บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารประกอบฟีโนลิคได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินจากใบสบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.) โดยพิจารณาเลือกชนิดของตัวทำละลาย ที่เหมาะสมในการสกัดจากค่าพารามิเตอร์การละลาย (solubility parameter) และทำการสกัดกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินจากใบสบู่ดำอบแห้ง โดยศึกษาถึงผลได้ (yield) ของการสกัดและวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่สกัดได้ การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็นสี่ส่วน ส่วนแรกเป็นการเตรียมและการวิเคราะห์ความชื้นของผงใบสบู่ดำอบแห้ง ส่วนที่สองเป็นการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินจากใบสบู่ดำอบแห้งด้วยตัวทำละลายแบบธรรมดา (Conventional Extraction, CE) และใช้เครื่องอัลตราโซนิค (Ultrasonic-Assisted Extraction, UAE) ส่วนที่สามเป็นการศึกษาอิทธิพลของตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอัตราส่วนของตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัด และส่วนที่สี่เป็นการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินจากใบสบู่ดำอบแห้ง โดยใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM)

4.1 การเตรียมและการวิเคราะห์ความชื้นใบสบู่ดำ

อบแห้งใบสบู่ดำด้วยเครื่องสุญญากาศที่อุณหภูมิ 80±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปร่อนเพื่อคัดแยกขนาด โดยเลือกใช้ผงสบู่ดำที่มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยในช่วง 1-1.19 มิลลิเมตร นำผงใบสบู่ดำอบแห้งที่ผ่านการคัดแยกขนาดแล้วไปวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นโดยเครื่องวิเคราะห์ความชื้น จากผลการวิเคราะห์พบว่าผงใบสบู่ดำแห้งมีความชื้นเฉลี่ยต่ำกว่า 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง

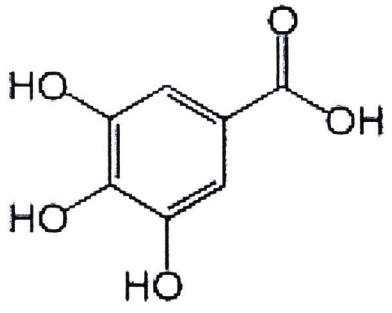
4.2 การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำ

การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของตัวทำละลายและสารสำคัญที่ต้องการสกัด โดยการพิจารณาความแตกต่างทางขั้วไฟฟ้าหรือค่าพารามิเตอร์การละลายของสารสำคัญ ตัวทำละลายที่ดีควรมีค่าความแตกต่างทางขั้วไฟฟ้าต่ำ หรือมีค่าพารามิเตอร์การละลายใกล้เคียงกับสารที่ต้องการสกัดมากที่สุด โดยค่าพารามิเตอร์การละลายสามารถคำนวณได้จากวิธีพิจารณากลุ่มองค์ประกอบของ Hoftyzer – Van Krevelen [11] ซึ่งในงานวิจัยนี้ศึกษาค่าพารามิเตอร์การละลายของสารสำคัญในใบสบู่ดำได้แก่กรดแกลลิก คลอริลาจิน และกรดแอลลาจิก และศึกษาค่าพารามิเตอร์การ

ละลายของตัวทำละลายร่วมระหว่างเมทานอลกับน้ำ ที่ความเข้มข้นต่างกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำ

4.2.1 ค่าพารามิเตอร์การละลายของกรดแกลลิก

การคำนวณค่าพารามิเตอร์การละลายของกรดแกลลิก โดยใช้วิธีการพิจารณากลุ่มองค์ประกอบของ Hoftyzer – Van Krevelen สามารถคำนวณได้จากองค์ประกอบของหมู่ฟังก์ชันจากโครงสร้างทางเคมีของกรดแกลลิก (รูปที่ 4.1) ที่มีผลต่อความสัมพันธ์ของอันตรกิริยาส่วนต่าง ๆ ได้แก่ อันตรกิริยาของส่วนที่ไม่มีขั้ว (F_d) อันตรกิริยาของส่วนที่มีขั้ว (F_p) และอันตรกิริยาในส่วนของพันธะไฮโดรเจน (E_h) กับจำนวนหมู่องค์ประกอบของกรดแกลลิกโดยแสดงองค์ประกอบพารามิเตอร์การละลายของกรดแกลลิกในตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 โครงสร้างโมเลกุลของกรดแกลลิก [23]

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบพารามิเตอร์การละลายของกรดแกลลิก

หมู่องค์ประกอบ	จำนวน	F_d $(J^{1/2}cm^{3/2}/mol)$	F_p^2 $(J^{1/2}cm^{3/2}/mol)^2$	E_h (J/mol)
=CH-	2	200	0	0
=C<	4	70	0	0
-OH	4	210	250000	20000
-CO-	1	290	592900	2000
Ring	1	190	0	0
		$\Sigma N*F_d=2000$	$\Sigma N*F_p^2=1592900$	$\Sigma N*E_h=82000$

Molar volume (V) = 97.2 cm^3/mol

ค่าของอันตรกิริยาขึ้นอยู่กับหมู่ฟังก์ชันองค์ประกอบ เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เป็นหมู่ที่มีขั้วและสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ ดังนั้นหมู่ไฮดรอกซิลจึงแสดงผลของอันตรกิริยาทั้งสามส่วน ค่าองค์ประกอบของพารามิเตอร์การละลายได้แก่ องค์ประกอบพารามิเตอร์การละลายของอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่มีขั้ว (dispersion component of solubility parameter, δ_d) อันตรกิริยาของส่วนที่มีขั้ว (polar component of solubility parameter, δ_p) และอันตรกิริยาในส่วนของพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding parameter of solubility parameter, δ_h) หรือที่เรียกว่าพารามิเตอร์การละลายแบบแฮนเซน (Hansen solubility parameter) สำหรับกรดแกลลิกสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4.1 - 4.4

$$\delta_d = \frac{(\Sigma N * F_d)}{V} = \frac{2000}{97.2} = 20.58 \ [MPa^{1/2}] \quad (4.1)$$

$$\delta_p = \frac{\sqrt{(\Sigma N * F_p^2)}}{V} = \frac{\sqrt{1592900}}{97.2} = 12.98 \ [MPa^{1/2}] \quad (4.2)$$

$$\delta_h = \sqrt{\frac{(\Sigma N * E_h)}{V}} = \sqrt{\frac{82000}{97.2}} = 29.05 \ [MPa^{1/2}] \quad (4.3)$$

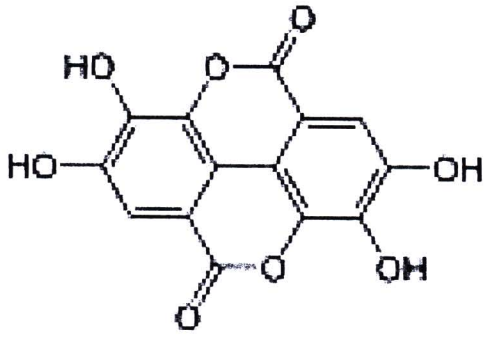
ค่าพารามิเตอร์การละลายรวม (δ) ของกรดแกลลิก

$$\delta = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} = 37.89 \ [MPa^{1/2}] \quad (4.4)$$

จากความสัมพันธ์ของ Hoftyer – Van Krevelen ซึ่งมีค่า δ_d = 20.58 $MPa^{1/2}$ δ_p = 12.98 $MPa^{1/2}$ และ δ_h = 29.05 $MPa^{1/2}$ ตามลำดับ ค่าพารามิเตอร์การละลายของกรดแกลลิกที่คำนวณได้จากสมการที่ 4.4 มีค่าเท่ากับ 37.89 $MPa^{1/2}$ จากผลการคำนวณจะเห็นได้ว่าค่าพารามิเตอร์การละลายขององค์ประกอบของอันตรกิริยาในส่วนที่ไม่มีขั้วและส่วนของพันธะไฮโดรเจนมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นสารที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดกรดแกลลิกได้ดีจึงควรเป็นสารละลายที่มีความสามารถในการละลายทั้งในส่วนที่ไม่มีขั้วและส่วนที่มีขั้วได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวทำละลายที่มีค่าพารามิเตอร์การละลายเท่ากับหรือใกล้เคียงกับ 37.89 $MPa^{1/2}$ มีแนวโน้มที่จะสกัดกรดแกลลิกได้ดี

4.2.2 ค่าพารามิเตอร์การละลายของกรดแอลลาจิก

การคำนวณค่าพารามิเตอร์การละลายของกรดแอลลาจิก โดยใช้วิธีการพิจารณากลุ่มองค์ประกอบของ Hoftyzer – Van Krevelen สามารถคำนวณได้จากองค์ประกอบของหมู่ฟังก์ชันจากโครงสร้างทางเคมีของกรดแอลลาจิกดังรูปที่ 4.2 และสามารถคำนวณค่าองค์ประกอบพารามิเตอร์การละลายได้ดังแสดงในตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.2 โครงสร้างโมเลกุลของกรดแอลลาจิก [22]

ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบพารามิเตอร์การละลายของกรดแอลลาจิก

หมู่องค์ประกอบ	จำนวน	F_d $(J^{1/2}cm^{3/2}/mol)$	F_p^2 $(J^{1/2}cm^{3/2}/mol)^2$	E_h (J/mol)
=CH-	2	200	0	0
=C<	10	70	0	0
-OH	4	210	250000	20000
-O-	2	100	160000	3000
-CO-	2	290	592900	2000
Ring	4	190	0	0
		$\sum N*F_d=3480$	$\sum N*F_p^2=2505800$	$\sum N*E_h=90000$

Molar volume (V) = 146.2 cm^3/mol

สำหรับกรดแอลลาจิกสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4.5 - 4.8

$$\delta_d = \frac{(\Sigma N * F_d)}{V} = \frac{3480}{146.2} = 23.80\ [MPa^{1/2}] \quad (4.5)$$

$$\delta_p = \frac{\sqrt{(\Sigma N * F_p^2)}}{V} = \frac{\sqrt{2505800}}{146.2} = 10.83\ [MPa^{1/2}] \quad (4.6)$$

$$\delta_h = \sqrt{\frac{(\Sigma N * E_h)}{V}} = \sqrt{\frac{90000}{146.2}} = 24.81\ [MPa^{1/2}] \quad (4.7)$$

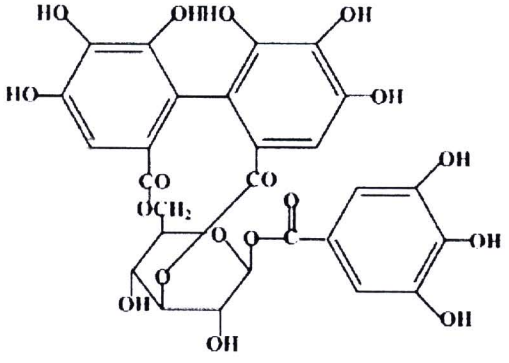
ค่าพารามิเตอร์การละลายรวม (δ) ของแอลลาจิก

$$\delta = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} = 36.05\ [MPa^{1/2}] \quad (4.8)$$

จากผลการคำนวณพบว่าสารที่จะใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดกรดแอลลาจิกได้ดีควรมีค่าพารามิเตอร์การละลายเท่ากับหรือใกล้เคียงกับ 36.05 $MPa^{1/2}$ มีแนวโน้มที่จะสกัดกรดแอลลาจิกได้ดี

4.2.3 ค่าพารามิเตอร์การละลายของคลอริลาจิน

การคำนวณค่าพารามิเตอร์การละลายของคลอริลาจิน โดยใช้วิธีการพิจารณากลุ่มองค์ประกอบของ Hoftyzer – Van Krevelen สามารถคำนวณได้จากองค์ประกอบของหมู่ฟังก์ชันจากโครงสร้างทางเคมีของคลอริลาจินดังรูปที่ 4.3 และสามารถคำนวณค่าองค์ประกอบพารามิเตอร์การละลายได้ดังแสดงในตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.3 โครงสร้างโมเลกุลของคลอริลาจิน [22]

ตารางที่ 4.3 องค์ประกอบพารามิเตอร์การละลายของคลอริลาจิน

หมู่องค์ประกอบ	จำนวน	F_d $(J^{1/2}cm^{3/2}/mol)$	F_p^2 $(J^{1/2}cm^{3/2}/mol)^2$	E_h (J/mol)
$>CH_2$	1	400	0	0
>C<	5	70	0	0
=CH-	4	200	0	0
=C<	14	70	0	0
-OH	11	210	250000	20000
-O-	4	100	160000	3000
-CO-	3	290	592900	2000
Ring	5	190	0	0
		$\Sigma N*F_d$=7060	$\Sigma N*F_p^2$=5168700	$\Sigma N*E_h$=238000

Molar volume (V) = 300.6 cm^3/mol

สำหรับคลอริลาจินสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4.9 - 4.12

$$\delta_d = \frac{(\Sigma N * F_d)}{V} = \frac{7060}{300.6} = 23.49 \ [MPa^{1/2}] \quad (4.9)$$

$$\delta_p = \frac{\sqrt{(\Sigma N * F_p^2)}}{V} = \frac{\sqrt{5168700}}{300.6} = 7.56 \ [MPa^{1/2}] \quad (4.10)$$

$$\delta_h = \sqrt{\frac{(\Sigma N * E_h)}{V}} = \sqrt{\frac{238000}{300.6}} = 28.14 \ [MPa^{1/2}] \quad (4.11)$$

ค่าพารามิเตอร์การละลายรวม (δ) ของคลอริลาจิน

$$\delta = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} = 37.43 \ [MPa^{1/2}] \quad (4.12)$$

จากผลการคำนวณพบว่าสารที่จะใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดคลอริลาจินได้ดีควรมีค่าพารามิเตอร์การละลายเท่ากับหรือใกล้เคียงกับ 37.43 $MPa^{1/2}$ มีแนวโน้มที่จะสกัดคลอริลาจินได้ดี

4.2.4 ค่าพารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ค่าพารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายบริสุทธิ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงในตารางที่ 4.4 สำหรับค่าพารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายร่วม สามารถคำนวณได้จากค่าพารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายบริสุทธิ์และอัตราส่วนของตัวทำละลายร่วม ตามความสัมพันธ์ดังสมการที่ 4.13

$$\delta_m = \sum_i x_i \delta_i \tag{4.13}$$

โดยที่ δ_m คือ พารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายร่วม [$MPa^{1/2}$]

x_i คือ อัตราส่วนเชิงปริมาตร

และ δ_i คือ พารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายบริสุทธิ์ i [$MPa^{1/2}$]

ตารางที่ 4.4 ค่าพารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายบริสุทธิ์ที่ 25 องศาเซลเซียส

ตัวทำละลาย	δ [$MPa^{1/2}$]			
	δ_d	δ_p	δ_h	δ(25°C)
น้ำ	15.6	16.0	42.3	47.8
เมทานอล	15.1	12.3	22.3	29.6

จากตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าค่าพารามิเตอร์การละลายของน้ำ (47.8 $MPa^{1/2}$) มากกว่าเมทานอล (29.6 $MPa^{1/2}$) เนื่องจากน้ำเป็นโมเลกุลที่มีค่าพารามิเตอร์การละลายขององค์ประกอบของอันตรกิริยาในส่วนของพันธะไฮโดรเจน (δ_h = 42.3 $MPa^{1/2}$) สูงกว่าค่าพารามิเตอร์การละลายขององค์ประกอบของอันตรกิริยาในส่วนที่ไม่มีขั้ว (δ_d = 15.6 $MPa^{1/2}$) และส่วนที่มีขั้ว (δ_p = 16.0 $MPa^{1/2}$) น้ำจึงเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงมาก เหมาะที่จะใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับสกัดสารที่มีขั้วสูงหรือมีค่าพารามิเตอร์การละลายเท่ากับหรือใกล้เคียงกับ 47.8 $MPa^{1/2}$ ในขณะที่เมทานอลมีค่าพารามิเตอร์การละลายขององค์ประกอบของอันตรกิริยาในส่วนที่ไม่มีขั้ว (δ_d = 15.1 $MPa^{1/2}$) และส่วนที่มีขั้ว (δ_p = 12.3 $MPa^{1/2}$) และค่าพารามิเตอร์การละลายขององค์ประกอบของอันตรกิริยาในส่วนของพันธะไฮโดรเจน (δ_h = 22.3 $MPa^{1/2}$) จะเห็นได้ว่าค่า δ_d δ_p และ δ_h ไม่ต่างกันมากนัก และเมื่อพิจารณาถึงค่าพารามิเตอร์การละลายรวม (29.6 $MPa^{1/2}$) จะเห็นได้ว่าเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีความสามารถในการละลายทั้งในส่วนที่ไม่มีขั้วและส่วนที่มีขั้วได้ดี แต่เนื่องจากค่าพารามิเตอร์การละลายของเมทานอลและน้ำยังไม่ใกล้เคียงกับค่าพารามิเตอร์การละลายของกรดแกลลิก (δ_d = 37.89 $MPa^{1/2}$) กรดแอลลาจิก (δ_d = 36.05 $MPa^{1/2}$) และคลอริลาจิน (δ_d = 37.43 $MPa^{1/2}$) ดังนั้นเพื่อเพิ่ม

ประสิทธิภาพในการสกัดจึงควรเลือกใช้ตัวทำละลายร่วมระหว่างเมทานอลกับน้ำแทนการใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ (น้ำหรือเมทานอล) โดยพิจารณาค่าพารามิเตอร์การละลายเพื่อเลือกความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสำคัญแต่ละชนิด

ในงานวิจัยนี้ทำการสกัดที่อุณหภูมิ ความเข้มข้นเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน ทำให้ค่าพารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายผสมแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยตัวทำละลายผสมในสภาวะปกติจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ดังนั้นการสกัดในสภาวะเป็นกรด (pH 3) ต้องทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายโดยการเติมกรดไฮโดรคลอลิก และในส่วนสภาวะการสกัดที่เป็นกลาง (pH 7) ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 10–20 หยด แต่เนื่องจากสารที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเติมลงไปในปริมาณเพียงเล็กน้อย ในการคำนวณค่าการละลายจึงไม่คิดอัตราส่วนของสารดังกล่าว ส่วนการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลต่อค่าพารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลาย ตามสมการที่ 4.14 ของ Barton [45]

$$\left(\frac{\delta_1}{\delta_2}\right)^2 = \frac{T_2}{T_1} \tag{4.14}$$

โดยที่ δ_i คือ พารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายที่อุณหภูมิใด ๆ [$MPa^{1/2}$]

T_i คือ อุณหภูมิในการสกัด (K)

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการคำนวณค่าพารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการศึกษาผลของอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินจากใบสบู่ดำ จะเห็นได้ว่าค่าพารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัดระหว่างเมทานอลและน้ำที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (23.17 - 38.70 $MPa^{1/2}$) จะมีค่าใกล้เคียงกับค่าพารามิเตอร์การละลายของกรดแกลลิก (37.89 $MPa^{1/2}$) กรดแอลลาจิก (36.05 $MPa^{1/2}$) และคลอริลาจิน (37.43 $MPa^{1/2}$) มากที่สุด นอกจากนั้นยังพบว่าความเข้มข้นของเมทานอลที่ต่างกันมีผลต่อค่าพารามิเตอร์การละลายมาก ดังนั้นการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสำคัญแต่ละชนิดควรเลือกตัวทำละลายที่มีค่าพารามิเตอร์การละลายใกล้เคียงกับสารที่ต้องการสกัดมากที่สุด เพื่อให้ได้ผลได้การสกัดสูงสุด

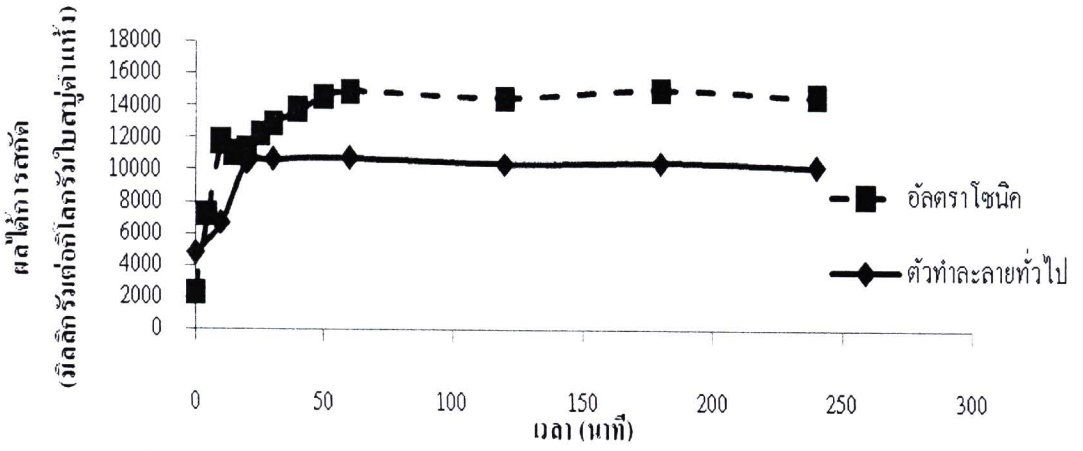
ตารางที่ 4.5 ค่าพารามิเตอร์การละลายของตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัด

ความเข้มข้นของเมทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	δ[MPa$^{1/2}$]					
	δ(25°C)	δ(30°C)	δ(40°C)	δ(50°C)	δ(60°C)	δ(70°C)
0	47.80	43.85	37.93	33.80	30.84	28.62
25	43.25	39.50	34.33	30.58	27.90	25.90
50	38.70	35.34	30.71	27.45	24.97	23.17
75	34.15	31.19	27.10	24.22	22.03	20.45
100	29.60	27.03	23.49	20.99	19.10	17.72

4.3 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดใบสบู่ดำ

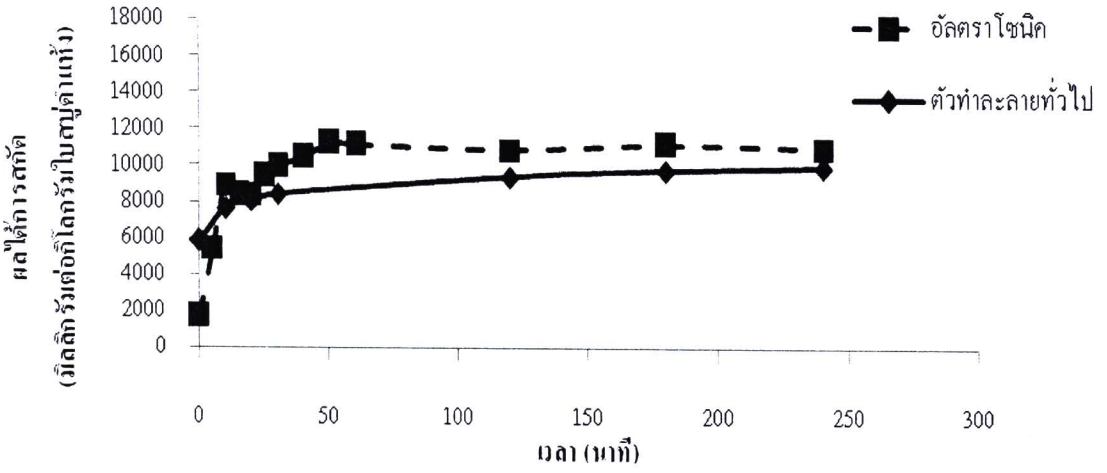
ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน จากใบสบู่ดำอบแห้งด้วยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องเขย่า (CE) และเครื่องอัลตราโซนิค (UAE) สภาวะที่ใช้ในการสกัดคืออุณหภูมิ 40 องศา-เซลเซียส ใช้เมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลาย และใช้อัตราส่วนของผงใบสบู่ดำอบแห้ง 1 กรัมต่อตัวทำละลายเมทานอล 40 มิลลิลิตร ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดทั้งสองวิธี (CE และ UAE) โดยพิจารณาจากผลได้ (yield) การสกัดของกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินที่สกัดได้

รูปที่ 4.4 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบผลได้การสกัดคลอริลาจินด้วยวิธีอัลตราโซนิค (UAE) และวิธีเขย่า (CE) ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้เมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลาย และใช้อัตราส่วนของผงใบสบู่ดำอบแห้ง 1 กรัมต่อตัวทำละลายเมทานอล 40 มิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าการสกัดเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในช่วงต้น เนื่องจากคลอริลาจินในสารสกัดตัวอย่างมีความเข้มข้นสูงจึงเกิดการแพร่ได้ดีใน 10 นาทีแรกสำหรับการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิค และ 20 นาทีแรกสำหรับการสกัดด้วยวิธีเขย่า หลังจากนั้นการสกัดจะเข้าสู่สมดุล จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสูงสุดของคลอริลาจินที่สกัดได้จากการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิค และวิธีเขย่าเท่ากับ 14565.85 และ 10437.59 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิคและวิธีเขย่าพบว่าวิธีอัลตราโซนิคสามารถสกัดคลอริลาจินได้มากกว่าวิธีเขย่า เนื่องจากคลื่นอัลตราโซนิคที่มีความถี่สูงสามารถทำให้เกิดการระเบิดของฟองก๊าซที่มีความรุนแรง ทำให้เซลล์ของใบสบู่ดำแตก สารสกัดจึงแพร่ออกสู่สารละลายได้มากกว่าวิธีเขย่า [27]



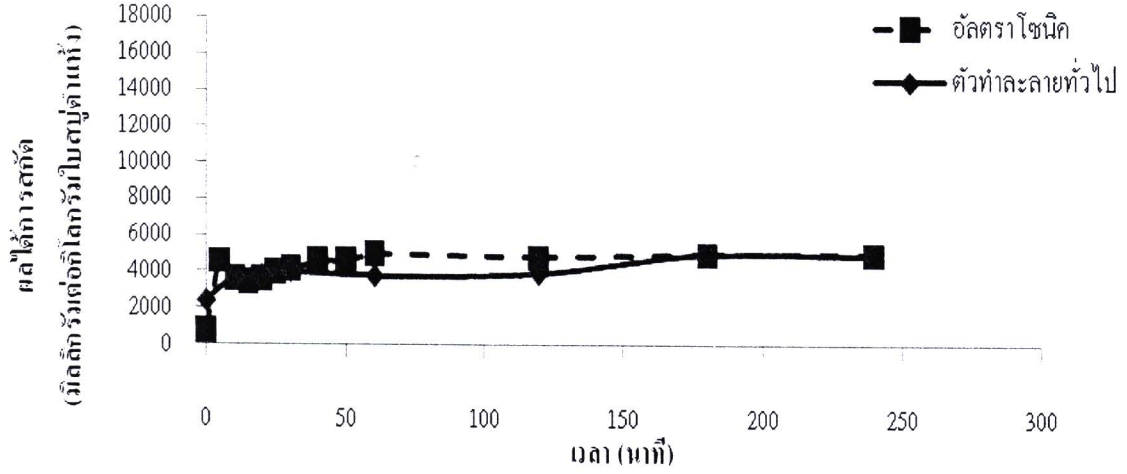
รูปที่ 4.4 ผลได้การสกัดคลอริลาจินจากใบสบู่ดำด้วยวิธีต่างกัน

รูปที่ 4.5 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกด้วยวิธีอัลตราโซนิคและวิธีเขย่า ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้เมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลาย และใช้อัตราส่วนของผงใบสบู่ดำอบแห้ง 1 กรัมต่อสารละลายเมทานอล 40 มิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าการสกัดเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในช่วง 10-20 นาทีแรกของการสกัดทั้งสองวิธี หลังจากนั้นการสกัดจะเข้าสู่สมดุล จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณสูงสุดของกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิค และวิธีเขย่าเท่ากับ 11248.42 และ 8067.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิคและวิธีเขย่าพบว่าปริมาณของกรดแอลลาจิกสูงสุดที่สกัดได้ด้วยทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ผลได้การสกัดสูงสุดของคลอริลาจินที่ได้จากวิธีการสกัดทั้งสองแตกต่างกันมาก (รูปที่ 4.4) เนื่องมาจากโครงสร้างทางเคมีของกรดแอลลาจิก (ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล 4 หมู่ และหมู่เอสเตอร์ 2 หมู่) จะเห็นได้ว่ากรดแอลลาจิกมีโครงสร้างโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่าคลอริลาจิน (ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล 11 หมู่ หมู่เอสเตอร์ 3 หมู่ และหมู่อีเทอร์ 1 หมู่) ดังนั้นการกวนเพียงเล็กน้อยในกระบวนการสกัดก็สามารถทำให้สกัดกรดแอลลาจิกออกมาได้



รูปที่ 4.5 ผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกจากใบสบู่ดำด้วยวิธีต่างกัน

ส่วนการศึกษาเปรียบเทียบผลได้การสกัดกรดแกลลิกด้วยวิธีอัลตราโซนิคและวิธีเขย่า ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6 ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้เมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลาย และใช้อัตราส่วนของผงใบสบู่ดำอบแห้ง 1 กรัมต่อตัวทำละลายเมทานอล 40 มิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าการสกัดเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในช่วงต้น หลังจากนั้น (10 นาที) การสกัดจะเข้าสู่สมดุล จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณสูงสุดของกรดแกลลิกที่สกัดได้จากการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิค และวิธีเขย่าเท่ากับ 4634.73 และ 3763.19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้งตามลำดับ และยังพบว่าปริมาณสูงสุดของกรดแกลลิกที่สกัดได้ด้วยสองวิธีไม่แตกต่างกันมากนัก เนื่องจากกรดแกลลิก (ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันคือไฮดรอกซิล 3 หมู่ และหมู่คาร์บอกซิล 1 หมู่) มีขนาดโมเลกุลเล็กเมื่อเทียบกับคลอริลาจิน และกรดแอลลาจิก จึงสามารถสกัดออกมาได้ง่ายกว่า



รูปที่ 4.6 ผลได้การสกัดกรดแกลลิกจากใบสบู่ดำด้วยวิธีต่างกัน

ผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของญาติกา โยธา [32] ซึ่งศึกษาการสกัดสารแอนติออกซิแดนท์จากเปลือกแก้วมังกรโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์เสริม พบว่าปริมาณสูงสุดที่สกัดได้ของสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธีอัลตราโซนิคและวิธีเขย่าไม่แตกต่างกันมากนัก ในขณะที่ผลได้การสกัดของเบตาไซยานินที่ได้จากการสกัดทั้งสองวิธีมีค่าแตกต่างกันมาก เนื่องจากเบตาไซยานินมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าสารประกอบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Qin Ma, Y. [38] ที่ศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลจากเปลือกส้ม ด้วยวิธีมาเซอเรชันและวิธีอัลตราโซนิค พบว่าวิธีอัลตราโซนิคช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารโมเลกุลใหญ่ได้ดีกว่าสารโมเลกุลเล็ก

เมื่อเปรียบเทียบผลการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิคและวิธีเขย่า พบว่าการสกัดกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน ด้วยวิธีอัลตราโซนิคสามารถสกัดกรดแกลลิก คลอริลาจิน และกรดแอลลาจิก ได้ในปริมาณสูง เนื่องจากผนังเซลล์ของใบสบู่ดำเป็นส่วนที่เพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์ ซึ่งการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิคสามารถส่งคลื่นความถี่สูงจนทำให้เกิดการระเบิดของฟองก๊าซที่มีความรุนแรงจนกระทั่งสามารถทำให้เซลล์ของใบสบู่ดำแตกได้ ทำให้อัตราการแพร่ของตัวถูกละลายออกสู่ภายนอกเซลล์เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่การสกัดด้วยวิธีเขย่าเป็นการแตกเซลล์ด้วยวิธีเชิงกลซึ่งเป็นวิธีที่ยากที่จะนำมาใช้ในการแตกเซลล์ใบสบู่ดำ [27]

ดังนั้นงานวิจัยในตอนต่อไปจึงมุ่งเน้นศึกษาอิทธิพลของตัวแปรที่มีผลต่อการสกัดใบสบู่ดำด้วยวิธีอัลตราโซนิค

4.4 การศึกษาอิทธิพลของตัวแปรที่มีผลต่อการสกัดใบสบู่ดำ

งานวิจัยตอนนี้เป็นการศึกษาการสกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำ โดยใช้คลื่นอัลตราโซนิคที่ความถี่ 44 กิโลเฮิรตซ์ ตัวกลางของคลื่นคือน้ำ เพื่อทำการศึกษาอิทธิพลของตัวแปร ได้แก่ อุณหภูมิ (30-70 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้นของเมทานอล (0-100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (3–11) โดยออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ผลการออกแบบการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 จากนั้นทำการวิเคราะห์และแสดงผลการทดลองในรูปพื้นที่ผิวตอบสนองดังนี้

ตารางที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญที่ได้จากการสกัดใบสบู่ดำที่สภาวะต่างกัน

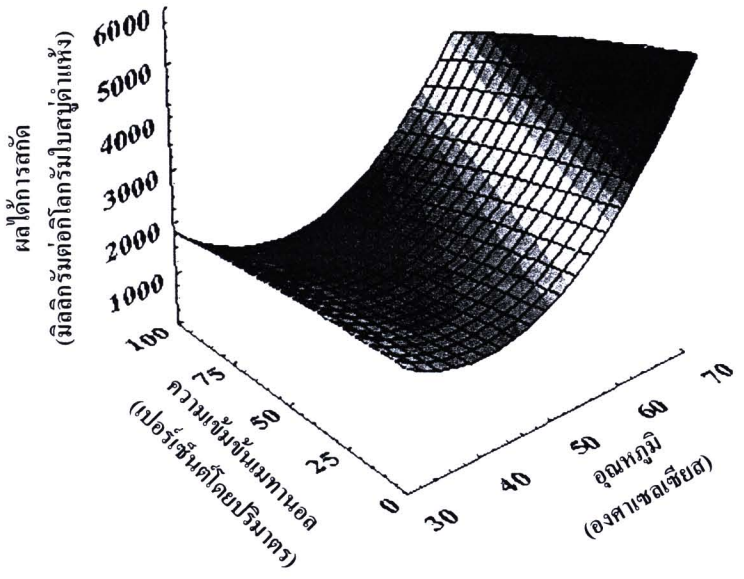
การทดลอง	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			ผลได้การสกัด (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง)					
	อุณหภูมิ	เมทานอล	pH	กรดแกลลิก		กรดแอลลาจิก		คลอริลาจิน	
	(^{0} C)	(% v/v)	(-)	การทดลอง	การทำนาย	การทดลอง	การทำนาย	การทดลอง	การทำนาย
1	40	25	5	1782.44	1486.62	3221.52	3773.87	8217.04	7025.48
2	40	25	9	1924.08	1951.57	3488.28	3335.73	8768.42	6310.86
3	40	75	5	1622.29	1305.18	4873.79	4199.60	4424.49	5845.80
4	40	75	9	1518.78	1148.64	4884.72	4486.48	10087.33	7877.67
5	60	25	5	2955.60	3113.06	3171.46	3542.19	8775.65	6667.10
6	60	25	9	3083.26	3187.70	3373.15	4019.85	4425.40	4615.89
7	60	75	5	2736.15	2496.02	3557.54	3682.62	9793.99	7933.33
8	60	75	9	1866.00	1949.18	5465.12	4885.30	11755.26	8628.6
9	50	50	7	2134.79	1615.45	3963.98	4133.86	3765.16	4084.06
10	30	50	7	1812.76	2184.44	4744.53	5067.13	10450.39	13474.87
11	70	50	7	4770.20	4611.42	5528.82	5234.27	12573.98	13867.42
12	50	0	7	2382.81	2279.43	2364.58	1642.52	1736.46	2361.05
13	50	100	7	542.99	859.46	2183.73	2933.70	4268.09	5194.08
14	50	50	3	1535.50	1777.10	4208.33	4007.86	3253.80	5929.26
15	50	50	11	1723.88	1695.21	4543.93	4772.41	4267.48	5909.92
16	50	50	7	1233.91	1615.45	4036.96	4133.86	2793.86	4084.06
17	50	50	7	1714.65	1615.45	4539.62	4133.86	2579.53	4084.06
18	50	50	7	1165.38	1615.45	3966.59	4133.86	2879.93	4084.06

4.4.1 ผลของปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.4.1.1 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของเมทานอลต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของเมทานอลต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ (รูปที่ 4.7) พบว่าอุณหภูมิส่งผลต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้สูงที่สุด จากกราฟพื้นผิวตอบสนองจะเห็นได้ว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 50 องศาเซลเซียส จะทำให้ปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้สูงขึ้น เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ความหนืดของตัวทำละลายจะมีค่าลดลง ทำให้สารละลายเกิดการปั่นป่วนมากขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลให้สัมประสิทธิ์การแพร่มีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้ตัวถูกละลายแพร่กระจายสู่ตัวทำละลายได้มากขึ้น แต่เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นกลับได้ปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้ลดต่ำลง เนื่องมาจาก

การเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลต่อค่าพารามิเตอร์การละลาย (ตารางที่ 4.5) ของกรดแกลลิกกับตัวทำละลายให้ต่างกันมากขึ้น ส่วนผลของความเข้มข้นของเมทานอลพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเมทานอลเพิ่มสูงขึ้นปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้ลดลง เนื่องมาจากปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้ส่วนใหญ่ขึ้นกับอุณหภูมิ การเพิ่มความเข้มข้นจึงส่งผลให้ปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้ลดลง ดังนั้นการสกัดโดยใช้เมทานอลความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จึงเหมาะสมที่สุด ประกอบกับกรดแกลลิกที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีขั้วสูง การสกัดโดยน้ำเป็นตัวทำละลายก็สามารถสกัดกรดแกลลิกออกมาได้



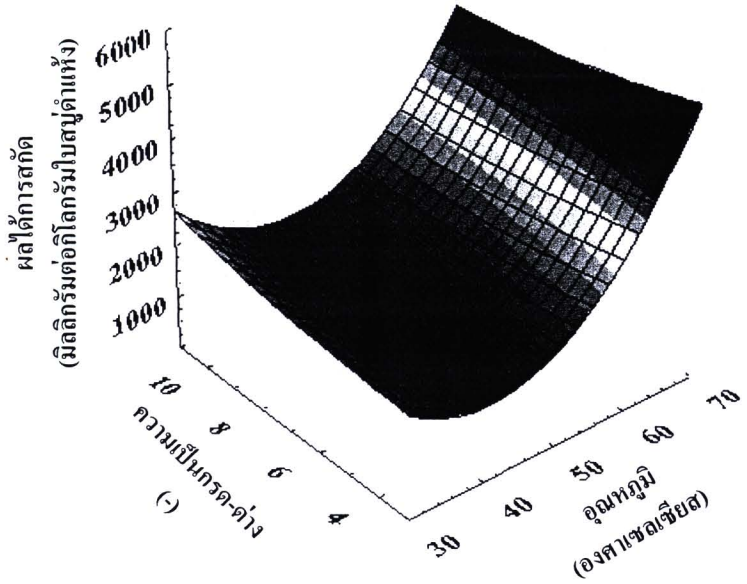
รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของเมทานอลต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.4.1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ (รูปที่ 4.8) พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิสูงสามารถสกัดกรดแกลลิกได้ดีกว่าการสกัดที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ความหนืดของตัวทำละลายจะมีค่าลดลงและส่งผลให้สัมประสิทธิ์การแพร่มีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้ตัวถูกละลายแพร่กระจายสู่ตัวทำละลายได้มากขึ้น และพบว่าปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อสารละลายมีค่าความเป็นด่างเพิ่มขึ้น เนื่องจาก

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจะไปเพิ่มประจุลบในสารละลายทำให้กรดแกลลิกซึ่งแสดงประจุบวกละลายออกมาสู่สารละลายมากขึ้น

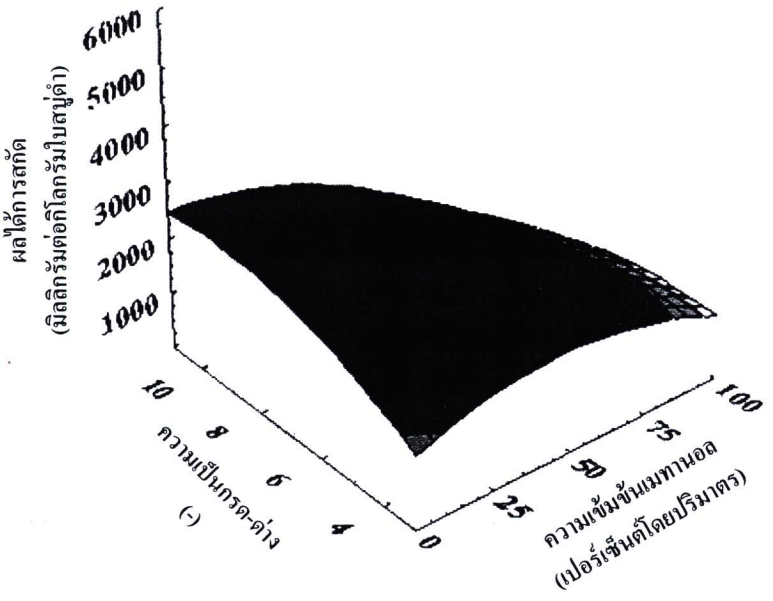
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.4.1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด - ด่างต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ (รูปที่ 4.9) แสดงให้เห็นว่าทั้งสองปัจจัยได้แก่ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความปีนกรด-ด่าง เป็นตัวแปรที่ส่งผลต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้ จากผลการทดลองพบว่า การสกัดที่ใช้ความเข้มข้นของเมทานอลในช่วง 0–75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้น เนื่องมาจากค่าพารามิเตอร์ในการละลายตลอดช่วงความเข้มข้นของเมทานอล (47.8–34.15 $MPa^{1/2}$) มีค่าใกล้เคียงกับค่าพารามิเตอร์การละลายของกรดแกลลิก (37.89 $MPa^{1/2}$) สำหรับผลของความเป็นกรด-ด่าง จะเห็นได้ว่าการสกัดในสภาวะที่เป็นด่างมีผลได้การสกัดกรดแกลลิกสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rodrigues และคณะ[35] เนื่องจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เติมลงไปปรับสภาวะความเป็นเบส จะทำให้เกิดประจุลบและบวกขึ้นในสารละลาย ส่งผลทำให้กรดแกลลิกที่แตกตัวเป็นอิออนละลายออกสู่สารละลายได้มากขึ้น



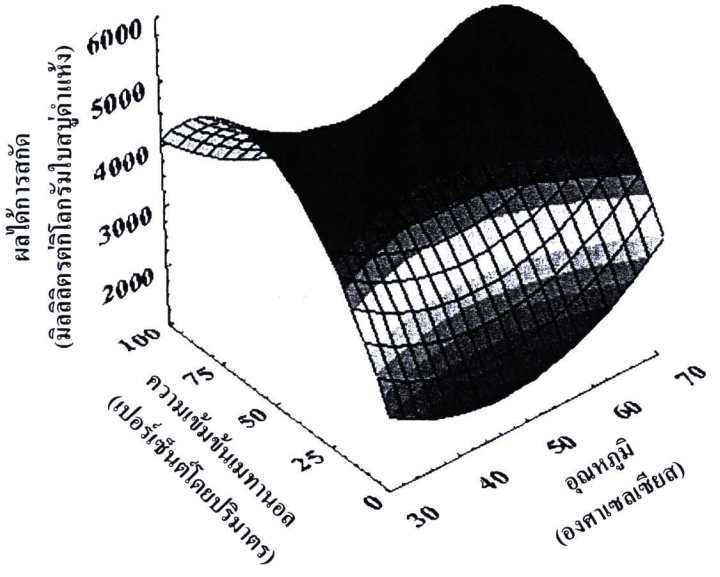
รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.4.2 ผลของปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.4.2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของเมทานอลต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของเมทานอลต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ (รูปที่ 4.10) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลในช่วง 0–70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะทำให้ได้ผลการสกัดเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลในช่วง 70–100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร กลับทำให้ผลได้การสกัดมีค่าลดลง เนื่องมาจากกรดแอลลาจิกเป็นสารที่มีทั้งส่วนมีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้ว การใช้เมทานอลที่ความเข้มข้นต่ำหรือสูงเกินไปก็จะทำให้สภาพใกล้เคียงกับตัวทำละลายบริสุทธิ์ (น้ำและเมทานอล) ทำให้เกิดความแตกต่างของขั้วไฟฟ้าระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับตัวทำละลายที่ใช้มากขึ้น จึงทำให้ความสามารถในการสกัดสารลดน้อยลง ซึ่งสภาพความเป็นขั้วของเมทานอลที่ความเข้มข้นในช่วง 0–70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (47–34.15 $MPa^{1/2}$) จะมีค่าใกล้เคียงกับสภาพขั้วของกรดแอลลาจิก (36.05 $MPa^{1/2}$) จึงทำให้สกัดกรดแอลลาจิกได้ในปริมาณมาก เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิพบว่าอุณหภูมิในช่วง 30–50 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณผลได้ของสารสกัดลดต่ำลงเนื่องมาจากการเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลทำให้

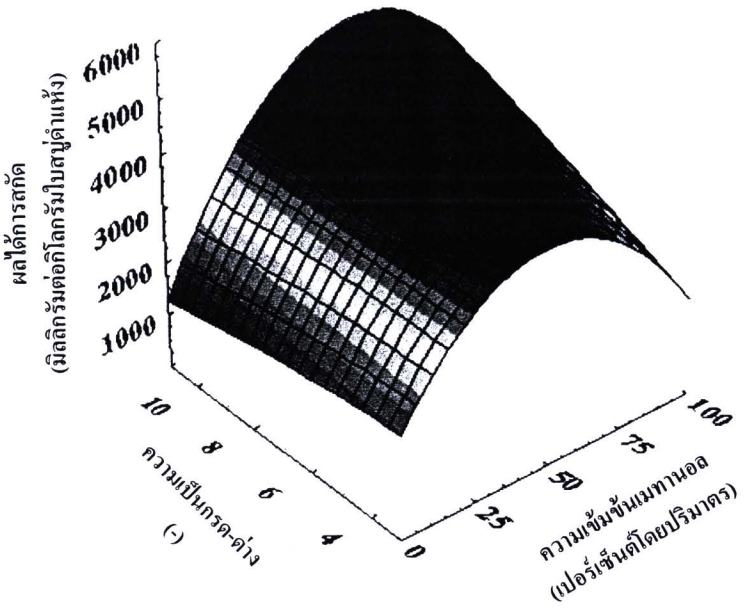
สภาพขั้วระหว่างตัวทำละลายและตัวถูกละลายแตกต่างกันมากขึ้น (47.80-20.99 $MPa^{1/2}$) ตามตารางที่ 4.5 แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นในช่วง 50–70 องศาเซลเซียส จะทำให้ประสิทธิภาพในการแพร่ของสารละลายเพิ่มมากขึ้น ความหนืดของสารละลายลดต่ำลง จึงสามารถสกัดกรดแอลลาจิกได้มากขึ้น



รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับความเข้มข้นของเมทานอล ต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสมุนไพร

4.4.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสมุนไพร

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสมุนไพร (รูปที่ 4.11) เมื่อทำการสกัดที่ค่าความเป็นกรด–ด่างเท่ากับ 7–11 พบว่าอุณหภูมิสูงสามารถสกัดกรดกรดแอลลาจิกได้ดีกว่าการสกัดที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ความหนืดของตัวทำละลายจะมีค่าลดลงและส่งผลให้สัมประสิทธิ์การแพร่มีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้ตัวถูกละลายแพร่กระจายสู่ตัวทำละลายได้มากขึ้น ทำให้ปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้เพิ่มสูงขึ้น เมื่อสารละลายเป็นด่างเพิ่มขึ้น แต่เมื่อพิจารณาที่ค่าความเป็นกรด–ด่างเท่ากับ 3–7 พบว่าปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้มีปริมาณลดต่ำลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็นผลมาจากสภาพขั้วของสารละลายที่อยู่ในช่วงสภาวะกรดนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจะทำให้สภาพขั้วระหว่างตัวทำละลาย (47.80-20.99 $MPa^{1/2}$) กับตัวถูกละลาย (36.05 $MPa^{1/2}$) ต่างกันมากขึ้น (ตารางที่ 4.5)

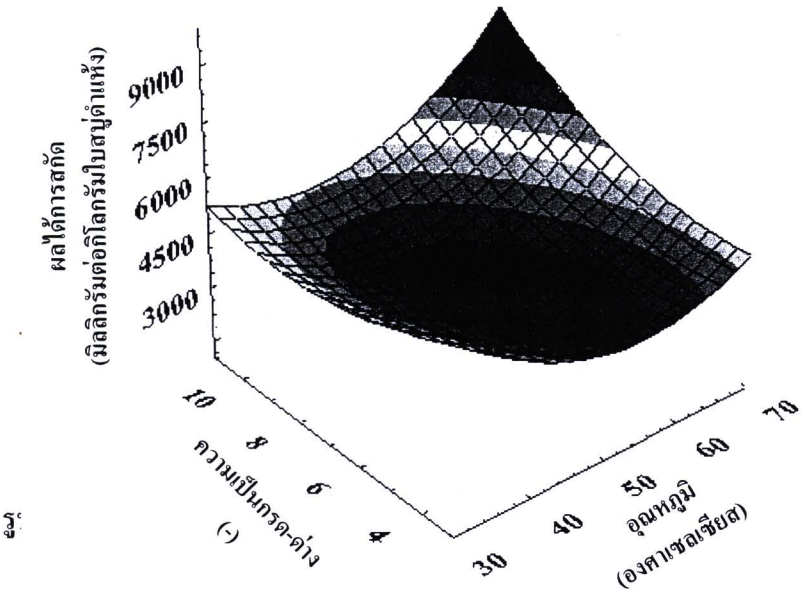


รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.4.3 ผลของปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.4.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของเมทานอลต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของเมทานอลต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ (รูปที่ 4.13) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นในทุกช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองนี้จะทำให้ปริมาณคลอริลาจินเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พบว่าคลอริลาจินที่สกัดได้มีแนวโน้มที่จะลดลงสำหรับการสกัดในช่วงอุณหภูมิต่ำ (30-55 องศาเซลเซียส) เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิทำให้ค่าพารามิเตอร์การละลายของสารละลาย (47.80-20.01 $MPa^{1/2}$) กับค่าพารามิเตอร์การละลายของคลอริลาจิน (37.43 $MPa^{1/2}$) ต่างกันมากขึ้น (ตารางที่ 4.5) จึงทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดลดต่ำลง แต่เมื่อพิจารณาในช่วงอุณหภูมิสูง 55-70 องศาเซลเซียส กลับพบว่าปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ความหนืดของตัวทำละลายมีค่าลดลงและส่งผลให้สัมประสิทธิ์การแพร่มีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้ตัวถูกละลายแพร่กระจายสู่ตัวทำละลายได้มากขึ้น แต่เนื่องจากคลอริลาจินมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่เมื่อเทียบกับกรดแกลลิก เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จึงค่อยๆ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ไม่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเหมือนกรดแกลลิก สำหรับผลของความเข้มข้นของเมทานอลพบว่าที่ความเข้มข้นสูง จะสกัด

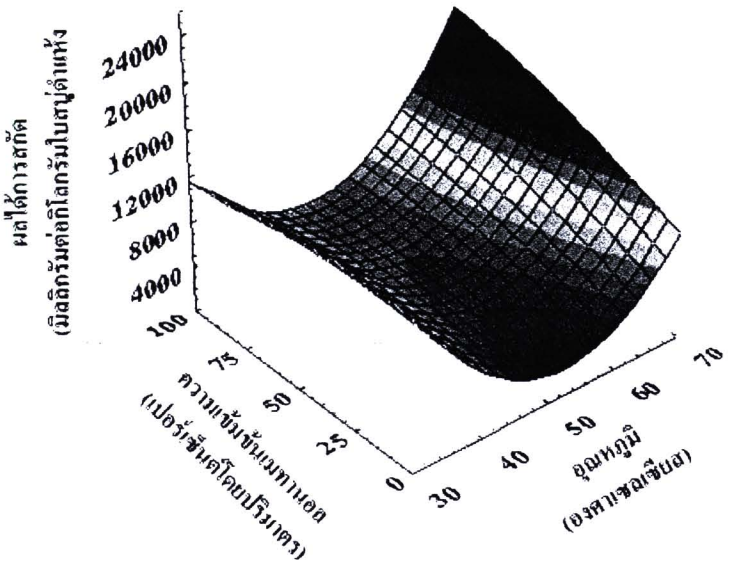


รู

4.4.2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ (รูปที่ 4.12) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลในช่วง 0–70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะทำให้ได้ผลการสกัดเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลในช่วง 70–100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร กลับทำให้ผลได้การสกัดมีค่าลดลง เนื่องมาจากสภาพขั้วของกรดแอลลาจิก (36.05 $MPa^{1/2}$) กับเมทานอลความเข้มข้นในช่วง 0–70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (47.8-35.06 $MPa^{1/2}$) มีค่าใกล้เคียงกันมากกว่าเมทานอลความเข้มข้นอยู่ในช่วง 70–100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (35.06-29.6 $MPa^{1/2}$) ดังตารางที่ 4.5 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น และเมื่อพิจารณาผลของความเป็นกรด–ด่างพบว่าส่งผลต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้น้อยมากเมื่อเทียบกับผลของความเข้มข้นของเมทานอล ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ ค.18

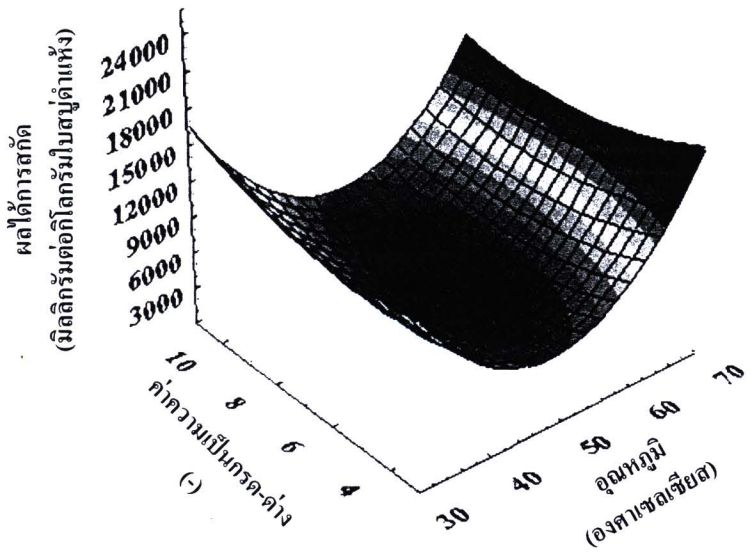
คลอริลาจินได้ดีเนื่องจากค่าพารามิเตอร์การละลายของคลอริลาจิน (37.43 $MPa^{1/2}$) และสารละลายเมทานอลความเข้มข้นในช่วง 50-100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (38.70-29.6 $MPa^{1/2}$) ดังตารางที่ 4.5 ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับความเข้มข้นของเมทานอล
ต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.4.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด - ด่างต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

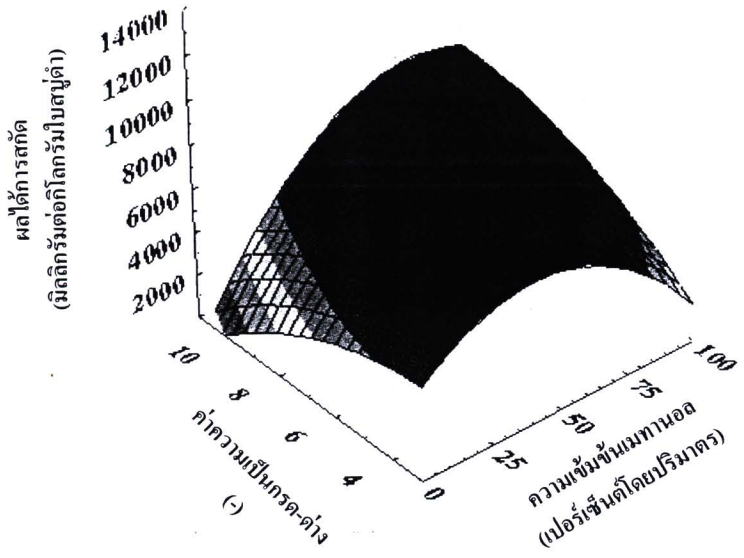
จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ (รูปที่ 4.14) พบว่าอุณหภูมิเป็นตัวแปรที่มีผลต่อปริมาณสารสกัดมากกว่าความเป็นกรด–ด่าง โดยในทุกช่วงของค่าความเป็นกรด–ด่างที่ใช้ในการทดลองนี้ การเพิ่มอุณหภูมิในช่วง 20–50 องศาเซลเซียส จะทำให้ผลได้การสกัดลดต่ำลง แต่การเพิ่มอุณหภูมิในช่วง 50–70 องศาเซลเซียส กลับได้ผลการสกัดที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ประสิทธิภาพในการแพร่ของสารละลายเพิ่มมากขึ้น จึงสามารถสกัดคลอริลาจินได้มากขึ้น แต่การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดก็จะทำให้ผลต่างของค่าพารามิเตอร์การละลายระหว่างตัวทำละลายกับตัวถูกละลายเพิ่มมากขึ้นด้วย จึงทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดลดลงในช่วงการสกัดที่อุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.4.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ (รูปที่ 4.15) แสดงให้เห็นว่าทั้งสองปัจจัยได้แก่ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความปีนกรด–ด่าง เป็นตัวแปรที่ส่งผลต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้ พบว่า การสกัดที่ใช้ความเข้มข้นของเมทานอลในช่วง 0–70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้น เนื่องมาจากค่าพารามิเตอร์การละลายของเมทานอลในช่วง 0–70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (47.8–35.06 $MPa^{1/2}$) มีค่าใกล้เคียงกับค่าพารามิเตอร์การละลายของคลอริลาจิน (37.43 $MPa^{1/2}$) จึงทำให้สกัดคลอริลาจินได้ปริมาณมาก และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเมทานอลในช่วง 70-100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอล จะทำให้ผลได้การสกัดลดลง สำหรับการสกัดในสภาวะที่เป็นกรด (pH=4) แต่การสกัดในสภาวะที่เป็นด่างมากขึ้นที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้ปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเมื่อเปลี่ยนค่าความเป็นกรด–ด่าง จะทำให้คลอริลาจินมีสถานะอิอออนที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลกระทบต่อผลได้การสกัด



รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.4.4 ผลของปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

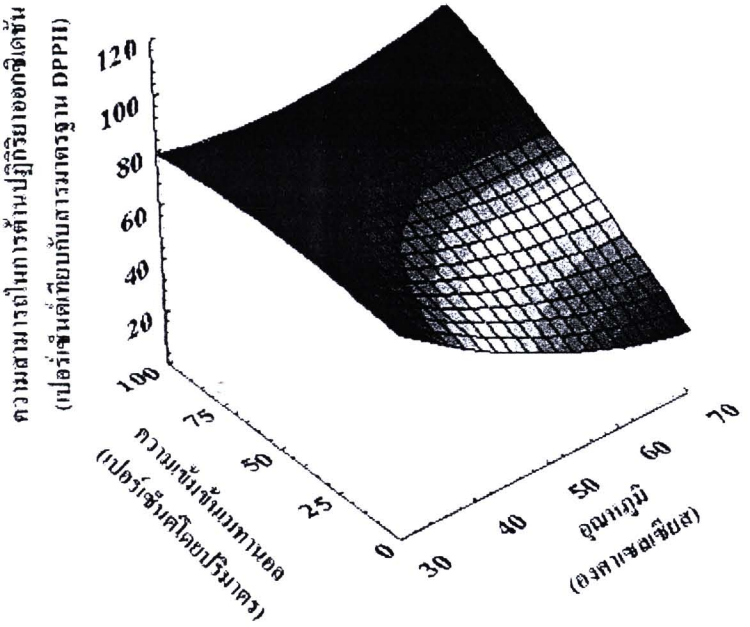
งานวิจัยส่วนนี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยในการสกัดที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ โดยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี modified original DPPH โดยให้สารสกัดจากใบสบู่ดำทำปฏิกิริยากับ DPPH ตามระยะเวลาที่กำหนด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 515 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของ DPPH ที่ลดลงตามเวลา ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ

การทดลอง	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (เปอร์เซ็นต์เทียบกับสารมาตรฐาน DPPH)	
	อุณหภูมิ (^{0} C)	เมทานอล (% v/v)	pH (-)	การทดลอง	การทำนาย
1	40	25	5	65.85	68.38
2	40	25	9	64.38	58.73
3	40	75	5	78.36	73.60
4	40	75	9	77.20	73.31
5	60	25	5	50.75	54.69
6	60	25	9	31.90	36.72
7	60	75	5	69.63	75.31
8	60	75	9	69.21	66.70
9	50	50	7	59.8	62.93
10	30	50	7	74.44	80.07
11	70	50	7	66.15	59.78
12	50	0	7	44.05	41.33
13	50	100	7	74.70	76.53
14	50	50	3	75.10	71.07
15	50	50	11	49.53	52.81
16	50	50	7	62.62	62.93
17	50	50	7	63.99	62.93
18	50	50	7	66.37	62.93

4.4.4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของเมทานอลต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ

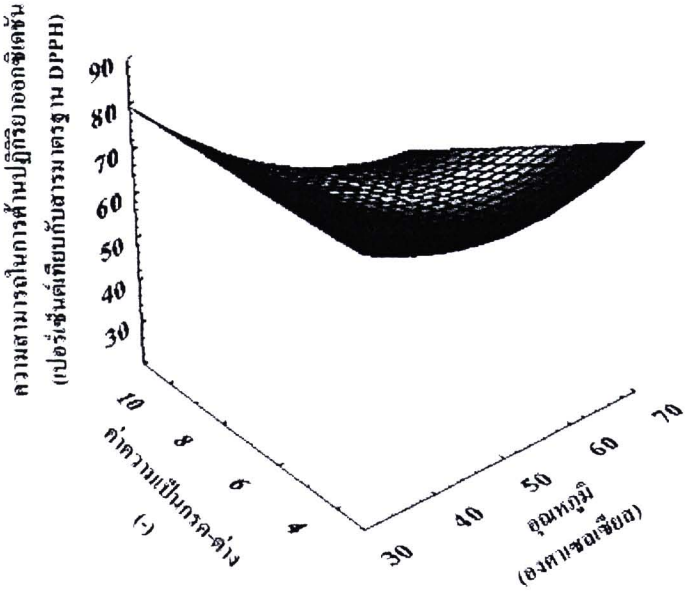
จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของเมทานอลต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ (รูปที่ 4.16) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลจะทำให้ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้น เนื่องจากการสกัดโดยใช้เมทานอลที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้สามารถสกัดสารประกอบฟีโนลิค ตัวอย่างเช่นกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก คลอริลาจิน และสารที่มีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้น (ตาราง ค.16–ค.18) สำหรับผลของอุณหภูมิพบว่าการสกัดที่อุณหภูมิต่ำสารสกัดที่ได้จะมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงกว่าการสกัดที่อุณหภูมิสูง และยังพบว่าเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้จะมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุด ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Rodrigues (2007) [35] ซึ่งทำการศึกษาการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากเปลือกมะพร้าวและพบว่าสภาวะที่ให้สารประกอบฟีโนลิคสูงที่สุดคือการสกัดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของเมทานอลต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ

4.4.4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ

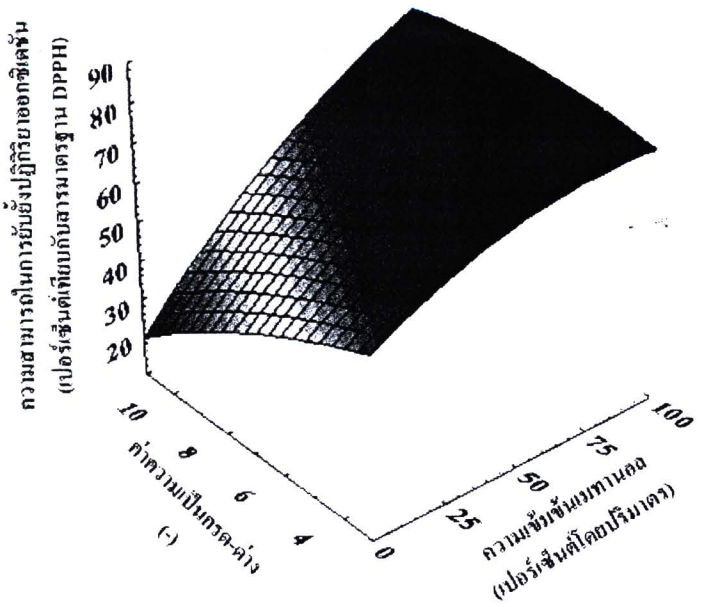
จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ (รูปที่ 4.17) แสดงให้เห็นว่าทั้งสองปัจจัยได้แก่ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด–ด่าง เป็นตัวแปรที่มีผลกระทบต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัด โดยพบว่าการสกัดในสภาวะที่เป็นด่างมากขึ้นจะทำให้ปริมาณกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก คลอริลาจิน และสารที่มีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ ค.16–ค.18) จึงทำให้ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้นด้วย และการสกัดที่อุณหภูมิต่ำ สารสกัดที่ได้จะมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูง เนื่องจากเมื่อทำสกัดที่อุณหภูมิสูงเกิน 50 องศาเซลเซียส จะทำให้สารประกอบฟีโนลิคสลายตัว ซึ่งจะทำให้คุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้จะมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น



รูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำ

4.4.4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ (รูปที่ 4.18) พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดใบสบู่ดำโดยใช้เมทานอลความเข้มข้นสูงและมีค่าของความเป็นกรด–ด่างสูง จะทำให้ได้สารสกัดซึ่งมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูง เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ เมทานอลและเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างจะทำให้ปริมาณกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ ค.16–ค.18)



รูปที่ 4.18 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของเมทานอลกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ

จากการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัด ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าสภาวะที่สามารถสกัดสารสำคัญได้ปริมาณสูงที่สุดคือการสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 และใช้เมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ความหนืดของตัวทำละลายจะมีค่าลดลง และสัมประสิทธิ์การแพร่มีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้ตัวถูกละลายแพร่กระจายสู่ตัวทำละลายได้มากขึ้น และยังพบว่าการสกัดที่ใช้ความเข้มข้นของเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผลได้การสกัดจะสูงขึ้น เนื่องจากค่าพารามิเตอร์ในการละลายของเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (38.70 $MPa^{1/2}$) มีค่าใกล้เคียง

กับค่าพารามิเตอร์การละลายของกรดแกลลิก (37.89 $MPa^{1/2}$) กรดแอลลาจิก (36.05 $MPa^{1/2}$) และคลอริลาจิน (37.43 $MPa^{1/2}$) โดยเมื่อทำการสกัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวนี้ พบว่าปริมาณกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินที่สกัดได้สูงสุดเท่ากับ 4770.20, 5528.82 และ 12573.98 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง ตามลำดับ สำหรับสภาวะที่สามารถสกัดสารที่มีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สูงสุด คือการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 และใช้ เมทานอล 75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลาย

4.5 สหสัมพันธ์สำหรับทำนายผลได้การสกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำ

จากผลการทดลองหาประสิทธิภาพในการสกัดสารสำคัญ (กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน) จากใบสบู่ดำ ภายใต้สภาวะการสกัดที่แตกต่างกัน คือ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ผลในรูปพื้นผิวตอบสนอง จะได้ความสัมพันธ์ของปัจจัยและผลได้การสกัดซึ่งแสดงในรูปแบบของสมการโพลิโนเมียลอันดับสอง (second-order polynomial equation) แสดงดังสมการที่ 4.15

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{3} b_i X_i + \sum_{i=1}^{3} b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} b_{ij} X_i X_j \qquad (4.15)$$

โดยที่ Y คือ ปริมาณสารสกัดหรือความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

b_0 คือ สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของจุดตัด (intercept)

b_i คือ สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear)

b_{ii} คือ สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์กำลังสอง (quadratic)

b_{ij} คือ สัมประสิทธิ์อันตรกิริยาระหว่างตัวแปร (interaction terms)

X_i และ X_j คือ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง

จากผลการทดลองสกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำ สามารถหาความสัมพันธ์ในรูปแบบของสมการที่ 4.15 ได้ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปโดยใช้วิธี F-test และ *t*-test ในการหาค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ค่าเอฟ (F-value) ค่าที (*t*-value) และค่าพี (*p*-value) เพื่อบอกนัยสำคัญทางสถิติและนัยสำคัญของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ในสมการที่ 4.15

4.5.1 สหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายผลได้การสกัด

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่สกัดได้จากใบสบู่ จะได้สหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายผลได้การสกัดสารสำคัญ ได้แก่ (กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน) ที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ ตามลำดับดังนี้

$$Y_{GA} = 6943.37 + 31.17X - 0.02X^2 - 329.01T + 4.46T^2 + 283.45\ P + 7.54P^2 - 0.44XT - 3.11XP - 4.88TP \quad (4.16)$$

$$Y_{EA} = 72501.33 - 177.83X - 0.12X^2 - 2392.30T + 23.97T^2 - 1459.76P + 114.72P^2 + 2.45XT + 13.73\ XP - 16.71TP \quad (4.17)$$

$$Y_{CG} = 12466.85 + 75.63X - 0.74X^2 - 315.90T + 2.54T^2 - 882.30P + 16.02\ P^2 - 0.29XT + 3.63\ XP + 11.45\ TP \quad (4.18)$$

โดยที่ Y_{GA} คือ ผลได้การสกัดกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง)

Y_{EA} คือ ผลได้การสกัดกรดแอลลาจิก (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง)

Y_{CG} คือ ผลได้การสกัดคลอริลาจิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง)

T คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

X คือ ความเข้มข้นของเมทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)

P คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-)

ตารางที่ 4.8 สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของผลได้การสกัดกรดแกลลิก

Parameters	Coefficient (b_i)	Sum of squares (ss)	F-value	p-value
Intercept (b_0)	6943.37	464666	2.68	0.14
T (b_3)	-329.01	1621220	9.35	0.02
X (b_1)	31.17	111391	0.64	0.45
P (b_5)	283.45	54166	0.31	0.59
TX (b_7)	-0.44	94889	0.55	0.48
TP (b_9)	-4.88	76170	0.44	0.53
XP (b_8)	-3.11	193116	1.11	0.32
T^2 (b_4)	4.46	4332681	24.99	0.00
X^2 (b_2)	-0.02	2895	0.02	0.90
P^2 (b_6)	7.54	19869	0.11	0.74

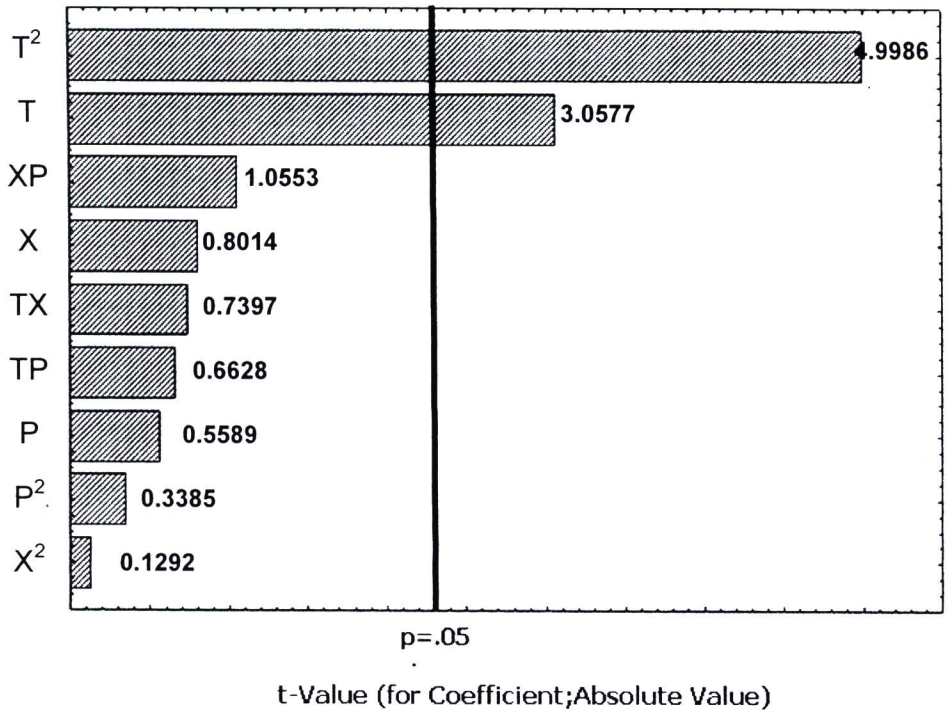
ตารางที่ 4.9 สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของผลได้การสกัดกรดแอลลาจิก

Parameters	Coefficient (b_i)	Sum of squares (ss)	F-value	p-value
Intercept (b_0)	12466.85	1498004	3.48	0.10
T (b_3)	-315.90	1494542	3.47	0.10
X (b_1)	75.63	655719	1.52	0.25
P (b_5)	-882.30	524799	1.22	0.30
TX (b_7)	-0.29	40706	0.09	0.77
TP (b_9)	11.45	419334	0.97	0.35
XP (b_8)	3.63	262831	0.61	0.46
T^2 (b_4)	2.54	1409902	3.27	0.11
X^2 (b_2)	-0.74	4645360	10.78	0.01
P^2 (b_6)	16.02	89561	0.21	0.66

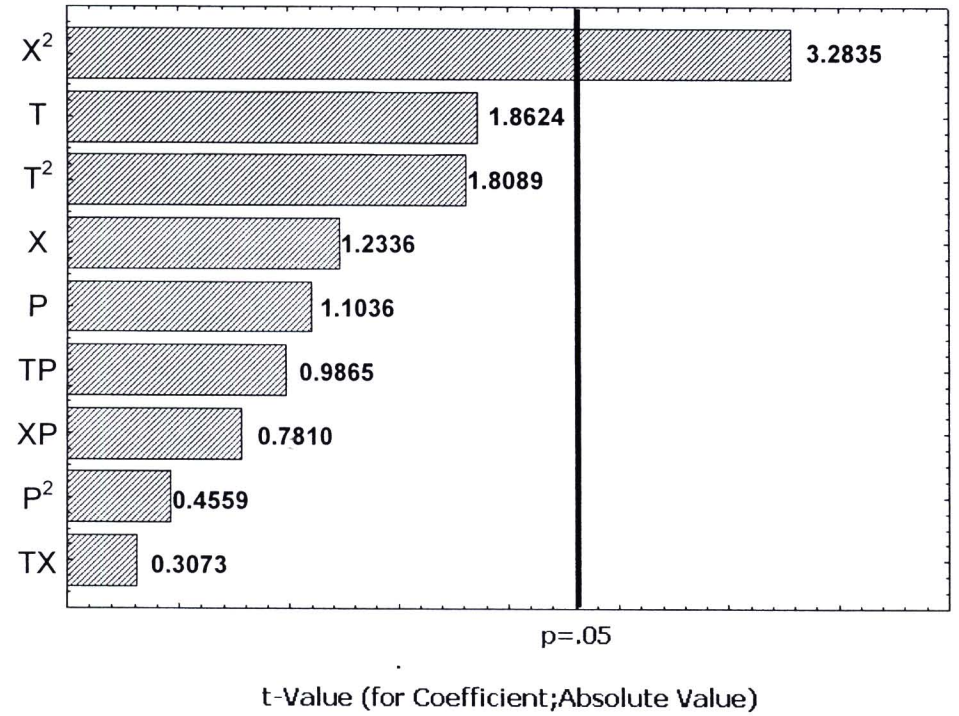
ตารางที่ 4.10 สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของผลได้การสกัดคลอริลาจิน

Parameters	Coefficient (b_i)	Sum of squares (ss)	F-value	p-value
Intercept (b_0)	72501.33	50663113	4.47	0.07
T (b_3)	-2392.30	85712516	7.57	0.03
X (b_1)	-177.83	3625226	0.32	0.59
P (b_5)	-1459.75	1436551	0.13	0.73
TX (b_7)	2.45	2991255	0.26	0.62
TP (b_9)	-16.71	893244	0.08	0.79
XP (b_8)	13.73	3771593	0.33	0.58
T^2 (b_4)	23.97	125334629	11.07	0.01
X^2 (b_2)	-0.12	128060	0.01	0.92
P^2 (b_6)	114.72	4594312	0.41	0.54

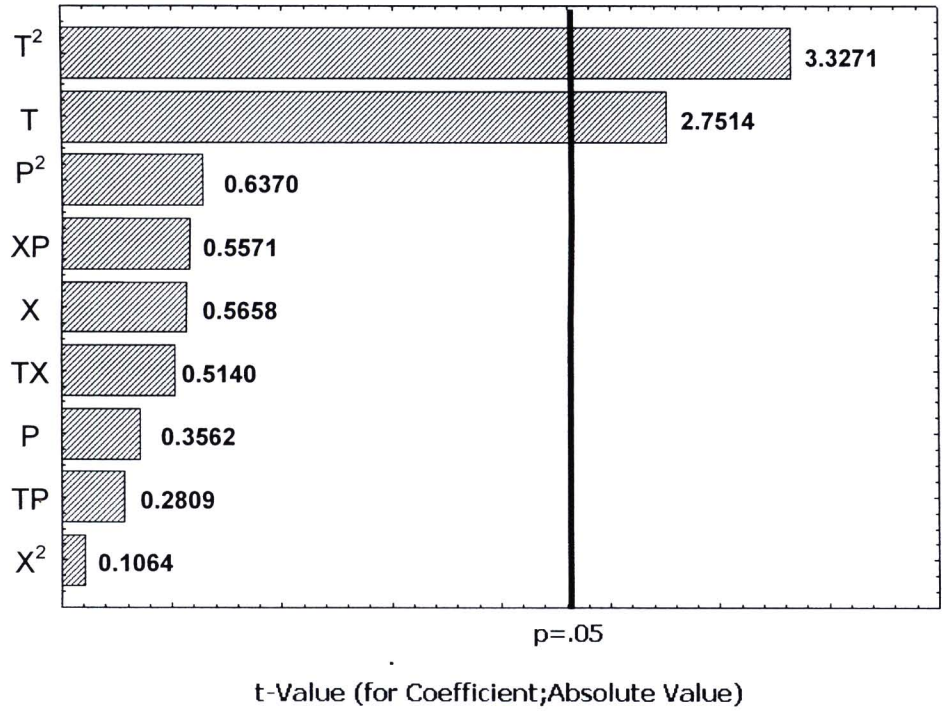
นัยสำคัญของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์แต่ละตัวในสมการโพลิโนเมียลอันดับสองจะพิจารณาจากค่า t และค่า p โดยตัวแปรที่มีความสอดคล้องกันจะมีค่าสัมบูรณ์ (absolute) ของ t มากและมีค่า p น้อย จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลได้การสกัดกรดแกลลิกกับปัจจัยต่าง ๆ พบว่าตัวแปรที่มีนัยสำคัญและมีผลต่อการสกัดมากที่สุดคือ เทอมของความสัมพันธ์กำลังสองของอุณหภูมิ, T^2 ($p = 0.0011$) รองลงมาคือเทอมของความสัมพันธ์เชิงเส้นของอุณหภูมิ, T ($p = 0.0156$) ส่วนเทอมความสัมพันธ์ของตัวแปรอื่นไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4.19 ในทำนองเดียวกันผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกกับปัจจัยต่าง ๆ พบว่าตัวแปรที่มีนัยสำคัญและมีผลต่อผลได้การสกัดมากที่สุดคือเทอมของความสัมพันธ์กำลังสองของความเข้มข้นของเมทานอล, X^2 ($p = 0.0111$) ส่วนเทอมความสัมพันธ์ของตัวแปรอื่นไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4.20 สำหรับผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลได้การสกัดคลอริลาจินกับปัจจัยต่าง ๆ พบว่าตัวแปรที่มีนัยสำคัญและมีผลต่อการสกัดมากที่สุดคือ เทอมของความสัมพันธ์กำลังสองของอุณหภูมิ, T^2 ($p = 0.0104$) รองลงมาคือเทอมของความสัมพันธ์เชิงเส้นของอุณหภูมิ, T ($p = 0.0250$) ส่วนเทอมความสัมพันธ์ของตัวแปรอื่นไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.19 ค่า t ของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์สำหรับสหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายผลได้การสกัดกรดแกลลิก

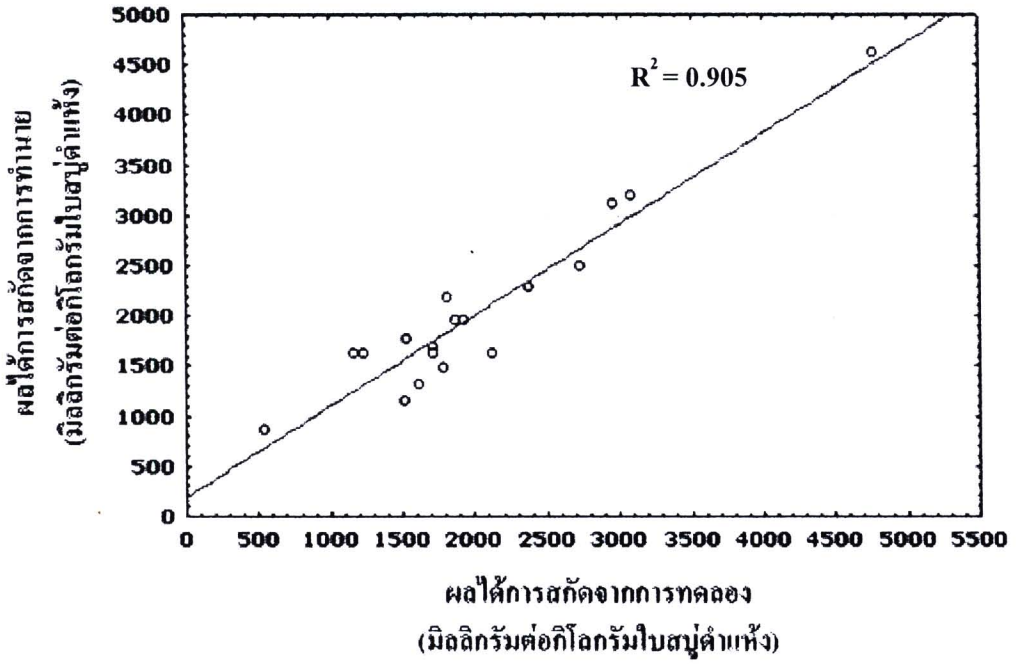


รูปที่ 4.20 ค่า t ของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์สำหรับสหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายผลได้การสกัดกรดแอลลาจิก

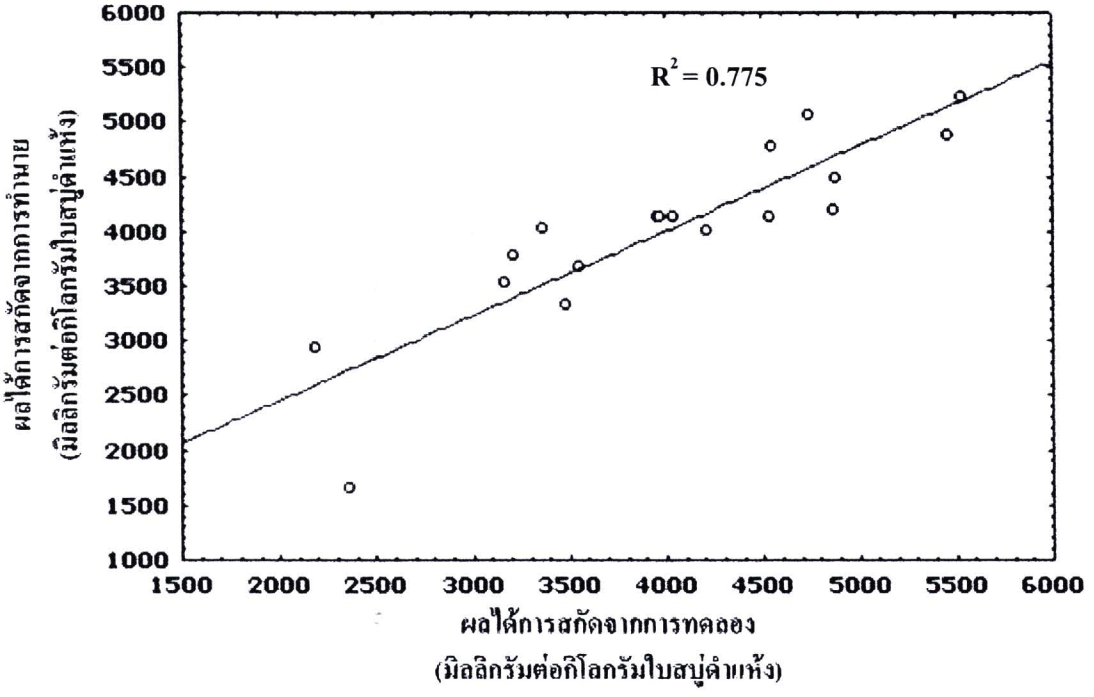


รูปที่ 4.21 ค่า t ของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์สำหรับสหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายผลได้การสกัดคลอริลาจิน

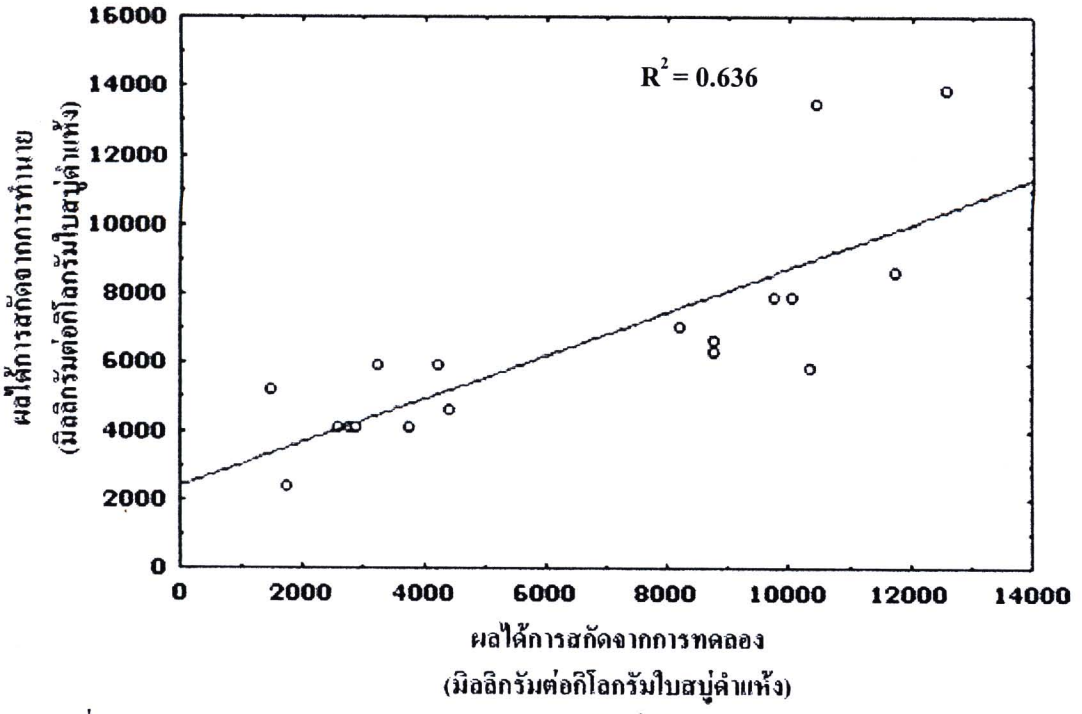
เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลได้การสกัดสารสำคัญที่ได้จากการคำนวณจากสมการที่ 4.16-4.18 กับผลได้การสกัดจากผลการทดลอง (ตารางที่ ค.16-ค.18) พบว่าผลได้การสกัดกรดแกลลิกที่สกัดได้จากการคำนวณและผลการทดลองมีค่าต่างกันน้อยที่สุด รองลงมาคือกรณีของผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกและคลอริลาจิน ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) พบว่าสหสัมพันธ์สำหรับผลได้การสกัดกรดแกลลิก (รูปที่ 4.22) กรดแอลลาจิก (รูปที่ 4.23) และคลอริลาจิน (รูปที่ 4.24) มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.905 0.775 และ 0.636 ตามลำดับ



รูปที่ 4.22 เปรียบเทียบผลได้การสกัดของกรดแกลลิกที่ได้จากการคำนวณกับผลการทดลอง



รูปที่ 4.23 เปรียบเทียบผลได้การสกัดของกรดแอลลาจิกที่ได้จากการคำนวณกับผลการทดลอง



รูปที่ 4.24 เปรียบเทียบผลได้การสกัดของคลอริลาจินที่ได้จากการคำนวณกับผลการทดลอง

4.5.2 สหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำ

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสำคัญที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ จะได้สหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด แสดงดังสมการที่ 4.19

$$YA = 141.88 - 0.59X - 0.002X2 - 2.30T + 0.02T2 + 1.44P - 0.06P2 + 0.02\,XT + 0.05XP - 0.10TP \quad (4.19)$$

โดยที่ Y_A คือ ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (เปอร์เซ็นต์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน DPPH)

T คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

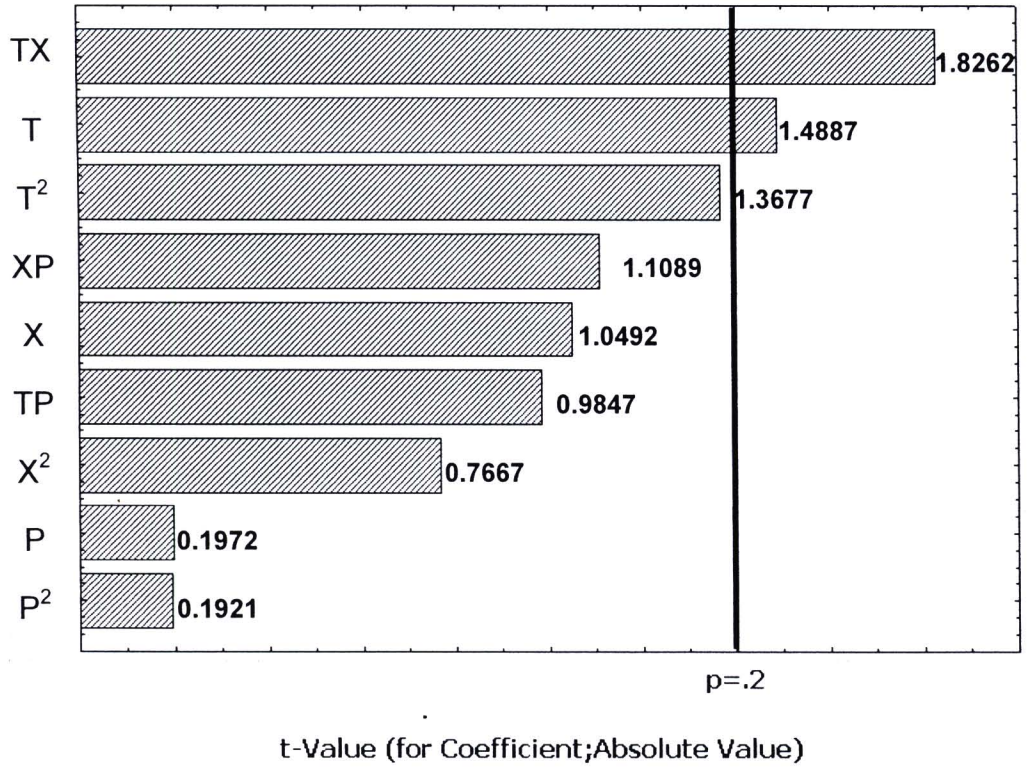
X คือ ความเข้มข้นของเมทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)

P คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-)

ตารางที่ 4.11 สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

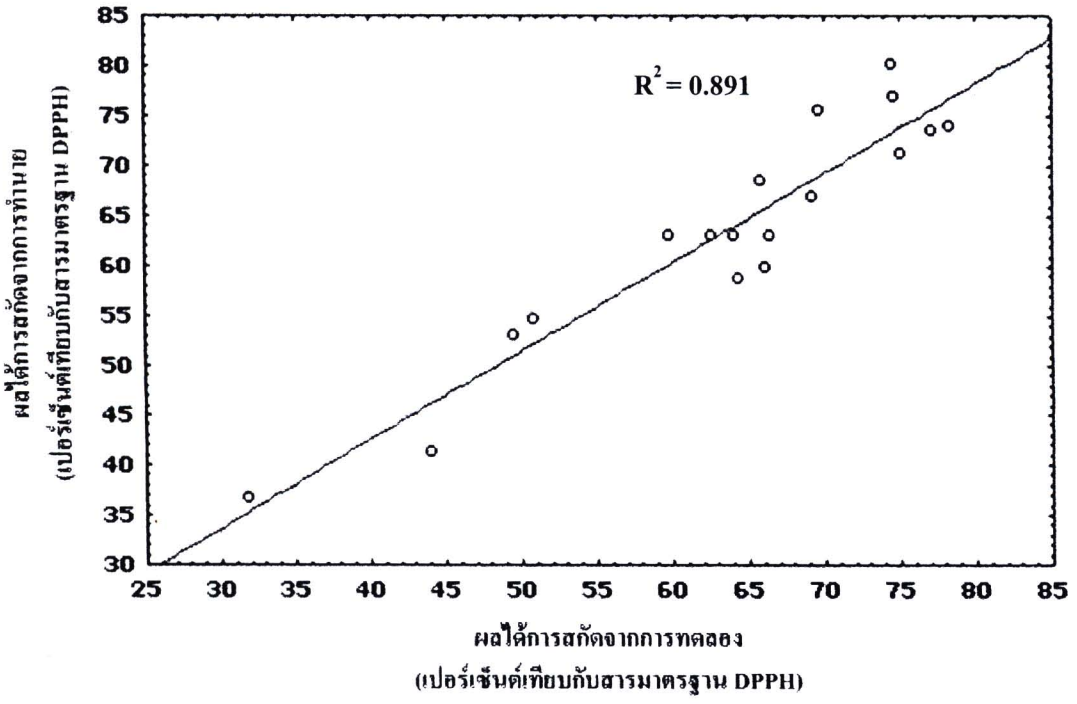
Parameters	Coefficient (b_i)	Sum of squares (ss)	F-value	p-value
Intercept (b_0)	141.88	194.01	5.43	0.05
T (b_3)	-2.30	79.17	2.22	0.17
X (b_1)	-0.59	39.31	1.10	0.32
P (b_5)	1.44	1.40	0.04	0.85
TX (b_7)	0.02	119.16	3.34	0.11
TP (b_9)	-0.10	34.62	0.97	0.35
XP (b_8)	0.05	43.83	1.23	0.30
T^2 (b_4)	0.02	66.81	1.87	0.21
X^2 (b_2)	0.002	20.98	0.59	0.47
P^2 (b_6)	-0.06	1.32	0.04	0.85

นัยสำคัญของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของแต่ละตัว ตัวแปรในสมการโพลิโนเมียลอันดับสองจะพิจารณาจากค่า t และค่า p โดยตัวแปรที่มีความสอดคล้องกันจะมีค่าสัมบูรณ์ของ t มากและมีค่า p น้อย จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันกับปัจจัยในการสกัด พบว่าตัวแปรที่มีนัยสำคัญและมีผลต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำมากที่สุดคือ เทอมของความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้น, TX ($p = 0.1051$) รองลงมาคือ อุณหภูมิ, T ($p = 0.1747$) ส่วนเทอมความสัมพันธ์ของตัวแปรอื่นไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.2$) ดังแสดงในรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 ค่า t ของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์สำหรับสหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนาย คุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

จากผลการคำนวณคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดตามสมการที่ 4.19 แสดงผลการคำนวณได้ดังตารางที่ ค.19 พบว่าคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดมีความแตกต่างกันระหว่างค่าที่ได้จากการคำนวณและค่าที่ได้จากการทดลองเล็กน้อย และพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) ของสหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัด (รูปที่ 4.26) มีค่าเท่ากับ 0.891



รูปที่ 4.26 เปรียบเทียบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ได้จากการคำนวณกับผลการทดลอง

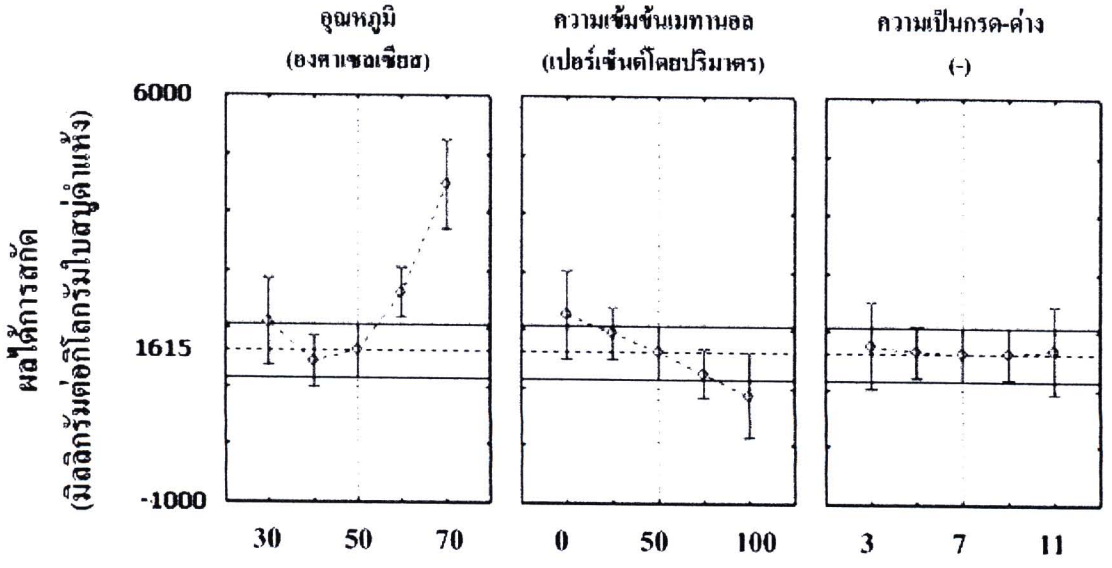
4.6 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำ

ศึกษาโครงร่างพื้นผิวที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง เพื่อวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสำคัญสามชนิดจากใบสบู่ดำ ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน และวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสำคัญที่มีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีที่สุด

4.6.1 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำ

4.6.1.1 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดกรดแกลลิกจากใบสบู่ดำ

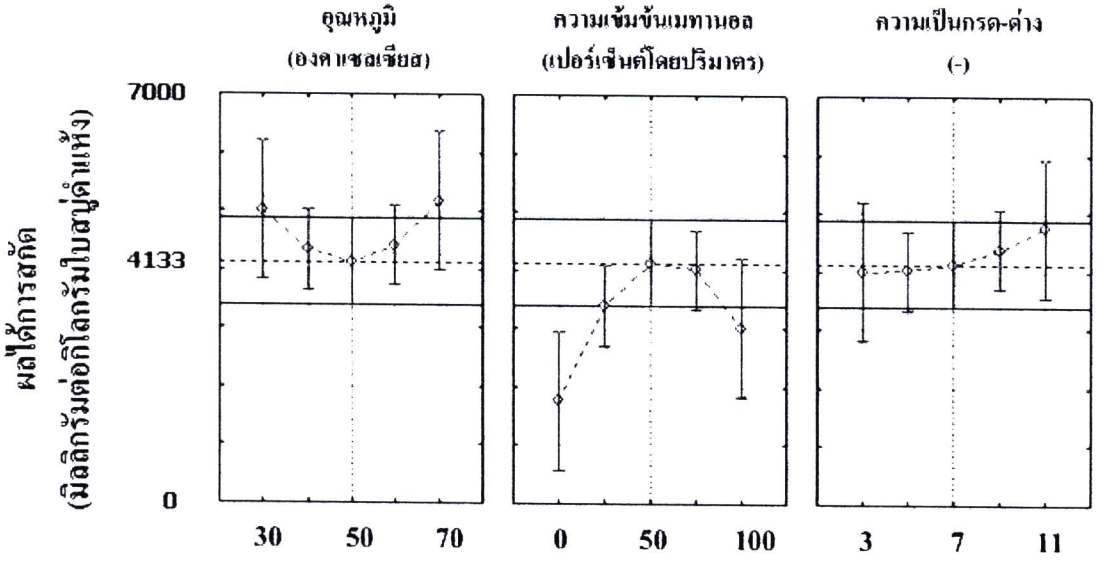
จากผลการศึกษาโครงร่างพื้นผิวที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง (รูปที่ 4.27) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดแกลลิกจากการทำนาย คือการสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้เมทานอลความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 11 การสกัดภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้พบว่าผลได้การสกัดกรดแกลลิกเท่ากับ 5641.48 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง



รูปที่ 4.27 ผลการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดกรดแกลลิกจากใบสบู่ดำ

4.6.1.2 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดกรดแอลลาจิกจากใบสบู่ดำ

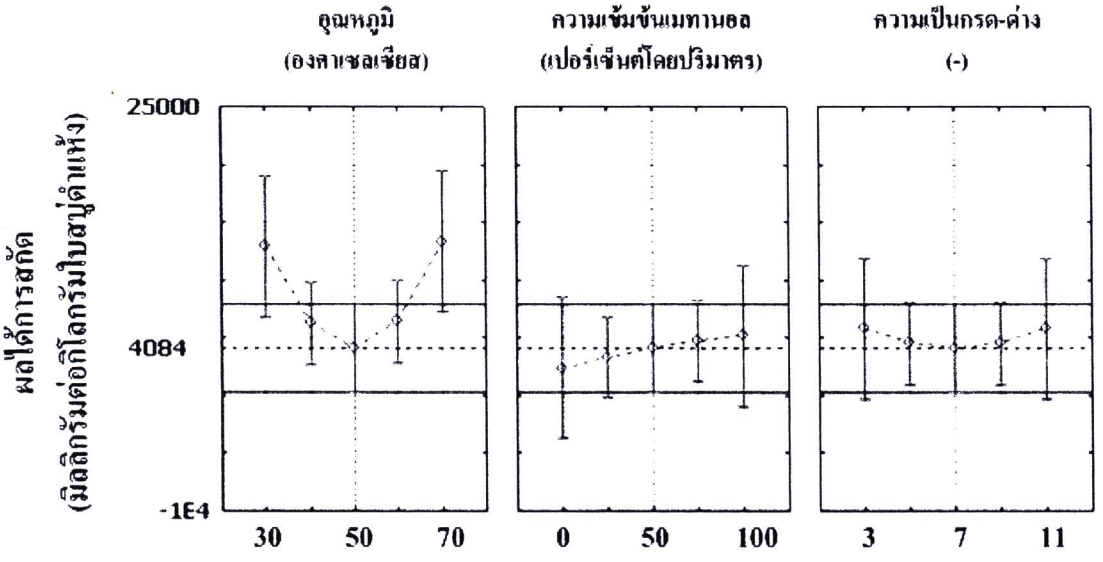
จากผลการศึกษาโครงร่างพื้นผิวที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง (รูปที่ 4.28) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดแอลลาจิกจากการทำนายคือการสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้เมทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 11 ที่สภาวะนี้พบว่าปริมาณกรดแอลลาจิกสูงสุดที่สกัดได้มีค่าเท่ากับ 6788.61 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง



รูปที่ 4.28 ผลการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดกรดแอลลาจิกจากใบสบู่ดำ

4.6.1.3 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดคลอริลาจินจากใบสบู่ดำ

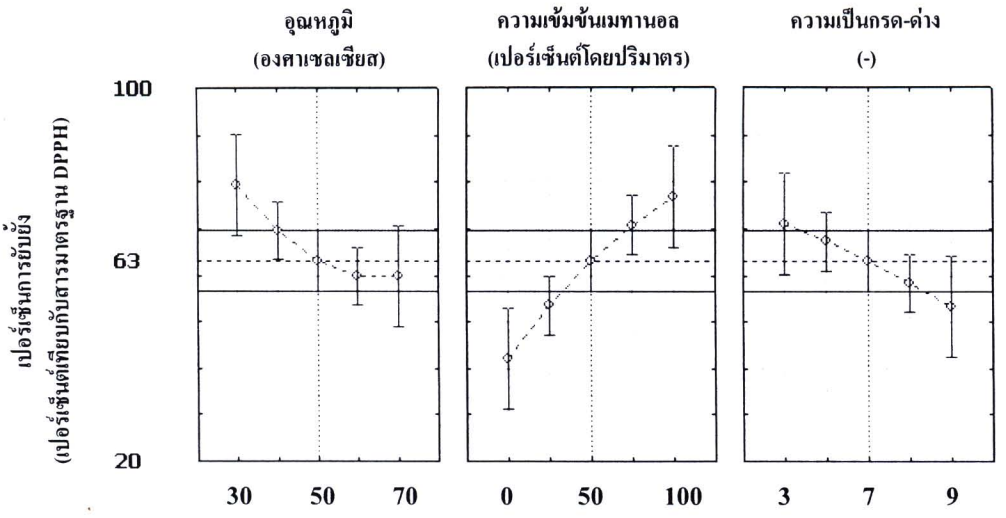
จากผลการศึกษาโครงร่างพื้นผิวที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง (รูปที่ 4.29) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคลอริลาจินจากการทำนายคือการสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้เมทานอลบริสุทธิ์ และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 11 ที่สภาวะนี้พบว่าปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้มีค่าเท่ากับ 20659.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง ตามลำดับ



รูปที่ 4.29 ผลการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดคลอริลาจินจากใบสบู่ดำ

4.6.2 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำที่มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุด

จากผลการศึกษาโครงร่างพื้นผิวที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเมทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง (รูปที่ 4.30) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำที่มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุดคือการสกัดที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส โดยใช้เมทานอลบริสุทธิ์ และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 ที่สภาวะนี้พบว่าสารสกัดใบสบู่ดำมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเท่ากับ 68.73 เปอร์เซ็นต์เทียบกับสารมาตรฐาน DPPH



รูปที่ 4.30 ผลการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำที่มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุด

4.7 การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสารสกัดใบสบู่ดำระหว่างการเก็บรักษา

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสกัดใบสบู่ดำของกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน ในระหว่างการเก็บรักษาสารสกัดใบสบู่ดำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นนำสารสกัดใบสบู่ดำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน ที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณหาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสารสกัดใบสบู่ดำในระหว่างการเก็บรักษาได้จากสมการที่ 4.20 และ 4.21 [46]

$$R_x = \frac{C_x}{C_{ref}} \times 100 \tag{4.20}$$

$$C_x = C_{ref} - C_t \tag{4.21}$$

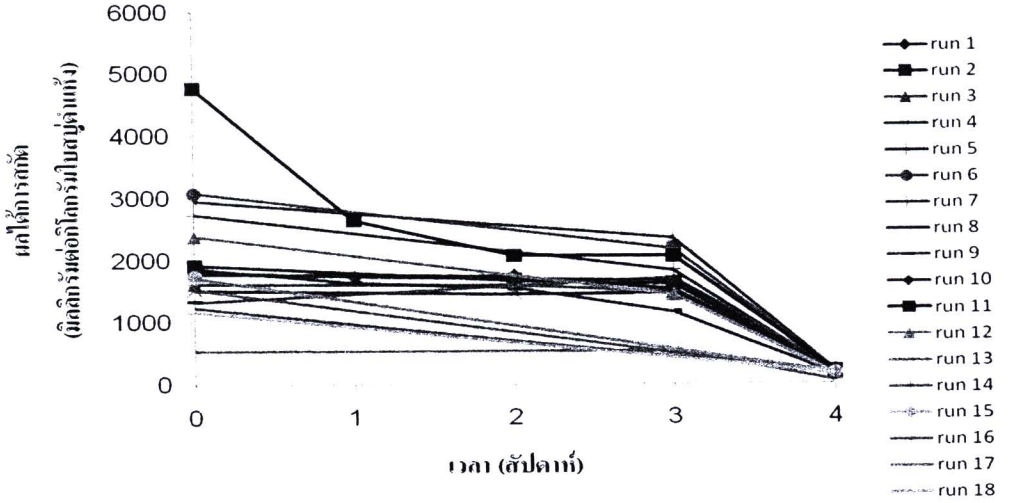
โดยที่ R_x คือ การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสารสกัดใบสบู่ดำในระหว่างการเก็บรักษา (เปอร์เซ็นต์)

C_x คือ ปริมาณสารสำคัญที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับปริมาณเริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง)

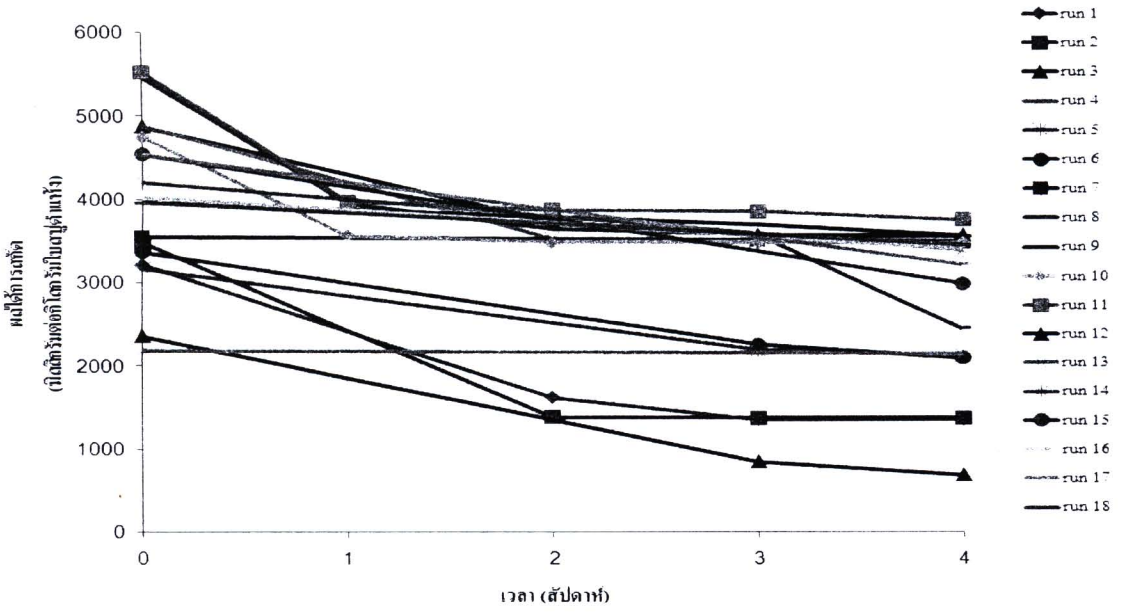
C_{ref} คือ ปริมาณสารเริ่มต้น (t=0) (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง)

C_t คือ ปริมาณสารที่เวลาต่างๆ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง)

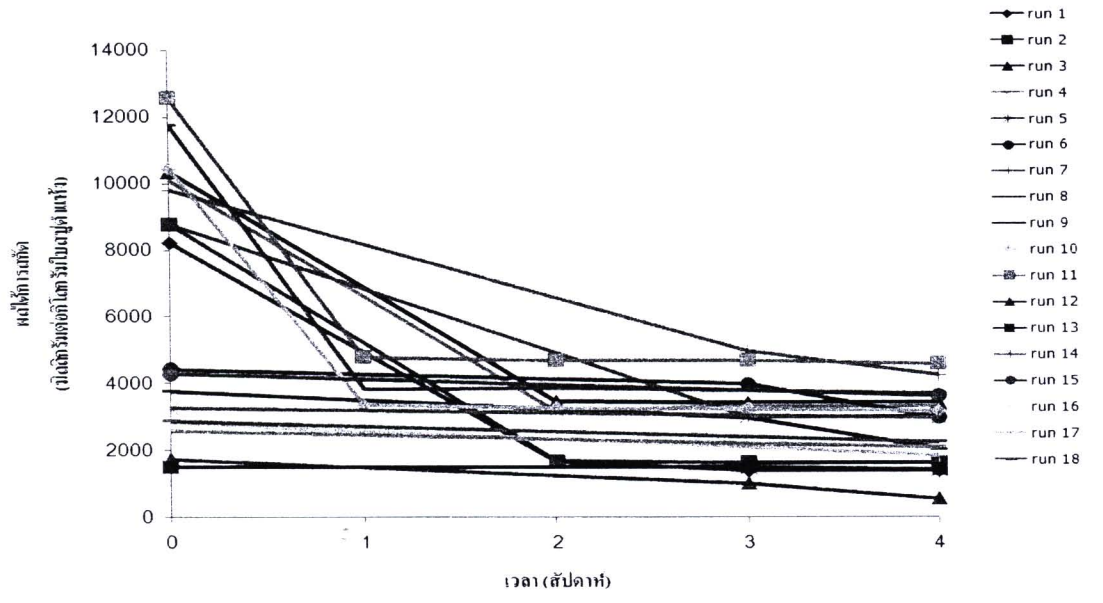
จากผลการทดลองพบว่า กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินในสารสกัดใบสบู่ดำมีปริมาณลดลงภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน โดยพบว่าการสกัดด้วยเมทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 กรดแกลลิกในสารสกัดใบสบู่ดำมีปริมาณลดลงมากที่สุดถึง 95.66 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การสกัดด้วยเมทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 หลังจากเก็บรักษาสารสกัดไว้ 1 เดือน กรดแกลลิกมีปริมาณลดลงน้อยที่สุดคือ 84.14 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.31) สำหรับกรดแอลลาจิกที่สกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีปริมาณลดลงหลังจากเก็บรักษาไว้ 1 เดือนมากที่สุดคือ 70.77 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การสกัดกรดแอลลาจิกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เมทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 มีปริมาณลดลงหลังจากเก็บรักษาไว้ 1 เดือนน้อยที่สุดคือ 1.18 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.32) ส่วนคลอริลาจินที่สกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้เมทานอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 มีปริมาณลดลงหลังจากเก็บรักษาไว้ 1 เดือนมากที่สุดคือ 83.06 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การสกัดคลอริลาจินโดยใช้เมทานอลบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีปริมาณลดลงหลังจากเก็บรักษาไว้ 1 เดือนน้อยที่สุดคือ 5.47 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.33) ทั้งนี้สารสำคัญทั้งสามในสารสกัดใบสบู่ดำมีปริมาณที่ลดลงอาจเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารสกัดเมื่ออยู่ในสารละลาย [31,47,48] จะเห็นได้ว่ากรดแอลลาจิกในสารสกัดใบสบู่ดำมีการลดลงน้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีคลอริลาจินบางส่วนที่สลายตัวเป็นกรดแอลลาจิกได้ [49]



รูปที่ 4.31 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแกลลิกระหว่างการเก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ



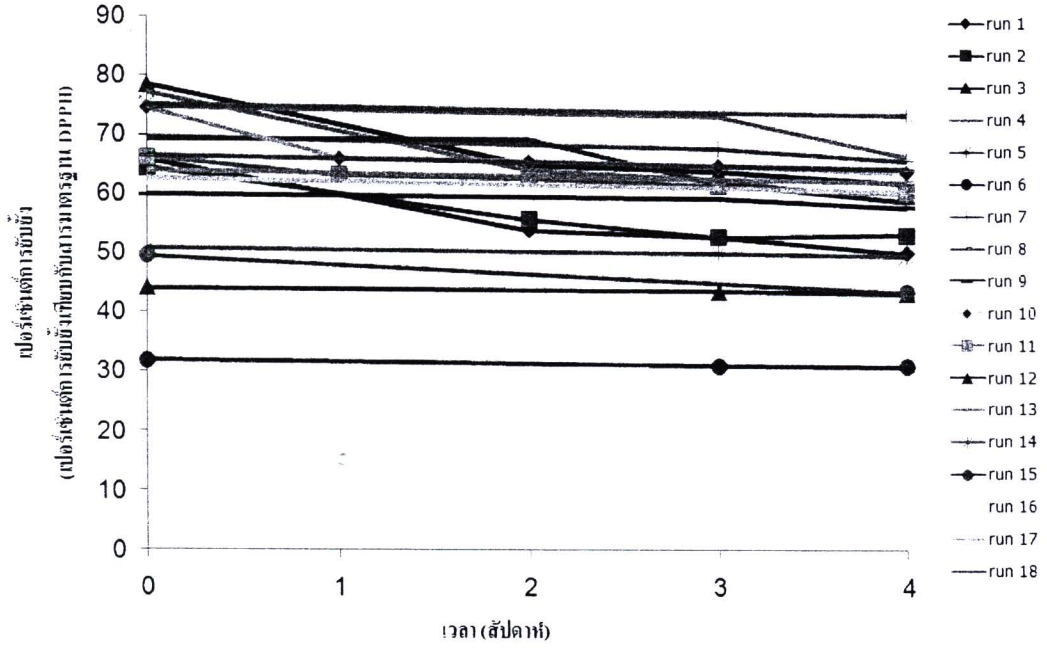
รูปที่ 4.32 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแอลลาจิกระหว่างการเก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ



รูปที่ 4.33 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอริลาจินระหว่างการเก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในระหว่างการเก็บรักษาสารสกัดใบสบู่ดำ ในสภาวะที่ไม่มีแสงและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน นำตัวอย่างสารสกัดไปวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยวิธี modified original DPPH เปรียบเทียบกับสารสกัดเริ่มต้น

จากผลการทดลองพบว่าการสกัดสาระสำคัญจากใบสบู่ดำด้วยน้ำบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 พบว่าความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดลดลงน้อยที่สุดเท่ากับ 2.08 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.34) กล่าวคือสารสกัดภายใต้สภาวะดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในระหว่างการเก็บรักษาน้อยที่สุด เนื่องจากการใช้อุณหภูมิต่ำในการสกัด ตัวทำละลายที่ใช้คือน้ำในสภาวะที่เป็นกลาง ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้ไม่ทำให้สารสำคัญในใบสบู่ดำสลายตัว ในขณะที่การสกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำด้วยเมทานอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 พบว่าความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลงมากที่สุดเท่ากับ 24.22 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.34) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่สกัดในสภาวะดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในระหว่างการเก็บรักษามากที่สุด



รูปที่ 4.34 การเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบสบู่ดำในระหว่างการเก็บรักษา