Published online: 26 July 2019

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบหนานเฉาเหว่ยโดยใช้คลื่นความถี่สูง

Ultrasonic Extraction Optimization of Phenolic Antioxidants from *Vernonia amygdalina* Leaf

ปิยปาณ ธรรมจารี

อีเมล์ : 6051701279@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร. ปัญญวัฒณ์ ปินตาทอง

อีเมล์ : punyawatt.pin@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

Mae Fah Luang University

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบหนานเฉาเหว่ย การศึกษาผลของความเข้มข้นของเอทานอลต่อการสกัด โดยใช้คลื่นความถี่สูง พบว่า เอทานอลร้อยละ 80 ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงสุด 84.05 ± 2.33 มก. สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการจับอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าใบหนานเฉาเหว่ยที่สกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 80 ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 87.15 ± 1.60 มก. สมมูลทรอลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองโดยใช้วิธีการออกแบบของ Box – Behnken เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบหนานเฉาเหว่ย โดยทำการศึกษา 3 ตัวแปร ได้แก่ อัตราส่วนตัวทำละลายต่อตัวอย่าง ความเข้มข้นของเอทานอลและเวลาที่ใช้ในการสกัด พบว่า อัตราส่วนตัวทำละลายต่อตัวอย่างและความเข้มข้นของเอทานอลมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิก คือ อัตราส่วนตัวทำละลายต่อตัวอย่าง 28.07 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก การสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 81.36 โดยปริมาตรและเวลาที่ใช้ในการสกัด 25.17 นาที ซึ่งสภาวะดังกล่าว คาดว่าจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และ

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการจับอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 89.15 มก. สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และ100.92 มก. สมมูลทรอลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ

คำสำคัญ : การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง/การสกัดด้วยคลื่นความถี่สูง/ใบหนานเฉาเหว่ย/ฟีนอลิก/ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

In the present work, phenolic antioxidant was extracted from *Vernonia amygdalina* leaf by ultrasonic – assisted extraction method. Effect of ethanol concentration on the extraction was studied and the results showed that the highest phenolic content (84.05 ± 2.33 mg GAE/g extract) was significantly obtained by 80 % w/v ethanol. Antioxidant capacity assayed by DPPH radical scavenging activity as greatly obtained at 87.15 ± 1.60 mg TEAC/g extract when 80 % ethanol was employed. Response surface methodology (RSM) based on Box – Behnken design (BBD) was used to optimize the extraction conditions of phenolic antioxidant compounds from *Vernonia amygdalina* leaf. Three independent variables including solvent-to-solid ratio, ethanol concentration and extraction time were investigated via parameters of extractable phenolic compound and DPPH radical scavenging activity. The results revealed that the all factors had significant effect on the all responses ($P < 0.05$). The optimum extraction conditions determined from 3D response surface were solvent-to-solid ratio of 28.07 % v/w, ethanol concentration of 81.36 % v/v and extraction time of 25.17 min. Under the predicted condition, it could provide the predicted values of 89.15 mg GAE/g extract and 100.92 mg TEAC/g extract for phenolic content and DPPH radical scavenging activity, respectively.

Keywords: Antioxidant/Phenolic/Response surface methodology/Ultrasonic-assisted extraction method/*Vernonia amygdalina* leaf

Mae Fah Luang University

บทนำ

อนุมูลอิสระมีความไวต่อปฏิกิริยาสูงเป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิดโรค เป็นปัจจัยทำให้โรคมีพัฒนาการอย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงยิ่งขึ้น อันเป็นผลให้เกิดภาวะที่เซลล์และร่างกายถูกออกซิไดส์จนเกินสมดุล (oxidation stress) ภาวะดังกล่าวทำให้ชีวโมเลกุลที่สำคัญในเซลล์เสียหายและถูกทำลาย เช่น ภาวะถูกออกซิไดส์จนเกินสมดุลพบในโรคมะเร็งและในโรคสมอง โรคเบาหวาน โรคความเสื่อมของประสาท สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ การบริโภคผักผลไม้มีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบพอลิฟีนอลลิกจากพืชมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ต้านการกลายพันธุ์ (antimutagens) เป็นต้น (โอภา วัชระคุปต์และคณะ, 2550; นุชนิภา นันทะวงศ์, 2558)

หนานเฉาเหว่ย มีต้นกำเนิดมาจากทวีปแอฟริกา แถบประเทศไนจีเรีย เคนยา เอธิโอเปียต่อมาพบในมาเลเซีย หนานเฉาเหว่ยเจริญได้ดีในประเทศแถบศูนย์สูตร อากาศร้อนชื้น พืชชนิดนี้สามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ดี มีฤทธิ์เย็นจัด รสขมฝาดเหมาะสำหรับคนที่มีร่างกายร้อน สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์มหาลัยมหิดล พบว่า สารสกัดน้ำของใบหนานเฉาเหว่ยมีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ลดน้ำตาลในเลือด ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย และต้านอนุมูลอิสระได้ มีรายงานว่าในใบหนานเฉาเหว่ยจากประเทศกานา ที่สกัดโดยเอทานอลและเมทานอล พบสารพฤษเคมีของใบหนานเฉาเหว่ย ได้แก่ saponins, terpenes, phenolic, alkaloids, tannins และ flavonoids (Adebayo et al.,2014)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีวิธีการสกัดหลายแบบ ประกอบไปด้วย เทคนิคการสกัดด้วยซอกห์เลต , การสกัดแบบไมโครเวฟ , การสกัดด้วยวิธีการแช่ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการสกัดแบบคลื่นความถี่สูงในใบหนานเฉาเหว่ยเทคนิคคลื่นความถี่ วิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM; Response Surface Methodology) เป็นวิธีการที่รวบรวมทางคณิตศาสตร์และสถิติมาใช้ในการสร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ปัญหาซึ่งแสดงผลตอบสนองต่อผลจากตัวแปรต่างๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาจุดหรือความเหมาะสมต่อผลนั้น ทำให้ง่ายต่อการจัดการและการอธิบายผล (กาญจณา ขันทกะพันธ์และเยาวภา สุขพรมา, 2559)

Mae Fah Luang University

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเตรียมสารสกัดหนานเฉาเหว่ยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการใช้คลื่นความถี่สูง

2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารฟีนอลิกจากใบหนานเฉาเหว่ย ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

ขอบเขตการวิจัย

เก็บตัวอย่างพืชจากจังหวัดพิษณุโลก เตรียมตัวอย่างใบหนานเฉาเหว่ย ทำการสกัดสารด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นความถี่สูง โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด แล้ววิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด หลังจากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง และวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทบทวนวรรณกรรม

จากการศึกษาของ Alara et al. (2018) ทำการสกัดสารด้วยคลื่นไมโครเวฟเพื่อที่จะเพิ่มปริมาณสารสกัดที่ได้และปริมาณสารฟีนอลิกให้ได้มากที่สุด จากใบหนานเฉาเหว่ย ได้ถูกออกแบบโดยใช้แบบจำลอง face-centered โดยพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษามีดังนี้ ช่วงเวลาของการฉายรังสีไมโครเวฟ (irradiation, 5-15 นาที) กำลังของไมโครเวฟ (microwave power, 400-600 วัตต์) อุณหภูมิ (temperature, 90-110 องศาเซลเซียส) และอัตราส่วนของสารตัวอย่างต่อตัวทำละลาย (feed-to-solvent ratio, 1:8-1:12 กรัมต่อมิลลิลิตร) สภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณสารสกัดสูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 22.34 โดยน้ำหนัก และปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด เท่ากับ 102.24 มก. สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด คือ ช่วงเวลาการฉายรังสีไมโครเวฟที่ 8 นาที กำลังของไมโครเวฟที่ 416 วัตต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างสารตัวอย่างต่อตัวทำละลายที่ 1:8 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งข้อมูลทั้งสองมีความสอดคล้องกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีค่า R^2 ของสารสกัดและสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 0.9664 และ 0.9885 ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อนำเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟมาเปรียบเทียบกับซอกเลต พบว่ามีค่าปริมาณสารสกัดและสารต้านอนุมูลอิสระและหมู่ฟังก์ชั่นซึ่งนำไปวิเคราะห์โดย FTIR มีปริมาณมากกว่าการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบซอกเลต

จากการศึกษาของอาภาภรณ์ จันทร์ปิรักษ์และคณะ (2561) ได้รายงานการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันจากกากกาแฟของพันธุ์โรบัสต้า และอะราบิก้า ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนโดยวิธีพื้นผิว

Mae Fah Luang University

ตอบสนอง และการออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วย อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อกากกาแฟ (4: 1-8 : 1 มก./ก.) อุณหภูมิในการสกัด (35-45 องศาเซลเซียส) และเวลาที่ใช้ในการสกัด (15-45 นาที) โดยในแต่ละปัจจัยมี 5 ระดับรอบ CCD เงื่อนไขการทดลอง 20 การทดลอง ผลการศึกษาพบว่าทุกปัจจัยมีสหสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อกากกาแฟ 8.14 มล./ก. อุณหภูมิในการสกัด 46.97 องศาเซลเซียส เวลาที่ในการสกัด 27.22 นาที และค่าปริมาณน้ำมันที่สกัดได้สูงสุดร้อยละ 13.04 โดยน้ำหนัก และเมื่อนำสภาวะเหล่านี้ไปทำการทดลองจึงพบว่า ค่าปริมาณน้ำมันที่สกัดได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 13.08 ± 0.20 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงและมีความแม่นยำสูงกับค่าทำนายจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ และวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำมันกาแฟที่สกัดได้ ค่ากรดไขมันของน้ำมันกาแฟปริมาณ 3.70 มก. สมมูลโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม แสดงว่าเหมาะสำหรับปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันและน้ำมันกาแฟมีค่าความหนืด 49.65 เซนติพอยส์ ที่ 40 องศาเซลเซียสและค่าความหนาแน่น 948 กก./ม.^{3} ที่ 15 องศาเซลเซียส

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างจากใบหนานเฉาเหว่ย

นำใบหนานเฉาเหว่ยแบบแห้ง มาจากสวนหทัยทิพย์ จังหวัดพิษณุโลกช่วงเดือนมกราคม พ.ศ.2562 จำนวน 1 กิโลกรัม จากนั้นปั่นให้เป็นผงละเอียด ด้วยเครื่องปั่นแห้งเก็บไว้ในถุงซิปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปสกัด

2. การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบหนานเฉาเหว่ยด้วยเทคนิคการใช้คลื่นความถี่สูง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิคคลื่นความถี่สูงเพื่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบหนานเฉาเหว่ย โดยทำการสกัดใน Ultrasonic bath ขนาดความถี่ 50/60 เฮิรตซ์ 660 วัตต์ ซึ่งมีการศึกษาวิจัยพบว่า เทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่ง่าย ประหยัดเวลา และให้ประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลิกสูง

2.1 ผลของความเข้มข้นเอทานอล

ทำการศึกษาผลของระดับความเข้มข้นเอทานอล ต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิก เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการกำหนดช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยความเข้มข้นเอทานอลที่ศึกษาคือร้อยละ 20, 40, 60, 80 และ 100 โดยปริมาตร โดยนำผงตัวอย่างพืช 12.5 กรัม ผสมกับสารละลายเอทานอล 250 มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราส่วนตัวทำละลายต่อตัวอย่าง เท่ากับ 20:1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก จากนั้นนำไปสกัดบน Ultrasonic bath เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารผสมมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatmann No.1 และทำให้แห้งด้วยการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสาร

Mae Fah Luang University

แบบหมุน ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสารสกัด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟินอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีการโครงร่างพื้นผิวตอบสนอง

ในงานวิจัยนี้ออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบ็นเกน (Box-Behnken Design, BBD) ซึ่งใช้หลักทางคณิตศาสตร์ด้านมิติ สามารถใช้กับการทดลองที่มีตัวแปรได้มากถึง 5 ตัวแปร โดยจะใช้ลูกบาศก์ (cube) ในการออกแบบการทดลอง ลูกบาศก์นี้ประกอบด้วยจุดศูนย์กลางและจุดกึ่งกลางของแต่ละด้าน ซึ่งตัวแปรที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แก่ ตัวทำละลายต่อตัวอย่าง (X_1) ความเข้มข้นของเอทานอล (X_2) และเวลา (X_3) โดยแต่ละตัวแปรทำการศึกษาที่ 3 ระดับคือ ตัวทำละลายต่อตัวอย่างที่10 20 และ30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 70 80 และ90 โดยปริมาตร ซึ่งคัดเลือดช่วงความเข้มข้นจากผลการทดลองจากข้อ 2.1 เนื่องจากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 70-90 โดยปริมาตร จะให้ผลในการสกัดสูงที่สุด และเวลาที่10 20 และ30 นาที โดยผลการออกแบบการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 สัญลักษณ์และระดับตัวแปรต่างๆ ในการออกแบบการทดลองแบบ Box-behnken

ตัวแปร	สัญลักษณ์	ระดับ	
		รหัสทั่วไป	รหัสระบุ
ตัวทำละลายต่อตัวอย่าง	X_1	10	-1
(เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก)		20	0
		30	+1
ความเข้มข้นของเอทานอล	X_2	70	-1
(ร้อยละโดยปริมาตร)		80	0
		90	+1
เวลา	X_3	10	-1
(นาที)		20	0
		30	+1

Mae Fah Luang University

จากนั้นทำการสกัดสารตัวอย่างในแต่ละสภาวะดังตารางที่ 2 โดยใช้วิธีการดังข้อ 2.1 นำสารสกัดทั้งหมดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์โมเดลทางคณิตศาสตร์เพื่อคำนวณหาสภาวะที่เหมาะสมจากโครงพื้นผิวตอบสนองต่อไป

ตารางที่ 2 ผลการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken แบบ 3 ตัวแปร 3 ระดับ

การทดลอง	**ตัวทำละลายต่อตัวอย่าง (X_1,%v/w)**	**ความเข้มข้นของเอทานอล (X_2,%v/v)**	**เวลา (X_3,นาที)**
1	0 (20)	-1 (70)	+1 (30)
2	0 (20)	0 (80)	0 (20)
3	0 (20)	0 (80)	0 (20)
4	-1 (10)	-1 (70)	0 (20)
5	-1 (10)	0 (80)	-1 (10)
6	+1 (30)	+1 (90)	0 (20)
7	-1 (10)	+1 (90)	0 (20)
8	+1 (30)	0 (80)	-1 (10)
9	0 (20)	+1 (90)	+1 (30)
10	+1 (30)	-1 (70)	0 (20)
11	0 (20)	0 (80)	0 (20)
12	0 (20)	0 (80)	0 (20)
13	0 (20)	0 (80)	0 (20)
14	0 (20)	+1 (90)	-1 (10)
15	0 (20)	-1 (70)	-1 (10)
16	-1 (10)	0 (80)	+1 (30)
17	+1 (30)	0 (80)	+1 (30)

Mae Fah Luang University

ผลการวิจัย

1. ผลของความเข้มข้นของเอทานอลต่อการสกัดสารจากใบหนานเฉาเหว่ย

1.1 ปริมาณสารสกัด

จากการสกัดสารออกฤทธิ์จากใบหนานเฉาเหว่ยด้วยวิธีคลื่นความถี่สูงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือร้อยละ 20, 40, 60, 80 และ 100 พบว่า สารสกัดที่ได้มีลักษณะสีเขียวเข้มหนืด เมื่อคำนวณหาร้อยละผลผลิตที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่ามีค่าดังนี้ ร้อยละผลผลิตที่ความเข้มข้นร้อยละ 20, 40, 60, 80 และ 100 มีค่าเท่ากับร้อยละ 49.01 ± 1.14, 41.79 ± 5.71, 57.60 ± 3.47, 31.71 ± 2.68 และ 6.45 ± 0.45 ตามลำดับ

จากผลการทดลองจะพบว่าที่เอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 60 ได้ผลผลิตมากที่สุด จากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ พบว่าการสกัดด้วยความเข้มข้นเอทานอลที่แตกต่างกัน มีผลทำให้ได้สารสกัดในปริมาณที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 60 มีปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Alara et al. (2017) พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 60 ได้ปริมาณสารสกัดสูงที่สุด

1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ในการสกัดใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ 20, 40, 60, 80 และ 100 ในขณะที่ปัจจัยอื่นมีค่าเวลาที่ใช้ในการสกัด 10 นาที และตัวทำละลายต่อตัวอย่าง 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 20, 40, 60, 80 และ 100 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 64.87 ± 3.39, 67.02 ± 1.34, 64.00 ± 3.23, 84.05 ± 2.33และ 66.59 ± 0.64 มก. สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ

จากผลการทดลองปริมาณสารสกัดพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ทำให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 และจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็นร้อยละ 100 การวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการสกัดใบหนานเฉาเหว่ยโดยวิธีคลื่นความถี่สูงด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อวิเคราะห์สารสกัดทั้งหมดแล้ว พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 80 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด จากการรายงานผลของ Alara et al. (2017) พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้ด้วยวิธีไมโครเวฟ โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 108.57 มก. สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด

Mae Fah Luang University

1.3 การทดสอบหาปริมาณการจับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity assay)

การทดสอบหาปริมาณการจับอนุมูลอิสระ DPPH ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมลอิสระของสารสกัดจากหนานเฉาเหว่ย เพราะอนุมูลอิสระ DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรและเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในการหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งใช้เวลาสั้น โดยการจับอนุมูลอิสระนั้นมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการจ่ายไฮโดรเจน และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดจากหนานเฉาเหว่ยด้วยความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกันคือ ความเข้มข้นร้อยละ 20, 40, 60, 80 และ 100 พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 55.12 ± 3.07, 75.68 ± 6.71, 73.83 ± 9.42, 87.15 ± 1.60 และ 51.71 ± 3.35 มก. สมมูลทรอลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ จากผลการทดลองสารสกัดที่สกัดด้วยความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 80 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด จากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ พบว่าการสกัดด้วยความเข้มข้นเอทานอลที่แตกต่างกันมีผลทำให้มีปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3 ผลของความเข้มข้นต่อร้อยละผลผลิต ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณการจับอนุมูลอิสระ DPPH

ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	ร้อยละผลผลิต	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/g extract)	ปริมาณการจับอนุมูลอิสระ DPPH (mg TEA/g extract)
20	49.01 ± 1.13^{b}	64.87 ± 3.39^{b}	55.12 ± 3.07^{c}
40	41.78 ± 5.71^{c}	67.02 ± 1.34^{b}	75.68 ± 6.71^{b}
60	57.60 ± 3.47^{a}	64.00 ± 3.23^{b}	73.83 ± 9.42^{b}
80	31.70 ± 2.68^{d}	84.05 ± 2.33^{a}	87.15 ± 1.60^{a}
100	6.45 ± 0.45^{e}	66.59 ± 0.64^{b}	51.71 ± 3.35^{c}

หมายเหตุ. ตัวยกอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก แสดงความแตกต่างกันของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

Mae Fah Luang University

2. การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง

งานวิจัยนี้ออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบ็นเกน (Box-Behnken Design, BBD) ตัวแปรที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แก่ ตัวทำละลายต่อตัวอย่าง (X_1) ความเข้มข้นของเอทานอล (X_2) และเวลา (X_3) เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากใบหนานเฉาเหว่ย การวิเคราะห์ความแปรปรวนแสดงดังตารางที่ 4และ 5 ตามลำดับ พบว่าแบบจำลองกำลังสองสามารถอธิบายข้อมูลจากการทดลองได้ดีที่สุด โดยทุกแบบจำลองนั้นมีความมีนัยสำคัญมากที่สุด ($p < 0.0001$) โดยทั่วไปความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการทำนายและการทดลองต้องมีความใกล้เคียงกันอย่างมาก ซึ่งสมการของการทำนายของปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงดังสมการที่ 1 และ 2

$$Y = 87.95 + 7.83X_1 + 7.32X_2 + 2.81X_3 - 1.76X_1X_2 - 1.46X_1X_3 - 1.85X_2X_3 - 6.80X_1^2 - 4.83X_2^2 - 7.89X_3^2 \quad \text{(สมการ 1)}$$

$$Y = 99.74 + 4.57X_1 - 7.27X_2 + 1.01X_3 - 0.6175X_1X_2 + 0.0075X_1X_3 - 0.4450X_2X_3 - 1.26X_1^2 - 25.44X_2^2 - 2.38X_3^2 \quad \text{(สมการ 2)}$$

เมื่อ X_1, X_2 และ X_3 คือ ตัวทำละลายต่อตัวอย่าง (10-30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก), ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ 70-90 โดยปริมาตร) และเวลาที่ใช้ในการสกัด (10 -30 นาที) ตามลำดับ

Mae Fah Luang University

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากใบหนานเฉาเหว่ย

Source	Sum of square	df	Mean Square	F value	Probability > F
Model	1634.77	9	181.64	34.50	<0.0001
X_1	490.63	1	490.63	93.18	<0.0001
X_2	429.10	1	429.10	81.49	<0.0001
X_3	63.39	1	63.39	12.04	0.0104
X_1X_2	12.43	1	12.43	2.36	0.1684
X_1X_3	8.53	1	8.53	1.62	0.2438
X_2X_3	13.76	1	13.76	2.61	0.1500
X_1^2	194.94	1	194.94	37.02	0.0005
X_2^2	98.20	1	98.20	18.65	0.0035
X_3^2	261.90	1	261.90	49.74	0.0002
Residual	36.86	7	5.27		
Lack of Fit	32.06	3	10.69	8.91	0.0304
Pure Error	4.80	4	1.20		
Cor Total	1671.63	16			

Std. Dev.: 2.29, R^2: 0.9780, Mean: 78.76, Adj R^2: 0.9496, C.V.%:2.91, Pred R^2: 0.6886, Adeq Precision: 17.2222

Mae Fah Luang University

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

Source	Sum of square	df	Mean Square	F value	Probability > F
Model	3416.58	9	379.62	68.61	<0.0001
X_1	166.90	1	166.90	30.16	0.0009
X_2	422.68	1	422.68	76.39	<0.0001
X_3	8.10	1	8.10	1.46	0.2656
X_1X_2	1.53	1	1.53	0.2757	0.6158
X_1X_3	0.0002	1	0.0002	0.0000	0.9951
X_2X_3	0.7921	1	0.7921	0.1432	0.7164
X_1^2	6.65	1	6.65	1.20	0.3093
X_2^2	2724.81	1	2724.81	492.46	<0.0001
X_3^2	23.93	1	23.93	4.32	0.0761
Residual	38.73	7	5.53		
Lack of Fit	22.85	3	7.62	1.92	0.2682
Pure Error	15.88	4	3.97		
Cor Total	3455.31	16			

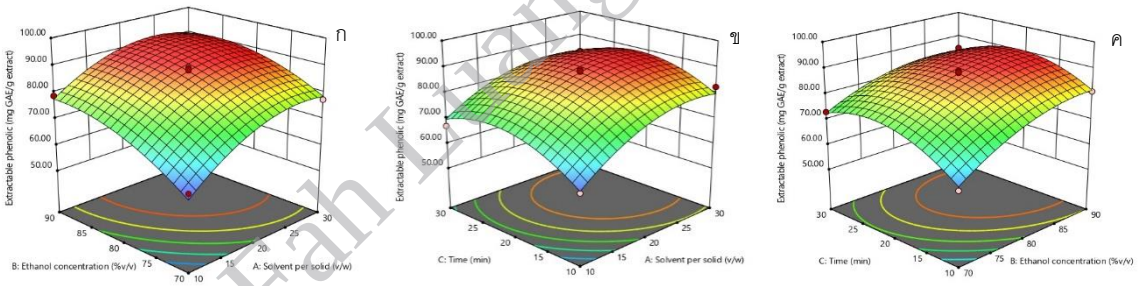
Std. Dev.: 2.35, R^2: 0.9888, Mean: 86.05, Adj R^2: 0.9744, C.V.%: 2.73, Pred R^2: 0.8870, Adeq Precision: 22.0914

ความเหมาะสมของแบบจำลอง ยิ่งไปกว่านั้นความเหมาะสมของแบบจำลองยังวิเคราะห์จากค่าสัมประสิทธิ์ในการตัดสินใจ (Coefficient of Determination, R^2) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.9780 และ0.9888 ตามลำดับ นอกจากนี้ความมีนัยสำคัญของแบบจำลองยังมีค่า 0.0001 % โดยมีค่า R^2 , Adj R^2 และ predicted R^2 มากกว่า 90 % ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมของแบบจำลอง

Mae Fah Luang University

2.1 อิทธิพลของปัจจัยในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การศึกษาผลของปัจจัยในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก จากภาพที่ 1 (ก) แสดงอิทธิพลร่วมของตัวทำละลายต่อตัวอย่าง และ ความเข้มข้นเอทานอล เมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัด คงที่ที่ 20 นาที พบว่าเมื่อเพิ่มตัวทำละลายต่อตัวอย่าง ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณตัวทำละลายมีผลให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากใบหนานเฉาเหว่ยเพิ่มขึ้น เนื่องจากปริมาณตัวทำละลายส่งผลต่อความสามารถในการละลายของสารและการแพร่ ซึ่งเกิดจากความแตกต่างของความเข้มข้นระหว่างสองเฟส และเมื่อพิจารณาร่วมกับปัจจัยความเข้มข้นของเอทานอล พบว่าประสิทธิภาพการสกัดแปรผันตรงตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น แสดงว่าความเข้มข้นเอทานอลที่สูงขึ้นส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้น ขณะที่การเพิ่มขึ้นของเวลา จากภาพที่ 1 (ข) และ 1 (ค) ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยจะเห็นได้ว่าทั้ง 3 ปัจจัย ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นแบบเป็นเส้นตรงในช่วงระยะแรก และจะเริ่มมีแนวโน้มเป็นเส้นโค้งเมื่อปริมาณทั้ง 3 ปัจจัย เพิ่มขึ้นในระยะสูงสุด

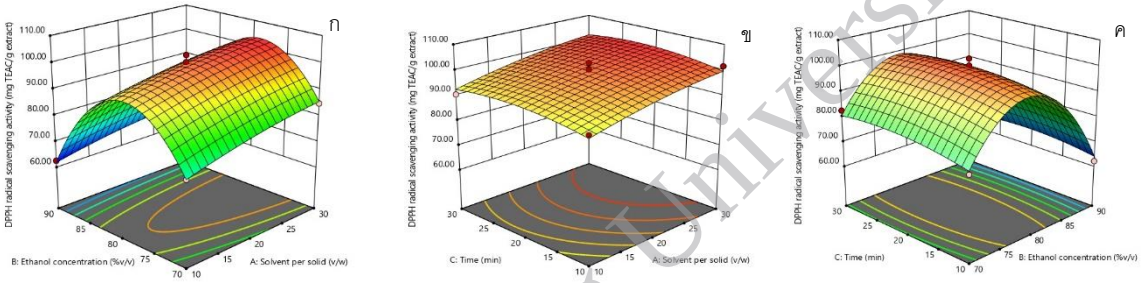


ภาพที่ 1 กราฟพื้นผิวตอบสนองผลของความสัมพันธ์ระหว่างตัวทำละลายต่อตัวอย่างกับความเข้มข้นของเอทานอล (ก), ตัวทำละลายต่อตัวอย่างกับเวลาที่ใช้ในการสกัด (ข) และความเข้มข้นของเอทานอลกับเวลาที่ใช้ในการสกัด (ค) ที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การศึกษาผลของปัจจัยในการสกัดที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากภาพที่ 2 (ก) แสดงอิทธิพลร่วมของอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อตัวอย่าง และความเข้มข้นเอทานอล เมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัด คงที่ที่ 20 นาที พบว่าปัจจัยทั้งสองส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อตัวอย่าง มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบเส้นตรง กล่าวคือการเพิ่มของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นผลจากอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น โดยอัตราส่วน

Mae Fah Luang University

ที่สูงสุด ส่งผลให้ให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเช่นกัน ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในช่วงแรกจะส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า ร้อยละ 80 จะส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลง ดังนั้นความเข้มข้นเอทานอลจึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในใบหนานเฉาเหว่ย ขณะที่ปัจจัยของเวลาดังภาพ 2 (ข) และ 2 (ค) ไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การเพิ่มขึ้นของเวลาไม่มีผลทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีการเปลี่ยนแปลง



ภาพที่ 2 กราฟพื้นผิวตอบสนอง ผลของความสัมพันธ์ระหว่างตัวทำละลายต่อตัวอย่างกับความเข้มข้นของเอทานอล (ก), ตัวทำละลายต่อตัวอย่างกับเวลาที่ใช้ในการสกัด (ข) และความเข้มข้นของเอทานอลกับเวลาที่ใช้ในการสกัด (ค) ที่มีผลต่อปริมาณการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

2.2 การวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสมด้วยฟังก์ชัน Response Optimizer

การทำนายสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในกระบวนการสกัด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดคือ ตัวทำละลายต่อตัวอย่าง 28.07 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 81.36 โดยปริมาตร และเวลา 25.17 นาที ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 89.15 มก. สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 100.92 มก. สมมูลทรอลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด จากนั้นต้องนำสภาวะที่ได้จากการประมวลผลของซอฟต์แวร์มาทำการทดลองเพื่อตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากใบหนานเหว่ย โดยค่าที่ใกล้เคียงกันจะสามารถยืนยันได้ว่าการประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง และการออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบ็นเกน เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด

Mae Fah Luang University

อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาการสกัดสารสำคัญจากใบหนานเฉาเหว่ย ด้วยการโดยใช้วิธีคลื่นความถี่สูง โดยออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบ็นเกน (Box-Behnken Design, BBD) และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง เพื่อศึกษาถึงผลของปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด พบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการสกัดสารสำคัญมากที่สุดคือ ความเข้มข้นของเอทานอล

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในกระบวนการสกัดนี้เพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญที่สกัดได้มากที่สุด คือ ตัวทำละลายต่อตัวอย่าง 28.07 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 81.36 โดยปริมาตร และเวลา 25.17 นาที ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 89.15 มก. สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 100.92 มก. สมมูลทรอลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด

ข้อเสนอแนะ

1. ใบหนานเฉาเหว่ยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นการดีที่จะนำใบหนานเฉาเหว่ยมาใช้ในการทำเครื่องสำอางต่อไป

2. การศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมการสกัด มีผลต่อปริมาณของสารพฤกษเคมีที่ได้ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด

รายการอ้างอิง

กาญจณา ขันทกะพันธ์ และเยาวภา สุขพรมา. (2559). การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากขิง โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง. *วารสาร มฉก. วิชาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 20*, 69-80.

นุชนิภา นันทะวงศ์. (2558). *ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ*. เชียงใหม่:เอราวัณการพิมพ์

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2550). *สารต้านอนุมูลอิสระ*. กรุงเทพฯ:นิวไทยมิตรภาพการพิมพ์.

Mae Fah Luang University

อาภาภรณ์ จันทร์ปิรักษ์, พัชราภรณ์ ดำนิล และอมรรัตน์ หงส์ผ้วย. (2561). ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันจากกากกาแฟ (โรบัสต้า/อะราบิก้า) ด้วยเฮกเซนโดยใช้วิธีวิทยาพื้นผิวตอบสนอง.*วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*. *28*(4) , 799-811.

Adebayo O.L., James A., Kasim S.B. and Jagri O.P., 2014. Leaf extracts of *Vernonia amygdalina* Del. from northern Ghana contain bioactive agents that inhibit the growth of some beta-lactamase producing bacteria *in vitro*. *British Journal of Pharmaceutical Research. 4*(2), 192-202.

Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Abdul Mudalip, S.K., & Olalere, O.A. (2017). Effect of drying methods on the free radicals scavenging activity of *Vernonia amygdalina* growing in Malaysia. *Journal of King Saud University*. *1*, 1-5.

Alara, O.R., Abdurahman, N.H., & Olalere, O.A., (2018). Optimization of microwave-assisted extraction of total flavonoids and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing. 7*, 36-48.

Elin, N.S., Berna, E., & Rani, S. (2018). Phytochemical screening, total flavonoid and total phenolic content and antioxidant activity of different parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacognosy Journal, 10*(1), 123-127.

Tailor, C.S., & Goyal, A. (2014). Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum conyzoides* Linn. leaves. *American Journal of Ethnomedicine, 1*(4), 244-249.

Mae Fah Luang University