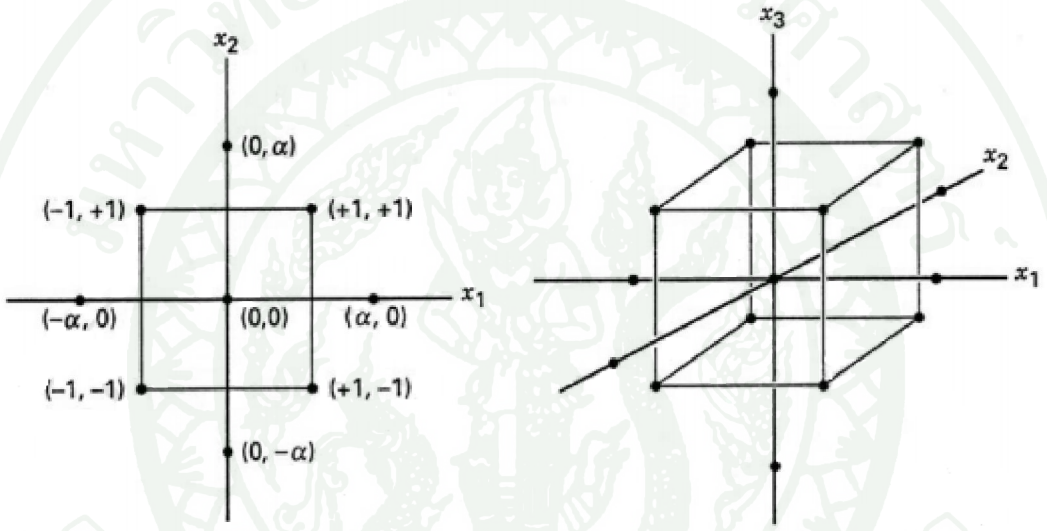
ที่มา: ศิวพร (2555)

การวิเคราะห์พื้นที่การตอบสนองนี้สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับค่าการตอบสนอง สามารถแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลตอบสนอง เมื่อระดับของปัจจัยเชิงปริมาณมีการเปลี่ยนแปลงและทำให้ทราบถึงระดับของปัจจัยเชิงปริมาณที่เหมาะสม (Optimum Value) ที่จะทำให้ได้ผลตอบสนองที่ดีที่สุด หรือสามารถเลือกจุดที่เหมาะสมได้จากผลตอบสนองหลาย ๆ ค่า ซึ่งการวิเคราะห์พื้นที่การตอบสนองมีวิธีที่น่าสนใจอยู่ 2 วิธีคือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1 การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design: CCD)

เป็นหนึ่งในวิธีการหาพื้นที่ผิวตอบสนองที่นิยมใช้เพื่อหากระบวนการที่เหมาะสม โดยทั่วไปการออกแบบส่วนผสมกลางจะประกอบด้วย 2^k แฟกทอเรียลที่มี n_f การทดลอง ในแนวแกน และ n_c การทดลอง ที่จุดศูนย์กลาง ซึ่งการออกแบบนี้เป็นการออกแบบที่ทุกระดับของแต่ละปัจจัยห่างจากจุดศูนย์กลางเท่ากัน ดังภาพที่ 18 แสดงการออกแบบส่วนประสมกลางสำหรับ k = 2 และ k = 3 ปัจจัย โดยภาพ ก) คือการออกแบบส่วนประสมกลางสำหรับ k = 2 และภาพ ข) คือการออกแบบส่วนประสมกลางสำหรับ k = 3 (ไชยวัฒน์, 2553)



ก) ข)

ภาพที่ 18 การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (CCD)

ที่มา: ไชยวัฒน์ (2553)

1.2 การออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design)

การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken เป็นการออกแบบสำหรับปัจจัยที่มีสามระดับสำหรับฟิตพื้นที่การตอบสนอง ซึ่ง Box-Behnken มีลักษณะการออกแบบโดยใช้หลักการของการออกแบบแฟคทอเรียล 2^k รวมกับการออกแบบบล็อคไม่สมบูรณ์ ผลของการออกแบบจะมีประสิทธิภาพมากทางด้านจำนวนของการทดลองที่ต้องการมีจำนวนน้อย เมื่อทำการออกแบบ Box-Behnken ที่มีจำนวน 3 ปัจจัย แต่ละปัจจัยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ โดยกำหนดให้ X_1, X_2 และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

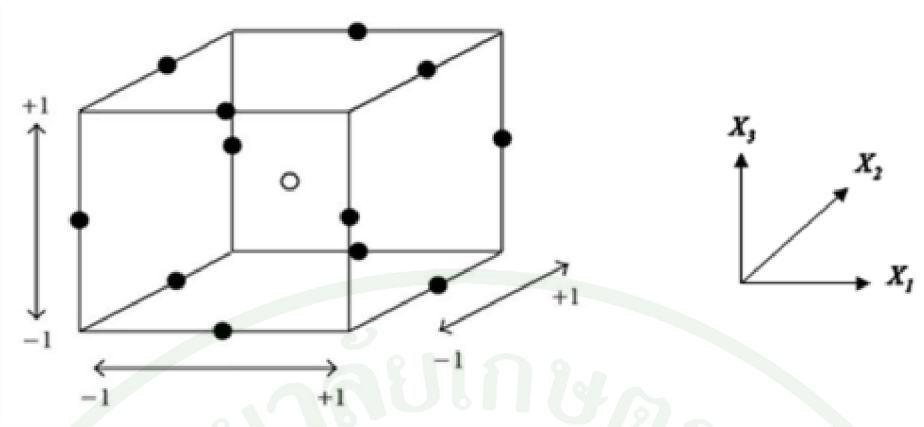
X_3 แทนปัจจัย ส่วนระดับปัจจัยแทนด้วย -1, 0 และ +1 จะได้การทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง (วราภรณ์, 2556) แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ที่มี 3 ปัจจัย

การทดลองที่	X_1	X_2	X_3
1	1	-1	0
2	0	0	0
3	1	1	0
4	0	-1	-1
5	0	-1	1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	0	0	0
9	-1	0	-1
10	0	1	-1
11	0	0	0
12	1	0	1
13	-1	1	0
14	-1	-1	0
15	0	1	1

เมื่อพิจารณารูปทางเรขาคณิตของการออกแบบ Box-Behnken ดังภาพที่ 19 เป็นการออกแบบรูปทรงกลม ที่ทุกจุดวางอยู่บนรูปวงกลมรัศมี $\sqrt{2}$ นอกจากนี้การออกแบบ Box-Behnken ไม่ได้รวมเอาจุดใด ๆ ที่เป็นจุดยอดของรูปลูกบาศก์ที่สร้างขึ้นจากขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่างของปัจจัยแต่ละปัจจัย การกระทำเช่นนี้เป็นประโยชน์อย่างมาก เมื่อจุดที่อยู่บนมุมรูปลูกกาศก์ คือ การรวมของปัจจัยระดับ (Factor-Level Combination) ที่แพงมากไปหรือเป็นไปไม่ได้ที่จะทำการทดลอง เนื่องจากข้อจำกัดทางกายภาพของกระบวนการ (ศิวพร, 2555)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 19 การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken สำหรับ 3 ปัจจัย

ที่มา: ศิวพร (2555)

ในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะนำการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken มาใช้กับการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยกระบวนการ GAS โดยศึกษา 3 ปัจจัยคือ ชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ อุณหภูมิและอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อให้ทราบถึงปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณสารที่ตกตะกอนได้ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิด

2. การวิเคราะห์การถดถอยแบบพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Regression Analysis)

การวิเคราะห์การถดถอยเป็นวิธีหนึ่งที่จะนำมาใช้สำหรับการประมาณค่าและการพยากรณ์ (Estimation and Prediction) และการหาค่าที่ดีที่สุด (Optimization) ซึ่งจะทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ประเภท ได้แก่ ตัวแปรตามหรือค่าตอบสนอง (Dependent Variable: Y or Response) และตัวแปรอิสระหรือปัจจัย (Independent Variables: X or Factors) โดยจะพยากรณ์ตัวแปรตามด้วยค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามและตัวแปรอิสระ ซึ่งเรียกว่าค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression Coefficient) การหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยจะทำได้หลังจากที่ได้สร้างหรือกำหนดรูปแบบของความสัมพันธ์ (Model) ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามแล้ว ซึ่งในการออกแบบพื้นที่การตอบสนองนั้นมีรูปแบบของแบบจำลองทั้งหมด 4 แบบจำลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้แก่ Linear model, Linear + Square model, Linear + Interaction model และ Full Quadratic model (ศิวพร, 2555) แสดงดังสมการที่ 12-15

Linear model

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3}\beta_i X_i \quad (12)$$

Linear + Square model

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3}\beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3}\beta_{ii} X_i^2 \quad (13)$$

Linear + Interaction model

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3}\beta_i X_i + \sum_{i=1}^{2}\sum_{j=1}^{3}\beta_{ij} X_{ij} \quad (14)$$

Full Quadratic model

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3}\beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3}\beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2}\sum_{j=1}^{3}\beta_{ij} X_{ij} \quad (15)$$

3. วิธีการพิจารณาความเหมาะสมของแบบจำลอง

การจะนำรูปแบบจำลองมาใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามและตัวแปรอิสระที่มีอยู่ 4 รูปแบบข้างต้นโดยวิธีพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Methodology) จะต้องมีหลักการในการเลือกตัวแบบจำลองที่เหมาะสมดังนี้

3.1 ทดสอบความมีนัยสำคัญของความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนองและเซตของตัวแปรถดถอยที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยพิจารณาสมมติฐานที่เหมาะสมของแต่ละแบบ ซึ่งพิจารณาจากค่า P-value

3.2 พิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination: R^2) ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ คือ ค่าที่แสดงสัดส่วนหรือเปอร์เซ็นต์ของความแปรผันทั้งหมดของตัวแปร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตาม Y เป็นค่าที่ใช้อธิบายความสามารถของสมการถดถอย หรือตัวแปรอิสระในสมการถดถอยว่าสามารถจะอธิบายการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตาม (Y) หรือค่าตอบสนอง โดยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 ซึ่งแบบจำลองที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเข้าใกล้ 1 หรือเท่ากับ 1 แสดงให้เห็นว่าตัวแปรอิสระที่อยู่ในแบบจำลองสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามได้ดี ดังนั้นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจยิ่งมาก สมการยิ่งมีความเหมาะสมมาก

3.3 พิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว หรือ R^2(adj) คือ ค่าที่แสดงสัดส่วนหรือเปอร์เซ็นต์ที่ตัวแปรอิสระ X มีส่วนในการอธิบายความแปรผันทั้งหมดของตัวแปรตาม Y ซึ่งเป็นค่าวัดว่ารูปแบบนั้นเหมาะสมกับข้อมูลอย่างไร สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 16

$$R^2_{adj} = 1 - \frac{n-1}{n-k-1} \times (1 - R^2) \quad (16)$$

กำหนดให้ n = จำนวนการทดลอง

k = จำนวนสัมประสิทธิ์ในแบบจำลอง

3.4 พิจารณาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Error: SE) ถ้าค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานมีค่าน้อย แสดงว่าแบบจำลองที่นำมาใช้มีความเหมาะสมค่อนข้างมาก แต่ถ้าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานมีค่ามาก แสดงว่าแบบจำลองที่นำมาใช้มีความเหมาะสมน้อย และถ้ากรณีที่ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานมีค่าเป็นศูนย์ แสดงว่าแบบจำลองมีความเหมาะสมดีมาก

3.5 พิจารณาฟังก์ชันความพึงพอใจ (Desirability Function) ซึ่งเป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการพิจารณาสภาวะของผลตอบสนอง ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนของตัวแปรอิสระ โดยค่าของความพึงพอใจของผลตอบสนอง (Desirability, d) จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 เมื่อ d มีค่าเท่ากับศูนย์ หมายถึง ผลตอบสนองนั้นอยู่นอกขอบเขตของการยอมรับ แต่ถ้า d มีค่าเพิ่มขึ้น ค่าความพึงพอใจก็จะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน และเมื่อ d มีค่าเท่ากับหนึ่ง หมายถึง ผลตอบสนองนั้นได้ความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบที่ใช้การสกัด

บัวบกสดจากตลาดสี่มุมเมือง ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำการทดลองโดยใช้ส่วนใบของบัวบกเท่านั้น

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เมทานอล (Methanol; CH_3OH, บริษัท Carlo Erba, ความบริสุทธิ์ 99.9%)

2.2 เอทานอล (Ethanol; C_2H_5OH, บริษัท Emsure, ความบริสุทธิ์ 99.9%)

2.3 อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile; CH_3CN, บริษัท Carlo Erba, ความบริสุทธิ์ 99.5%)

2.4 น้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดประจุออกแล้วหรือน้ำ DI (De-ionization, 18 MΩ/cm)

2.5 คาร์บอนไดออกไซด์ (High Purity Grade, บริษัท TIG)

2.6 สารมาตรฐานของกรดอะเซียติก (Asiatic acid; บริษัท Sigma-Aldrich, HPLC Grade, ความบริสุทธิ์ 97%)

2.7 สารมาตรฐานอะเซียติโคไซด์ (Asiaticoside; บริษัท Fluka, HPLC Grade, ความบริสุทธิ์ 98.5%)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.8 สารมาตรฐานกรดมาเดคาสซิก (Madecassic acid; บริษัท Extrasynthese, HPLC Grade,ความบริสุทธิ์ 90%)

2.9 สารมาตรฐานมาเดคาสซิโคไซด์ (Madecassoside; บริษัท Extrasynthese, HPLC Grade,ความบริสุทธิ์ 97.5%)

2.10 สารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox; บริษัท Fluka, HPLC Grade, ความบริสุทธิ์ 98%)

2.11 สาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; บริษัท Fluka, HPLC Grade, ความบริสุทธิ์ 85%)

2.12 สาร 2,2-azion-bis-3-ethylbenzothiazo line-6-sulphonic acid (ABTS; บริษัท Fluka, HPLC Grade, ความบริสุทธิ์ 99%)

2.13 โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate; $K_2S_2O_8$, บริษัท Loba Chemie, ความบริสุทธิ์ 98%)

2.14 สารมาตรฐานแกลลิค (Gallic Acid Monohydrate; $C_7H_6O_5.H_2O$, บริษัท Sigma Aldrich, ความบริสุทธิ์ 98%)

2.15 สารโฟลินซิโอแคลทู (Folin-Ciocalteu's Reagent; บริษัท Carlo Erba)

2.16 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate; Na_2CO_3, บริษัท Univar, ความบริสุทธิ์ 99.8%)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1 ปั๊มความดันสูง (High Pressure Pump; บริษัท ISCO รุ่น 260D)

3.2 Heater (บริษัท)

3.3 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven; บริษัท Memmert)

3.4 เครื่องล้างความถี่สูง (Cavitator Ultrasonic Cleaner; บริษัท Mettler Electronic)

3.5 เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (บริษัท Adventure Ohaus)

3.6 ปั๊มสุญญากาศ (ยี่ห้อ Welch Vacuum Thomas รุ่น Compressors & Vacuum Pump)

3.7 เครื่องบดอาหารแห้ง (บริษัท Philips)

3.8 ชุดกรองโมบายเฟสของเครื่อง HPLC (Glass Filtration Kit)

3.9 อุปกรณ์ High Performance Liquid Chromatography

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.10 เครื่อง UV spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Genesys 10S UV-Visible

4. เครื่องมือวิเคราะห์

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รายละเอียดของเครื่องมือวิเคราะห์ HPLC แสดงดังต่อไปนี้

เครื่อง HPLC	: Thermo Finnigan
ระบบที่ใช้	: Gradient
คอลัมน์	: Reverse Phase Kinetex C18 (100 x 2.1 mm I.D.; 2.6 μm)
เฟสเคลื่อนที่	: Acetonitrile: Water
ตัวตรวจสอบ	: UV Detector
เวลาที่ใช้	: 28 min
อัตราการไหล	: 0.5 ml/min
ระบบปั๊ม	: Gradient pump
ตัวกรอง	: Membrane Filter (Millipore type HA, pore size 0.45 μm)
เครื่องกำเนิดแสง	: UV – Visible spectrophotometer
ค่าการดูดกลืนแสง	: 206 nm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การเตรียมวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัด

1.1 นำบัวบกสดมาแยกเอาเฉพาะส่วนใบของบัวบก

1.2 นำใบบัวบกที่ได้ล้างด้วยน้ำให้สะอาด ตากลมให้ใบสะเด็ดน้ำ จากนั้นนำมาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 นำใบบัวบกแห้งที่อบแล้วมาทำการปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหารแห้ง เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสกัดสารต่อไป จากนั้นนำผงใบบัวบกที่ได้บรรจุลงในขวดสีชา เก็บผงใบบัวบกไว้ในช่องแช่แข็ง

2. การสกัดผงบัวบกด้วยวิธีการแช่ (Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อหาปริมาณสารที่สกัดได้ทั้งหมด

2.1 ทำการชั่งน้ำหนักผงใบบัวบก 2.5 กรัม ใส่ในขวดสีชาขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด

2.2 นำตัวทำละลายเอทานอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร มาเทลงในขวดสีชาแต่ละขวดที่บรรจุผงใบบัวบกที่ชั่งน้ำหนักไว้

2.3 ทำการเขย่าให้สารผสมกันและนำไปสั่นที่เครื่องล้างความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 เมื่อครบเวลาในการแช่ผงใบบัวบกของแต่ละขวดแล้วทำการกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 เก็บสารสกัดที่ได้ใส่ขวดสีชาไว้เป็นการสกัดรอบแรก

2.5 นำกากตะกอนที่อยู่บนกระดาษกรองมาแช่ด้วยเอทานอลซ้ำอีกครั้ง โดยทำการทดลองตามข้อ 2.2-2.5 จนครบ 4 รอบ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญด้วยเครื่อง HPLC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การสกัดผงบัวบกด้วยวิธีการแช่ (Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

3.1 ทำการชั่งน้ำหนักผงบัวบก 5 กรัม ใส่ในขวดสีชาขนาด 75 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด

3.2 นำตัวทำละลายเอทานอลผสมเมทานอล ซึ่งมีเอทานอลผสมอยู่ 0, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตรอย่างละ 50 มิลลิลิตร นำมาเทใส่ลงในขวดสีชาแต่ละขวดที่บรรจุผงบัวบกที่ชั่งหนักไว้

3.3 ทำการเขย่าให้สารผสมกันและนำไปสั่นที่เครื่องล้างความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 ทำการกรองสารสกัดที่ได้จากการแช่ผงใบบัวบกแห้งด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่อเมทานอลอัตราส่วนต่าง ๆ ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 เพื่อเอาตะกอนของผงบัวบกออกจากสารสกัด สารสกัดที่ได้จะนำมาใช้เป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการตกตะกอนต่อไป

4. การตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกโดยใช้กระบวนการ Gas Anti-Solvent

4.1 ทำการต่ออุปกรณ์เครื่องมือดังภาพที่ 20

4.2 ใส่สารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้จากหัวข้อที่ 3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บรรจุลงใน Precipitator Chamber

4.3 ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ Heater เป็นตัวให้ความร้อนกับน้ำที่บรรจุอยู่ใน Water bath

4.4 ตรวจสอบทิศทางการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเปิดวาล์ว V-02 ให้ทิศทางของคาร์บอนไดออกไซด์ไหลลงด้านล่าง และเปิดวาล์ว V-03 เพื่อให้ทิศทางไหลเข้าด้านล่างของ Precipitator chamber ส่วนวาล์ว V-04 ให้ปิดไว้ก่อน

4.5 เมื่อได้อุณหภูมิ (25, 35 หรือ 45 องศาเซลเซียส) ตามที่ต้องการแล้ว จะเริ่มกระบวนการโดยเปิดวาล์ว V-01 เพื่อให้คาร์บอนไดออกไซด์ไหลเข้าสู่ Precipitator Chamber ด้วยอัตราไหล (3 6 หรือ 9 มิลลิลิตรต่อนาที) ตามที่ได้กำหนดไว้ข้างต้น โดยเริ่มฉีดที่ความดันประมาณ 45 บาร์

4.6 เพิ่มความดันของระบบจนถึง 90 บาร์ เพื่อให้สารเกิดการตกตะกอนออกมามากขึ้น

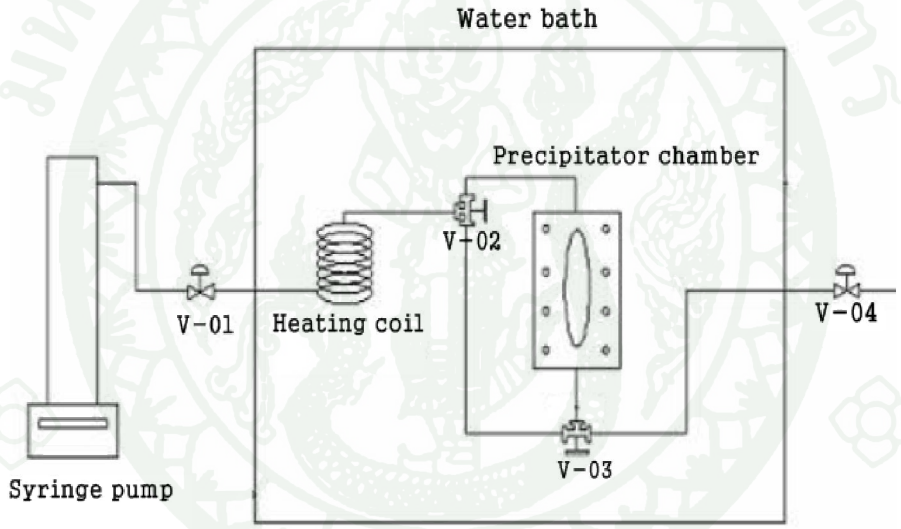
4.7 ทำการล้างตัวทำละลายออกจาก Precipitator Chamber เพื่อป้องกันไม่ให้สารออกฤทธิ์สำคัญละลายกลับไปในตัวทำละลาย โดยเปลี่ยนทิศทางการไหลของวาล์ว V-02 และ V-03 เพื่อให้คาร์บอนไดออกไซด์ไหลลงจากด้านบนของ Precipitator Chamber ลงด้านล่าง และเปิดวาล์ว V-04 เพื่อให้คาร์บอนไดออกไซด์และตัวทำละลายอินทรีย์ไหลออกจากระบบ โดยขั้นตอนนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จะใช้คาร์บอนไดออกไซด์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในการล้างและทำการล้างที่ความดันคงที่ที่ 90 บาร์ โดยควบคุมอัตราการไหลของสารละลายที่ออกจากระบบให้มีค่าประมาณ 0.8-1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยการปรับวาล์ว V-04

4.8 เมื่อทำการล้างเสร็จแล้ว ลดความดันในระบบให้เป็นความดันบรรยากาศก่อนเก็บตัวอย่าง

4.9 เก็บตัวอย่างจาก Precipitator Chamber โดยการนำเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาชะล้างตะกอนของสารสกัดที่ติดอยู่กับ Filter และนำเอทานอลอีก 10 มิลลิลิตร มาชะล้างตะกอนที่ติดอยู่ใน Chamber (ยี่ห้อ Jerguson) บรรจุลงในขวดสีชาและปิดฝาให้สนิท เพื่อรอการวิเคราะห์ผลหาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญและสมบัติการต้านออกซิเดชันต่อไป โดยการทดลอง 1 ครั้ง จะได้สารตัวอย่างทั้งหมด 2 ขวด



ภาพที่ 20 แผนภาพอุปกรณ์ที่ใช้ในการตกตะกอนด้วยเทคนิค GAS

5. สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากพืชสมุนไพรบัวบกในกลุ่มไตรเทอร์ปีน คือ มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) อะเซียติโคไซด์ (Asiaticoside) กรดมาเดคาสสิก (Madecassic Acid) และกรดอะเซียติก (Asiatic Acid) โดยการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลผสมเมทานอล ซึ่งมีเอทานอลผสมอยู่ 0, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยใช้เวลาในการแช่ 24 ชั่วโมง และนำมาตกตะกอนโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัว Anti-Solvent ด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ อุณหภูมิ 25, 35 และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

45 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 3 6 และ 9 มิลลิลิตรต่อนาที งานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบการทดลองโดยใช้โปรแกรม MINITAB version 15 เลือกการออกแบบการทดลองที่เรียกว่า บ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken) โดยสภาวะการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ บ็อกซ์-เบห์นเคน แสดงตามตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สภาวะการทดลองที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยเทคนิค GAS

การทดลองที่	อุณหภูมิ	อัตราการไหล	ตัวทำละลายอินทรีย์
	(^{o}C)	(ml/min)	(% เอทานอล)
1	45	6	100
2	35	9	100
3	35	3	100
4	25	6	100
5	45	9	50
6	45	3	50
7	35	6	50
8	35	6	50
9	35	6	50
10	25	9	50
11	25	3	50
12	45	6	0
13	35	9	0
14	35	3	0
15	25	6	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยเครื่อง HPLC

6.1 การเตรียม Mobile Phase ในการวิเคราะห์

Mobile Phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์มี 2 ชนิดคือ อะซิโตไนไตรล์ และน้ำ DI

6.1.1 นำอะซิโตรไนไตรล์ และน้ำ DI ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ไปกรองด้วยชุดกรอง Mobile phase โดยใช้กระดาษกรองชนิด Nylon ขนาด 0.45 µm แล้วนำมาบรรจุไว้ในขวด Duran

6.1.2 นำอะซิโตไนไตรล์ และน้ำ DI ที่ผ่านการกรองแล้ว มาทำการกำจัดอากาศด้วยเครื่องล้างความถี่สูง เวลา 30 นาที

6.2 การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่ได้จากการสกัด

6.2.1 เตรียมสารมาตรฐาน 4 ชนิดคือ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งน้ำหนักสารแต่ละชนิดมาอย่างละ 5 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร อย่างละขวด และปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้เป็น 25 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5, 10, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6.2.2 นำสารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กรองด้วยตัวกรอง (Syringe Filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC หลังจากนั้นนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด มาทำเป็นกราฟของสารมาตรฐาน (Calibration Curve) โดยการเทียบพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

6.2.3 นำสารสกัดที่ได้จากกระบวนการ GAS ที่สภาวะต่าง ๆ มาทำการกรองด้วยตัวกรอง (Syringe Filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เช่นกันและนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเครื่อง HPLC

6.2.4 คำนวณหาความเข้มข้นมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก ในสารสกัดตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟจากกราฟมาตรฐานของสารทั้ง 4 ชนิด และเปรียบเทียบเวลาในการชะ (Retention Time) กับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การทดสอบฤทธิ์การต้านการออกซิเดชัน

7.1 การทดสอบการต้านการออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

7.1.1 เตรียมสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งน้ำหนักสาร Trolox 0.0025 กรัมลงใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้เป็น 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำ DI ให้มีความเข้มข้น 0.015, 0.03, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.1.2 เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.04 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่งน้ำหนักสาร DPPH 0.0016 กรัม ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้เป็น 100 มิลลิลิตร

7.1.3 นำสารสกัดที่ได้จากกระบวนการ GAS และจากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มาทำการเจือจางด้วยน้ำ DI โดยเจือจางที่ 60 120 และ 180 เท่า สำหรับสารสกัดที่ได้จากกระบวนการ GAS และเจือจาง 720 และ 960 เท่าสำหรับสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

7.1.4 นำสารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสารสกัดที่เจือจางแล้วมาอย่างละ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง แล้วทำการเติมสารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีก่อนการนำไปตรวจสอบ

7.1.5 สารละลายที่ได้จะต้องมีสีม่วงอ่อน ถ้าสารละลายที่ได้สีออกน้ำตาลม่วงแสดงว่าสารสกัดมีความเข้มข้นมากเกินไปต้องนำสารสกัดนั้นไปเจือจางเพิ่มด้วยน้ำ DI

7.1.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer

7.1.7 คำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสมการที่ 17

$$\text{DPPH Radical Scavenging Activity (\%)} = \left[\frac{\text{Absorbance control} - \text{Absorbance Sample}}{\text{Absorbance control}}\right] \times 100 \qquad (17)$$

หมายเหตุ - Absorbance Control คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

- Absorbance Sample คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ผสมกับสารละลาย Trolox หรือสารสกัดที่เจือจางแล้ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.1.8 วิเคราะห์ปริมาณ Trolox เทียบเท่าของสารสกัดและสารที่ตกตะกอนได้ โดยนำเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระที่คำนวณได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7.2 การทดสอบการต้านการออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging Assay

7.2.1 เตรียมสารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธีการเตรียมเดียวกันกับวิธี DPPH Assay

7.2.2 เตรียมสารละลาย ABTS (2,2-azion-bis-3-ethylbenzothiazo line-6-sulphonic acid) ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ โดยทำการชั่งสาร ABTS 0.0384 กรัม ลงใน Volumetric Flask 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้เป็น 10 มิลลิลิตร

7.2.3 เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium Persulfate) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ โดยทำการชั่งสารโพแทสเซียสเปอร์ซัลเฟต 0.0166 กรัม ลงใน Volumetric Flask 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

7.2.4 ผสมสารละลาย ABTS และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตในอัตราส่วน 8:12 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ในที่มืดและเย็นเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อเปลี่ยน ABTS เป็น $ABTS^{+}$

7.2.5 เจือจางสารละลาย $ABTS^{+}$ ด้วยเอทานอลอัตราส่วนประมาณ 3:100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.70 ± 0.02 ก่อนการใช้งานทุกครั้ง

7.2.6 นำสารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสารสกัดที่เจือจางแล้วมาอย่างละ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง แล้วทำการเติมสารละลายเจือจาง $ABTS^{+}$ 6 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

7.2.7 คำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากสมการที่18 และวิเคราะห์ปริมาณ Trolox เทียบเท่าของสารสกัดที่ได้กับกราฟมาตรฐาน

ABTS Radical Scavenging Activity (%)

$$= \left[\frac{\text{Absorbance control} - \text{Absorbance Sample}}{\text{Absorbance control}}\right] \times 100 \qquad (18)$$

หมายเหตุ - Absorbance Control คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- Absorbance Sample คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่ผสมกับสารละลาย Trolox หรือสารสกัดที่เจือจางแล้ว

8. หาปริมาณสารฟีนอลิก ด้วยวิธี Total Phenolic Compounds Content

8.1 เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิคความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งน้ำหนักสาร แกลลิค 0.0025 กรัมลงใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้เป็น 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำ DI ให้มีความเข้มข้น 0.015, 0.03, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8.2 เตรียมสารละลายเจือจาง 10 เท่าของ Folin Reagent (Folin Reagent 1 ส่วนต่อน้ำ DI 9 ส่วน) โดยการตวง Folin Reagent 15 มิลลิลิตรผสมกับน้ำ DI 135 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย Folin 150 มิลลิลิตร

8.3 เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 % (w/v) โดยการชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ลงใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

8.4 นำสารละลายกรดแกลลิคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสารสกัดที่เจือจางแล้วมาอย่างละ 2.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง แล้วทำการเติมสารละลายเจือจาง 10 เท่าของ Folin Reagent 2.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันสีที่ได้จะเป็นสีเหลือง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 มิลลิลิตรลงไปผสมให้เข้ากันสีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าอ่อน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการนำไปตรวจสอบ

8.5 ตัวควบคุมใช้น้ำ DI 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเจือจาง 10 เท่าของ Folin Reagent และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต โดยเตรียมเหมือนข้อ 8.4 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

8.6 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง (คำนวณจาก Absorbance Sample – Absorbance Control) กับความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิค และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากสารสกัดบัวบกด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent (GAS) โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากผงใบบัวบกด้วยวิธีการแช่ (Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเลือกใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ ตัวทำละลายเอทานอลผสมเมทานอล ซึ่งมีเอทานอลผสมอยู่ 0, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร ขั้นตอนที่สอง นำสารสกัดที่ได้มาตกตะกอนโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัวต้านการละลาย (Anti-Solvent) ด้วยกระบวนการ GAS โดยทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญ ได้แก่ ชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ อุณหภูมิ และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญเพื่อให้ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญมากที่สุด งานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MINITAB 15 ซึ่งผู้วิจัยเลือกการออกแบบที่เรียกว่า Box-Behnken ได้สภาวะที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง และมีการจำลองสมการทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมกับข้อมูลการทดลอง

โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ 4 ชนิด ได้แก่ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก ด้วยเครื่อง HPLC นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังได้ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay และวิธี ABTS Radical Scavenging Assay และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Total Phenolic Compounds Content

1. ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญจากการสกัดผงบัวบกด้วยวิธีการแช่ด้วยเอทานอล

การสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยวิธีการแช่ด้วยเอทานอลเวลา 24 ชั่วโมง จะแช่ซ้ำจำนวน 4 รอบ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ได้ทั้งหมดต่อปริมาณผงใบบัวบก 1 กรัม จากการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสามารถสกัดสารมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก โดยปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่สกัดได้ทั้งหมดต่อน้ำหนักผงบัวบก 1 กรัม แสดงดังตารางที่ 13

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญจากการสกัดผงบัวบกด้วยวิธีการแช่ด้วยเอทานอล

การแช่ครั้งที่	มาเดคาสโซไซด์ µg/g	อะเซียติโคไซด์ µg/g	กรดมาเดคาสสิก µg/g	กรดอะเซียติก µg/g
1	6,068±275	3,288±77	3,101±157	1,714±25
2	2,410±263	1,156±152	832±32	389±25
3	1,433±194	657±100	347±58	169±29
4	877±138	349±69	185±68	758±13
รวม	10,788±254	5,450±88	4,465±237	2,346±29
% ปริมาณสารจากการแช่ครั้งที่ 1 ต่อปริมาณสารที่ได้ทั้งหมด	56.25	60.33	69.45	73.06

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

จากตารางที่ 13 พบว่า การแช่ผงใบบัวบกด้วยเอทานอลสามารถสกัดสารมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติกได้ปริมาณ 10,788±254 5,450±88 4,465±237 และ 2,346±29 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมผงใบบัวบก ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการแช่ในรอบแรกสามารถสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิดออกมาได้ปริมาณมากเมื่อเทียบกับการแช่ครั้งที่ 2 3 และ 4 โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ปริมาณสารจากการแช่ครั้งที่ 1 ต่อปริมาณสารที่ได้ทั้งหมดประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นการลดเวลาและขั้นตอนในการทำการทดลอง งานวิจัยนี้จึงนำสารสกัดที่ได้จากการแช่ครั้งที่ 1 มาใช้สำหรับการทดลองการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญ เนื่องจากการแช่ครั้งแรกได้ปริมาณสารออกมามากและราคาของวัตถุดิบไม่แพง

2. การตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากสารสกัดบัวบกด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent

ในการศึกษาการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากสารสกัดบัวบกด้วยกระบวนการ GAS ก่อนเริ่มกระบวนการจะทำการแช่ผงบัวบกด้วยตัวทำละลายเอทานอลผสมเมทานอล ซึ่งมีเอทา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอลผสมอยู่ 0, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ปริมาณผงบัวบก 5 กรัมต่อตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร) นำสารสกัดที่ได้มาตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS วิเคราะห์ปริมาณของสารออกฤทธิ์สำคัญที่ได้ด้วยเทคนิค HPLC โดยแสดงปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ตกตะกอนได้ในหน่วยไมโครกรัมต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญจากการตกตะกอนสารสกัดบัวบกด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร)

ลำดับ	สภาวะการทดลอง			มาเดคาสโซไซด์ µg	อะเซียติโคไซด์ µg	กรดมาเดคาสิก µg	กรดอะเซียติก µg
	% เอทานอล	T (°C)	FlowRate (ml/min)				
1	100	45	6	2,479±180	1,093±12	1,742±481	644±199
2	100	25	6	2,786±213	1,242±123	1,969±665	779±307
3	100	35	3	3,179±707	1,375±324	1,822±585	727±275
4	100	35	9	3,636±261	1,522±31	1,028±310	342±154
5	50	45	3	4,936±546	2,491±293	1,689±535	577±273
6	50	25	3	5,472±697	2,732±415	2,066±572	810±278
7	50	25	9	4,892±711	2,442±374	1,975±646	746±199
8	50	45	9	5,064±946	2,457±438	2,049±572	739±194
9	50	35	6	4,916±486	2,462±252	2,213±789	878±158
10	50	35	6	4,942±510	2,516±333	1,872±839	794±325
11	50	35	6	4,975±868	2,475±439	1,917±840	781±403
12	0	45	6	5,116±776	2,585±418	1,385±620	418±292
13	0	35	3	4,491±579	2,251±360	2,015±368	730±172
14	0	35	9	5,235±713	2,642±361	1,932±832	713±364
15	0	25	6	5,828±374	2,926±93	1,699±263	588±81

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 14 การตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากสารสกัดบัวบกด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent พบว่าสภาวะการทดลองที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอลผสม 0 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 6 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถตกตะกอนสารมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์ออกมาปริมาณมากที่สุด คือ 5,828±374 และ 2,926±93 ไมโครกรัม ตามลำดับ ส่วนที่สภาวะการทดลองที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอลผสม 50 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 6 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถตกตะกอนสารกรดมาเดคาสิกและกรดอะเซียติกออกมาปริมาณมากที่สุด คือ 2,213±789 และ 878±158 ไมโครกรัม ตามลำดับ

3. การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken และวิเคราะห์ผลด้วยพื้นที่การตอบสนอง ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตอบสนอง โดยใช้วิธีการวิเคราะห์การถดถอยเพื่อหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยที่ทำการศึกษา ซึ่งการวิเคราะห์การถดถอยมีแบบจำลองอยู่ทั้งหมด 4 แบบ คือ แบบ Linear แบบ Linear+Square แบบ Linear+Interaction และแบบ Full Quadratic โดยในงานวิจัยนี้ศึกษาหาแบบจำลองที่เหมาะสมต่อตัวแปรตอบสนอง 4 ตัวแปรคือ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสิก และกรดอะเซียติก และกำหนดตัวแปรอิสระ 3 ตัวแปร ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ (ในหน่วยของเปอร์เซ็นต์ของเอทานอล) อุณหภูมิ และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งแต่ละปัจจัยของตัวแปรอิสระแบ่งเป็น 3 ระดับ ดังนี้

- ชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ (เอทานอลผสมเมทานอล ซึ่งมีเอทานอลผสมอยู่ 0, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร)
- อุณหภูมิ (25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส)
- อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ (3, 6 และ 9 มิลลิลิตรต่อนาที)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1 มาเดคาสโซไซด์

เมื่อพิจารณาแบบจำลองทั้ง 4 แบบ โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว (R^2 (adj)) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) ของแต่ละแบบจำลอง เพื่อทำการเปรียบเทียบกันและเลือกแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับสารมาเดคาสโซไซด์ เพื่อให้สามารถอธิบายผลการทดลองได้ดีที่สุด แสดงตามตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ค่าความคลาดเคลื่อนและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วของแต่ละแบบจำลอง สำหรับสารมาเดคาสโซไซด์

แบบจำลอง	R^2 (%)	R^2 (adj) (%)	SE
Linear	52.49	49.01	794.417
Linear+Square	70.73	66.11	647.688
Linear+Interaction	53.52	46.18	816.173
Full Quadratic	71.76	64.50	662.878

หลักในการเลือกแบบจำลองที่ดีและเหมาะสมนั้น การเลือกจะต้องเลือกแบบจำลองที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) สูง มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว (R^2 (adj)) ใกล้เคียงกับค่า R^2 และมีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) น้อย จากตารางที่ 15 พบว่าแบบจำลอง Linear+Square นั้นมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ค่อนข้างสูงคือ 70.73 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว 66.11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า R^2 และนอกจากนี้ยังมีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานที่น้อยที่สุด คือ 647.688 จึงทำให้แบบจำลอง Linear+Square เป็นแบบจำลองที่มีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นตัวแทนแบบจำลอง เพื่อใช้อธิบายผลของตัวแปรอิสระต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณสารมาเดคาสโซไซด์

เมื่อทำการหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปรอิสระ (X_i) โดยใช้วิธี Response Surface Regression จากโปรแกรม MINITAB 15 ซึ่งกำหนดให้ระดับของแต่ละปัจจัยเป็นตัวแปรแบบ Uncoded Variable ได้ผลลัพธ์แสดงดังตารางที่ 16

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 16 ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของสารมาเดคาสโซไซด์

Term	Symbol	Coef	SE Coef	P
Constant	-	6,356.31	2,500.23	0.015
Solvent	S	15.50	8.22	0.067
Flow rate	F	-122.15	263.19	0.645
Temp	T	-39.24	136.86	0.776
Solvent*Solvent	SS	-0.37	0.08	0.000
Flow rate*Flow rate	FF	12.78	21.62	0.558
Temp*Temp	TT	0.31	1.95	0.873

หมายเหตุ R^2 = 70.73 % R^2 (adj) = 66.11 % SE = 647.688

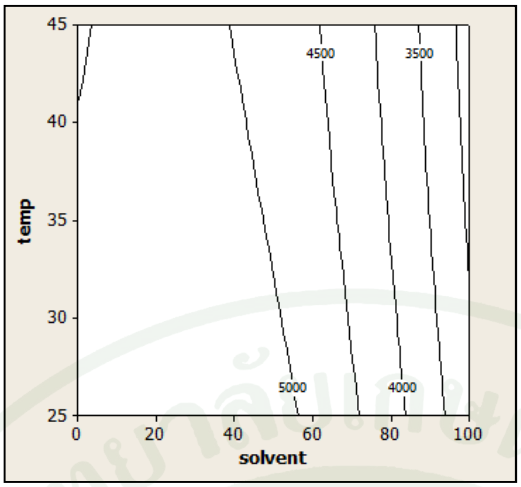
จากตารางที่ 16 สามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารมาเดคาสโซไซด์กับตัวแปรอิสระ (ตัวทำละลายอินทรีย์ อุณหภูมิ และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์) ตามแบบจำลองแบบ Linear+Square ได้ตามสมการที่ 19

ปริมาณของมาเดคาสโซไซด์ = 6,356.31+15.50S-122.15F-39.24T-0.37SS
+12.78FF+0.31TT (19)

แบบจำลองแบบ Linear+Square สามารถนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารมาเดคาสโซไซด์กับตัวแปรอิสระ (ตัวทำละลายอินทรีย์ อุณหภูมิ และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์) แสดงดังภาพที่ 21

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

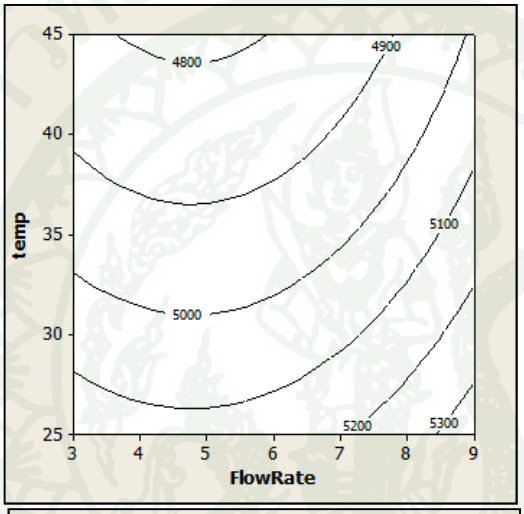
(ก)



Hold Values

Flow Rate 6 ml/min

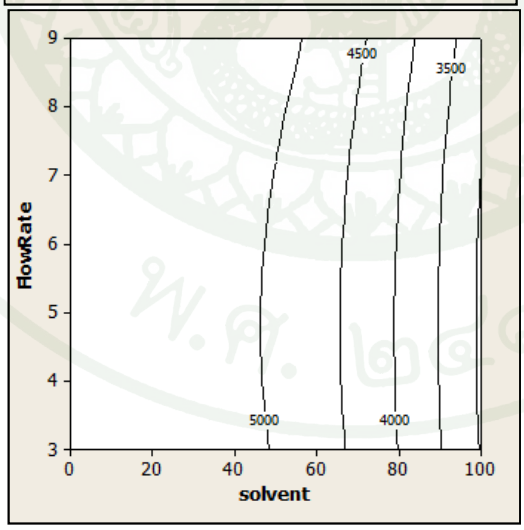
(ข)



Hold Values

Solvent 50% of Ethanol

(ค)



Hold Values

Temperature 35 °C

ภาพที่ 21 Contour Plots แสดงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณมาเดคาสโซไซด์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากกราฟโครงร่าง (Contour Plot) ของปริมาณสารมาเดคาสโซไซด์ภาพที่ 21(ก) พบว่าปริมาณของมาเดคาสโซไซด์มีปริมาณลดลง เมื่อทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้มาเดคาสโซไซด์ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากขึ้น จึงทำให้สารตกตะกอนออกมาช้า ปริมาณสารที่ได้จึงลดลง ยกตัวอย่างเช่น ที่ตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณสารที่ได้จะมีค่ามากกว่า 5,000 ไมโครกรัม แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 45 องศาเซลเซียส ปริมาณที่ได้จะน้อยลงต่ำกว่า 5,000 ไมโครกรัม

จากภาพที่ 21(ข) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์จาก 3 เป็น 5 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณของมาเดคาสโซไซด์ที่ได้มีปริมาณลดลง เช่น ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเพิ่มอัตราการไหลจาก 3 เป็น 5 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณของมาเดคาสโซไซด์มีปริมาณลดลงจาก 5,000 เหลือ 4,970 ไมโครกรัม ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามที่อุณหภูมิเดียวกันเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์จาก 5 เป็น 9 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าปริมาณของมาเดคาสโซไซด์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 4,970 เป็น 5,200 ไมโครกรัม ตามลำดับ เนื่องจากการเพิ่มอัตราการไหลทำให้เกิดการตกตะกอนของสารได้เร็ว ปริมาณที่ได้จึงมีปริมาณมาก

จากภาพที่ 21(ค) พบว่าปริมาณของมาเดคาสโซไซด์มีปริมาณลดลง เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีส่วนผสมของเอทานอลเพิ่มขึ้น เนื่องจากโครงสร้างของมาเดคาสโซไซด์ประกอบด้วยวงเบนซีน 5 วงที่มีหมู่ไฮดรอกซิลและมีโมเลกุลของน้ำตาลที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระหลายหมู่เป็นองค์ประกอบ จึงทำให้มาเดคาสโซไซด์เป็นสารประกอบไตรเทอร์ปีนที่มีขั้วสูง จึงละลายในเมทานอลได้ดีกว่าในเอทานอล ส่งผลให้ในกระบวนการตกตะกอนสามารถตกตะกอนสารมาเดคาสโซไซด์ออกมาได้น้อยลงเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรย์ที่มีเปอร์เซนต์เอทานอลสูง ตัวอย่างเช่น ที่อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 6 มิลลิลิตรต่อนาที การการเพิ่มอัตราส่วนของเอทานอลจาก 50 เป็น 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณมาเดคาสโซไซด์ลดลงจาก 5,000 เป็น 3,500 ไมโครกรัม ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงค่า P พบว่าค่า P ของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ในเทอม Linear (S) และ เทอม Square (SS) มีค่าน้อยสุดเมื่อเทียบกับค่า P ของปัจจัยอื่น แสดงให้เห็นว่าชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อปริมาณของมาเดคาสโซไซด์มากที่สุด เมื่อนำสมการแบบจำลองของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณสารมาเดคาสโซไซด์ (สมการที่ 19) มาคำนวณหาค่ามาเดคาสโซไซด์ที่สภาวะต่าง ๆ และนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง แสดงตามตารางที่ 17

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบปริมาณสารมาเดคาสโซไซด์ที่ได้จากการทดลองกับปริมาณสารมาเดคาสโซไซด์ที่ได้จากแบบจำลองแบบ Linear+Square (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร)

การทดลองที่	สภาวะการทดลอง			มาเดคาสโซไซด์ (µg)		% ความแตกต่าง
	% เอทานอล	T (^{o}C)	Flow Rate (ml/min)	ผลการทดลอง	แบบจำลอง	
1	100	45	6	2,479±180	2,795.44	12.76
2	100	25	6	2,786±213	3,146.24	12.93
3	100	35	3	3,179±707	2,961.23	6.85
4	100	35	9	3,636±261	3,148.49	13.41
5	50	45	3	4,936±546	4,816.83	2.41
6	50	25	3	5,472±697	5,167.63	5.56
7	50	25	9	4,892±711	5,354.89	9.46
8	50	45	9	5,064±946	5,004.09	1.18
9	50	35	6	4,916±486	4,939.84	0.48
10	50	35	6	4,942±510	4,939.84	0.04
11	50	35	6	4,975±868	4,939.84	0.71
12	0	45	6	5,116±776	4,945.44	3.33
13	0	35	3	4,491±579	5,111.23	13.81
14	0	35	9	5,235±713	5,298.49	1.21
15	0	25	6	5,828±374	5,296.24	9.12
สภาวะที่เหมาะสม	21.21	25	9	5,733±537	5,667.19	1.15

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 17 พบว่าปริมาณของมาเดคาสโซไซด์ที่ได้จากการทดลองกับที่ได้จากแบบจำลองมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 6.22 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างที่น้อย คือ 1.15 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งปริมาณของมาเดคาสโซไซด์ที่ได้จากการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมมีค่าที่สูง คือ 5,733±537 ไมโครกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองในสมการที่ 1 สามารถนำไปใช้ได้จริง

3.2 อะเซียติโคไซด์

เมื่อพิจารณาแบบจำลองทั้ง 4 แบบ โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว (R^2 (adj)) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) ของแต่ละแบบจำลอง เพื่อทำการเปรียบเทียบกันและเลือกแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับสารอะเซียติโคไซด์ เพื่อให้สามารถอธิบายผลการทดลองได้ดีที่สุด แสดงตามตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ค่าความคลาดเคลื่อนและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วของแต่ละแบบจำลอง สำหรับสารอะเซียติโคไซด์

แบบจำลอง	R^2 (%)	R^2 (adj) (%)	SE
Linear	57.79	54.71	427.009
Linear+Square	77.44	73.88	324.294
Linear+Interaction	58.48	51.92	439.933
Full Quadratic	78.12	72.50	332.741

จากตารางที่ 18 พบว่าแบบจำลอง Linear+Square นั้นมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ค่อนข้างสูงคือ 77.44 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว 73.88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า R^2 และนอกจากนี้ยังมีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานที่น้อยที่สุด คือ 324.294 จึงทำให้แบบจำลอง Linear+Square เป็นแบบจำลองที่มีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นตัวแทนแบบจำลอง เพื่อใช้อธิบายผลของตัวแปรอิสระต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณสารอะเซียติโคไซด์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อทำการหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปรอิสระ (X_i) โดยใช้วิธี Response Surface Regression จากโปรแกรม MINITAB 15 ซึ่งกำหนดให้ระดับของแต่ละปัจจัยเป็นตัวแปรแบบ Uncoded Variable ได้ผลลัพธ์แสดงดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของสารอะเซียติโคไซด์

Term	Symbol	Coef	SE Coef	P
Constant	-	3,273.75	1,251.85	0.013
Solvent	S	9.19	4.12	0.031
Flow rate	F	-12.67	131.78	0.924
Temp	T	-30.20	68.53	0.662
Solvent*Solvent	SS	-0.22	0.04	0.000
Flow rate*Flow rate	FF	1.80	10.83	0.869
Temp*Temp	TT	0.30	0.97	0.757

หมายเหตุ R^2 = 77.44 % R^2 (adj) = 73.88 % SE = 324.294

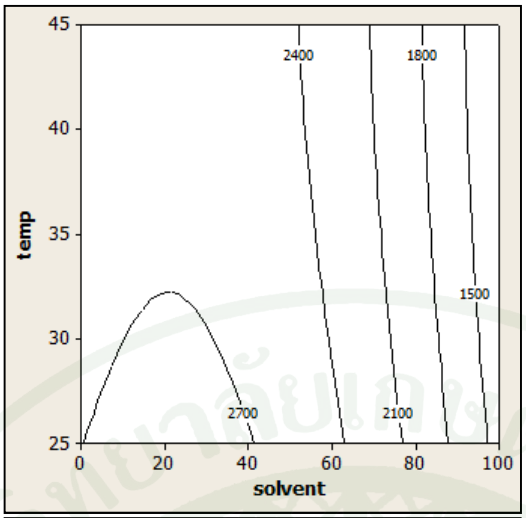
จากตารางที่ 19 สามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารอะเซียติโคไซด์กับตัวแปรอิสระต่าง ๆ ตามแบบจำลองแบบ Linear+Square ได้ตามสมการที่ 20

ปริมาณของอะเซียติโคไซด์ = 3,273.75+9.19S-12.67F-30.20T-0.22SS+1.8FF+0.3TT (20)

จากแบบจำลองสามารถนำไปสร้างกราฟโครงร่างแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารอะเซียติโคไซด์กับตัวแปรอิสระต่าง ๆ ของแบบจำลองแบบ Linear+Square แสดงดังภาพที่ 22

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

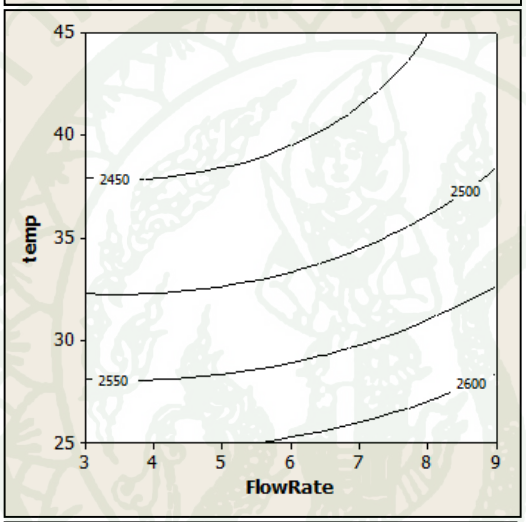
(ก)



Hold Values

Flow Rate 6 ml/min

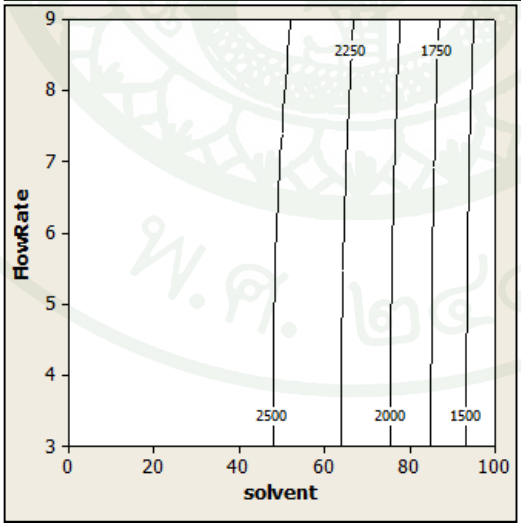
(ข)



Hold Values

Solvent 50% of Ethanol

(ค)



Hold Values

Temperature 35 °C

ภาพที่ 22 Contour Plots แสดงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณอะเซียติโคไซด์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากกราฟโครงร่างของปริมาณสารอะเซียติโคไซด์ภาพที่ 22(ก) พบว่าการใช้ชนิดตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของเอทานอลผสมอยู่มาก เมื่อทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูงขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณของอะเซียติโคไซด์มีปริมาณลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้อะเซียติโคไซด์ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากขึ้น จึงทำให้สารตกตะกอนออกมาช้า ปริมาณสารที่ได้จึงลดลง ตัวอย่างเช่น ที่ตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณสารที่ได้จะมีค่า1,800 ไมโครกรัม แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 45 องศาเซลเซียส ปริมาณที่ได้จะลดลงเหลือ 1,500 ไมโครกรัม ในขณะที่ทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ และใช้ชนิดตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของเอทานอลผสมอยู่น้อย ปริมาณของอะเซียติโคไซด์ที่ได้มีปริมาณสูง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ ส่งผลให้อะเซียติโคไซด์ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้น้อยลง จึงทำให้สารตกตะกอนออกมาเร็ว ปริมาณสารที่ได้จึงมาก เช่น เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผสมเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณของอะเซียติโคไซด์ที่ได้จะมีค่ามากกว่า 2,700 ไมโครกรัม

จากภาพที่ 22(ข) พบว่าการเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์และทำการทดลองที่อุณหภูมิต่ำ ส่งผลให้ระบบสามารถตกตะกอนสารอะเซียติโคไซด์ออกมาได้เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการเพิ่มอัตราการไหลทำให้เกิดการตกตะกอนของสารได้เร็วขึ้น ปริมาณที่ได้จึงมีปริมาณมาก เช่น ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส การเพิ่มอัตราการไหลจาก 3 เป็น 9 มิลลิลิตรต่อนาที ส่งผลให้ปริมาณอะเซียติโคไซด์มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 2,550 เป็น 2,600 ไมโครกรัม ตามลำดับ

จากภาพที่ 22(ค) พบว่าปริมาณของอะเซียติโคไซด์มีปริมาณลดลง เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีส่วนผสมของเอทานอลเพิ่มขึ้น เนื่องจากอะเซียติโคไซด์เป็นสารประกอบไตรเทอร์ปีนที่มีขั้วสูงเช่นเดียวกับมาเดคาสโซไซด์ จึงละลายได้ดีในเมทานอลมากกว่าในเอทานอล ส่งผลให้ในกระบวนการตกตะกอนสามารถตกตะกอนสารอะเซียติกโคไซด์ออกมาได้น้อยลง เช่น ที่อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 6 มิลลิลิตรต่อนาที การเพิ่มอัตราส่วนของเอทานอลจาก 50 เป็น 90 เปอร์เซนต์ พบว่าปริมาณอะเซียติโคไซด์ลดลงจาก 2,500 เป็น 1,500 ไมโครกรัม ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงค่า P พบว่าค่า P ของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ในเทอม Linear (S) และ เทอม Square (SS) มีค่าต่ำกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าชนิดตัวทำละลายอินทรีย์เป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อปริมาณอะเซียติโคไซด์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสมการแบบจำลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของปริมาณสารอะเซียติโคไซด์ (สมการที่ 20) มาคำนวณหาค่าอะเซียติโคไซด์ ที่สภาวะต่าง ๆ และนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง แสดงตามตารางที่ 20

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบปริมาณสารอะเซียติโคไซด์ที่ได้จากการทดลองกับปริมาณสารอะเซียติโคไซด์ที่ได้จากแบบจำลองแบบ Linear+Square (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร)

การทดลองที่	สภาวะการทดลอง			อะเซียติโคไซด์(µg)		% ความแตกต่าง
	% เอทานอล	T (^{o}C)	Flow Rate (ml/min)	ผลการทดลอง	แบบจำลอง	
1	100	45	6	1,093±12	1,230.03	12.54
2	100	25	6	1,242±123	1,414.03	13.85
3	100	35	3	1,375±324	1,281.44	6.80
4	100	35	9	1,522±31	1,335.02	12.29
5	50	45	3	2,491±293	2,409.94	3.25
6	50	25	3	2,732±415	2,593.94	5.05
7	50	25	9	2,442±374	2,647.52	8.42
8	50	45	9	2,457±438	2,463.52	0.27
9	50	35	6	2,462±252	2,482.53	0.83
10	50	35	6	2,516±333	2,482.53	1.33
11	50	35	6	2,475±439	2,482.53	0.30
12	0	45	6	2,585±418	2,511.03	2.86
13	0	35	3	2,251±360	2,562.44	13.84
14	0	35	9	2,642±361	2,616.02	0.98
15	0	25	6	2,926±93	2,695.03	7.89
สภาวะที่เหมาะสม	21.21	25	9	2,948±249	2,833.97	3.87

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 20 พบว่าปริมาณของอะเซียติโคไซด์ที่ได้จากการทดลองกับที่ได้จากแบบจำลองมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 6.03 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างที่น้อย คือ 3.87 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งปริมาณของอะเซียติโคไซด์ที่ได้จากการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมมีค่าที่สูง คือ 2,948±249 ไมโครกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองในสมการที่ 20 สามารถนำไปใช้ได้จริง

3.3 กรดมาเดคาสสิก

เมื่อพิจารณาแบบจำลองทั้ง 4 แบบ โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว (R^2 (adj)) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) ของแต่ละแบบจำลอง เพื่อทำการเปรียบเทียบกันและเลือกแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับกรดมาเดคาสสิกเพื่อให้สามารถอธิบายผลการทดลองได้ดีที่สุด แสดงตามตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ค่าความคลาดเคลื่อนและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วของแต่ละแบบจำลอง สำหรับกรดมาเดคาสสิก

แบบจำลอง	R^2 (%)	R^2 (adj) (%)	SE
Linear	3.21	0	600.122
Linear+Square	8.65	0	605.584
Linear+Interaction	6.73	0	611.908
Full Quadratic	12.18	0	618.712

จากตารางที่ 21 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว (R^2 (adj)) ของทุกแบบจำลองมีค่าเท่ากับศูนย์ จึงเลือกแบบจำลองแบบ Linear เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ที่ใกล้เคียงกับค่า R^2 (adj) มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่ามีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานที่น้อยที่สุด คือ 600.122 จึงทำให้แบบจำลอง Linear เป็นแบบจำลองที่มีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นตัวแทนแบบจำลอง เพื่อใช้อธิบายผลของตัวแปรอิสระต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณกรดมาเดคาสสิก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อทำการหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปรอิสระ (X_i) โดยใช้วิธี Response Surface Regression จากโปรแกรม MINITAB 15 ซึ่งกำหนดให้ระดับของแต่ละปัจจัยเป็นตัวแปรแบบ Uncoded Variable ได้ผลลัพธ์แสดงดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของกรดมาเดคาสสิก

Term	Symbol	Coef	SE Coef	P
Constant	-	2,405.66	516.583	0.000
Solvent	S	-1.17	2.45	0.634
Flow rate	F	-25.35	40.833	0.538
Temp	T	-10.57	12.25	0.393

หมายเหตุ R^2 = 3.21 % R^2 (adj) = 0 % SE = 600.122

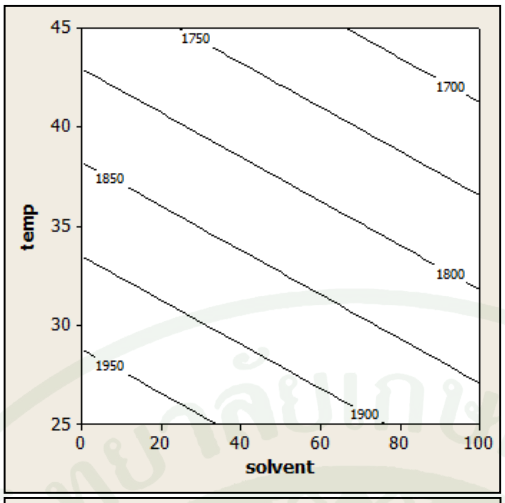
จากตารางที่ 22 สามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของกรดมาเดคาสสิกกับตัวแปรอิสระต่าง ๆ ตามแบบจำลองแบบ Linear ได้ตามสมการที่ 21

ปริมาณของกรดมาเดคาสสิก = 2,405.66-1.17S-25.35F-10.57T (21)

จากแบบจำลองสามารถนำไปสร้างกราฟโครงร่างแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของกรดมาเดคาสสิกกับตัวแปรอิสระต่าง ๆ ของแบบจำลองแบบ Linear แสดงดังภาพที่ 23

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

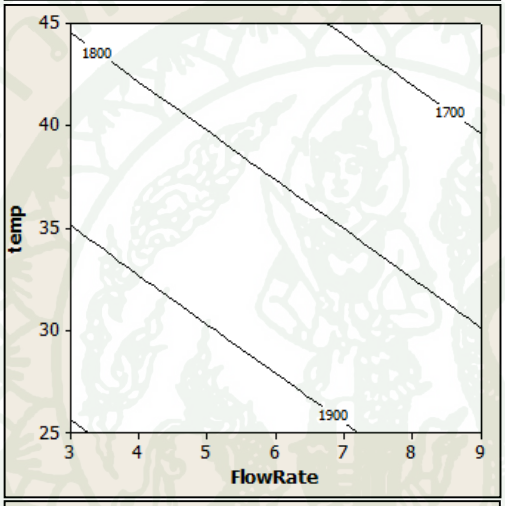
(ก)



Hold Values

Flow Rate 6 ml/min

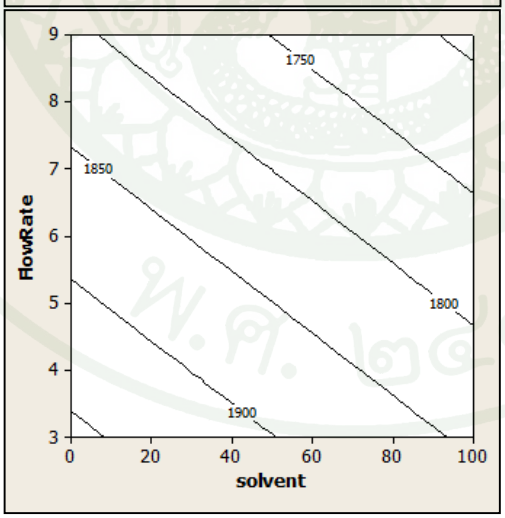
(ข)



Hold Values

Solvent 50% of Ethanol

(ค)



Hold Values

Temperature 35 °C

ภาพที่ 23 Contour Plots แสดงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณกรดมาเดคาสสิก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากกราฟโครงร่างของปริมาณกรดมาเดคาสสิกภาพที่ 23(ก) พบว่าการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ และใช้ชนิดตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของเอทานอลผสมอยู่น้อย สามารถตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายที่ผสมเอทานอลอยู่มากและทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูง เนื่องการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้กรดมาเดคาสสิกละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากขึ้น จึงทำให้สารตกตะกอนออกมาช้า ปริมาณสารที่ได้จึงได้น้อยลง เช่น ตัวทำละลายที่มีเอทานอลผสมอยู่ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจาก 25 เป็น 45 องศาเซลเซียส ปริมาณสารอะเซียติโคไซด์ที่ได้มีปริมาณลดลงจาก 1,960 เหลือ 1,750 ไมโครกรัม ตามลำดับ

จากภาพที่ 23(ข) พบว่าการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ และการลดอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์และทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากการลดอัตราการไหลทำให้ระบบมีเวลาในการเข้าสู่สมดุลนานขึ้น ทำให้เกิดการตกตะกอนของสารออกมาได้มากขึ้น เช่น ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 3 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกได้ปริมาณ 2,000 ไมโครกรัมซึ่งมากกว่า การตกตะกอนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 9 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งได้ปริมาณสาร 1,750 ไมโครกรัม

จากภาพที่ 23(ค) พบว่าการลดอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์และใช้ชนิดตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของเอทานอลผสมอยู่น้อย สามารถตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์และใช้ชนิดตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของเอทานอลผสมอยู่มาก เนื่องจากโครงสร้างของกรดมาเดคาสสิกประกอบด้วยวงเบนซีน 5 วง มีหมู่ไฮดรอกซิลที่แสดงความเป็นขั้ว จึงทำให้กรดมาเดคาสสิกเป็นสารประกอบไตรเทอร์ปีนที่มีขั้วแต่มีความเป็นขั้วน้อยกว่าสารกลุ่มไกลโคไซด์ จึงละลายในเมทานอลได้ดีกว่าในเอทานอล ส่งผลให้ในกระบวนการตกตะกอนสามารถตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกออกมาได้มากขึ้น เช่น ที่ อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 3 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกได้ปริมาณมากที่สุด

เมื่อพิจารณาถึงค่า P พบว่าค่า P ของแต่ละปัจจัย ไม่มีปัจจัยไหนที่ต่ำกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าปัจจัยแต่ละปัจจัยไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณกรดมาเดคาสสิก นอกจากนี้พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของแต่ละตัวแปรมีค่าเป็นลบ ดังนั้นการเพิ่มเปอร์เซ็นต์เอทานอล อุณหภูมิหรืออัตรา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้ได้ปริมาณของกรดมาเดคาสสิกน้อยลง เมื่อนำสมการแบบจำลองของปริมาณกรดมาเดคาสสิก (สมการที่ 21) มาคำนวณหาค่ากรดมาเดคาสสิกที่สภาวะต่าง ๆ และนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง แสดงตามตารางที่ 23

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบปริมาณกรดมาเดคาสสิกที่ได้จากการทดลองกับปริมาณกรดมาเดคาสสิกที่ ได้จากแบบจำลองแบบ Linear (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร)

การทดลองที่	สภาวะการทดลอง			กรดมาเดคาสสิก (µg)		% ความแตกต่าง
	% เอทานอล	T (^{o}C)	Flow Rate (ml/min)	ผลการทดลอง	แบบจำลอง	
1	100	45	6	1,742±481	1,660.91	4.65
2	100	25	6	1,969±665	1,872.31	4.91
3	100	35	3	1,822±585	1,842.66	1.13
4	100	35	9	1,028±310	1,690.56	64.45
5	50	45	3	1,689±535	1,795.46	6.30
6	50	25	3	2,066±572	2,006.86	2.86
7	50	25	9	1,975±646	1,854.76	6.09
8	50	45	9	2,049±572	1,643.36	19.80
9	50	35	6	2,213±789	1,825.11	17.53
10	50	35	6	1,872±839	1,825.11	2.50
11	50	35	6	1,917±840	1,825.11	4.79
12	0	45	6	1,385±620	1,777.91	28.37
13	0	35	3	2,015±368	1,959.66	2.75
14	0	35	9	1,932±832	1,807.56	6.44
15	0	25	6	1,699±263	1,989.31	17.09
สภาวะที่เหมาะสม	0	25	3	1,678±163	2,065.36	23.08

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 23 พบว่าปริมาณของกรดมาเดคาสสิกที่ได้จากการทดลองกับที่ได้จากแบบจำลองมีความแตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 12.64 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากบางสภาวะการทดลอง สามารถตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกออกมาได้น้อย (เช่น การทดลองที่ 4) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากพืชอาจได้ปริมาณสารที่ไม่แน่นอน จึงส่งผลให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างมีค่าที่สูงมากถึง 64.45 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกได้ ซึ่งสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของแบบจำลองแบบ Linear เท่ากับ 3.21 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมสามารถตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกออกมาได้ปริมาณ 1,678±163 ไมโครกรัม เมื่อเทียบกับปริมาณกรดมาเดคาสสิกที่ได้จากแบบจำลองมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 23.08 เปอร์เซ็นต์

3.4 กรดอะเซียติก

เมื่อพิจารณาแบบจำลองทั้ง 4 แบบ โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว (R^2 (adj)) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) ของแต่ละแบบจำลอง เพื่อทำการเปรียบเทียบกันและเลือกแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับกรดอะเซียติกเพื่อให้สามารถอธิบายผลการทดลองได้ดีที่สุด แสดงตามตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ค่าความคลาดเคลื่อนและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วของแต่ละแบบจำลอง สำหรับกรดอะเซียติก

แบบจำลอง	R^2 (%)	R^2 (adj) (%)	SE
Linear	5.02	0	260.760
Linear+Square	14.66	1.18	256.749
Linear+Interaction	9.82	0	263.928
Full Quadratic	19.45	0	259.897

จากตารางที่ 24 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว (R^2 (adj)) ของทุกแบบจำลองมีค่าเท่ากับศูนย์ ยกเว้นแบบจำลองแบบ Linear+Square มีค่า R^2 (adj) เท่ากับ 1.18

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 14.66 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานที่น้อยที่สุด คือ 256.749 จึงทำให้แบบจำลอง Linear+Square เป็นแบบจำลองที่มีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นตัวแทนแบบจำลอง เพื่อใช้อธิบายผลของตัวแปรอิสระต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณกรดอะเซียติก

เมื่อทำการหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปรอิสระ (X_i) โดยใช้วิธี Response Surface Regression จากโปรแกรม MINITAB 15 ซึ่งกำหนดให้ระดับของแต่ละปัจจัยเป็นตัวแปรแบบ Uncoded Variable ได้ผลลัพธ์แสดงดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ค่าสัมปะสิทธิ์ถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของกรดอะเซียติก

Term	Symbol	Coef	SE Coef	P
Constant	-	83.8025	991.113	0.933
Solvent	S	6.1163	3.259	0.068
Flow rate	F	39.8435	104.331	0.705
Temp	T	35.2157	54.254	0.520
Solvent*Solvent	SS	-0.0601	0.031	0.059
Flow rate*Flow rate	FF	-4.3807	8.571	0.612
Temp*Temp	TT	-0.6005	0.771	0.441

หมายเหตุ R^2 = 14.66 % R^2 (adj) = 1.18 % SE = 256.749

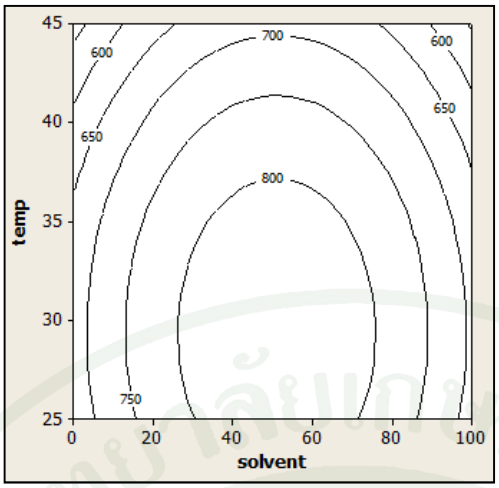
จากตารางที่ 25 สามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของกรดอะเซียติกกับตัวแปรอิสระต่าง ๆ ตามแบบจำลองแบบ Linear+Square ได้ตามสมการที่ 22

ปริมาณของกรดอะเซียติก= 83.8025+6.1163S+39.8435F+35.2157T
-0.0601SS-4.3807FF-0.6005TT (22)

จากแบบจำลองสามารถนำไปสร้างกราฟโครงร่างแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของกรดอะเซียติกกับตัวแปรอิสระต่าง ๆ ของแบบจำลองแบบ Linear+Square แสดงดังภาพที่ 24

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

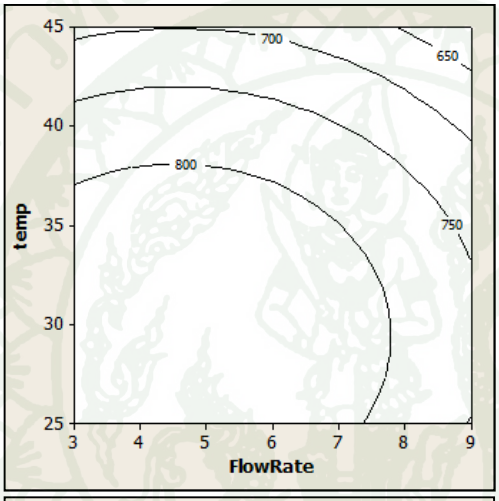
(ก)



Hold Values

Flowrate 6 ml/min

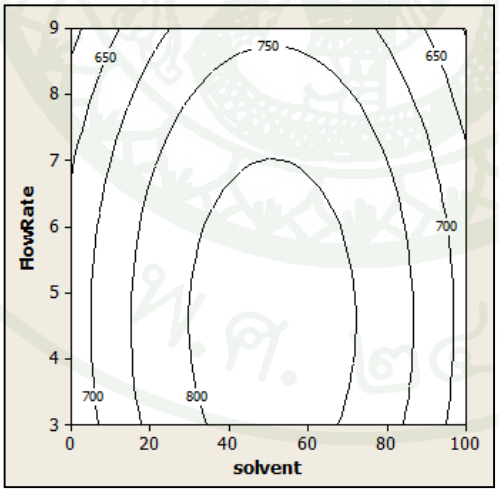
(ข)



Hold Values

Solvent 50% of Ethanol

(ค)



Hold Values

Temperature 35 °C

ภาพที่ 24 Contour Plots แสดงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณกรดอะเซียติก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากกราฟโครงร่างของปริมาณกรดอะเซียติกภาพที่ 24(ก) พบว่าการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียสและใช้ตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของเอทานอลผสมอยู่ประมาณ 30-70 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนกรดอะเซียติกได้มากประมาณ 800 ไมโครกรัม แต่การใช้ตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของเอทานอลน้อยหรือมากจนเกินไป ทำให้ปริมาณสารที่ได้มีค่าน้อยลง และนอกจากนี้ยังพบอีกว่าที่เปอร์เซ็นต์เอทานอลในตัวทำละลายอินทรีย์ใด ๆ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิส่งผลให้ปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้มีค่าน้อยลง เช่น ที่ตัวทำละลายที่ผสมเอทานอลอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 35 เป็น 45 องศาเซลเซียส ปริมาณสารที่ได้มีค่าลดลงจาก 800 เป็น 700 ไมโครกรัม เนื่องจากการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้กรดอะเซียติก ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากขึ้น จึงทำให้สารตกตะกอนออกมาช้า ปริมาณสารที่ได้จึงได้น้อยลง

จากภาพที่ 24(ข) พบว่าการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ สามารถตกตะกอนกรดอะเซียติกได้มาก เช่นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียสและอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำกว่า 7 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถตกตะกอนกรดอะเซียติกได้ในปริมาณมาก ประมาณ 800 ไมโครกรัม เมื่อเทียบกับการใช้อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์สูงและทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูง พบว่าจะได้ปริมาณกรดอะเซียติกออกมาน้อยกว่า เนื่องจากการลดอัตราการไหลทำให้ระบบมีเวลาในการเข้าสู่สมดุลนานขึ้น ทำให้เกิดการตกตะกอนของสารออกมาได้มาก

จากภาพที่ 24(ค) พบว่าการตกตะกอนที่อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำกว่า 6.5 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของเอทานอลผสมอยู่ประมาณ 30-70 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนกรดอะเซียติกได้มากประมาณ 800 ไมโครกรัม แต่การใช้ตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของเอทานอลน้อยหรือมากจนเกินไป ทำให้ปริมาณสารที่ได้มีค่าน้อยลง เนื่องจากกรดอะเซียติกเป็นสารประกอบไตรเทอร์ปีนที่มีขั้วอยู่เล็กน้อยเช่นเดียวกับกรดมาเดคาสสิก จึงละลายได้ดีในตัวทำละลายผสมซึ่งมีค่าความเป็นขั้วกลาง ๆ ส่งผลให้ในกระบวนการตกตะกอนสามารถตกตะกอนกรดอะเซียติกออกมาได้มากขึ้น

เมื่อพิจารณาถึงค่า P พบว่าค่า P ของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์มีค่าน้อยสุดเมื่อเทียบกับค่า P ของปัจจัยอื่น แสดงให้เห็นว่าชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อปริมาณของกรดอะเซียติกมากที่สุด เมื่อนำสมการแบบจำลองของปริมาณกรดอะเซียติก (สมการที่ 22) มาคำนวณหาค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรดอะเซียติกที่สภาวะต่าง ๆ และนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง แสดงตามตารางที่ 26

ตารางที่ 26 เปรียบเทียบปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากการทดลองกับปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากแบบจำลองแบบ Linear+Square (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร)

การทดลองที่	สภาวะการทดลอง			กรดอะเซียติก (µg)		% ความแตกต่าง
	% เอทานอล	T (^{o}C)	Flow Rate (ml/min)	ผลการทดลอง	แบบจำลอง	
1	100	45	6	644±199	544.482	15.45
2	100	25	6	779±307	680.868	12.60
3	100	35	3	727±275	671.474	7.64
4	100	35	9	342±154	595.124	74.01
5	50	45	3	577±273	688.166	19.27
6	50	25	3	810±278	824.552	1.80
7	50	25	9	746±199	748.202	0.30
8	50	45	9	739±194	611.816	17.21
9	50	35	6	878±158	817.66	6.87
10	50	35	6	794±325	817.66	2.98
11	50	35	6	781±403	817.66	4.69
12	0	45	6	418±292	533.852	27.72
13	0	35	3	730±172	660.844	9.47
14	0	35	9	713±364	584.494	18.02
15	0	25	6	588±81	670.238	13.99
สภาวะที่เหมาะสม	50.50	29.24	4.576	436±17	846.29	94.10

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 26 พบว่าปริมาณของกรดอะเซียติกที่ได้จากการทดลองกับที่ได้จากแบบจำลองมีความแตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 15.47 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากบางสภาวะการทดลอง สามารถตกตะกอนกรดอะเซียติกออกมาได้น้อยกว่าแบบจำลองมาก จึงส่งผลให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างมีค่าที่สูงมากถึง 74.01 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการตกตะกอนกรดอะเซียติกได้ ซึ่งสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของแบบจำลองแบบ Linear+Square เท่ากับ 14.66 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมสามารถตกตะกอนกรดอะเซียติกออกมาได้ปริมาณ 436±17 ไมโครกรัม เมื่อเทียบกับปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากแบบจำลองมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 94.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าแตกต่างกันมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกรดอะเซียติกที่ตกตะกอนออกมาได้มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสารกลุ่มไกลโคไซด์ ความแตกต่างของปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญเพียงเล็กน้อย จึงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างมีค่ามาก ซึ่งทำให้แบบจำลองที่ได้จากสมการที่ 22 ไม่สามารถนำไปใช้ได้จริง

3.5 สารไตรเทอร์ปีนรวม

เมื่อพิจารณาแบบจำลองทั้ง 4 แบบ โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว (R^2 (adj)) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) ของแต่ละแบบจำลอง เพื่อทำการเปรียบเทียบกันและเลือกแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับสารไตรเทอร์ปีนรวม (รวม 4 ชนิด คือมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก) เพื่อให้สามารถอธิบายผลการทดลองได้ดีที่สุด แสดงตามตารางที่ 27

ตารางที่ 27 ค่าความคลาดเคลื่อนและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วของแต่ละแบบจำลอง สำหรับสารไตรเทอร์ปีนรวม

แบบจำลอง	R^2 (%)	R^2 (adj) (%)	SE
Linear	52.29	48.80	1,335.63
Linear+Square	78.75	75.39	925.877
Linear+Interaction	55.11	48.03	1,345.62
Full Quadratic	81.58	76.84	898.279

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 27 พบว่าแบบจำลอง Linear+Square นั้นมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ค่อนข้างสูงคือ 78.75 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว 75.39 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า R^2 และนอกจากนี้ยังมีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานที่น้อย คือ 925.877 จึงทำให้แบบจำลอง Linear+Square เป็นแบบจำลองที่มีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นตัวแทนแบบจำลอง เพื่อใช้อธิบายผลของตัวแปรอิสระต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวม

เมื่อทำการหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปรอิสระ (X_i) โดยใช้วิธี Response Surface Regression จากโปรแกรม MINITAB 15 ซึ่งกำหนดให้ระดับของแต่ละปัจจัยเป็นตัวแปรแบบ Uncoded Variable ได้ผลลัพธ์แสดงดังตารางที่ 28

ตารางที่ 28 ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวม

Term	Symbol	Coef	SE Coef	P
Constant	-	11,575.3	3,574.11	0.002
Solvent	S	40.5	11.75	0.001
Flow rate	F	-80.7	376.23	0.831
Temp	T	-26.0	195.65	0.895
Solvent*Solvent	SS	-0.8	0.11	0.000
Flow rate*Flow rate	FF	6.9	30.91	0.825
Temp*Temp	TT	-0.2	2.78	0.929

หมายเหตุ R^2 = 78.75 % R^2 (adj) = 75.39 % SE = 925.877

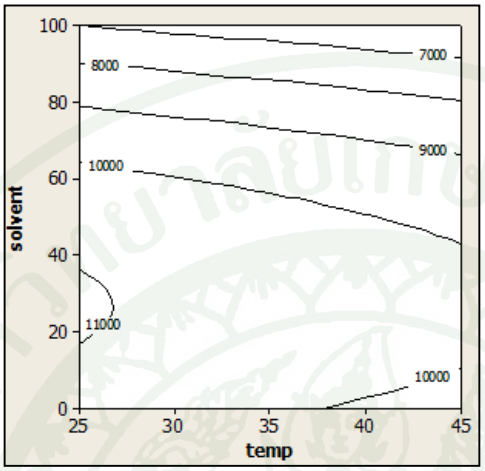
จากตารางที่ 28 สามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวมกับตัวแปรอิสระต่าง ๆ ตามแบบจำลองแบบ Linear+Square ได้ตามสมการที่ 23

ปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวม = 11,575.3+40.5S-80.7F-26.0T-0.8SS+
6.9FF-0.2TT (23)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากแบบจำลองสามารถนำไปสร้างกราฟโครงร่างแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวมกับตัวแปรอิสระต่าง ๆ ของแบบจำลองแบบ Linear+Square แสดงดังภาพที่ 25

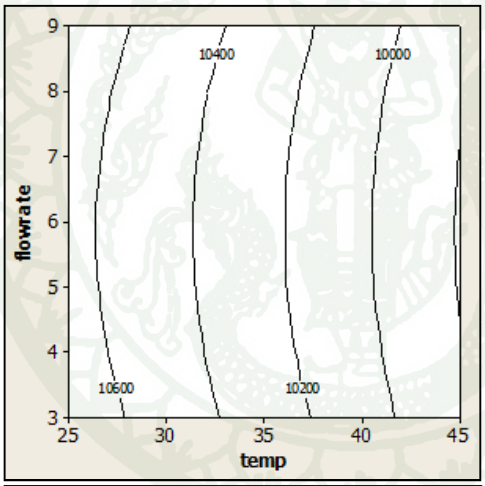
(ก)



Hold Values

Flow Rate 6 ml/min

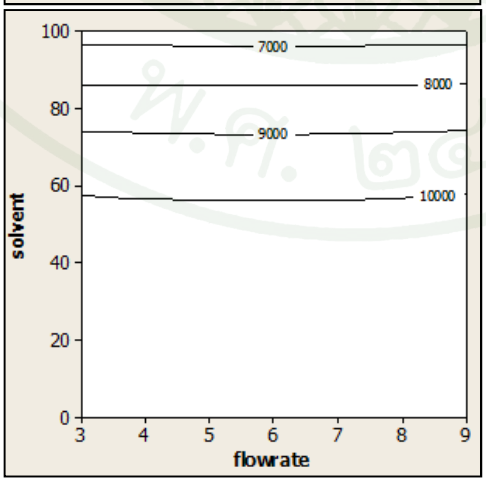
(ข)



Hold Values

Solvent 50% of Ethanol

(ค)



Hold Values

Temperature 35 °C

ภาพที่ 25 Contour Plots แสดงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากกราฟโครงร่างของปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมภาพที่ 25(ก) พบว่าการใช้ชนิดตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของเอทานอลผสมอยู่มาก เมื่อทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูงขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวมมีปริมาณลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการตกตะกอนที่อุณหภูมิสูงส่งผลให้สารออกฤทธิ์สำคัญบางชนิด เช่น มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์และกรดมาเดคาสสิก ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากขึ้น จึงทำให้สารตกตะกอนออกมาช้า ปริมาณสารรวมที่ได้จึงลดลง ตัวอย่างเช่น ที่ตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณสารที่ได้จะมีค่า 8,000 ไมโครกรัม แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 45 องศาเซลเซียส ปริมาณที่ได้จะลดลงเหลือ 7,000 ไมโครกรัม ในขณะที่ทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำและใช้ชนิดตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของเอทานอลผสมอยู่น้อย ปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ได้มีปริมาณสูง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ ส่งผลให้สารออกฤทธิ์สำคัญละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้น้อยลง จึงทำให้สารตกตะกอนออกมาเร็ว ปริมาณสารที่ได้จึงมาก เช่น เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผสมเอทานอล 25 เปอร์เซ็นต์ ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ได้จะมีค่ามากกว่า 11,000 ไมโครกรัม

จากภาพที่ 25(ข) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์จาก 3 เป็น 6 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ได้มีปริมาณลดลง เช่น ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเพิ่มอัตราการไหลจาก 3 เป็น 6 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวมมีปริมาณลดลงจาก 10,400 เหลือ 10,350 ไมโครกรัม ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามที่อุณหภูมิเดียวกันเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์จาก 6 เป็น 9 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวมมีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 10,350 เป็น 10,400 ไมโครกรัม ตามลำดับ เนื่องจากการเพิ่มอัตราการไหลทำให้เกิดการตกตะกอนของสารได้เร็ว ปริมาณที่ได้จึงมีปริมาณมาก

จากภาพที่ 25(ค) พบว่าปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนรวมมีปริมาณลดลง เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีส่วนผสมของเอทานอลเพิ่มขึ้น เนื่องจากโครงสร้างของสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนประกอบด้วยวงเบนซีน 5 วง ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบ จึงทำให้สารไตรเทอร์ปีนเป็นสารที่มีขั้ว จึงละลายในเมทานอลได้ดีกว่าในเอทานอล ส่งผลให้ในกระบวนการตกตะกอนสามารถตกตะกอนสารไตรเทอร์ปีนรวมออกมาได้น้อยลง ตัวอย่างเช่น ที่อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 6 มิลลิลิตรต่อนาที การเพิ่มอัตราส่วนของเอทานอลจาก 55 เป็น 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมลดลงจาก 10,000 เป็น 7,500 ไมโครกรัม ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้ยังพบอีกว่าภาพ Contour Plots ทั้ง 3 ภาพของสารไตรเทอร์ปีนรวม มีลักษณะของกราฟคล้ายกับกราฟโครงร่างของปริมาณมาเดคาสโซไซด์ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณมาเดคาสโซไซด์มีปริมาณสารมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิด จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อกราฟโครงร่างของสารไตรเทอร์ปีนรวมมากกว่าสารออกฤทธิ์ชนิดอื่น

เมื่อพิจารณาถึงค่า P พบว่าค่า P ของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ในเทอม Linear (S) และ เทอม Square (SS) มีค่าต่ำกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าชนิดตัวทำละลายอินทรีย์เป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสมการแบบจำลองของปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวม (สมการที่ 23) มาคำนวณหาค่าสารไตรเทอร์ปีนรวมที่สภาวะต่าง ๆ และนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง แสดงตามตารางที่ 29

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 29 เปรียบเทียบปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ได้จากการทดลองกับปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ได้จากแบบจำลองแบบ Linear+Square (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร)

การทดลองที่	สภาวะการทดลอง			สารไตรเทอร์ปีนรวม(µg)		% ความแตกต่าง
	% เอทานอล	T (^{o}C)	Flow Rate (ml/min)	ผลการทดลอง	แบบจำลอง	
1	100	45	6	5,958±871	5,814.2	2.41
2	100	25	6	6,777±740	6,614.2	2.40
3	100	35	3	7,103±172	6,290	11.45
4	100	35	9	6,527±242	6,302.6	3.44
5	50	45	3	9,693±164	9,845	1.57
6	50	25	3	11,080±375	10,645	3.93
7	50	25	9	10,055±1245	10,657.6	5.99
8	50	45	9	10,308±871	9,857.6	4.37
9	50	35	6	10,469±1288	10,209.2	2.48
10	50	35	6	10,124±846	10,209.2	0.84
11	50	35	6	10,148±1875	10,209.2	0.60
12	0	45	6	9,504±1495	9,764.2	2.74
13	0	35	3	9,487±508	10,240	7.94
14	0	35	9	10,521±963	10,252.6	2.55
15	0	25	6	11,040±120	10,564.2	4.31
สภาวะที่เหมาะสม	26.26	25	9	11,653±1,000	11,144.46	4.36

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

จากตารางที่ 29 พบว่าปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ได้จากการทดลองกับที่ได้จากแบบจำลองมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 3.80 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างที่น้อย คือ 4.36 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยมีปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ได้จากการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมมีค่าที่สูง คือ 11,653±1,000 ไมโครกรัม นอกจากนี้ยังพบอีกว่าปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมขึ้นกับปริมาณของมาเดคาสโซไซด์เป็นสำคัญ เนื่องจากปริมาณมาเดคาสโซไซด์เป็นปริมาณสารที่พบมากที่สุดในการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS เมื่อเทียบกับสารออกฤทธิ์สำคัญชนิดอื่น โดยพบว่ามีมาเดคาสโซไซด์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของสารไตรเทอร์ปีนรวม

จากรูป Contour Plot ทั้งหมดแสดงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ ได้แก่ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก พบว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีเปอร์เซ็นต์เอทานอลน้อย (มีปริมาณเมทานอลสูง) สามารถตกตะกอนสารมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์และกรดมาเดคาสสิก ได้ปริมาณที่สูงกว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีเปอร์เซ็นต์เอทานอลสูง เนื่องจากสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 3 ชนิดเป็นสารประกอบไตรเทอร์ปีนที่มีขั้ว จึงละลายในเมทานอลได้ดีกว่าเอทานอล ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของนฤมล (2551) ที่ศึกษาผลของชนิดตัวทำละลาย (80% เมทานอล และ 80% เอทานอล) ที่ใช้สกัดสารประกอบไตรเทอร์ปีนในบัวบก พบว่าการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญโดยใช้เมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสารประกอบไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด คือ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก สูงกว่าการสกัดโดยใช้เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีเปอร์เซ็นต์เอทานอลในระดับกลาง ๆ สามารถตกตะกอนกรดอะเซียติกได้มากที่สุด เนื่องจากกรดอะเซียติกมีความเป็นขั้วต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสาร 3 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้น โดยพิจารณาจากจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลที่มีน้อยที่สุด จึงทำให้กรดอะเซียติกละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วกลาง ๆ

ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิทำให้ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ตกตะกอนได้มีปริมาณลดลง เนื่องจากเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการละลายของสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกในตัวทำละลายผสม (ตัวทำละลายอินทรีย์ผสมกับคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะใกล้จุดวิกฤต) เพิ่มขึ้น และนอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ ยังส่งผลให้ความหนาแน่นของคาร์บอนไดออกไซด์ลดลงด้วย ส่งผลให้การอิ่มตัวของสารละลายผสมเกิดช้า ปริมาณของสารออกฤทธิ์สำคัญที่ได้จึงมีปริมาณน้อย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวุฒิชัย (2549) ที่ได้ศึกษาสารสกัดแอนโดรกราโฟไลด์ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในฟ้าทลายโจร ด้วยกระบวนการ GAS โดยศึกษาผลของอุณหภูมิ ชนิดของตัวทำละลาย และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจาก 35 เป็น 40 และ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ เมทานอล เอทา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอล และอะซีโตน เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เปอร์เซ็นต์สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ตกตะกอนได้มีแนวโน้มลดลง นอกจากนี้การเพิ่มอุณหภูมิยังส่งผลต่อการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์สำคัญ ซึ่งจากงานวิจัยของ Niamnuy *et al.* (2013) ที่ได้ทำการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของบัวบกด้วยวิธีการอบแห้งที่แตกต่างกัน พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิส่งผลต่อปริมาณสารกลุ่มไกลโคไซด์ (มาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์) ซึ่งทำให้สารกลุ่มไกลโคไซด์เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส แตกตัวเป็นสารประกอบกลุ่มอะไกลโคนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กได้ นอกจากนี้ He *et al.* (2006) ซึ่งศึกษาปริมาณสารไตรเทอร์ปีนที่สกัดจากแบลคโคฮอช (Cimicifuga Racemosa หรือ Black Cohosh) พบว่าเมื่อให้ความร้อนกับสารสกัดจากแบลคโคฮอชที่ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าปริมาณสารไตรเทอร์ปีนลดลง และเกิดการเปลี่ยนรูปจากสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ เป็นสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน

ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ พบว่าการลดอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ลง สามารถตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกและกรดอะเซียติกได้มาก เนื่องจากการลดอัตราการไหลทำให้ระบบมีเวลาในการเข้าสู่สมดุลนานขึ้น ทำให้เกิดการตกตะกอนของกรดทั้ง 2 ชนิดออกมาได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวุฒิชัย (2549) ที่ได้ศึกษาสารสกัดแอนโดรกราโฟไลด์ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในฟ้าทลายโจร ด้วยกระบวนการ GAS โดยศึกษาผลของอุณหภูมิ ชนิดของตัวทำละลาย และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ พบว่าเมื่อทำการลดอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ จาก 15 เป็น 10 และ 5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสและใช้เมทานอล เอทานอล อะซีโตนและไดเมทิลฟอร์มาไมด์ เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า เปอร์เซ็นต์สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ตกตะกอนได้มีแนวโน้มสูงขึ้น ในทางตรงกันข้าม การลดอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถตกตะกอนอะเซียติโคไซด์ได้น้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากการลดอัตราการไหลทำให้เกิดการอิ่มตัวของสารละลายลดลง จึงเกิดการตกตะกอนของอะเซียติโคไซด์ได้น้อย ปริมาณสารที่ได้จึงมีปริมาณน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวุฒิชัย (2549) เมื่อลดอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์จาก 5 เป็น 3 และ 1 มิลลิลิตรต่อนาทีพบว่าเปอร์เซ็นต์การตกตะกอนแอนโดรกราโฟไลด์ที่ได้มีแนวโน้มลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์จาก 3 เป็น 5 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณของมาเดคาสโซไซด์ที่ได้มีปริมาณน้อยลง แต่เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์จาก 5 เป็น 9 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าปริมาณของมาเดคาสโซไซด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาสมโดยใช้โปรแกรม MINITAB

การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม MINITAB 15 เป็นการนำเอาค่า Desirability Functions มาใช้ในการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งการใช้โปรแกรม MINITAB 15 มีสิ่งที่ต้องกำหนดดังนี้

4.1 ค่าขอบเขตบน (Upper Limit) ของปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ

ค่าขอบเขตบนเป็นค่าที่มากที่สุดของปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ตกตะกอนได้จากสภาวะการทดลองต่าง ๆ ซึ่งการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม MINITAB 15 เมื่อต้องการทำ Maximize ไม่จำเป็นต้องกำหนดขอบบน

4.2 ค่าเป้าหมาย (Target) ของปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ต้องการ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกทั้ง 4 ชนิด คือ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก และปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวม ซึ่งผู้วิจัยได้กำหนดค่าเป้าหมายให้มีค่ามากกว่าปริมาณสารสูงสุดของสารแต่ละชนิดที่ตกตะกอนได้ โดยกำหนดค่าเป้าหมายของมาเดคาสโซไซด์เท่ากับ 6,000 ไมโครกรัม ค่าเป้าหมายของอะเซียติโคไซด์เท่ากับ 3,000 ไมโครกรัม ค่าเป้าหมายของกรดมาเดคาสสิกเท่ากับ 2,500 ไมโครกรัม ค่าเป้าหมายของกรดอะเซียติกเท่ากับ 900 ไมโครกรัม และค่าเป้าหมายของสารไตรเทอร์ปีนรวมเท่ากับ 11,000 ไมโครกรัม

4.3 ค่าขอบเขตล่าง (Lower Limit) ของปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ

ค่าขอบเขตล่างเป็นค่าที่น้อยที่สุดของปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ตกตะกอนได้ โดยผู้วิจัยได้กำหนดค่าขอบเขตล่างของมาเดคาสโซไซด์เท่ากับ 2,274 ไมโครกรัม ค่าขอบเขตล่างของอะเซียติโคไซด์เท่ากับ 1,079 ไมโครกรัม ค่าขอบเขตล่างของกรดมาเดคาสสิกเท่ากับ 821 ไมโครกรัม ค่าขอบเขตล่างของกรดอะเซียติกเท่ากับ 172 ไมโครกรัม และค่าขอบเขตล่างของสารไตรเทอร์ปีนรวมเท่ากับ 4,967 ไมโครกรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

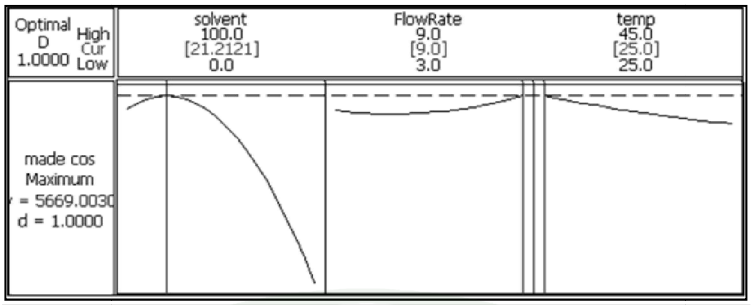
4.4 ค่า Weight

ค่า Weight เป็นตัวกำหนดรูปแบบของ Desirability ถ้าค่า Desirability (d) มีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าสภาวะที่เหมาะสมที่โปรแกรมคำนวณได้มีความน่าเชื่อถือมาก

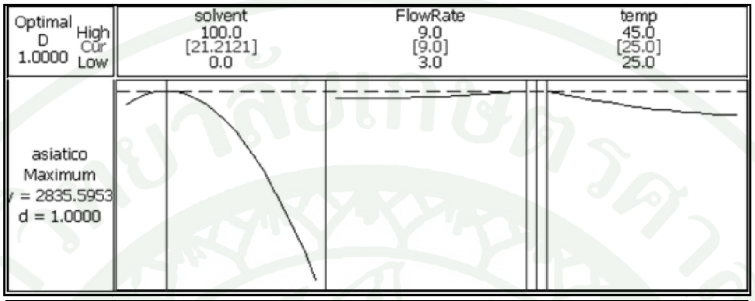
เมื่อกำหนดค่าดังกล่าวข้างต้นทั้งหมดแล้ว โปรแกรม MINITAB 15 สามารถประมวลผลสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิดด้วยกระบวนการ GAS แสดงดังภาพที่ 26 นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิดระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากแบบจำลองของแต่ละสภาวะที่เหมาะสม โดยแสดงดังตารางที่ 30

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

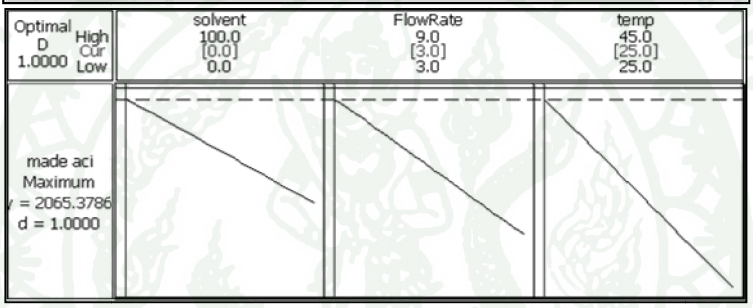
(ก)



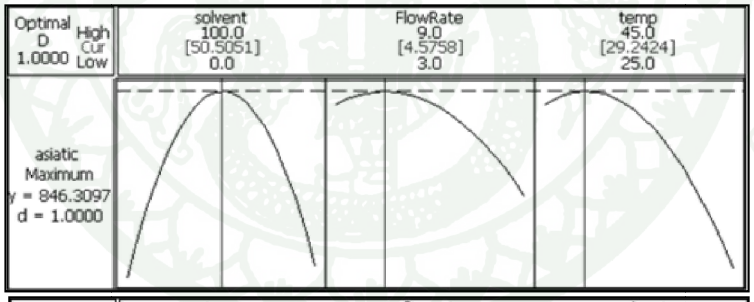
(ข)



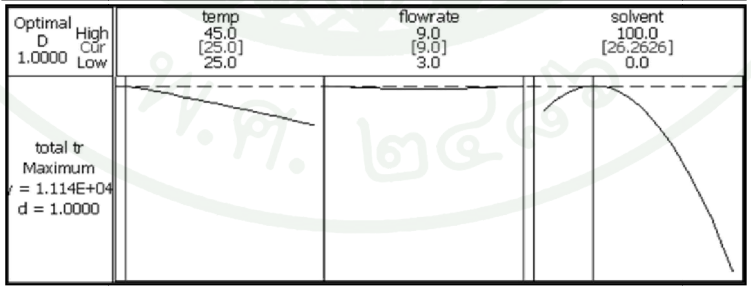
(ค)



(ง)



(จ)



ภาพที่ 26 สภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิด คือ (ก) มาเดคาสโซไซด์ (ข) อะเซียติโคไซด์ (ค) กรดมาเดคาสสิก (ง) กรดอะเซียติก และ (จ) สารไตรเทอร์ปีนรวม ด้วยกระบวนการ GAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 30 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทั้ง 4 ชนิดที่สภาวะการทดลองที่เหมาะสม

ลำ	มาเดคาสโซไซด์			อะเซียติโคไซด์			กรดมาเดคาสสิก			กรดอะเซียติก			สารออกฤทธิ์ทั้งหมด		
ดับ	ทดลอง	จำลอง	%	ทดลอง	จำลอง	%	ทดลอง	จำลอง	%	ทดลอง	จำลอง	%	ทดลอง	จำลอง	%
O1	5,733±537	5,667.19	1.15	2,948±249	2,833.97	3.87	1,560±204	-	-	631±123	-	-	10,873±789	-	-
O2	5,915±173	-	-	3,002±79	-	-	1,678±163	2,065.36	23.08	516±57	-	-	11,111±468	-	-
O3	5,956±323	-	-	3,027±195	-	-	1,435±99	-	-	436±17	846.29	94.1	10,854±590	-	-
O4	6145±306	-	-	3131±196	-	-	1897±409	-	-	480±102	-	-	11,653±1,000	11,144.46	4.36

หมายเหตุ ลำดับที่ O1 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์ (S=21.21, F=9, T=25)

ลำดับที่ O2 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิก (S=0, F=3, T=25)

ลำดับที่ O3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก (S=50.5, F=4.576, T=29.24)

ลำดับที่ O4 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของสารไตรเทอร์ปีนรวม (S=26.26, F=9, T=25)

S คือ เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของเอทานอลที่ใช้ในตัวทำละลายผสม

F คือ อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ หน่วยมิลลิลิตรต่อนาที

T คือ อุณหภูมิของระบบที่ใช้ในการตกตะกอน หน่วยองศาเซลเซียส

% คือ เปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง

ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิด แสดงในหน่วยไมโครกรัมต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 30 พบว่าที่สภาวะที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์ (ลำดับที่ O1) และสภาวะที่เหมาะสมของสารไตรเทอร์ปีนรวม (ลำดับที่ O4) มีปริมาณของมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ และสารไตรเทอร์ปีนรวมที่ได้จากการทดลองกับที่ได้จากแบบจำลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 1.15, 3.87 และ 4.36 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับแบบจำลองแบบ Linear+Square ที่มีค่า R^2 สูง มีค่า R^2(adj) ใกล้เคียงกับ ค่า R^2 และมีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) ที่น้อย ทำให้ได้แบบจำลองที่มีความคลาดเคลื่อนน้อยและสามารถนำสมการแบบจำลองของสารแต่ละชนิดไปใช้คำนวณปริมาณสารได้จริง ส่วนสภาวะที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิก (ลำดับที่ O2) มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 23.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างที่มีค่าระดับปานกลาง ทั้งนี้เป็นเพราะการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากพืชอาจได้ปริมาณสารที่ไม่แน่นอน และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของแบบจำลองแบบ Linear ของกรดมาเดคาสสิกเท่ากับ 3.21 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ค่อนข้างต่ำ จึงทำให้เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างมีค่าต่างกันปานกลาง สำหรับสภาวะที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก (ลำดับที่ O3) มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 94.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างที่มีค่าสูง ทั้งนี้เป็นเพราะกรดอะเซียติกที่ตกตะกอนได้มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับสารออกฤทธิ์ชนิดอื่น ดังนั้นความแตกต่างของปริมาณสารเพียงเล็กน้อย จึงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างที่ได้มีค่ามาก นอกจากนี้ยังมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของแบบจำลองแบบ Linear+Square ของกรดอะเซียติกเท่ากับ 14.66 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ค่อนข้างต่ำ จึงทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนที่แตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตาม การตกตะกอนของสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิดที่สภาวะการทดลองที่เหมาะสมนี้ไม่ได้เป็นค่าที่สูงที่สุด ยังมีการทดลองบางการทดลองที่มีค่าสูงกว่าเล็กน้อย

5. การเปรียบเทียบสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์กับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS

ผลการทดลองส่วนนี้เป็นการเปรียบเทียบปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์กับปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS เท่านั้น เนื่องจากราคาของสารมาตรฐานกรดอะเซียติกมีราคาถูกกว่าสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด (มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์และกรดมาเดคาสสิก) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสามารถสร้างกราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในตัวทำละลายเอทานอล เมทานอลและตัวทำละลายผสม จึงทำให้ทราบปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดได้ โดยแสดงผลการเปรียบเทียบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรดอะเซียติกที่ได้จากแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์กับปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ในหน่วยของ % Recovery แสดงดังตารางที่ 31

ตารางที่ 31 เปรียบเทียบปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์กับปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร)

การทดลองที่	สภาวะการทดลอง			กรดอะเซียติก (µg)		% Recovery
	% เอทานอล	T (^{o}C)	Flow Rate (ml/min)	Maceration	GAS	
1	100	45	6	788±299	644±199	81.73
2	100	25	6	890±311	779±307	87.53
3	100	35	3	894±169	727±275	81.32
4	100	35	9	757±104	342±154	45.18
5	50	45	3	1,232±280	577±273	46.83
6	50	25	3	1,220±206	810±278	66.39
7	50	25	9	1,242±130	746±199	60.06
8	50	45	9	1,376±327	739±194	53.71
9	50	35	6	1,313±329	878±158	66.87
10	50	35	6	1,171±261	794±325	67.81
11	50	35	6	1,231±223	781±403	63.44
12	0	45	6	1,484±248	418±292	28.17
13	0	35	3	1,273±383	730±172	57.34
14	0	35	9	1,319±457	713±364	54.06
15	0	25	6	1,131±42	588±81	51.99

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

จากตารางที่ 31 พบว่าการแช่ผงบัวบกด้วยตัวทำละลาย 100 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร (การทดลองที่ 1-4) สามารถสกัดกรดอะเซียติกได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 832 ไมโครกรัม การ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แช่ผงบัวบกด้วยตัวทำละลาย 50 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร (การทดลองที่ 5-11) สามารถสกัดกรดอะเซียติกได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 1,255 ไมโครกรัม และการแช่ผงบัวบกด้วยตัวทำละลาย 0 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร (การทดลองที่ 12-15) สามารถสกัดกรดอะเซียติกได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 1,301 ไมโครกรัม นอกจากนี้พบว่าค่า % Recovery ของกรดอะเซียติกจากกระบวนการ GAS อยู่ในช่วง 28.17-87.53 เปอร์เซ็นต์ โดยสภาวะที่ใช้ในการตกตะกอน (อุณหภูมิและอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์) มีผลต่อ % Recovery นอกจากนี้ยังพบอีกว่า การแช่ผงบัวบกด้วยตัวทำละลาย 100 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และใช้อัตราการไหล 6 มิลลิลิตรต่อนาที มีค่า % Recovery สูงสุดเท่ากับ 87.53 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การแช่ผงบัวบกด้วยตัวทำละลาย 0 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และใช้อัตราการไหล 6 มิลลิลิตรต่อนาที มีค่า % Recovery ต่ำสุดเท่ากับ 28.17 เปอร์เซ็นต์ และยังพบอีกว่า % Recovery ของกรดอะเซียติกที่ได้มีค่าไม่เกิน 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากสารสกัดที่ได้จากการแช่ ดังนั้นปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้จากการตกตะกอนจึงมีค่าน้อยกว่ากรดอะเซียติกที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งกระบวนการ GAS นี้จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น และสามารถเลือกตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญที่เราสนใจได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การวิเคราะห์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดบัวบกและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเทคนิค GAS

การวิเคราะห์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay และวิธี ABTS Radical Scavenging Assay ในงานวิจัยนี้ได้แสดงผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดบัวบกและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเทคนิค GAS โดยรายงานผลการทดลองออกมาเป็นปริมาณของ Trolox เทียบเท่า (Trolox Equivalent) ในหน่วยไมโครกรัมต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร เนื่องจากการเจือจางของสารสกัดและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนของแต่ละสภาวะการทดลองไม่เท่ากันจึงไม่สามารถเปรียบเทียบผลการทดลองในหน่วยเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระได้ ดังนั้นจึงมีการนำค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระมาทำการคำนวณให้อยู่ในหน่วยของปริมาณ Trolox เทียบเท่าเพื่อให้ง่ายต่อการเปรียบเทียบผล ซึ่งถ้าปริมาณ Trolox เทียบเท่า มีค่ามาก จะหมายความว่าสารสกัดและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากไปด้วย

6.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดบัวบกที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัวต้านการละลายที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยทำการตรวจ DPPH ซ้ำ 3 ครั้ง จากการทดลองทั้งหมด 45 การทดลอง แสดงดังตารางที่ 32 โดยแสดงในหน่วยไมโครกรัมของปริมาณ Trolox เทียบเท่า (Trolox Equivalent) ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 32 ค่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ของสารสกัดบัวบกที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

การทดลองที่	สภาวะการทดลอง			ปริมาณ Trolox เทียบเท่า (µg)	
	% เอทานอล	T (^{o}C)	Flow Rate (ml/min)	Maceration	GAS
1	100	45	6	3,011±236	1,095±132
2	100	25	6	2,736±878	1,078±143
3	100	35	3	2,932±116	1,142±219
4	100	35	9	2,571±746	1,215±163
5	50	45	3	6,098±418	3,290±342
6	50	25	3	5,700±640	3,951±369
7	50	25	9	5,983±249	3,952±382
8	50	45	9	5,668±351	3,312±744
9	50	35	6	5,938±54	3,560±718
10	50	35	6	6,097±718	3,784±554
11	50	35	6	6,161±519	3,567±411
12	0	45	6	10,013±1033	4,173±503
13	0	35	3	9,647±464	4,305±455
14	0	35	9	10,647±1726	4,931±735
15	0	25	6	9,504±1627	5,622±336
สภาวะที่เหมาะสม 1	21.21	25	9	15,728±2356	4,328±491
สภาวะที่เหมาะสม 2	0	25	3	19,155±979	4,810±381
สภาวะที่เหมาะสม 3	50.50	29.24	4.576	11,348±901	3,678±474

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=9)

สภาวะที่เหมาะสม 1 คือ สภาวะที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติกโคไซด์

สภาวะที่เหมาะสม 2 คือ สภาวะที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิก

สภาวะที่เหมาะสม 3 คือ สภาวะที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 32 พบว่าสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Maceration) ทุกการทดลองมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 12-15) มีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 9,953 ไมโครกรัม แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด รองลงมาคือตัวทำละลายผสมเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 5-11) มีค่าเฉลี่ยปริมาณ Trolox เทียบเท่าเท่ากับ 5,949 ไมโครกรัม และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 1-4) โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณ Trolox เทียบเท่าเท่ากับ 2,813 ไมโครกรัม ตามลำดับ ในส่วนของการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่า สภาวะที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิกมีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงที่สุด 19,155±979 ไมโครกรัม รองลงมาคือสภาวะที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติกโคไซด์ 15,728±2,356 ไมโครกรัม และสภาวะที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก 11,348±901ไมโครกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการทดลองที่ 12-15 กับสภาวะที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิก ซึ่งใช้เอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ในการสกัดเหมือนกัน แต่มีปริมาณ Trolox เทียบเท่าแตกต่างกันมากทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิห้องที่ทำการแช่ผงบัวบกในแต่ละวัน

สารที่ได้จากการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากกระบวนการ GAS มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ทุกการทดลองเช่นเดียวกัน ซึ่งการแช่ผงบัวบกด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 12-15) เมื่อนำมาตกตะกอนแล้วสารที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือตัวทำละลายผสมเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 5-11) และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 1-4) ตามลำดับ ซึ่งสภาวะที่มีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงที่สุด คือที่สภาวะการแช่บัวบกด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ และนำมาตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 6 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งมีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงที่สุดคือ 5,622±336 ไมโครกรัม ในส่วนของการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญในสภาวะที่เหมาะสม พบว่า สภาวะที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิกมีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงที่สุด 4,810±381 ไมโครกรัม รองลงมาคือสภาวะที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติกโคไซด์ 4,328±491 ไมโครกรัม และสภาวะที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก 3,678±474 ไมโครกรัม ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้มีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับการแช่บัวบกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการตกตะกอนด้วยเทคนิค GAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging Assay

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดบัวบกที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัวต้านการละลายที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ ด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging Assay โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยทำการตรวจ ABTS ซ้ำ 3 ครั้ง จากการทดลองทั้งหมด 45 การทดลอง แสดงดังตารางที่ 33 โดยแสดงในหน่วยไมโครกรัมของปริมาณ Trolox เทียบเท่า (Trolox Equivalent) ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 33 ค่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ของสารสกัดบัวบกที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ ด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging Assay

การทดลองที่	สภาวะการทดลอง			ปริมาณ Trolox เทียบเท่า (μg)	
	% เอทานอล	T (^{o}C)	Flow Rate (ml/min)	Maceration	GAS
1	100	45	6	11,939±1250	2,903±229
2	100	25	6	13,815±572	3,442±1048
3	100	35	3	12,099±1571	3,166±190
4	100	35	9	13,136±1507	3,340±738
5	50	45	3	18,922±721	7,155±1096
6	50	25	3	20,758±2624	9,480±1660
7	50	25	9	18,180±2736	9,582±762
8	50	45	9	19,363±1789	8,653±1904
9	50	35	6	18,928±3009	8,842±1878
10	50	35	6	20,412±1690	9,201±874
11	50	35	6	20,561±1191	9,900±1436
12	0	45	6	26,095±3440	8,368±664
13	0	35	3	23,966±4634	8,730±1042
14	0	35	9	26,683±787	10,729±820
15	0	25	6	23,882±4018	10,145±2179
สภาวะที่เหมาะสม 1	21.21	25	9	27,138±2687	7,143±168
สภาวะที่เหมาะสม 2	0	25	3	35,828±2029	6,954±224
สภาวะที่เหมาะสม 3	50.50	29.24	4.576	23,157±732	6,625±983

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=9)

สภาวะที่เหมาะสม 1 คือ สภาวะที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติกโคไซด์

สภาวะที่เหมาะสม 2 คือ สภาวะที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิก

สภาวะที่เหมาะสม 3 คือ สภาวะที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก

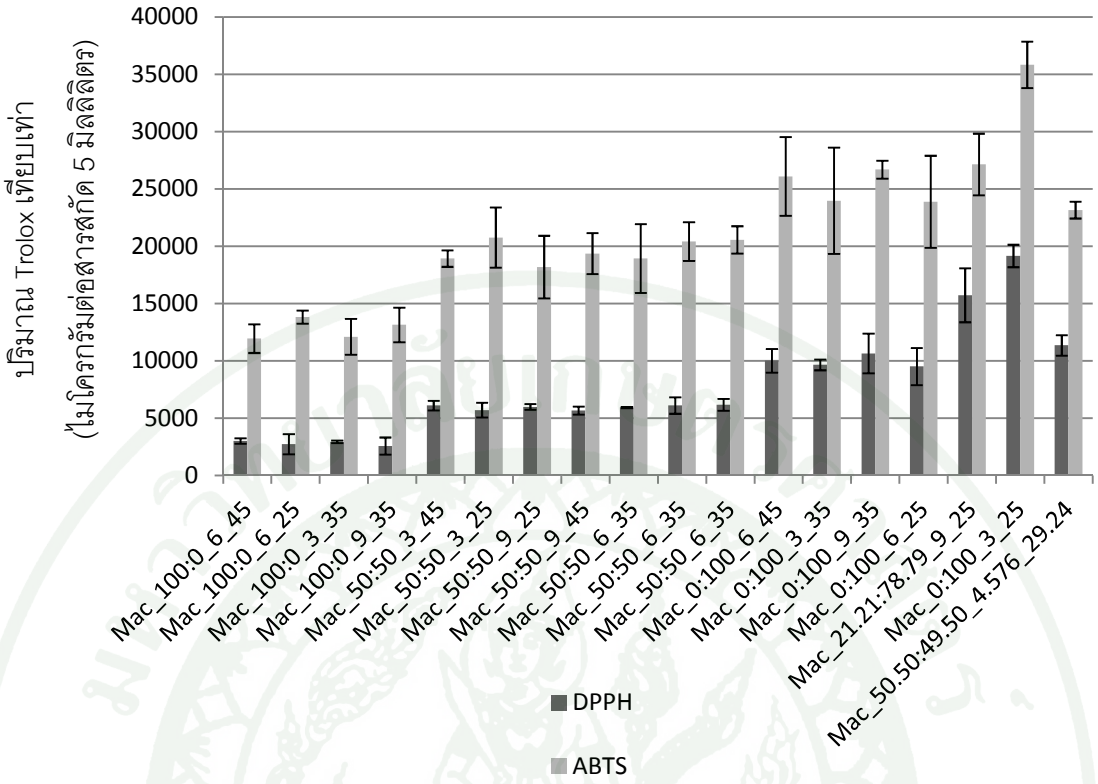
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 33 พบว่าสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Maceration) ทุกการทดลองมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 12-15) มีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 25,157 ไมโครกรัม แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด รองลงมาคือตัวทำละลายผสมเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 5-11) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 19,589 ไมโครกรัม และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 1-4) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12,747 ไมโครกรัม ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้มีแนวโน้มในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH Assay และยังพบว่าการทดลองที่ 12-15 กับสภาวะที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสิก ซึ่งใช้เอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ในการสกัดเหมือนกัน แต่มีปริมาณ Trolox เทียบเท่าแตกต่างกันมากทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิห้องที่ทำการแช่ผงบัวบกในแต่ละวัน จึงทำให้ปริมาณสารที่ได้แตกต่างกันเช่นเดียวกันกับวิธี DPPH Assay

สารที่ได้จากการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากกระบวนการ GAS มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ทุกการทดลองเช่นเดียวกัน ซึ่งการแช่ผงบัวบกด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 12-15) เมื่อนำมาตกตะกอนแล้วสารที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือตัวทำละลายผสมเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 5-11) และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 1-4) ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้มีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับการแช่บัวบกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และยังพบอีกว่าสภาวะที่มีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงที่สุด คือที่สภาวะการแช่บัวบกด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ และนำมาตกตะกอนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 9 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งมีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงที่สุดคือ 10,729±820ไมโครกรัม นอกจากนี้ยังพบว่าสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการตกตะกอนด้วยเทคนิค GAS เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH Assay

เปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระหรือปริมาณของ Trolox เทียบเท่า ที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay และวิธี ABTS Radical Scavenging Assay ของสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS โดยแสดงดังภาพที่ 27 และ 28 ตามลำดับ

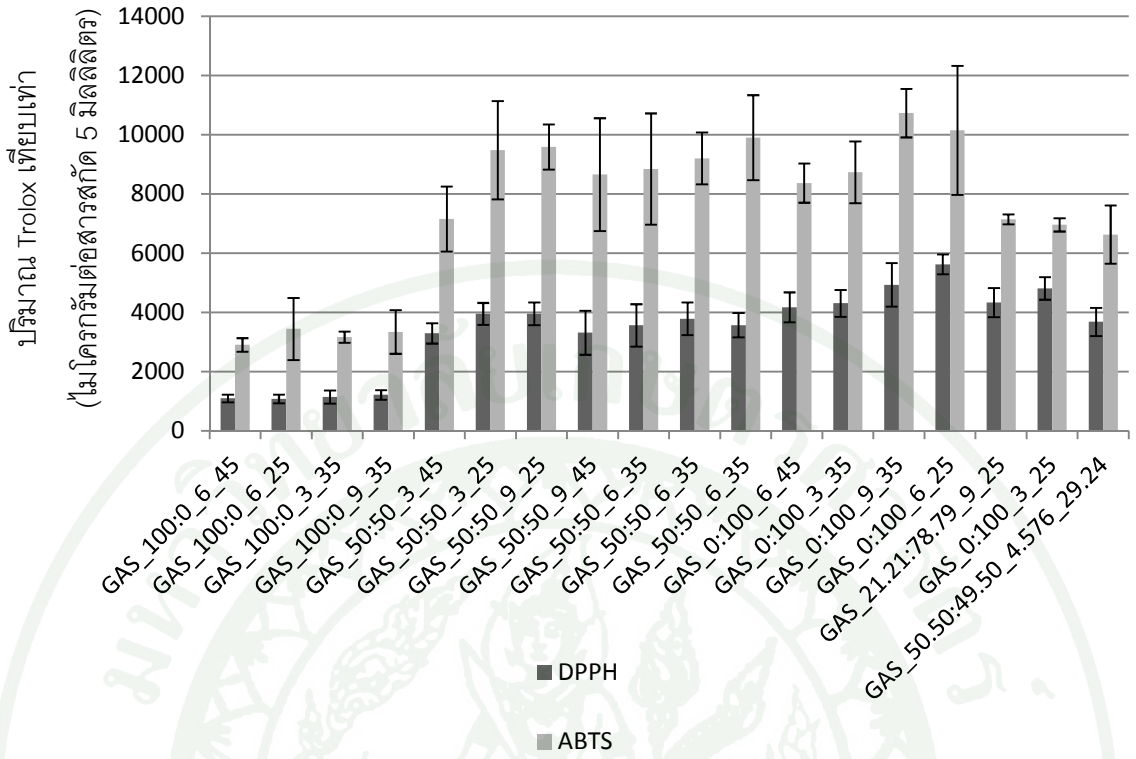
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 27 เปรียบเทียบปริมาณของ Trolox เทียบเท่าของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ จากการวิเคราะห์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay

หมายเหตุ Mac_100:0_6_45 คือ การสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญโดยการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีเอทานอลผสมอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ก่อนการนำไปตกตะกอนด้วยเทคนิค GAS ที่อัตราการไหล 6 มิลลิลิตรต่อนาที และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 28 เปรียบเทียบปริมาณของ Trolox เทียบเท่าของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ จากการวิเคราะห์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay

หมายเหตุ GAS_100:0_6_45 คือ การตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากสารสกัดด้วยการแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีเอทานอลผสมอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และนำไปตกตะกอนโดยใช้อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 6 มิลลิลิตรต่อนาที และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

จากภาพที่ 27 และภาพที่ 28 จะสังเกตเห็นว่าที่สภาวะการทดลองเดียวกัน ปริมาณของ Trolox เทียบเท่าที่วัดค่าได้ของทั้งสองวิธีมีค่าแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารสกัดที่ได้มีหลายชนิดโดยมีทั้งแบบมีขั้วและแบบไม่มีขั้ว ซึ่งอาจจะทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีความเสถียรสูง และอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีความเสถียรต่ำ ได้ไม่เท่ากัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dahn *et al.* (2012) ที่ได้ทำการศึกษาการสกัด Essential Oil จาก Lavender ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต โดยทำการศึกษาผลกระทบของความดัน อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยนำน้ำมันที่ได้มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มีค่าแตกต่างกัน โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงความดันกับเวลาที่ใช้ในการสกัดเท่านั้นที่ส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ส่วนความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ไม่ขึ้นกับทั้งความดัน เวลา และอุณหภูมิ

นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ วราภรณ์ (2556) ที่ได้ทำการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วม โดยทำการศึกษาผลกระทบของความดัน อุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัดต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มีค่าแตกต่างกันและไม่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน

6.3 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Compounds Content)

ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีในสารสกัดบัวบกที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัวต้านการละลายที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยทำการตรวจ Total Phenolic Compounds Content ซ้ำ 3 ครั้ง จากการทดลองทั้งหมด 45 การทดลอง แสดงดังตารางที่ 34 โดยแสดงในหน่วยไมโครกรัมของปริมาณ Gallic Acid เทียบเท่า (Gallic Acid Equivalent) ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 34 ค่า Gallic Acid Equivalent Capacity ของสารสกัดบัวบกที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ ด้วยวิธี Total Phenolic Compound Content

การทดลองที่	สภาวะการทดลอง			ปริมาณ Gallic Acid เทียบเท่า (µg)	
	% เอทานอล	T (^{o}C)	Flow Rate (ml/min)	Maceration	GAS
1	100	45	6	2,369±282	772±58
2	100	25	6	2,306±353	830±69
3	100	35	3	2,275±422	933±85
4	100	35	9	2,805±398	965±68
5	50	45	3	5,076±768	2,203±200
6	50	25	3	5,323±304	2,879±357
7	50	25	9	4,818±286	2,698±330
8	50	45	9	5,005±756	2,361±417
9	50	35	6	4,927±168	2,571±250
10	50	35	6	4,779±301	2,673±279
11	50	35	6	4,821±265	2,665±209
12	0	45	6	7,706±797	2,844±577
13	0	35	3	7,443±295	3,080±468
14	0	35	9	7,815±111	3,517±487
15	0	25	6	7,226±482	3,653±49
สภาวะที่เหมาะสม 1	21.21	25	9	10,851±899	3,157±193
สภาวะที่เหมาะสม 2	0	25	3	13,658±143	3,360±418
สภาวะที่เหมาะสม 3	50.50	29.24	4.576	8,917±374	2,896±318

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=9)

สภาวะที่เหมาะสม 1 คือ สภาวะที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติกโคไซด์

สภาวะที่เหมาะสม 2 คือ สภาวะที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิก

สภาวะที่เหมาะสม 3 คือ สภาวะที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก

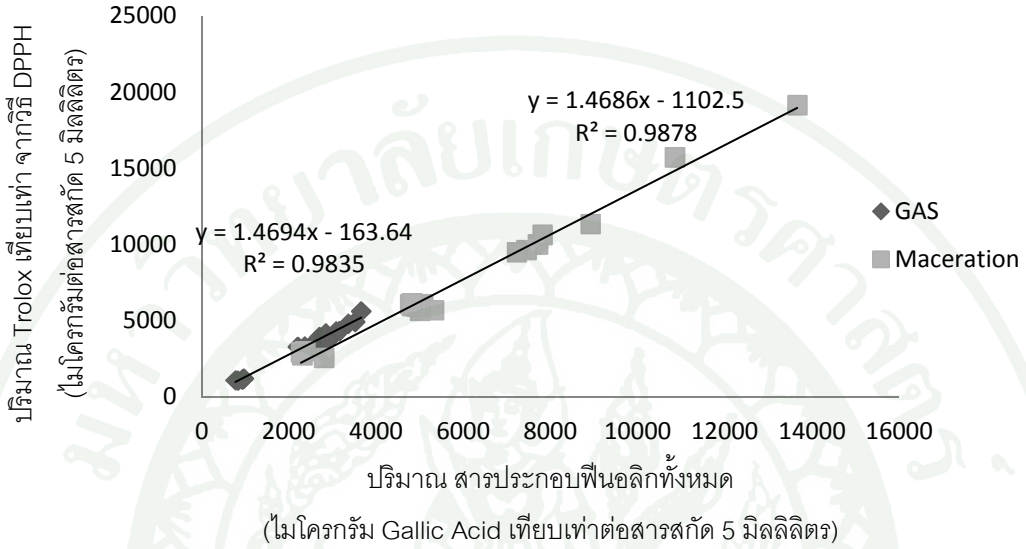
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 34 พบว่าสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 12-15) มีปริมาณ Gallic Acid เทียบเท่า สูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณ Gallic Acid เทียบเท่าเท่ากับ 7,548 ไมโครกรัม แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือตัวทำละลายผสมเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 5-11) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4,964 ไมโครกรัม และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 1-4) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2,439 ไมโครกรัม ตามลำดับ ในส่วนของการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสิกมีปริมาณ Gallic Acid เทียบเท่าสูงที่สุด 13,658±143 ไมโครกรัม รองลงมาคือสภาวะที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติกโคไซด์ 10,851±899 ไมโครกรัม และสภาวะที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก 8,917±374 ไมโครกรัม ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยวิธี DPPH Assay และ ABTS Assay ที่กล่าวไว้ก่อนหน้า โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์เอทานอลในตัวทำละลายส่งผลโดยตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด โดยปริมาณสารประกอบฟีนอกลิกทั้งหมดจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อใช้เปอร์เซ็นต์เอทานอลในตัวทำละลายลดลง และยังพบอีกว่าการทดลองที่ 12-15 กับสภาวะที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิก ซึ่งใช้เอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ในการสกัดเหมือนกัน แต่มีปริมาณ Gallic Acid เทียบเท่าแตกต่างกันมากทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิห้องที่ทำการแช่ผงบัวบกในแต่ละวัน จึงทำให้ปริมาณสารที่ได้แตกต่างกันเช่นเดียวกันกับวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay

สำหรับสารที่ได้จากการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากกระบวนการ GAS พบว่าการแช่ผงบัวบกด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ทุกสภาวะการทดลอง (การทดลองที่ 12-15) เมื่อนำมาตกตะกอนแล้วสารที่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือตัวทำละลายผสมเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 5-11) และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ (การทดลองที่ 1-4) ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้มีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารที่ได้จากการแช่ด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ และนำมาตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 6 มิลลิลิตรต่อนาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคือ 3,653±49 ไมโครกรัม นอกจากนี้ยังพบว่าสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการตกตะกอนด้วยเทคนิค GAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

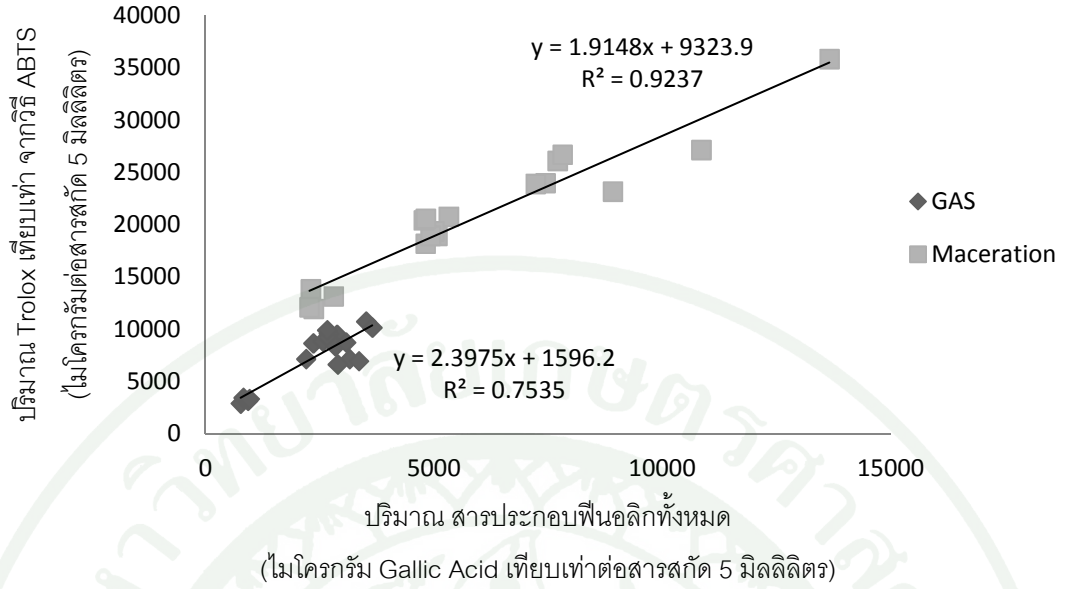
นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบแนวโน้มของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay และ ABTS Assay แสดงดังภาพที่ 29 และ 30 ตามลำดับ



ภาพที่ 29 ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (ปริมาณ Trolox) จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH Assay กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Maceration) กับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS

จากภาพที่ 29 พบว่าปริมาณ Trolox เทียบเท่าที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก กล่าวคือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Maceration) เท่ากับ 0.9878 และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS เท่ากับ 0.9835 จากค่า R^2 ที่สูงเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่าเราสามารถนำความสัมพันธ์ของสมการที่ได้มาทำนายผลของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ ยกตัวอย่างเช่น ถ้าทราบปริมาณ Trolox เทียบเท่าของสารสกัดที่สภาวะใด ๆ เราสามารถนำสมการข้างต้นมาทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ ทำให้สามารถประหยัดเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ผลการทดลองได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 30 ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (ปริมาณ Trolox) จากการทดสอบด้วยวิธี ABTS Assay กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Maceration) กับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS

จากภาพที่ 30 พบว่าปริมาณ Trolox เทียบเท่าที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Assay กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกเช่นเดียวกันกับวิธี DPPH Assay โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Maceration) เท่ากับ 0.9237 ซึ่งมีค่า R^2 ที่สูงสามารถนำความสัมพันธ์ของสมการที่ได้มาทำนายผลของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ สำหรับค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS มีค่าเท่ากับ 0.7535 ซึ่งค่า R^2 ที่ได้มีความสัมพันธ์ระดับปานกลาง จึงทำให้สมการความสัมพันธ์ที่ได้ไม่สามารถนำมาคำนวณหาปริมาณ Trolox และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ได้จริง

จากผลการทดลองที่ได้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของนฤมล (2551) ซึ่งทำการศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกโดยการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 5 ชนิด คือ 80% เมทานอล 80%เอทานอล น้ำ ปิโตรเลียม

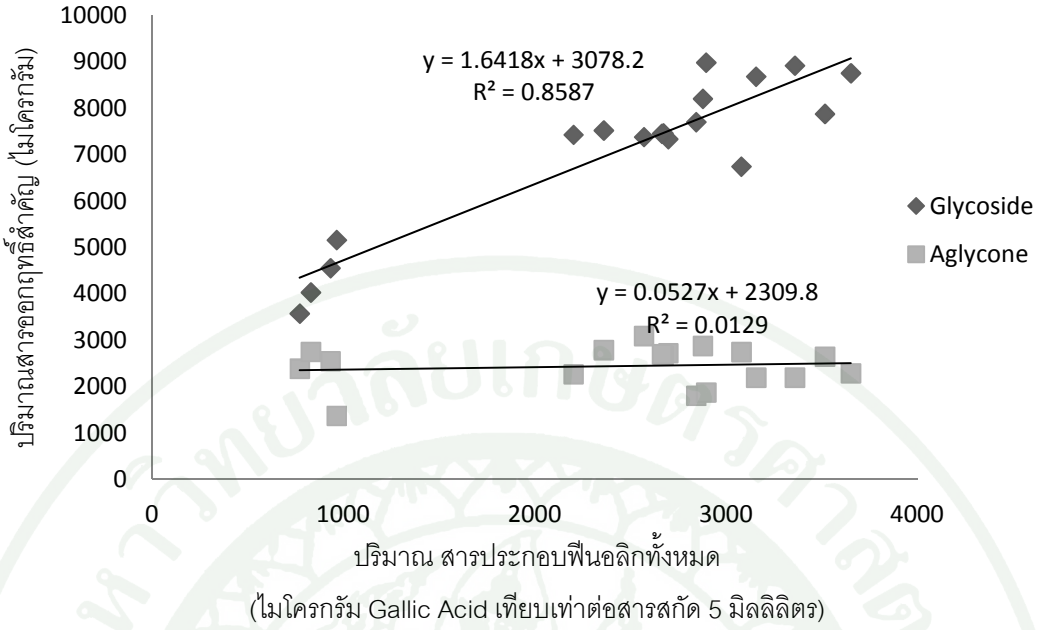
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อีเทอร์ และเฮกเซน โดยนำสารสกัดที่ได้มาทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยพบว่าสารสกัดจาก 80% เมทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจาก 80% เอทานอล สารสกัดจากน้ำ สารสกัดจากปิโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดจากเฮกเซน ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของพงศธร และคณะ (2551) ที่ได้ทำการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay ของเปลือกผลไม้ 8 ชนิด คือ มังคุด มะม่วง กล้วยหอม ทุเรียน ลองกอง มะละกอ ส้ม และสับปะรด จากการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเปลือกผลไม้มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9556 และ 0.9792 ตามลำดับ

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับปริมาณสารไกลโคไซด์และปริมาณสารอะไกลโคนที่ได้จากการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยกระบวนการ GAS แสดงดังภาพที่ 31

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 31 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับปริมาณสารไกลโคไซด์และปริมาณสารอะไกลโคนที่ได้จากการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยกระบวนการ GAS

จากภาพที่ 31 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเทคนิค GAS ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารอะไกลโคน (กรดอะเซียติกและกรดมาเดคาสสิก) อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า R^2 ที่ต่ำมากคือ 0.0129 ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณสารไกลโคไซด์ (มาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.8587 ซึ่งมีความสัมพันธ์ระดับสูง จึงสามารถนำความสัมพันธ์ของสมการที่ได้มาทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณสารไกลโคไซด์ได้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของนิพัทธา และ วริพัสย์ (2553) ที่ได้ทำการศึกษาหาปริมาณแอนโธไซยานินซึ่งเป็นสารประกอบไกลโคไซด์หรือเอซิลไกลโคไซด์ชนิดหนึ่งกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย 51 สายพันธุ์ จากการศึกษาพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในกลุ่มข้าวที่มีสี (กลุ่มข้าวสีแดง ข้าวสีม่วงและข้าวเหนียวดำ) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มข้าวที่ไม่มีสี (ข้าวกล้อง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบอีกว่าปริมาณของสารแอนโธไซยานินมีแนวโน้มสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด กล่าวคือ ข้าวกลุ่มที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงจะมีปริมาณแอนโธไซยานินสูงตามด้วย เนื่องจากสารประกอบฟีนอลที่พบทั่วไปในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โคไซด์ (glycoside) โดยน้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ น้ำตาลกลูโคส (glucose) (พิมพ์เพ็ญ และ นิธิยา, ม.ป.ป.)

7. ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ตกตะกอนได้จากกระบวนการ GAS เทียบกับผงบัวบก 1 กรัม

ทางผู้วิจัยได้ทำการเปลี่ยนหน่วยของปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ตกตะกอนได้ในหน่วยไมโครกรัมต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร เป็นหน่วยไมโครกรัมต่อผงบัวบก 1 กรัม โดยการนำมาคำนวณกับปริมาตรสารสกัดที่ได้จากการแช่ที่ได้ทั้งหมด เพื่อสามารถนำมาเปรียบเทียบงานวิจัยของผู้อื่นได้ง่ายขึ้น แสดงดังตารางที่ 36 ซึ่งปริมาณสารที่คำนวณได้จะเป็นปริมาณสารอย่างน้อยที่สุดที่จะทำการตกตะกอนออกมาได้ เนื่องจากในขั้นตอนเริ่มต้นได้ทำการแช่ผงบัวบก 5 กรัมกับตัวทำละลายอินทรีย์ 50 มิลลิลิตร แต่สารสกัดที่กรองได้มีปริมาตรประมาณ 25-33 มิลลิลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารละลายยังติดอยู่กับกากตะกอนของบัวบกซึ่งกรองออกมาได้ไม่หมด และสารละลายบางส่วนอาจระเหยไปในอากาศระหว่างการกรอง จึงทำให้ได้สารสกัดออกมาน้อยกว่า 50 มิลลิลิตร นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบผลการทดลองกับงานวิจัยของ วราภรณ์ (2556) โดยแสดงดังตารางที่ 37

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 35 ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ตกตะกอนได้จากกระบวนการ GAS ในหน่วยไมโครกรัมต่อผงบัวบก 1 กรัม

การทดลองที่	สภาวะการทดลอง			ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ (µg/g ผงบัวบก)			
	% เอทานอล	T (°C)	FlowRate (ml/min)	มาเดคาสโซไซด์	อะเซียติโคไซด์	กรดมาเดคาสสิก	กรดอะเซียติก
1	100	45	6	3,351±521	1,473±147	2,380±826	881±333
2	100	25	6	3,377±353	1,507±194	2,424±970	963±440
3	100	35	3	4,083±704	1,765±327	2,380±845	952±390
4	100	35	9	4,558±390	1,907±53	1,292±416	430±202
5	50	45	3	5,899±544	2,976±282	2,052±754	710±368
6	50	25	3	6,543±740	3,263±423	2,499±839	989±405
7	50	25	9	6,150±1,105	3,071±575	2,475±799	939±267
8	50	45	9	6,366±1,353	3,089±633	2,564±719	926±251
9	50	35	6	6,324±1,127	3,164±542	2,874±1,228	1,127±241
10	50	35	6	6,117±604	3,111±376	2,363±1,206	1,002±471
11	50	35	6	6,084±1,471	3,021±713	2,379±1,248	978±582
12	0	45	6	5,927±669	2,990±309	1,645±821	502±369
13	0	35	3	5,443±669	2,728±418	2,443±444	883±197
14	0	35	9	6,264±650	3,161±331	2,327±1,015	858±440
15	0	25	6	6,647±711	3,334±267	1,936±323	670±110
O1	21.21	25	9	6,720±595	3,458±331	1,839±335	737±111
O2	0	25	3	6,938±159	3,522±88	1,968±176	604±58
O3	50.5	29.24	4.576	7,544±542	3,832±284	1814±60	552±14

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

O1 คือ สภาวะที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติกโคไซด์

O2 คือ สภาวะที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิก

O3 คือ สภาวะที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 36 ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญจากการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วม

การทดลองที่	สภาวะการทดลอง			ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ (μg/g ผงบัวบก)			
	P (Bar)	T (°C)	ตัวทำละลายร่วม (%mol)	มาเดคาสโซไซด์	อะเซียติโคไซด์	กรดมาเดคาสสิก	กรดอะเซียติก
1	150	35	2.0	105.67	26.22	204.41	8.42
2	180	45	2.5	80.13	13.71	145.58	8.32
3	150	35	3.0	146.05	29.25	257.46	18.50
4	120	40	2.0	112.92	40.07	203.41	4.33
5	180	40	2.0	85.35	18.82	180.05	7.73
6	180	40	3.0	118.02	31.40	240.00	23.20
7	120	40	3.0	139.45	39.00	234.50	11.97
8	150	40	2.5	74.49	33.85	147.41	13.19
9	120	45	2.5	94.01	25.11	148.78	6.57
10	150	45	3.0	103.40	15.34	209.97	19.64
11	180	35	2.5	134.24	69.46	180.85	16.89
12	150	40	2.5	128.33	19.86	262.00	9.48
13	150	45	2.0	88.97	27.42	200.97	4.46
14	150	40	2.5	129.97	43.06	176.81	15.06
15	120	35	2.5	85.42	35.72	133.98	10.50

ที่มา: วราภรณ์ (2556)

จากตารางที่ 36 และ 37 พบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิดเมื่อนำมาตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS จะได้ปริมาณสารมากกว่าการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตโดยมีเอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วมทุกสภาวะการทดลอง โดยมีค่ามากกว่ากันประมาณ 10-200 เท่า เช่น เมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่ 15 ของการทดลองทั้ง 2 วิธี พบว่าปริมาณสารมาเดคาสโซไซด์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS มีค่ามากกว่ามาเดคาสโซไซด์ที่ได้จากการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตโดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วมถึง 77.8 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตกตะกอนสารออกฤทธิ์ด้วยวิธีนี้ นอกจากจะเลือกตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญที่ต้องการและได้สารออกฤทธิ์สำคัญที่มีความบริสุทธิ์แล้วยังสามารถตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิดได้ในปริมาณที่มากอีกด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

งานวิจัยนี้ศึกษาการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยเทคนิค GAS โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะใกล้จุดวิกฤตเป็นตัวต้านการละลาย และศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อการตกตะกอน ได้แก่ เปอร์เซ็นต์เอทานอลในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและเมทานอล (0-100 เปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร) อุณหภูมิ (25-45 °C) และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ (3-9 ml/min) และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญ นอกจากนี้ยังศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอน จากการศึกษาสามารถสรุปผลได้ ดังนี้

1. การสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญโดยการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าการแช่ผงบัวบกด้วยเอทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพียงรอบเดียวเพียงพอต่อการสกัด เนื่องจากการแช่รอบแรกสามารถสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิดออกมาในปริมาณมาก โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณสารที่แช่ครั้งแรกต่อปริมาณสารที่ได้ทั้งหมดประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์

2. การตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยเทคนิค GAS พบว่าสามารถตกตะกอนมาเดคาสโซไซด์ออกมาได้ปริมาณมากที่สุด รองลงมาคืออะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก ตามลำดับ

3. การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยกระบวนการ GAS พบว่าชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ส่งผลต่อปริมาณมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ และกรดอะเซียติกอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณกรดมาเดคาสสิกไม่พบปัจจัยที่มีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยปัจจัยที่ศึกษาแต่ละปัจจัยส่งผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญดังนี้

3.1 การใช้ตัวทำละลายที่มีเปอร์เซ็นต์เอทานอลน้อย (มีปริมาณเมทานอลสูง) สามารถตกตะกอนสารมาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์และกรดมาเดคาสสิก ได้ปริมาณที่สูงกว่าการใช้ตัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำละลายที่มีเปอร์เซ็นต์เอทานอลสูง ในขณะที่การใช้ตัวทำละลายที่มีเปอร์เซ็นต์เอทานอลในระดับกลาง ๆ สามารถตกตะกอนกรดอะเซียติกได้มากที่สุด

3.2 การเพิ่มอุณหภูมิทำให้ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิด ที่ตกตะกอนได้มีปริมาณลดลง

3.3 การลดอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ลง สามารถตกตะกอนกรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติกได้มาก แต่สามารถตกตะกอนอะเซียติโคไซด์ได้น้อยลง นอกจากนี้ยังพบอีกว่า การเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์จาก 3 เป็น 5 ml/min ปริมาณของมาเดคาสโซไซด์ที่ได้มีปริมาณน้อยลง แต่เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์จาก 5 เป็น 9 ml/min พบว่าปริมาณของมาเดคาสโซไซด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

4. จากการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยกระบวนการ GAS โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติกโคไซด์คือสภาวะการแช่ผงบัวบกด้วยเอทานอล 21.21 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 °C และใช้อัตราการไหล 9 ml/min สามารถตกตะกอนมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติกโคไซด์ได้ 5,733±537 และ 2,948±249 µg ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกคือสภาวะการแช่ผงบัวบกด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 °C และใช้อัตราการไหล 3 ml/min สามารถตกตะกอนกรดมาเดคาสสิกได้ 1,678±163 µg สภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนกรดอะเซียติกคือสภาวะการแช่ผงบัวบกด้วยเอทานอล 50.50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 29.24 °C และใช้อัตราการไหล 4.576 ml/min สามารถตกตะกอนกรดอะเซียติกได้ 436±17 µg ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนสารไตรเทอร์ปีนรวมคือสภาวะการแช่ผงบัวบกด้วยเอทานอล 26.26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 °C และใช้อัตราการไหล 9 ml/min สามารถตกตะกอนสารไตรเทอร์ปีนรวมได้ 11,653±1,000 µg

5. การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay และ วิธี ABTS Radical Scavenging Assay พบว่าสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Maceration) และสารที่ได้จากการตกตะกอนสารออกฤทธิ์สำคัญจากกระบวนการ GAS ทุกการทดลองมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS โดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้เอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงที่สุด แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด รองลงมาคือใช้ตัวทำละลายผสมเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังพบว่าที่สภาวะการแช่บัวบกด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ และนำมาตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 °C อัตราการไหล 6 ml/min มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ซึ่งมีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงที่สุดคือ 5,622±336 µg และที่สภาวะการแช่บัวบกด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ และนำมาตกตะกอนที่อุณหภูมิ 35 °C อัตราการไหล 9 ml/min มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด ซึ่งมีปริมาณ Trolox เทียบเท่าสูงที่สุดคือ 10,729±820 µg นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 ชนิดสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการตกตะกอนด้วยเทคนิค GAS

6. จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS มีปริมาณสารเพิ่มมากขึ้นเมื่อลดปริมาณของเอทานอลในตัวทำละลายผสมลง ซึ่งมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS นอกจากนี้ยังพบว่าที่สภาวะการแช่บัวบกด้วยเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์ และนำมาตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25 °C อัตราการไหล 6 ml/min มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคือ 3,653±49 µg โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณ Trolox เทียบเท่าที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 ชนิดและปริมาณสารกลุ่มไกลโคไซด์จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเทคนิค GAS กล่าวคือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารกลุ่มไกลโคไซด์แปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งสามารถนำสมการความสัมพันธ์ที่ได้มาทำนายผลของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารกลุ่มไกลโคไซด์ กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเทคนิค GAS ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารอะไกลโคนอย่างมีนัยสำคัญ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาปัจจัยของเปอร์เซ็นต์เอทานอลในตัวทำละลายผสม พบว่าที่เปอร์เซ็นต์เอทานอลที่มีค่าต่ำเท่านั้นที่จะให้ผลการสกัดที่ดี เนื่องจากความเป็นขั้วของเมทานอลมีมากกว่าเอทานอล อย่างไรก็ตามความเป็นพิษของเมทานอลก็อาจส่งผลต่อผู้วิจัยและความเชื่อมั่นของผู้บริโภคในกรณีที่มีการขยายไปสู่ภาคอุตสาหกรรม จึงอาจทำการเปลี่ยนตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วใกล้เคียงกับเมทานอล แต่มีความเป็นพิษน้อยกว่า

2. เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการทดลองเบื้องต้น จึงยังไม่ได้มีการวิเคราะห์หาปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์และหาสารออกฤทธิ์สำคัญชนิดอื่นที่มีอยู่ในบัวบก ดังนั้นในการทดลองต่อไปควรมีการวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ชนิดอื่นที่สามารถสกัดได้จากบัวบก และควรมีการทดสอบหาปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ เพื่อสามารถใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้ ถึงแม้ในการทดลองครั้งนี้พบว่าสารที่ตกตะกอนได้จากกระบวนการ GAS มีลักษณะที่ค่อนข้างแห้งก็ตาม

3. การแช่ผงบัวบกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการแช่สกัดที่อุณหภูมิห้อง แต่จากการทำการทดลองพบว่าอุณหภูมิห้องในแต่ละวันอาจมีความแตกต่างกัน จึงทำให้ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่สกัดได้มีปริมาณไม่เท่ากัน ดังนั้นเพื่อให้ปริมาณสารที่สกัดได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน จึงควรควบคุมอุณหภูมิในการแช่ให้เท่ากันทุกการทดลอง เช่น อาจทำการสกัด โดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)

4. ในการทดลองต่อไปควรจะเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ได้จากผงใบบัวบกที่ผ่านการอบแห้งกับบัวบกสด ว่ามีปริมาณแตกต่างกันอย่างไร และควรศึกษาถึงผลของความร้อนในการทำผงใบบัวบกแห้งที่มีต่อปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เกศินี ศรีสุระ. 2549. **การสกัดวิตามินอีจากเมล็ดดอกทานตะวันโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตและการตกผลึกวิตามินอีโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะใกล้จุดวิกฤต**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

แคทลียา ปวุตติกุล, ชัชนี ผ่องจิตต์ และ อักษร ธรรมกุล. 2542. **การวิเคราะห์หาปริมาณอะเซียติโคไซด์จากบัวบกจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิราพร เพลินจิตต์. 2554. **ความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. 2554. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ : แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. **ว. วิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์**. 1(1):59-70.

ชินนทัต สินประเสริฐโชติ. 2550. **การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันทานตะวันโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตเป็นตัวกลาง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไชยวัฒน์ นพเก้า. 2553. **การศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะการหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยแบคทีเรียกรดแลคติก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ณัฐพันธุ์ ตันตินฤพงษ์ และ ตุลาภรณ์ ม่วงแดง. 2543. **การพัฒนาสบู่สมุนไพรต้านเชื้อ**. โครงการพิเศษคณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. 2546. **พืชผักผลไม้ไทยที่มีคุณค่าเป็นทั้งอาหารและยา**. สาระความรู้ทางเกษตร. แหล่งที่มา: http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio45-46/45-460032.htm, 21 ธันวาคม 2555.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เดลินิวส์. 2553. **ประโยชน์ของบัวบก**. แหล่งที่มา: http://rueanthai2.lefora.com/2010/07/08/20100708160753/, 21 ธันวาคม 2555.

นิพัทธา ชาติสุวรรณ และวริพัสย์ อารีกุล. 2553. พารามิเตอร์สี ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแอนโธไซยานินในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ.*ใน* **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48** : สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพฯ, หน้า 252-260 (646 หน้า)

นฤมล นอยหวอย. 2551. **ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบก** (Centella Asiatica (Linn.) Urban). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พงศธร ล้อสุวรรณ, จิตศิริ ราชตนะพันธุ์ และศศิธร จันทนวรางกูร. 2551. **สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านจุลินทรีย์ของเปลือกผลไม้**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป. **สารประกอบฟีนอล**. ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร. แหล่งที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound, 1 เมษายน 2557.

พรรณี ลิ้มสวัสดิ์ และ จีระวรรณ หัสโรค. 2542. อาหารธรรมชาติ, น.64. **อาหารสมุนไพร**. สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุข. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ.

มานพ เจริญไชยตระกูล. 2553. **เทคโนโลยีของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตกับอุตสาหกรรมยา**. จำนวน 500 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รัชดาวรรณ พิชิตชาตรี และ พรเพ็ญ สุนทรกิจจารักษา. 2542. **วิธีสกัดสารจากบัวบกที่เหมาะสม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วันเซ็ง สิทธิกิจโยธิน และ ดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข. 2554. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว. **ว. วิทยาศาสตร์บูรพา**. 16(1):47-55.

วันดี กฤษณพันธ์. 2541. **สมุนไพรน่ารู้**. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ

วุฒิชัย ตรัยศิลานันท์. 2549. **การสกัดสารออกฤทธิ์จากฟ้าทะลายโจรโดยใช้กระบวนการ Gas Anti-Solvent**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราภรณ์ กิตติพันธ์วรกุล. 2556. **การสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตที่มีตัวทำละลายร่วม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวพร สุทธิกรชัย. 2555. **การเพิ่มอัตราการละลายของยาซัลฟาเม็ทท็อกซาโซลด้วยกระบวนการ Gas Anti-Solvent**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริรัตน์ พัชรกิตติกุล, สุธาสินี ฉัตรเงิน และ ธัญวรัตน์ วิวัฒโนดม. 2552. **การศึกษาวิธีการสกัดสารจากบัวบกเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีสารสำคัญในปริมาณสูง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.

ศูนย์รวมข้อมูลสิ่งมีชีวิตในประเทศไทย. 2552. **บัวบก**. แหล่งที่มา: http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=6, 18 ธันวาคม 2555.

สมจิตร วงศ์กำชัย. 2544. **ผลของการใช้คลื่นเหนือเสียงต่อการสกัดสารสำคัญจากบัวบก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมใจ ชัยเจริญกิจ, พิลาวัณย์ มหพันธ์, พวงแก้ว ลคนทินกร, จันทรา ชัยพานิช และ โอทอง สวัสดีมงคล. 2530. **การสกัดสารสำคัญในบัวบก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อินทรา คุ้มญาติ. 2552. **ผลของระดับความแก่อ่อนและแหล่งเพาะปลูกต่อปริมาณกรดไขมัน สารประกอบฟีนอกลิกและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในมะพร้าวน้ำหอมและมะพร้าวกะทิ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ. 2550. **บัวบกสารต้านมะเร็ง**. แหล่งที่มา: http://samoonpri.blogspot.com/2007/10/blog-post_9303.html, 18 ธันวาคม 2555.

Bader, G., V. Wray, U. Jus and K. Hiller. 1998. Enzymatic hydrolysis of the cytotoxic triterpenoid glycoside virgaureasaponin. **Phytochemistry**. 49: 153-156.

Bombardelli, E., G. Patri and R. Pozzi.1992. Complexs of saponins and their aglycons with phosphilipids and pharmaceutical and cosmetic compositions containing them. **US Patent**. 5,166,136.

Bonstem, J.E. 1941. A new heteroside, asiaticoside, isolated from Hydrocotyle asiatica (Umbelliferae). **Bull. Sci. Pharmacol.** 5 : 49-186.

Boonnoun, P., H. Neromeb, S. Machmudahb, M. Gotob and A. Shotipruk. 2013. Supercritical anti-solvent micronization of marigold-derived lutein dissolved in dichloromethane and ethanol. **J Supercrit Fluid.** 77: 103-109.

Brennecke, J.F. and C.A. Eckert . 1989. Phase equilibria for supercritical fluid process design. **Aiche J.** 35: 1409-1427.

Chem Blink. n.d. **Asiatic Acid and Madecasic Acid**. Available Source: http://www.chemblink.com, January 25, 2013.

Chemical book. n.d. **Madecassoside**. Available Source: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6210654.htm, January 25, 2013.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Critical Processes. n.d. **More Details on Supercritical Fluids and Carbondioxide.** Available Source: http://www.criticalprocesses.com/Supercritical%20fluids%20-%20More%20details.htm, March 20, 2013.

Cheng, C.L., J.S. Guo, J. Luk and M.W.L. Koo. 2004. The healing effects of Centella extract and asiaticoside on acetic acid induced gastric ulcers in rats. **Life Sci.** 74(18): 2237-2249.

Choi, J.H., D.H. Kim, W.J. Sung and S.K. Oh. 1982. Kinetic studies on the thermal degradation on ginsenosides in ginseng extract. **Korean J Food Sci Tech.** 14(3): 197-202.

Dahn, L.T., N.D.A. Triet, L.T.N. Han, J. Zhao, R. Mammucari and N. Foster. 2012. Antioxidant activity, yield and chemical composition of lavender essential oil extracted by supercritical CO_2. **J Supercrit Fluid.** 70:27–34.

Danielle Levy Nutrition Consulting. 2013. **Pennywort/Gotu Kola a delicious&medicinal plant.** Available Source: http://daniellelevynutrition.com/2013/02/10/pennywort-aka-gotu-kola-a-delicious-medicinal-plant/, January 8, 2013.

Domingo, C. and J. Saurinac. 2012. An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: Towards green and sustainable pharmaceuticals: A review **Analytica Chimica Acta.** 744: 8-22.

Dunstan, C.A., Y. Noreen, G. Serrano, P.A. Cox, P. Perera and L. Bohlin. 1997. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays. **J Ethnopharmacol.** 57: 35-56.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hamill, F.A., S. Apio, N.K. Mubiru, R. Bukenya-Ziraba, M. Mosango, O.W. Magnyi and D.D. Soejarto. 2003. Traditional herbal drugs of southern Uganda, II: literature analysis and antimicrobial assays. **J Ethnopharmacol**. 84: 57-78.

He, K., G.F. Pauli, B. Zheng, T. Wang, N. Bai, T. Peng, M. Roller and A. Zheng. 2006. Cimicifuga species identification by high performance liquid chromatography-photodiode array/mass spectrometric/evaporative light scattering detection for quality control of black cohosh products. **J Chromatogr A**. 1112 (1-2): 241-254.

Jia, G. and X. Lu. 2008. Enrichment and purification of madecassoside and asiaticoside from Centella asiatica extracts with macroporous resins. **J Chromatogr A**. 1193: 136-141.

Kim, W.J., J. Kim, B. Veriansyah, J.D. Kim, Y.W. Lee, S.G. Oh and R. Raymond. 2009. Extraction of bioactive components from Centella asiatica using subcritical water. **J Supercrit Fluid**. 48: 211-216.

Kormin, S. 2005. **The effect of heat processing on triterpene glycosides and antioxidant activity of herbal pegaga (Centella asiatica L. Urban) drink**. M.E. Thesis, Technological University of Malaysia.

Kwon, H.J., J.H. Park, G.T. Kim and Y.D. Park. 2011. Determination of madecassoside and asiaticoside contents of C. asiatica leaf and C. asiatica-containing ointment and dentifrice by HPLC-coupled pulsed amperometric detection. **Microchem J.** 98: 115-120.

Lepetit, JC. 2005. Madecassoside-immune regulation of psoriasis-like disorders by natural anti-inflammatory active ingredient. **SOFW J.** 131(4): 28,30,32,34.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Leray, C. 2012. **Terpenoids.** Available Source: http://www.cyberlipid.org/cyberlip/home0001.htm, July 21, 2012.

Malpani, A.S. 2009. **Promising Novel Approaches for Oral Delivery of Poorly Soluble Drugs Department of Pharmaceutics, Roland Institute of Pharmaceutical Sciences.** Berhampur, Orissa, India. 7(4).

McHugh, M.A. and V.J. Krukonis1986. **Supercritical fluid extraction: Principles and practice Butterworths.** Boston.

Montechchio, G.P., A. Samaden, S. Carbone, M. Vigotti, S. Siragusa and F. Piovella. 1991. Centella asiatica triterpenic fraction (CATTF) reduces the number of circulating endothelial cells in subjects with post phlebitic syndrome. **Haematologica.** 76: 256-259.

Muangnoi, C. 2007. **Bioaccessibility cellular uptake and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of triterpenoids from Centella asiatica (LINN) urban.** M. Sc. Thesis, Mahidol University.

Niamnuy, C., M. Charoenchaitrakool, P. Mayachiew and S. Devahastin. 2013. Bioactive Compounds and Bioactivities of Centella asiatica (L.) Urban Prepared by Different Drying Methods and Conditions. **Dry Technol.** 31: 2007-2015.

Patel, J.M. 2008. A review of potential health benefits of flovonoids**. J Lethbridge undergraduate research.** 3(2).

Poizot A. and D. Dumez.1978. Modification of the healing kinetics after iterative expresis in the rat. Action of titrated extract of Centella asiatica (TECA) on duration of healing. **CR Hebd Seances Acad Sci D.** 286(10): 789-792.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pramongkit, K.1995. **Active constituents of Centella asiatica (Linn.) Urban in Thailand.** M.Sc. Thesis, Mahidol University.

Ramos, S. 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **J Nutr Biochem.** 18: 427-442.

Raynie, D.E.1997. Chapter 5 Meeting the natural products challenge with supercritical fluids. **Extraction and pollution prevention.** Washington DC. 68-75.

Rizvi, S.S.H., A.L. Benado, J.A. Zollweg and J.A. Daniels. 1986. Supercritical fluid extraction: Fundamental principles and modeling methods. **Food Technol.** 40: 55-65.

Royal Society of Chemistry. 2008. **Supercritical Processing**. Available Source: http://www.rsc.org/Education/EiC/issues/2008November/SupercriticalProcessing.asp, March 20,2013.

Samy, P.R. and S. Ignacimuthu. 2000. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India. **J Ethnopharmacol.** 69: 63-71.

Shukla, A., A.M. Rasik, G.K. Jain, R. Shankar, D.K. Kulshrestha and B.N. Dhawan. 1999. Invitro and invivo wound healing activity of asiaticoside isolated from Centella asiatica.**J Ethnopharmacol.** 65: 1-11.

Sigma-aldrich. n.d. **Asiaticoside.** Available Source: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/43191?lang=en&region=TH, January 25, 2013.

Sing, B. and R.P. Rastogi. 1969. A reinvestigation of triterpenes of Centella asiatica. **Phytochemistry.** 8: 917-921.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Smith, J.M., H.C.V. Ness and M.M. Abbott. 2005. **Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics Seventh Edition in SI Units**. McGraw –Hill. Singapore.

Sribusarakum, A. 1997. **Chromatographic Determination of Active Constituents of Centella asiatica (Linn.) Urban**. M.Sc. Thesis, Mahidol University.

Srivastava, R., Y.N. Shukla and S. Kumar. 1997. Chemistry and pharmacology of Centella asiatica: A review. **J Med Aro Sci**. 19: 1049-1056.

Sunikumar, K.C., S. Parameshwaraiah and H.G. Shirakumar. 1998. Evaluation of topical formulations of aqueous extract of Centella asiatica on upon wounds in rat. **Indian J Exp Biol**. 36: 569-572.

Supawantanakul, S. 2003. **Effects of Asiaticoside on Low Potassium Medium Induced Cell Death in Cultured Rat Cerebellar Granule Neurons**. M.Sc. Thesis, Chulalongkorn University.

Tan, P.V., C.K. Njimi and J.F. Ayafor. 1997. Screening of some African medicinal plants for antiulcerogenic activity: Part 1. **Phytother Res**. 11(1): 45-7

Tsurumi, K., Y. Haramatsu, M. Hayashi and H. Fujimura. 1973. **Effect of madecassol on wound healing**. Oyo Yakuri. 7(6): 833-843.

Yildiz, N., S. Tuna, O. Doker and A. Calimli. 2007. Micronization of salicylic acid and taxol (paclitaxel) by rapid expansion of supercritical fluids (RESS). **J Supercrit Fluid**. 41(3):440-451.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การสร้างกราฟมาตรฐานของสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกทั้ง 4 ชนิด

การเตรียมสารมาตรฐานของสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ มาเดคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก โดยทำการเตรียม Stock Solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จากนั้นนำ Stock Solution มาทำการเตรียมความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จะได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟมา จากนั้นทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ

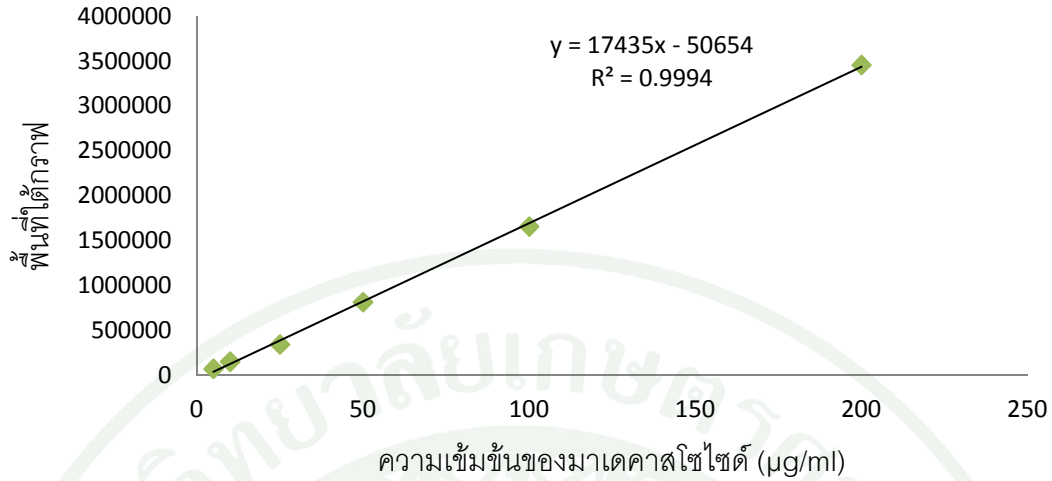
1.1 กราฟมาตรฐานของมาเดคาสโซไซด์ในเอทานอล

จากการนำสารมาตรฐานของมาเดคาสโซไซด์ที่ละลายในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จะได้พื้นที่ใต้กราฟ แสดงดังตารางผนวกที่ ก1 และได้กราฟมาตรฐานของมาเดคาสโซไซด์ดังภาพผนวกที่ ก1

ตารางผนวกที่ ก1 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของมาเดคาสโซไซด์

ความเข้มข้นของมาเดคาสโซไซด์ (µg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ
5	71069
10	150485
25	342547
50	815229
100	1658032
200	3458324

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานของมาเดคาสโซไซด์ในเอทานอล

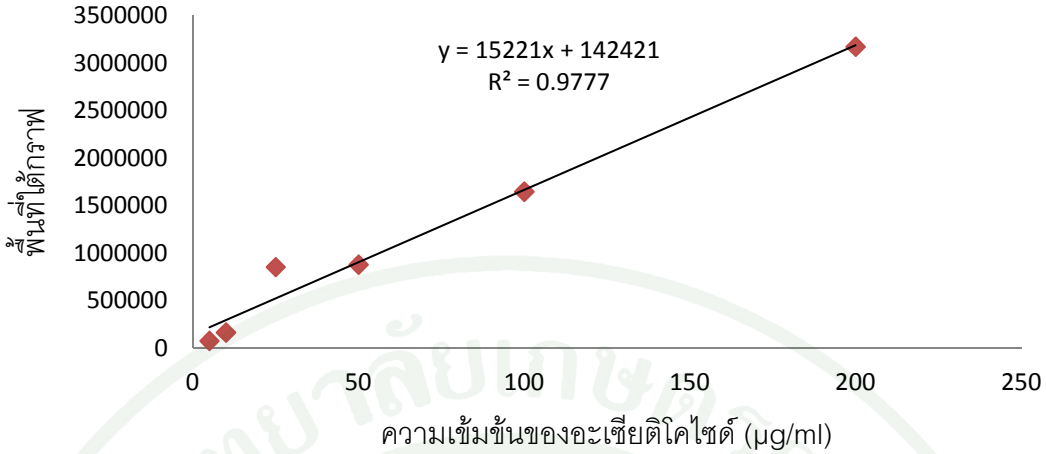
1.2 กราฟมาตรฐานของอะเซียติโคไซด์ในเอทานอล

จากการนำสารมาตรฐานของอะเซียติโคไซด์ที่ละลายในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จะได้พื้นที่ใต้กราฟ แสดงดังตารางผนวกที่ ก2 และได้กราฟมาตรฐานของอะเซียติโคไซด์ดังภาพผนวกที่ ก2

ตารางผนวกที่ ก2 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของอะเซียติโคไซด์

ความเข้มข้นของอะเซียติโคไซด์ (µg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ
5	76593
10	165042
25	853322
50	878684
100	1646475
200	3170511

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานของอะเซียติโคไซด์ในเอทานอล

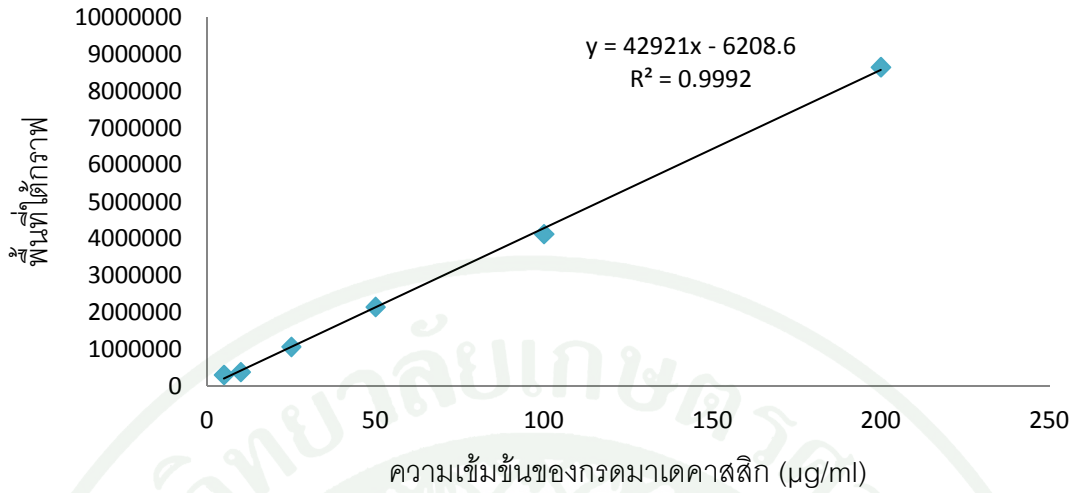
1.3 กราฟมาตรฐานของกรดมาเดคาสสิกในเอทานอล

จากการนำสารมาตรฐานของกรดมาเดคาสสิกที่ละลายในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จะได้พื้นที่ใต้กราฟ แสดงดังตารางผนวกที่ ก3 และได้กราฟมาตรฐานของกรดมาเดคาสสิกดังภาพผนวกที่ ก3

ตารางผนวกที่ ก3 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของกรดมาเดคาสสิก

ความเข้มข้นของกรดมาเดคาสสิก (µg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ
5	309392
10	388515
25	1071279
50	2151447
100	4129141
200	8651983

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก3 กราฟมาตรฐานของกรดมาเดคาสิกในเอทานอล

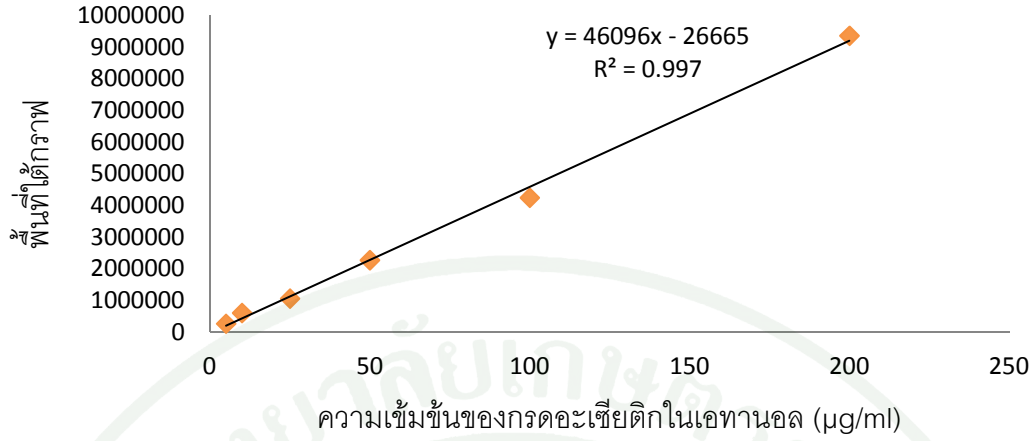
1.4 กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในเอทานอล

จากการนำสารมาตรฐานของกรดอะเซียติกที่ละลายในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จะได้พื้นที่ใต้กราฟ แสดงดังตารางผนวกที่ ก4 และได้กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในเอทานอลดังภาพผนวกที่ ก4

ตารางผนวกที่ ก4 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของกรดอะเซียติกในเอทานอล

ความเข้มข้นของกรดอะเซียติก (µg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ
5	267235
10	607162
25	1062630
50	2275762
100	4244860
200	9359880

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก4 กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในเอทานอล

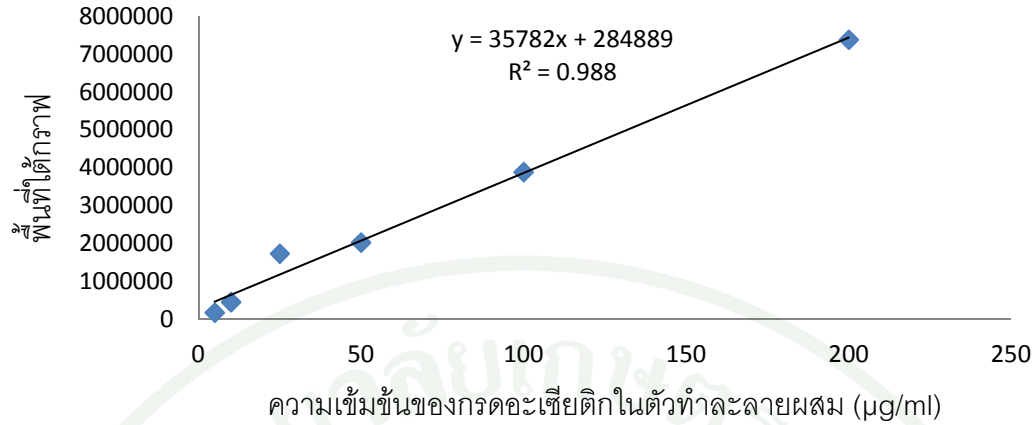
1.5 กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในตัวทำละลายเอทานอลผสมเมทานอลอัตราส่วน 50:50 เปอร์เซ็นต์

จากการนำสารมาตรฐานของกรดอะเซียติกที่ละลายในตัวทำละลายผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จะได้พื้นที่ใต้กราฟ แสดงดังตารางผนวกที่ ก5 และได้กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในตัวทำละลายผสมดังภาพผนวกที่ ก5

ตารางผนวกที่ ก5 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของกรดอะเซียติกในตัวทำละลายผสม

ความเข้มข้นของกรดอะเซียติก (µg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ
5	173160
10	453035
25	1734116
50	2027910
100	3888756
200	7387506

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก5 กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในตัวทำละลายผสม

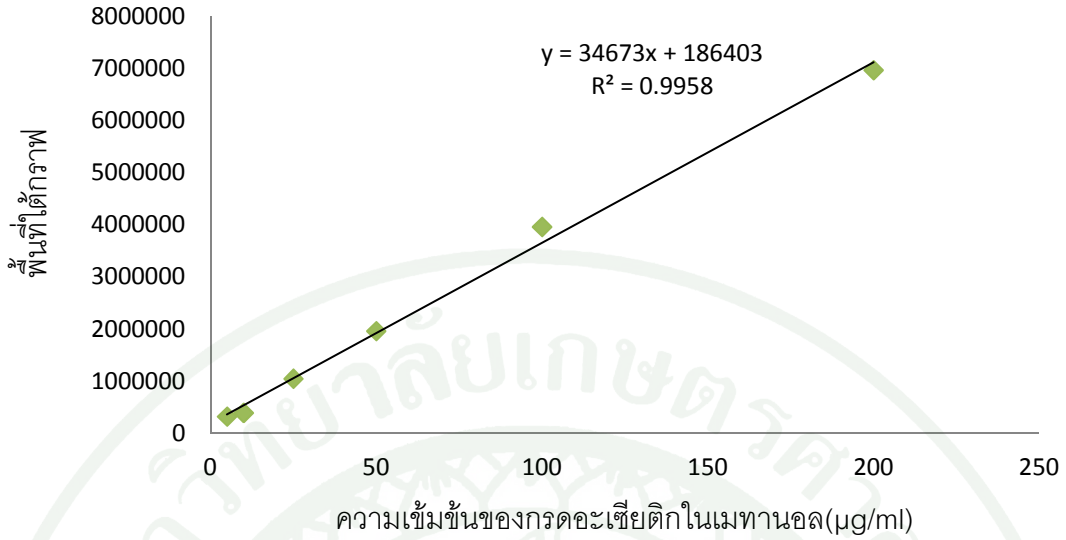
1.6 กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในเมทานอล

จากการนำสารมาตรฐานของกรดอะเซียติกที่ละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จะได้พื้นที่ใต้กราฟ แสดงดังตารางผนวกที่ ก6 และได้กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในเมทานอลดังภาพผนวกที่ ก6

ตารางผนวกที่ ก6 ค่าพื้นที่ใต้กราฟตามความเข้มข้นต่าง ๆ ของกรดอะเซียติกในเมทานอล

ความเข้มข้นของกรดอะเซียติก (µg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ
5	319349
10	389144
25	1045770
50	1959577
100	3959952
200	6967236

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก6 กราฟมาตรฐานของกรดอะเซียติกในเมทานอล

จากกราฟมาตรฐานของสารออกฤทธิ์สำคัญทั้ง 4 ชนิด สามารถนำมาคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS โดยนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะทำให้ทราบถึงปริมาณของสารออกฤทธิ์สำคัญที่ได้ในหน่วยของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

2. การสร้างกราฟมาตรฐานของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

เตรียมสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ DI จากนั้นเจือจางด้วยน้ำ DI ให้มีความเข้มข้น 0.015, 0.03, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากเครื่อง UV Spectrophotometer มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระจากสมการที่ 17 (DPPH Assay) และสมการที่ 18 (ABTS Assay) จากนั้นทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Trolox กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1 กราฟมาตรฐานของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay

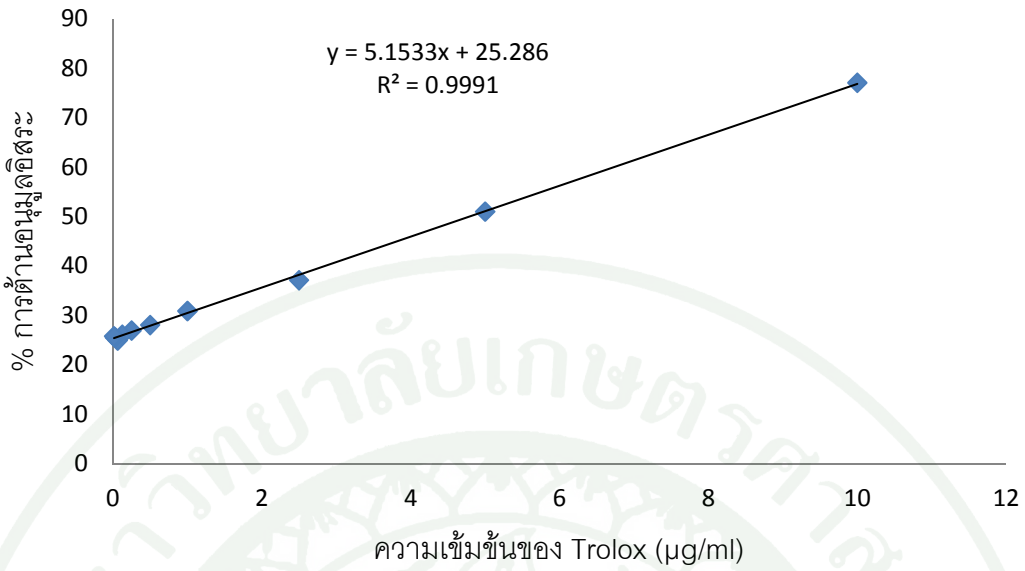
จากการนำสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยวิธี DPPH Assay จะได้ค่าดูดกลืนแสงและเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ แสดงดังตารางผนวกที่ ก7 และได้กราฟมาตรฐานของของการต้านอนุมูลอิสระ ดังภาพผนวกที่ ก7

ตารางผนวกที่ ก7 ค่าดูดกลืนแสงและเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยวิธี DPPH Assay

ความเข้มข้นของ Trolox (µg/ml)	ค่าดูดกลืนแสง	เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ
10	0.081	77.05382
5	0.173	50.9915
2.5	0.222	37.11048
1	0.244	30.87819
0.5	0.254	28.04533
0.25	0.258	26.91218
0.125	0.261	26.06232
0.0625	0.265	24.92918
0.03	0.263	25.49575
0.015	0.262	25.77904

หมายเหตุ ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุมเท่ากับ 0.353

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก7 กราฟมาตรฐานของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay

2.2 กราฟมาตรฐานของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Assay

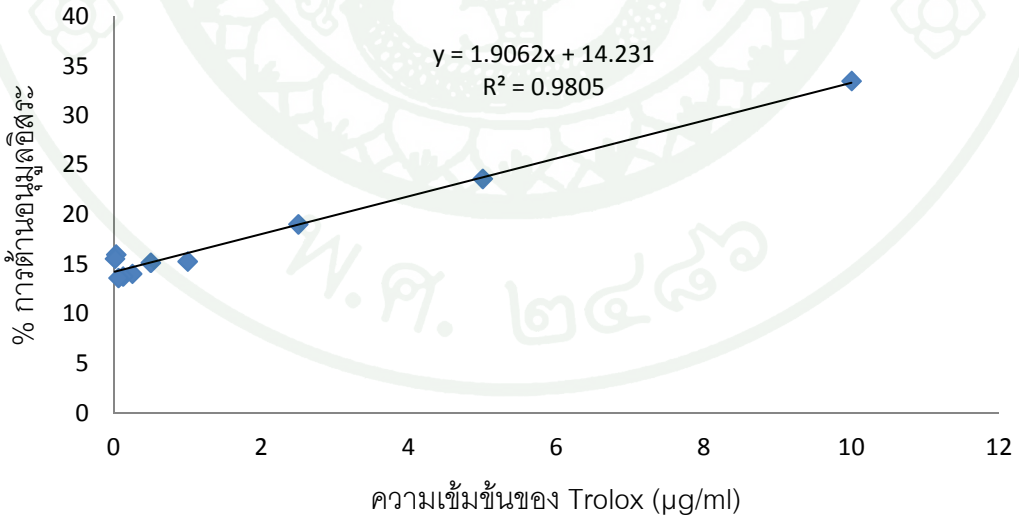
จากการนำสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยวิธี ABTS Assay จะได้ค่าดูดกลืนแสงและเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ แสดงดังตารางผนวกที่ ก8 และได้กราฟมาตรฐานของของการต้านอนุมูลอิสระ ดังภาพผนวกที่ ก8

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก8 ค่าดูดกลืนแสงและเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยวิธี ABTS Assay

ความเข้มข้นของ Trolox (µg/ml)	ค่าดูดกลืนแสง	เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ
10	0.479	33.47222
5	0.55	23.61111
2.5	0.583	19.02778
1	0.61	15.27778
0.5	0.611	15.13889
0.25	0.619	14.02778
0.125	0.621	13.75
0.0625	0.622	13.61111
0.03	0.605	15.97222
0.015	0.608	15.55556

หมายเหตุ ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุมเท่ากับ 0.72



ภาพผนวกที่ ก8 กราฟมาตรฐานของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Assay

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากกราฟมาตรฐานของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี สามารถนำมาคำนวณปริมาณ Trolox เทียบเท่าของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS โดยนำสารตัวอย่างมาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay และวิธี ABTS Assay นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระหลังจากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะทำให้ทราบถึงปริมาณของสาร Trolox เทียบเท่าในหน่วยของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

3. การสร้างกราฟมาตรฐานของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

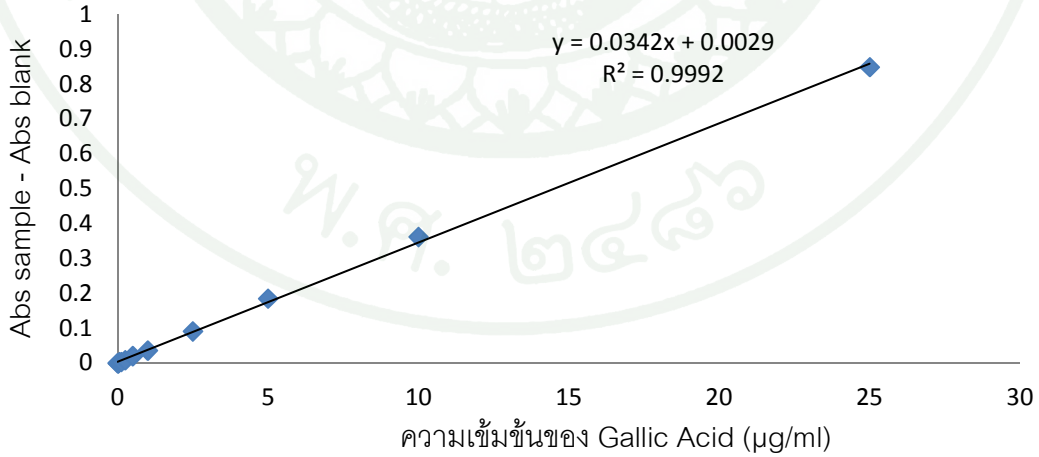
เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิคความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ DI จากนั้นเจือจางด้วยน้ำ DI ให้มีความเข้มข้น 0.015, 0.03, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้มาทำการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากเครื่อง UV Spectrophotometer มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิคกับผลต่างของค่าดูดกลืนแสง (ผลต่างของค่าดูดกลืนแสง = ค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง – ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุม) แสดงดังตารางผนวกที่ ก9 และภาพผนวกที่ ก9 จากกราฟมาตรฐานที่ได้สามารถนำมาคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS โดยนำสารตัวอย่างมาทำการทดสอบด้วยวิธี Total Phenolic Compound Content นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะทำให้ทราบถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ปริมาณ Gallic Acid เทียบเท่า) ในหน่วยของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก9 ค่าดูดกลืนแสงของการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ความเข้มข้นของ Gallic Acid (µg/ml)	ค่าดูดกลืนแสง	ผลต่างของค่าดูดกลืนแสง
0	0.031	0
0.015	0.031	0
0.03	0.031	0
0.0625	0.034	0.003
0.125	0.034	0.003
0.25	0.039	0.008
0.5	0.051	0.02
1	0.067	0.036
2.5	0.122	0.091
5	0.216	0.185
10	0.393	0.362
25	0.88	0.849

หมายเหตุ ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุมเท่ากับ 0.031



ภาพผนวกที่ ก9 กราฟมาตรฐานของการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

การคำนวณหาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ ปริมาณ Trolox เทียบเท่า
และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การคำนวณหาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณมาเดคาสโซไซด์จากการตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการแช่ด้วยเอทานอล 100 % ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และใช้อัตราการไหล 3 มิลลิลิตรต่อนาที นำตะกอนสารที่ได้ทั้ง 2 ส่วน คือ ส่วนที่ติดอยู่กับ Filter และส่วนที่ติดอยู่กับ Jerguson มาชะตะกอนด้วยเอทานอล และนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จะได้พื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 3316197 และ 3512195 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของมาเดคาสโซไซด์จะได้ความเข้มข้นของมาเดคาสโซไซด์เท่ากับ 193.1 และ 204.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หาปริมาณสารในหน่วยไมโครกรัมโดยนำความเข้มข้นที่ได้มาคูณกับ 10 ซึ่งเป็นปริมาณเอทานอลที่นำมาชะตะกอนในขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง จะได้ 1,931 และ 2,044 ไมโครกรัม (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร) ตามลำดับ และสามารถเปลี่ยนปริมาณสารที่ได้เป็นหน่วยไมโครกรัมต่อกรัม (ผงบัวบก) โดยคำนวณจากสมการดังต่อไปนี้

Filter : $$\frac{M}{v} \times \frac{V}{w} = \frac{1931\ \mu g}{5\ ml} \times \frac{305\ ml}{5\ g} = 2{,}355.8 \frac{\mu g}{g_{\text{ผงบัวบก}}}$$

Jerguson : $$\frac{M}{v} \times \frac{V}{w} = \frac{2044\ \mu g}{5\ ml} \times \frac{305\ ml}{5\ g} = 2{,}493.7 \frac{\mu g}{g_{\text{ผงบัวบก}}}$$

เมื่อปริมาณสารที่ได้จากทั้ง 2 ส่วน มารวมกันจะได้ 2,355.8+2,493.7 = 4849.5 µg/g

โดยที่ M คือ ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญในหน่วยไมโครกรัม
v คือ ปริมาตรสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร ที่ใช้ในการตกตะกอน
V คือ ปริมาตรสารสกัดที่ได้จากการแช่ที่กรองออกมาได้ทั้งหมด
w คือ น้ำหนักของผงบัวบกที่ใช้ในการแช่

ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญของสารที่ตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลอง ต่าง ๆ แสดงดังตารางผนวกที่ ข1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญของสารที่ตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ

Run	S (%)	T (°C)	F (ml/ min)	V (ml)	มาเดคาสโซไซด์		อะเซียติโคไซด์		กรดมาเดคาสสิก		กรดอะเซียติก	
					µg*	µg/g	µg*	µg/g	µg*	µg/g	µg*	µg/g
1	100	45	6	37	2610	3863	1101	1630	2101	3110	792	1172
2	100	25	6	34	2761	3700	1250	1674	2467	3306	1021	1368
3	100	35	3	31	3975	4849	1740	2123	1168	1424	415	506
4	100	35	9	30	3599	4319	1546	1856	878	1053	279	335
5	50	45	3	31	4341	5383	2174	2696	2258	2800	794	985
6	50	25	3	32	4700	6016	2264	2898	2708	3466	1104	1412
7	50	25	9	31	4463	5534	2191	2717	2698	3346	871	1080
8	50	45	9	30	4331	5197	2103	2523	2176	2611	738	886
9	50	35	6	35	5373	7522	2636	3691	2990	4186	955	1336
10	50	35	6	33	4470	5901	2193	2895	2832	3739	1144	1510
11	50	35	6	33	4993	6591	2390	3155	2886	3810	1213	1601
12	0	45	6	31	5403	6591	2661	3246	2076	2532	741	904
13	0	35	3	30	3893	4672	1872	2246	2439	2927	926	1111
14	0	35	9	29	6043	7010	3055	3544	1179	1368	413	479
15	0	25	6	28	6236	6984	3033	3397	1407	1576	495	554
16	100	45	6	33	2554	3371	1099	1450	1929	2546	723	954
17	100	25	6	29	2587	3000	1115	1294	2226	2582	883	1024
18	100	35	3	33	2624	3464	1122	1481	2292	3026	931	1229
19	100	35	9	32	3396	4346	1487	1903	1384	1772	517	662
20	50	45	3	32	5053	6467	2547	3260	1612	2063	667	854
21	50	25	3	31	6056	7389	3055	3727	1611	1966	777	947
22	50	25	9	33	5712	7426	2872	3734	1772	2304	851	1106

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

Run	S (%)	T (°C)	F (ml/ min)	V (ml)	มาเดคาสโซไซด์		อะเซียติโคไซด์		กรดมาเดคาสสิก		กรดอะเซียติก	
					µg*	µg/g	µg*	µg/g	µg*	µg/g	µg*	µg/g
23	50	45	9	32	6131	7848	2947	3772	1424	1823	544	697
24	50	35	6	31	4970	6163	2576	3195	1413	1752	697	864
25	50	35	6	31	5483	6799	2859	3545	1504	1865	739	916
26	50	35	6	31	5834	7234	2950	3658	1457	1807	714	886
27	0	45	6	31	4237	5254	2135	2647	1200	1488	342	424
28	0	35	3	32	4533	5802	2291	2933	1835	2349	605	775
29	0	35	9	31	4694	5821	2390	2964	1791	2221	609	755
30	0	25	6	31	5747	7127	2874	3564	1774	2200	623	773
31	100	45	6	31	2274	2820	1079	1338	1196	1483	418	518
32	100	25	6	29	3010	3431	1361	1552	1214	1384	434	495
33	100	35	3	34	2938	3937	1262	1691	2007	2690	836	1120
34	100	35	9	32	3913	5009	1532	1961	821	1051	229	293
35	50	45	3	27	5414	5847	2752	2972	1197	1292	270	292
36	50	25	3	28	5659	6225	2877	3165	1878	2066	551	606
37	50	25	9	31	4500	5490	2263	2761	1455	1775	517	631
38	50	45	9	32	4729	6053	2322	2972	2546	3259	933	1194
39	50	35	6	30	4405	5287	2173	2608	2237	2684	983	1179
40	50	35	6	29	4871	5650	2495	2894	1281	1486	500	580
41	50	35	6	27	4099	4427	2084	2251	1407	1519	415	448
42	0	45	6	26	5708	5936	2959	3078	879	914	172	179
43	0	35	3	29	5049	5857	2590	3004	1771	2054	659	764
44	0	35	9	30	4967	5961	2479	2975	2826	3391	1117	1341
45	0	25	6	27	5501	5831	2869	3041	1917	2032	645	684

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

Run	S (%)	T (°C)	F (ml/ min)	V (ml)	มาเดคาสโซไซด์		อะเซียติโคไซด์		กรดมาเดคาสสิก		กรดอะเซียติก	
					µg*	µg/g	µg*	µg/g	µg*	µg/g	µg*	µg/g
O1.1	21.21	25	9	29	5201	6034	2670	3097	1561	1811	576	668
O1.2	21.21	25	9	28	6275	7028	3152	3530	1356	1519	772	865
O1.3	21.21	25	9	31	5724	7097	3023	3748	1764	2187	547	678
O2.1	0	25	3	29	5840	6774	2951	3423	1576	1828	505	586
O2.2	0	25	3	30	5791	6949	2963	3555	1593	1912	465	558
O2.3	0	25	3	29	6113	7091	3094	3589	1867	2166	577	669
O3.1	50.50	29.24	4.576	33	6183	8162	3139	4143	1393	1839	430	568
O3.2	50.50	29.24	4.576	32	5587	7151	2801	3585	1364	1746	424	542
O3.3	50.50	29.24	4.576	30	6099	7318	3140	3768	1548	1857	455	546
O4.1	26.26	25	9	28	5887	6594	2972	3329	1474	1651	403	451
O4.2	26.26	25	9	25	6065	6065	3071	3071	1926	1926	441	441
O4.3	26.26	25	9	25	6484	6484	3351	3351	2290	2290	595	595

หมายเหตุ µg* คือหน่วยไมโครกรัมต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร

การทดลองที่ 1-15 คือการทดลองซ้ำที่ 1

การทดลองที่ 16-30 คือการทดลองซ้ำที่ 2

การทดลองที่ 31-45 คือการทดลองซ้ำที่ 3

การทดลองที่ O1.1-O1.3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์

การทดลองที่ O2.1-O2.3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิก

การทดลองที่ O3.1-O3.3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก

การทดลองที่ O4.1-O4.3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของสารออกฤทธิ์สำคัญทั้งหมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การคำนวณหาปริมาณ Trolox เทียบเท่า และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การคำนวณหาปริมาณ Trolox เทียบเท่า ทำได้โดยนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี (DPPH Assay และ ABTS Assay) มาหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระจากสมการที่ 17 และ 18 แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานการต้านอนุมูลอิสระ จะได้ความเข้มข้นของ Trolox หน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำความเข้มข้นที่ได้มาคูณกับจำนวนเท่าของการเจือจางและคูณ 10 ซึ่งเป็นปริมาณเอทานอลที่นำมาชะตะกอนในขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง ดังสมการ

$$C \times X \times 10 = 1041\ \frac{\mu g}{ml} \times 60 \text{ เท่า} \times 10ml = 6246\ \mu g$$

โดยที่ C คือความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

X คือจำนวนเท่าที่ใช้ในการเจือจางสารตัวอย่าง

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยไมโครกรัม สามารถคำนวณแบบเดียวกันกับการหาปริมาณ Trolox เทียบเท่า แสดงดังตารางผนวกที่ ข2 และ ข3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 ปริมาณ Trolox เทียบเท่าของการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารที่ตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ (ต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากการแช่ 5 มิลลิลิตร)

Run	S	T	F	X	ตะกอนของ	DPPH (µg)			ABTS (µg)			Phenolic (µg)		
	(%)	(°C)	(ml/min)	(เท่า)	สารติดอยู่ที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	100	45	6	60	Filter	625	705	600	1834	1681	1301	493	440	440
					Jerguson	280	401	488	1342	1232	545	318	282	300
2	100	25	6	60	Filter	593	492	628	1118	1681	1212	440	423	423
					Jerguson	374	431	431	1118	1187	1034	388	388	388
3	100	35	3	60	Filter	687	583	741	1386	1771	1745	563	581	511
					Jerguson	656	583	713	1342	1771	1123	458	475	458
4	100	35	9	60	Filter	374	553	938	1252	1906	1212	440	405	405
					Jerguson	500	553	741	1342	1636	1212	511	493	475
5	50	45	3	120	Filter	1500	1652	1707	4295	4172	3313	1091	1056	1056
					Jerguson	1312	1409	1425	4833	3723	3046	986	951	846
6	50	25	3	120	Filter	1875	1470	1875	4654	4352	4646	1196	1161	1091
					Jerguson	2126	1592	1819	4475	4442	4558	1407	1337	1267

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Run	S	T	F	X	ตะกอนของ	DPPH (µg)			ABTS (µg)			Phenolic (µg)		
	(%)	(°C)	(ml/min)	(เท่า)	สารติดอยู่ที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
7	50	25	9	120	filter	1562	2078	1819	4922	5162	3935	1337	1337	1302
					jerguson	1813	1592	1707	4654	4622	3046	1091	951	986
8	50	45	9	120	filter	1500	1531	1650	4027	3453	3224	1021	916	1021
					jerguson	1500	1227	1650	7072	2913	3579	986	881	951
9	50	35	6	120	filter	2627	2200	2213	6355	5791	4380	1758	1618	1582
					jerguson	1875	1896	1875	4743	5072	3313	1161	1267	1126
10	50	35	6	120	filter	2689	1044	1988	5101	4712	4469	1372	1196	1407
					jerguson	1750	801	1594	4475	3183	3935	811	1232	1091
11	50	35	6	120	filter	2627	1409	2044	5908	6061	5091	1582	1582	1512
					jerguson	1625	1166	1763	4206	4622	3757	1232	1196	1196
12	0	45	6	120	filter	2439	2017	2100	5281	4712	4558	1582	1302	1407
					jerguson	2251	2260	2269	4295	4622	3935	1477	1337	1442
13	0	35	3	120	filter	1750	2078	2382	4116	4622	4380	1196	1232	1547
					jerguson	2001	2139	2213	5191	4532	4291	1407	1407	1407

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Run	S	T	F	X	ตะกอนของ	DPPH (µg)			ABTS (µg)			Phenolic (µg)		
	(%)	(°C)	(ml/min)	(เท่า)	สารติดอยู่ที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
14	0	35	9	120	Filter	3503	2808	2550	5639	4982	4202	2074	1793	1688
					Jerguson	3065	2808	2607	4743	5432	4380	1758	1723	1477
15	0	25	6	120	Filter	3566	3173	3169	6982	5611	5447	2144	1898	2004
					Jerguson	2564	2869	2663	4385	4442	4913	1688	1582	1618
16	100	45	6	60	Filter	371	898	656	2301	1448	1547	458	423	405
					Jerguson	371	898	547	1044	1538	1367	335	282	265
17	100	25	6	60	Filter	343	946	465	1269	1673	1726	388	405	353
					Jerguson	484	970	520	1762	1628	1951	405	405	353
18	100	35	3	60	Filter	513	874	492	1583	1718	2086	493	546	458
					Jerguson	371	826	547	1044	1358	1412	370	353	318
19	100	35	9	60	Filter	569	946	329	1403	1538	1636	475	493	458
					Jerguson	598	946	738	1269	1358	1726	475	440	493
20	50	45	3	120	Filter	2159	2416	1039	3794	5680	4892	1407	1372	1372
					Jerguson	1252	1748	985	2268	3435	3273	951	775	775

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Run	S	T	F	X	ตะกอนของ	DPPH (µg)			ABTS (µg)			Phenolic (µg)		
	(%)	(°C)	(ml/min)	(เท่า)	สารติดอยู่ที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
21	50	25	3	120	filter	2102	2655	2348	4872	6309	6151	1512	1618	1442
					jerguson	1989	2512	1366	3615	5950	7051	1477	1477	1372
22	50	25	9	120	filter	1762	2416	1803	4154	5231	5162	1372	1442	1337
					jerguson	1819	2512	1912	3974	5591	4892	1337	1477	1372
23	50	45	9	120	filter	2215	2703	2239	7297	6489	5971	1618	1688	1618
					jerguson	1649	2082	1585	3974	4423	4172	1126	1091	1126
24	50	35	6	120	filter	1875	2225	2021	5501	5770	6061	1512	1477	1477
					jerguson	1309	1939	1585	4064	4064	4442	1021	1021	1091
25	50	35	6	120	filter	2102	2750	2675	5231	6219	5162	1653	1828	1653
					jerguson	1535	2225	1857	4333	5501	4172	1232	1196	1196
26	50	35	6	120	filter	1479	2369	1530	6938	5411	4712	1372	1337	1337
					jerguson	1989	2416	2184	5860	5770	5342	1477	1442	1442
27	0	45	6	120	filter	1252	2034	1312	3256	3256	4622	916	951	846
					jerguson	1989	2607	1585	3705	4603	4622	1372	1407	1302

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Run	S	T	F	X	ตะกอนของ	DPPH (µg)			ABTS (µg)			Phenolic (µg)		
	(%)	(°C)	(ml/min)	(เท่า)	สารติดอยู่ที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
28	0	35	3	120	filter	1309	2607	2184	4693	4962	5432	1653	1477	1512
					jerguson	1819	2369	1475	3615	5231	4802	1372	1337	1337
29	0	35	9	120	filter	1875	2703	2075	3705	5591	5522	1372	1512	1407
					jerguson	1932	2703	2239	4064	8734	5611	1582	1653	1582
30	0	25	6	120	filter	2895	3418	3112	5231	7926	7770	2214	2109	2109
					jerguson	1989	2750	2348	3794	5860	5611	1512	1512	1372
31	100	45	6	70	filter	500	429	602	2046	921	1899	473	432	473
					jerguson	377	619	493	1209	1026	1847	411	370	350
32	100	25	6	70	filter	592	492	566	2412	2445	2266	493	514	473
					jerguson	592	397	385	2046	1814	2633	411	432	391
33	100	35	3	70	filter	377	651	854	1784	1341	1847	534	514	493
					jerguson	438	239	133	1941	1184	2056	452	452	370
34	100	35	9	70	filter	285	682	782	2831	2077	2423	718	637	370
					jerguson	285	334	782	1941	1762	1532	350	391	657

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Run	S	T	F	X	ตะกอนของ	DPPH (µg)			ABTS (µg)			Phenolic (µg)		
	(%)	(°C)	(ml/min)	(เท่า)	สารติดอยู่ที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
35	50	45	3	60	filter	2304	1637	1416	3121	2176	3244	1160	1125	1142
					jerguson	2211	1962	1473	3705	2491	2930	1265	1247	1247
36	50	25	3	60	filter	1403	1236	1658	3951	2861	3289	1300	1212	1230
					jerguson	2430	2240	2863	4668	4753	4726	2019	1861	1932
37	50	25	9	60	filter	1640	1616	2245	4713	3041	8409	1475	1300	1318
					jerguson	1877	2132	3264	4982	4437	5310	1581	1668	1598
38	50	45	9	60	filter	929	938	1658	2606	2636	3783	967	932	1002
					jerguson	1535	938	2276	4399	3627	4232	1440	1405	1458
39	50	35	6	60	filter	1192	1318	1813	3772	2636	3424	1265	1177	1195
					jerguson	1087	1182	1813	3861	2771	3559	1160	1107	1125
40	50	35	6	60	filter	2141	2051	2307	5789	5113	4412	1598	1598	1563
					jerguson	1561	1453	1535	3906	3357	3738	1142	1177	1107
41	50	35	6	60	filter	1561	1643	1875	4668	4032	4008	1318	1247	1300
					jerguson	1377	1453	1597	4041	4167	4502	1125	1142	1142

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Run	S	T	F	X	ตะกอนของ	DPPH (µg)			ABTS (µg)			Phenolic (µg)		
	(%)	(°C)	(ml/min)	(เท่า)	สารติดอยู่ที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
42	0	45	6	60	filter	1640	2376	2925	4489	4798	775	1511	1914	1914
					jerguson	1667	2403	2430	4713	4527	4547	1633	1704	1581
43	0	35	3	60	filter	3670	2760	2362	3525	4335	4367	2511	1879	1914
					jerguson	2118	1696	1817	3705	3121	3649	1458	1493	1581
44	0	35	9	60	filter	2009	2648	2708	6058	5879	5445	2177	2230	2107
					jerguson	1667	2268	2214	5745	5969	4861	1844	1844	1826
45	0	25	6	60	filter	3856	3469	3452	5234	3975	4951	2142	2423	2528
					jerguson	2056	1578	1674	3435	2581	3155	1300	1335	1388
O1.1	21.21	25	9	120	filter	1571	1995	2791	3237	3092	4115	1442	1512	1477
					jerguson	1874	1692	2791	3506	3452	3936	1407	1547	1442
O1.2	21.21	25	9	120	filter	2844	3026	2368	4582	4351	2861	2074	2179	1161
					jerguson	1935	2177	2227	3775	3542	2861	1653	1688	1196
O1.3	21.21	25	9	120	filter	1389	1753	1592	3147	3362	4026	1442	1477	1477
					jerguson	1995	1935	3003	3775	2642	4026	1793	1653	1793

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Run	S	T	F	X	ตะกอนของ	DPPH (µg)			ABTS (µg)			Phenolic (µg)		
	(%)	(°C)	(ml/min)	(เท่า)	สารติดอยู่ที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
O2.1	0	25	3	120	filter	2541	3087	3567	3775	3182	3488	2004	2039	2635
					jerguson	1692	2238	2368	3954	3362	3130	1477	1547	1547
O2.2	0	25	3	120	filter	1874	2420	2368	3147	3632	3578	1688	1793	1582
					jerguson	2480	2784	2650	3058	4261	3846	1653	1863	1653
O2.3	0	25	3	120	filter	2602	3087	3497	3685	4531	2861	1933	1968	1828
					jerguson	843	1389	1803	3775	2373	2951	986	1021	1021
O3.1	50.50	29.24	4.576	120	filter	1449	2298	2368	3416	3272	3578	1337	1618	1442
					jerguson	1571	1995	2086	3237	2552	3041	1407	1442	1302
O3.2	50.50	29.24	4.576	120	filter	1449	1753	1874	3058	2822	2861	1302	1407	1302
					jerguson	1207	1449	1662	3596	2552	2503	1232	1337	1232
O3.3	50.50	29.24	4.576	120	filter	1874	2238	2227	3596	4081	3936	1582	1758	1582
					jerguson	1631	2238	1733	3685	4081	3757	1547	1688	1547

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข3 ปริมาณ Trolox เทียบเท่าของการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 5 มิลลิลิตร

Run	Solvent	X	DPPH (µg)			ABTS (µg)			Phenolic (µg)		
	(%)	(เท่า)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	100	960	2494	2719	3002	10375	12013	10049	2400	2400	2400
2	100	960	2744	3448	3227	12167	17769	12183	2821	2681	2540
3	100	960	2994	2962	3002	11450	15970	11828	2821	2540	2681
4	100	960	3245	2962	752	15391	17049	12183	3242	2821	2821
5	50	960	6250	4421	6377	20048	19208	18942	4225	4505	4365
6	50	960	6250	5880	5027	22555	24964	19653	4646	5768	4646
7	50	960	6750	4907	5702	22197	18129	19653	4505	4505	4505
8	50	960	6750	5151	5927	22914	15610	20009	4505	3944	4505
9	50	960	7001	5151	5702	20048	20287	17875	5067	4505	4786
10	50	960	7001	6123	5927	21122	21367	17519	4786	5488	3804
11	50	960	7001	4178	5702	18615	21726	21787	4926	4365	4505
12	0	960	10506	9528	9527	21839	26403	24633	6751	7172	6891
13	0	960	11258	8556	9752	24705	27123	22499	7172	7172	7593
14	0	960	13010	12690	12002	24346	30720	27478	7312	8154	7593
15	0	960	11508	10744	11102	23272	26763	24633	6751	7874	7593
16	100	960	2516	4511	2412	16615	13741	9494	2260	2260	1698
17	100	960	2062	4893	3066	16974	11226	11293	1979	1979	1979
18	100	960	1836	4129	3066	11226	13741	13811	1839	1979	1698
19	100	960	2516	5084	2630	13381	11944	11293	2400	2119	2540
20	50	960	6368	6229	5684	21644	18411	17769	5628	4365	4926
21	50	960	6368	7374	5247	22722	20566	23165	6330	5488	5067
22	50	960	5462	6993	5247	19129	19848	19568	4646	5347	5207
23	50	960	5915	6420	5029	20926	18411	23885	5488	5909	6049

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข3 (ต่อ)

Run	Solvent	X	DPPH (µg)			ABTS (µg)			Phenolic (µg)		
	(%)	(เท่า)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
24	50	960	5689	5275	6993	21644	20566	22806	5067	4926	5347
25	50	960	7502	6993	5466	23440	23440	19927	4646	5768	4926
26	50	960	7728	4511	6338	22003	22003	21007	5067	5347	4926
27	0	960	11128	8901	13319	30266	23800	36117	8856	6751	9979
28	0	960	10448	11383	8083	28829	28111	27483	8154	8154	7032
29	0	960	9541	10428	10483	27033	24159	28562	7593	8014	8014
30	0	960	9088	11192	8302	28470	29188	24245	7172	8575	7032
31	100	960	2163	3159	4125	13670	7397	14100	2681	2540	2681
32	100	960	1952	2073	1160	14387	11000	17333	2119	2400	2260
33	100	960	1952	2073	4372	10800	8118	11944	2260	2400	2260
34	100	960	3427	1856	666	11876	11721	13381	3804	2961	2540
35	50	900	4704	9397	5455	14972	15984	23323	4618	8171	4882
36	50	900	4991	3979	6183	19206	15717	18271	5539	5145	5276
37	50	900	4596	4997	9195	19878	12339	12882	5013	4882	4750
38	50	900	4003	3776	8037	18869	14366	19281	5145	4882	4618
39	50	900	4398	5201	8037	16179	13690	17260	4882	4882	4882
40	50	900	5781	4590	5489	20551	15379	20965	4882	3961	4750
41	50	900	6374	5811	7805	21560	17743	18607	4618	5013	4618
42	0	950	9648	7853	9706	26663	20868	24263	7931	7375	7653
43	0	950	10127	8281	8937	17584	17584	21774	7236	7514	6958
44	0	950	7563	10647	9461	27373	25147	25329	8069	7653	7931
45	0	950	10127	4304	9164	24704	15804	17864	7375	5153	7514
O1.1	21.21	960	16447	20328	18378	25896	27613	32204	10695	12379	12379
O1.2	21.21	960	14021	17417	13298	18005	32649	21459	11537	12379	8168

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข3 (ต่อ)

Run	Solvent (%)	X (เท่า)	DPPH (µg)			ABTS (µg)			Phenolic (µg)		
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
O1.3	21.21	960	14021	15476	12169	32352	21139	32921	10414	10975	8730
O2.1	0	960	16447	19843	20636	32352	34088	47964	12940	13782	13782
O2.2	0	960	16932	22753	15151	33787	33369	37935	13782	14905	12660
O2.3	0	960	21783	21783	17066	33070	36966	32921	13502	14344	13221
O3.1	50.50	960	8199	13051	9883	18722	27613	20743	9291	10695	7888
O3.2	50.50	960	13051	14021	9404	20874	30491	20026	8730	9572	8449
O3.3	50.50	960	10140	14021	10362	18722	26894	24324	8168	9853	7607

หมายเหตุ การทดลองที่ 1-15 คือการทดลองซ้ำที่ 1

การทดลองที่ 16-30 คือการทดลองซ้ำที่ 2

การทดลองที่ 31-45 คือการทดลองซ้ำที่ 3

การทดลองที่ O1.1-O1.3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และอะเซียติโคไซด์

การทดลองที่ O2.1-O2.3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิก

การทดลองที่ O3.1-O3.3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก

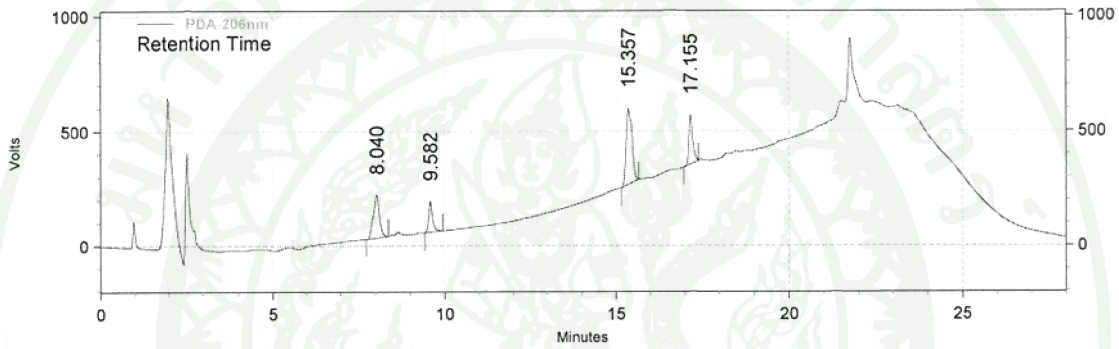
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตรแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญด้วยเทคนิค HPLC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญด้วยเทคนิค HPLC ของสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และสารที่ตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS จะได้โครมาโตแกรม แสดงดังภาพผนวกที่ ค1 โดยที่มาเดคาสโซไซด์มี Retention Time ประมาณ 8 นาที อะเซียติโคไซด์มี Retention Time ประมาณ 9 นาที กรดมาเดคาสสิกมี Retention Time ประมาณ 15 นาที และกรดอะเซียติกมี Retention Time ประมาณ 17 นาที ซึ่งค่าพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรมของสารที่ตกตะกอนได้ในแต่ละสภาวะการทดลอง แสดงดังตารางผนวกที่ ค1 และค่าพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรมของสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แสดงดังตารางผนวกที่ ค2



ภาพผนวกที่ ค1 โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 พื้นที่ใต้กราฟของสารที่ตกตะกอนด้วยกระบวนการ GAS ที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ (กลั้วสารที่ตกตะกอนใน Filter และ Jerguson ด้วยเอทานอลอย่างละ 10 ml)

Run	S (%)	T (°C)	F (ml/min)	ตะกอนของสารติดอยู่ที่	พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม			
					มาเดคาสโซไซด์	อะเซียติโคไซด์	กรดมาเดคาสสิก	กรดอะเซียติก
1	100	45	6	filter	2421642	1155711	7252776	2975847
				jerguson	2027359	805092	1753936	619886
2	100	25	6	filter	2355830	1100700	6158031	2671433
				jerguson	2356571	1086168	4418533	1980854
3	100	35	3	filter	3316197	1476767	3792722	1394784
				jerguson	3512195	1456715	1206240	463825
4	100	35	9	filter	2455874	1074634	2725487	920583
				jerguson	3718260	1564129	1028486	311749
5	50	45	3	filter	3698956	1811937	6855075	2583050
				jerguson	3768436	1782414	2825514	1025201
6	50	25	3	filter	3697233	1679068	5576288	2521982
				jerguson	4396061	2051594	6032509	2511378
7	50	25	9	filter	3906953	1851186	7190569	2453054
				jerguson	3772621	1768568	4377644	1508380
8	50	45	9	filter	3686098	1749449	6181068	2244479
				jerguson	3763257	1736220	3144837	1104813
9	50	35	6	filter	5014100	2283641	7823048	2736616
				jerguson	4252594	2013823	4998336	1610239
10	50	35	6	filter	4042357	1820352	5533663	2712614
				jerguson	3650430	1802323	6611223	2507748
11	50	35	6	filter	4520011	2079918	8006464	3837126
				jerguson	4084378	1843205	4369266	1700013

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

Run	S (%)	T (°C)	F (ml/min)	ตะกอนของสารติดอยู่ที่	พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม			
					มาเดคาสโซไซด์	อะเซียติโคไซด์	กรดมาเดคาสสิก	กรดอะเซียติก
12	0	45	6	filter	4264716	1983808	5307118	2179637
				jerguson	5053566	2351237	3590069	1183901
13	0	35	3	filter	3263984	1469180	4962472	1991976
				jerguson	3422199	1664982	5492912	2223345
14	0	35	9	filter	4871837	2350781	1773863	618401
				jerguson	5562864	2583816	3275801	1233051
15	0	25	6	filter	6595382	2890660	2015865	771530
				jerguson	4175271	2010947	4009422	1455580
16	100	45	6	filter	2377788	1139155	6455288	2572004
				jerguson	1973575	818165	1810889	705462
17	100	25	6	filter	2115789	955184	5677395	2401325
				jerguson	2292523	1027196	3864197	1615604
18	100	35	3	filter	2407361	1098375	6998064	3076946
				jerguson	2066997	894059	2828863	1161565
19	100	35	9	filter	2503419	1171796	4579048	1846772
				jerguson	3315458	1376159	1350331	482595
20	50	45	3	filter	5337903	2501514	5217905	2167286
				jerguson	3370038	1660241	1687240	855646
21	50	25	3	filter	5324077	2489852	3768954	1844274
				jerguson	5133911	2445126	3133675	1682125
22	50	25	9	filter	4472728	2095005	5244967	2484059
				jerguson	5385127	2561782	2350174	1384699
23	50	45	9	filter	6417107	2992547	4379216	1476077
				jerguson	4171017	1777976	1720737	980152

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

Run	S (%)	T (°C)	F (ml/min)	ตะกอนของสารติดอยู่ที่	พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม			
					มาเดคาสโซไซด์	อะเซียติโคไซด์	กรดมาเดคาสสิก	กรดอะเซียติก
24	50	35	6	filter	4680443	2309176	4578985	2098618
				jerguson	3883478	1897128	1474524	1059215
25	50	35	6	filter	5247016	2577474	4813286	2302122
				jerguson	4211909	2058711	1628690	1049910
26	50	35	6	filter	4711478	2251087	4437692	2124009
				jerguson	5359204	2524321	1805015	1115895
27	0	45	6	filter	2988616	1403131	2790993	793737
				jerguson	4297036	2130732	2346877	729285
28	0	35	3	filter	4608939	2111055	3914444	1252206
				jerguson	3192307	1661020	3949767	1484667
29	0	35	9	filter	4088822	1901970	3880573	1297737
				jerguson	3994319	2021419	3794919	1455158
30	0	25	6	filter	6161399	2807829	3586489	1231698
				jerguson	3757555	1851639	4016409	1587379
31	100	45	6	filter	2134135	1101851	3992253	1527815
				jerguson	1729979	825828	1127040	344704
32	100	25	6	filter	2765578	1253640	3142377	1209515
				jerguson	2381059	1103469	2057818	739993
33	100	35	3	filter	2524188	1104360	5667220	2955229
				jerguson	2496626	1101667	2936003	844127
34	100	35	9	filter	2728106	1099945	2083715	550988
				jerguson	3992917	1516399	1427715	451782
35	50	45	3	filter	4712061	2154983	2683682	688414
				jerguson	4626246	2318892	2440154	504488

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

Run	S (%)	T (°C)	F (ml/min)	ตะกอนของสารติดอยู่ที่	พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม			
					มาเดคาสโซไซด์	อะเซียติโคไซด์	กรดมาเดคาสสิก	กรดอะเซียติก
36	50	25	3	filter	3510649	1599531	2419946	1246098
	50			jerguson	6254009	3064755	5628599	1242082
37	50	25	9	filter	3332500	1587235	3130004	1090914
				jerguson	4412137	2141918	3103403	1240655
38	50	45	9	filter	3648334	1746954	5029129	1721430
				jerguson	4495202	2071852	5885546	2526498
39	50	35	6	filter	3952441	1803871	6436489	3097544
				jerguson	3627225	1788380	3150406	1379908
40	50	35	6	filter	4863090	2316200	4094200	1696332
				jerguson	3528250	1766147	1390258	556390
41	50	35	6	filter	4229972	2033320	3891208	1147205
				jerguson	2815172	1423659	2134139	710902
42	0	45	6	filter	4994032	2312493	2095238	350246
				jerguson	4856446	2476496	1664155	390378
43	0	35	3	filter	4899749	2308777	3302939	1344687
				jerguson	3801662	1917652	4285642	1639548
44	0	35	9	filter	4574386	2200902	5391308	2346054
				jerguson	3984447	1857611	6723664	2751409
45	0	25	6	filter	6643259	3171251	4109756	1467136
				jerguson	2845650	1480925	4193366	1453400
O1.1	21.21	25	9	filter	4553850	2200899	3404582	1351217
				jerguson	4413334	2147565	3283226	1248807
O1.2	21.21	25	9	filter	6055946	2817162	3325650	1972743
				jerguson	4782914	2264644	2481254	1532465

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

Run	S (%)	T (°C)	F (ml/min)	ตะกอนของสารติดอยู่ที่	พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม			
					มาเดคาสโซไซด์	อะเซียติโคไซด์	กรดมาเดคาสสิก	กรดอะเซียติก
O1.3	21.21	25	9	filter	4694215	2264666	3813628	1219977
				jerguson	5183518	2621034	3744591	1245871
O2.1	0	25	3	filter	5790464	2634583	3098278	1039745
				jerguson	4290057	2141595	3651543	1234332
O2.2	0	25	3	filter	5057337	2378586	3273947	979530
				jerguson	4937670	2415775	3551392	1110465
O2.3	0	25	3	filter	6238290	2821496	4249059	1340571
				jerguson	4318076	2172501	3751180	1266151
O3.1	50.50	29.24	4.576	filter	5551384	2664992	3640724	1210552
				jerguson	5127875	2397632	2327717	720010
O3.2	50.50	29.24	4.576	filter	5124124	2354460	3923861	1332197
				jerguson	4515135	2194030	1919581	566707
O3.3	50.50	29.24	4.576	filter	5162397	2491605	3504810	1011885
				jerguson	5369108	2572793	3125487	1033453
O4.1	26.26	25	9	filter	5716577	2628923	4635670	891152
				jerguson	4446910	2179588	1677972	912987
O4.2	26.26	25	9	filter	5920453	2731287	4746008	1283381
				jerguson	4552160	2228158	3508935	697245
O4.3	26.26	25	9	filter	5266828	2501804	5845680	1475363
				jerguson	5935985	2883086	3971269	1215631

หมายเหตุ การทดลองที่ 1-15 คือการทดลองซ้ำที่ 1

การทดลองที่ 16-30 คือการทดลองซ้ำที่ 2

การทดลองที่ 31-45 คือการทดลองซ้ำที่ 3

การทดลองที่ O1.1-O1.3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของมาเดคาสโซไซด์และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อะเซียติโคไซด์

การทดลองที่ O2.1-O2.3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของกรดมาเดคาสสิก

การทดลองที่ O3.1-O3.3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของกรดอะเซียติก

การทดลองที่ O4.1-O4.3 เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของสารออกฤทธิ์สำคัญทั้งหมด

ตารางผนวกที่ ค2 พื้นที่ใต้กราฟของสารสกัดที่ได้จากการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

Run	Solvent (%)	พื้นที่ใต้กราฟของกรดอะเซียติก
1	100	9441431
2	100	10601411
3	100	6793321
4	100	6938728
5	50	10791681
6	50	10705647
7	50	10248351
8	50	10761690
9	50	10910078
10	50	10794475
11	50	10916475
12	0	12116989
13	0	12080495
14	0	7141803
15	0	8354016
16	100	8126091
17	100	8916085
18	100	9881381
19	100	7917013
20	50	9630957

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

Run	Solvent (%)	พื้นที่ใต้กราฟของกรดอะเซียติก
21	50	7994756
22	50	8689948
23	50	7546522
24	50	6966830
25	50	7321114
26	50	7924675
27	0	10627890
28	0	7557919
29	0	7893892
30	0	7783820
31	100	4140616
32	100	5015437
33	100	7973986
34	100	5994172
35	50	6885983
36	50	8354833
37	50	8585095
38	50	12092223
39	50	11169261
40	50	7883066
41	50	8452706
42	0	8683866
43	0	7402359
44	0	12971425
45	0	7948480

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ อรกนิษฐ์ จันทร์เทศ

เกิดวันที่ 21 กันยายน 2532

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี

ประวัติการศึกษา วศ.บ. (วิศวกรรมศาสตร์) ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่งปัจจุบัน -

สถานที่ทำงานปัจจุบัน -

ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -

ทุนการศึกษาที่ได้รับ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์