Published Online: 24 JUL 2023

การเปรียบเทียบสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางเครื่องสำอางจากผลหมากด้วยการใช้วิธีแบบตัวทำละลายและวิธีดีฟยูเทกติค

Comparison of Phenolic Content and Cosmetic Bioactivities from *Areca Catechu* Extracted by Solvent and Deep Eutectic Solvent Extraction

กนกวรรณ ดัดวัตร์
อีเมล: 6451701251@lamduan.mfu.ac.th
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
สำนักวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สริตา สังข์ทอง
อีเมล: sarita.san@mfu.ac.th
สำนักวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

การค้นคว้าอิสระนี้ผู้วิจัยสนใจเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ และความคงตัวของ pH ในสภาวะต่าง ๆ จากผลหมากด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายโดยใช้เอทานอลร้อยละ 70 และวิธีดีฟยูเทกติค การศึกษานี้เลือกใช้ตัวรับพันธะไฮโดรเจน (HBA) คือ L-Proline และใช้ตัวให้พันธะไฮโดรเจน (HBD) ที่แตกต่างกัน คือ กลีเซอรอล กรดแลคติก และยูเรีย ซึ่งเป็นสารที่มีความปลอดภัยและมีประโยชน์ในทางเครื่องสำอาง โดยใช้อัตราส่วน 1:2 ปริมาณน้ำร้อยละ 30 โดยปริมาตร และใช้วิธีคลื่นความถี่สูงในการสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหมากด้วย L-proline-urea ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ สารแทนนิน มากกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) มีค่าเท่ากับ 190.58 ± 2.34 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง, 586.5 ± 5.20 มิลลิกรัมสมมูลของรูตินต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง และ 544.57 ± 9.08 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ และผลหมากที่สกัดด้วย L-proline-urea ให้ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP สูงสุดเช่นเดียวกัน มีค่าเท่ากับ 344.91 ± 0.61 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง, 639.15 ± 0.69 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง และ 310.87 ± 6.65 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้การสกัดด้วยวิธีดีฟยูเทกติคช่วยให้ pH ของสารสกัดมีความเสถียรในอุณหภูมิสูง สรุปได้ว่าการสกัดผลหมากด้วย L-proline-urea ช่วยในการสกัดได้สารสกัดหมากที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าการใช้

เอทานอลร้อยละ 70 ดังนั้นวิธีการสกัดดีฟยูเทกติคจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการสกัดหมากด้วยวิธีการสกัดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ดีฟยูเทกติค, หมาก, สารต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลิก

ABSTRACT

The objective of this study was to compare total phenolic contents, total flavonoid contents, total tannin contents and antioxidant activities from *Areca catechu* extracted by 70% ethanol and deep eutectic solvent. This research used DES based on L-proline as a hydrogen bond acceptor (HBA) by combination with different hydrogen bond donors (HBD) of glycerol, lactic acid, and urea, which are safe and beneficial in cosmetics, The combination ratio was 1:2 molar ratio, 30% water (v/v), and combined ultrasonic assisted extraction at 45 ºC for 60 min. According to the results obtained, Areca catechu extracted from L-proline-urea exhibited total phenolic contents, total flavonoid contents, and total tannin contents significantly higher than 70% ethanol extraction ($p < 0.05$) content of 190.58 ± 2.34 mg GAE/g dry sample, 586.5 ± 5.20 mg RE/ g dry sample, and 544.57 ± 9.08 mg CE/g dry sample, respectively, and greater antioxidant activities of DPPH, ABTS, and FRAP were found in the L-proline-urea extracted exhibiting 344.91 ± 0.61 mg TEAC/g dry sample, 639.15 ± 0.69 mg TEAC/g dry sample and 310.87 ± 6.65 mg TEAC/g dry sample, respectively. In addition, DES extraction could improve pH stability at high temperatures. This research can be concluded that *Areca catechu* extracted by L-proline-urea exhibited a higher extraction efficiency of bioactive compounds and antioxidant activities than 70% ethanol as an organic solvent, thus DES extraction can be a suitable alternative for areca extraction that is environmentally friendly and effective.

Keywords: Deep Eutectic Solvent, *Areca catechu,* Antioxidant, Phenolic Compounds

บทนำ/หลักการและเหตุผล

ในปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและการใส่ใจดูแลสุขภาพมากยิ่งขึ้น รวมถึงผู้บริโภคให้ความสนใจกับผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดจากพืชมากขึ้นเช่นเดียวกัน (Hoang et al., 2021) เดิมการสกัดสารจากพืชนิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์แต่การสกัดด้วยวิธีนี้พบว่ามีการระเหยของสารอินทรีย์ที่ส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมและต่อสุขภาพ และอาจมีการตกค้างของสารในผลิตภัณฑ์ (Liu et al., 2022) จากกระแสการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมทำให้การสกัดด้วยวิธี Green Solvent ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นเช่นกัน วิธีดีฟยูเทกติค (Deep Eutectic Solvent; DES) ได้รับการยอมรับว่าเป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เป็นวิธีการสกัดที่เตรียมได้ง่าย สารที่ใช้ไม่ไวไฟ ความเป็นพิษต่ำ มีความปลอดภัย สารที่ใช้สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (Hikmawanti et al., 2021) มีการศึกษาพบว่าวิธีนี้ได้ประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ช่วยคงความเสถียรของสารสกัดดีกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Murador et al., 2019)

หมาก (*Areca catechu* Linn.) อุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีทั้งสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน (Peng et al., 2015) จึงทำให้หมากมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่โดดเด่น ฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย การศึกษาที่ผ่านมานิยมใช้เอทานอลในการสกัดสารสำคัญในผลหมาก ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 เป็นสารควบคุม และวิธีดีฟยูเทกติคเลือกใช้สารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับพันธะไฮโดรเจน คือ L-proline และตัวรับพันธะไฮโดรเจน คือ กลีเซอรอล กรดแลคติก และ ยูเรีย เนื่องจากเป็นสารที่มีความปลอดภัยในทางเครื่องสำอาง ราคาไม่แพง และมีประโยชน์ต่อผิวพรรณ ดังนั้นการค้นคว้าอิสระนี้ผู้วิจัยสนใจเปรียบเทียบการสกัดผลหมากด้วยวิธีตัวทำละลายอินทรีย์และวิธีดีฟยูเทกติคเพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และความคงตัวของ pH ที่สภาวะต่าง ๆ เพื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการสกัดหมากด้วยวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมแทนการใช้วิธีตัวทำละลายอินทรีย์ ช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลหมาก และสามารถนำไปใช้เป็นสารสำคัญในทางเครื่องสำอางได้

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากผลหมากด้วยวิธีตัวทำละลาย และวิธีดีฟยูเทกติค

เตรียมตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และเตรียมสารผสมดีฟยูเทกติคโดยนำสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับไฮโดรเจน คือ L-proline และตัวให้พันธะไฮโดรเจน คือ กลีเซอรอล กรดแลคติก และ ยูเรีย ผสมกันในอัตราส่วน 1:2 อัตราส่วนโดยโมล ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมน้ำร้อยละ 30 โดยปริมาตร (Wang et al., 2021) ใช้อัตราส่วนผลหมากต่อตัวทำละลาย 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิคที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที

จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงและเก็บส่วนที่เป็นของเหลวเหนือตะกอนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาทดลองต่อไป

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu นำสารสกัดหมากที่เตรียมไว้เติม Folin-Ciocalteu's reagent จากนั้นเติม 20% โซเดียมคาร์บอเนต ปรับปริมาตรด้วยน้ำ และบ่มสารอุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน (อ้างอิงจาก Zhang et al., 2009)

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric โดยนำสารสกัดหมาก จากนั้นเติม 5% โซเดียมไนไตรท์ และ 10% อลูมิเนียมคลอไรด์ผสมให้เข้ากัน เติม 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำ จากนั้นบ่มสารที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และใช้รูตินเป็นสารมาตรฐาน (อ้างอิงจาก Zhang et al., 2009)

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารแทนนิน

วิเคราะห์ปริมาณสารแทนนินด้วยวิธี Vanillin-HCl assay โดยเป็นการวัดคอนเดนส์แทนนิน นำสารสกัดหมากเติม 1% vanillin ที่ละลายในเมทานอล และ 9 โมลาร์ ของกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร และใช้คาเทชิน (catechin) เป็นสารมาตรฐาน (ดัดแปลงจาก Herald et al., 2014)

5. การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP

การวิเคราะห์ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH นำสารสกัดหมากผสมกับ 95% เอทานอล เติม 0.2 มิลลิโมลาร์ DPPH ที่ ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันและตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน (ดัดแปลงจาก Wang et al., 2018)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยเตรียม ABTS ให้อยู่ในรูปพร้อมใช้ โดยนำ 7.0 มิลลิโมลาร์ ABTS และ 2.45 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ผสมเข้าด้วยกันอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดผลหมากที่เจือจางผสมกับเมทานอล และเติมสารละลาย ABTS ที่เตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันจากนั้นทิ้งไว้ 6 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน

วิเคราะห์ปริมาณของสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP นำสารสกัดหมากที่เจือจางมาผสมกับอะซิเตตบัฟเฟอร์ เติมสารละลาย FRAP ที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นระยะเวลา 30 นาที

จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร และใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน (ดัดแปลงจาก Kocak et al., 2016)

6. ศึกษาสมบัติความคงตัวของค่า pH ของสารสกัดหมาก

ทดสอบความคงตัวค่า pH โดยนำสารสกัดหมากที่สกัดจากเอทานอลร้อยละ 70 และวิธีดีฟยูเทกติค นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter และบันทึกผลทุก ๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 28 วัน

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการศึกษาที่ได้จากสารสกัดผลหมากด้วยวิธีตัวทำละลายและดีฟยูเทกติค ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ (n=3) ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Science (SPSS Statistic 21) ใช้วิธีทดสอบ One Way ANOVA ในการทดสอบแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (p-values < 0.05) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey test

ผลวิจัย (Results)

1. การเตรียมสารสกัดจากผลหมากด้วยวิธีตัวทำละลาย และวิธีดีฟยูเทกติค

การสกัดผลหมากด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 เพื่อใช้เป็นสารควบคุม ได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นของเหลวและมีค่า pH เท่ากับ 5.54 ± 0.07 และสารสกัดผลหมากที่สกัดด้วยวิธีดีฟยูเทกติคพบว่าผลหมากที่สกัดด้วย Pro-Gly มีความหนืดปานกลาง มีค่า pH เท่ากับ 5.74 ± 0.03 การสกัดด้วย Pro-Lac จะได้สารสกัดที่มีความหนืดปานกลาง ได้ค่า pH เท่ากับ 2.42 ± 0.04 และการสกัด Pro-Urea ได้สารสกัดที่มีความหนืดมากกว่าตัวทำละลายอื่น ได้ค่า pH เท่ากับ 6.75 ± 0.19

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหมากพบว่าการใช้ Pro-Urea ให้ค่าปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุดเท่ากับ 190.58 ± 2.34 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ซึ่งมากกว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 70 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามการใช้ Pro-Gly และ Pro-Lac ให้ค่าปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 139.32 ± 4.63 และ 126.14 ± 9.32 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 70 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

3. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

พบว่าสารสกัดหมากที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และวิธีดีฟยูเทกติคทั้ง 3 ชนิด ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) พบว่าสารสกัดหมากที่สกัดด้วย Pro-Urea ให้ปริมาณ

ฟลาโวนอยด์มากสุดเท่ากับ 586.50 ± 5.20 มิลลิกรัมสมมูลของรูตินต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ซึ่งมากกว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 70 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) การสกัดที่ใช้เอทานอลร้อยละ 70 มีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 551.00 ± 2.83 มิลลิกรัมสมมูลของรูตินต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ซึ่งมากกว่าการใช้ Pro-Gly และ Pro-Lac อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) มีค่าเท่ากับ 376.19 ± 0.75 และ 235.51 ± 6.47 มิลลิกรัมสมมูลของรูตินต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหมากที่สกัดด้วย Pro-Urea ให้ปริมาณคอนเดนส์แทนนินสูงสุด มีค่าเท่ากับ 544.57 ± 9.08 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ซึ่งมากกว่าสารสกัดหมากที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และสารสกัดที่สกัดด้วย Pro-Gly และ Pro-Lac ได้ปริมาณสารคอนเดนส์แทนนินเท่ากับ 285.00 ± 3.69 และ 284.02 ± 6.53 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าเอทานอลร้อยละ 70 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ในสารสกัดหมาก

	TPC (mg GAE/g dry sample)	TFC (mg RE/g dry sample)	TTC (mg CE/g dry sample)
70% Ethanol	156.99 ± 3.93^{b}	551.00 ± 2.83^{b}	450.82 ± 8.13^{b}
Pro-Gly	139.32 ± 4.63^{c}	376.19 ± 0.75^{c}	285.00 ± 3.69^{c}
Pro-Lac	126.14 ± 9.32^{c}	235.51 ± 6.47^{d}	284.02 ± 6.53^{c}
Pro-Urea	190.58 ± 2.34^{a}	586.5 ± 5.20^{a}	544.57 ± 9.08^{a}

หมายเหตุ ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD), n=3 และตัวยกอักษรภาษาอังกฤษในแนวสดมภ์แสดงความแตกต่างกันของสารสกัดผลหมากที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$

5. การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าการสกัดด้วย Pro-Urea ให้การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดมีค่าเท่ากับ 344.91 ± 0.61 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง มากกว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 70 ที่ได้ค่าเท่ากับ 340.97 ± 1.37 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง รองลงมาคือสารสกัดที่สกัดด้วย Pro-Gly มีค่าเท่ากับ 335.04 ± 2.81 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ซึ่งไม่แตกต่างจากเอทานอลร้อยละ 70

อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่สารสกัดที่สกัดด้วย Pro-Lac มีค่าเท่ากับ 233.29 ± 5.24 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ให้ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าสารสกัดหมากที่สกัดด้วย Pro-Urea ให้ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) มีค่าเท่ากับ 639.15 ± 0.69 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS มากกว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 70 ที่มีค่าเท่ากับ 445.57 ± 5.79 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง แต่อย่างไรก็ตาม Pro-Gly และ Pro-Lac มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 336.34 ± 7.16 และ 313.88 ± 7.43 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเอทานอลร้อยละ 70 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหมากที่สกัดด้วย Pro-Urea ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) มีค่าเท่ากับ 310.87 ± 6.65 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ซึ่งมากกว่าตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอลร้อยละ 70 อย่างไรก็ตามการใช้ Pro-Gly และ Pro-Lac มีค่าเท่ากับ 177.74 ± 7.57 และ 176.39 ± 0.93 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ มีประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ FRAP น้อยกว่าเอทานอลร้อยละ 70 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงผลดังตารางที่ 2

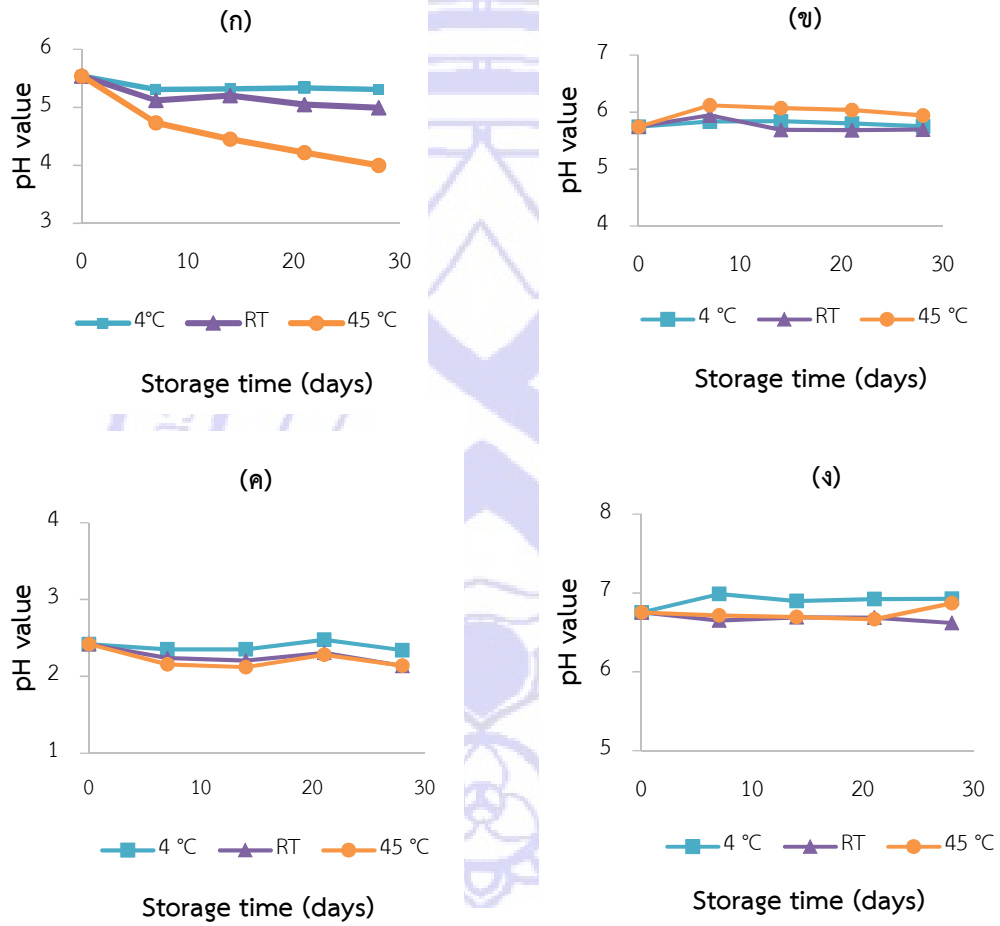
ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ของสารสกัดหมาก

	DPPH (mg TEAC/g dry sample)	ABTS (mg TEAC/g dry sample)	FRAP (mg TEAC/g dry sample)
70% Ethanol	340.97 ± 1.37^{ab}	445.57 ± 5.79^{b}	232.58 ± 3.90^{b}
Pro-Gly	335.04 ± 2.81^{b}	336.34 ± 7.16^{c}	177.74 ± 7.57^{c}
Pro-Lac	233.29 ± 5.24^{c}	313.88 ± 7.43^{d}	176.39 ± 0.93^{c}
Pro-Urea	344.91 ± 0.61^{a}	639.15 ± 0.69^{a}	310.87 ± 6.65^{a}

หมายเหตุ ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD), n=3 และตัวยกอักษรภาษาอังกฤษในแนวสดมภ์แสดงความแตกต่างกันของสารสกัดผลหมากที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$

6. การศึกษาสมบัติความคงตัวของค่า pH จากสารสกัดหมาก

จากการศึกษาความคงตัวของ pH จากสารสกัดผลหมากที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ผลจากภาพที่ 1 แสดงค่า pH ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดหมากที่ใช้ดีฟยูเทกติคค่า pH มีแนวโน้มลดลงเพียงเล็กน้อย แต่ค่า pH ของสารสกัดหมากที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่า pH มีแนวโน้มลดลงไปจาก pH เริ่มต้น เนื่องจากการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 เมื่ออยู่ในที่อุณหภูมิสูงอาจมีการระเหยของน้ำได้ ซึ่งความคงตัวของค่า pH ของการสกัดหมากด้วยวิธีดีฟยูเทกติคสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางเครื่องสำอางได้ เพราะถ้าหากสารสกัดมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH มากที่อุณหภูมิสูงเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางเครื่องสำอางอาจส่งผลต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์ได้



ภาพที่ 1 แสดงความคงตัวของค่า pH ของสารสกัดผลหมากที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง และ 45 องศาเซลเซียส ที่สกัดด้วยระบบตัวทำละลายต่าง ๆ (ก) เอทานอลร้อยละ 70 (ข) Pro-Gly (ค) Pro-Lac และ (ง) Pro-Urea

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ (Discussion and Suggestion)

จากผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบการสกัดผลหมากด้วยวิธีตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และใช้วิธีดีฟยูเทกติคพบว่าการใช้ L-proline-urea ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์ และแทนนินสูงที่สุด และให้ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP มากกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอลร้อยละ 70 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dai et al. (2013) และ Doldolova et al. (2021) พบว่าตัวทำละลายดีฟยูเทกติคเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างดีฟยูเทกติคกับสารประกอบฟีนอลิกช่วยเพิ่มความสามารถในการสกัดสารมากยิ่งขึ้นมากกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ การศึกษาค้นคว้าอิสระนี้พบว่าเมื่อสารสกัดหมากที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และแทนนินมากส่งผลให้มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากเช่นกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Byun et al. (2021) พบว่าฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหมากสัมพันธ์กับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในผลหมาก และการศึกษานี้พบว่าการใช้ตัวทำละลายดีฟยูเทกติคสกัดผลหมากช่วยคงความเสถียรของค่า pH ของสารสกัดที่อุณหภูมิสูงมากกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์

ทั้งนี้การเลือกใช้ตัวทำละลายดีฟยูเทกติคต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของดีฟยูเทกติค เช่น ค่า pH สารที่ใช้เป็น HBA และ HBD อัตราส่วน HBA:HBD, ปริมาณน้ำที่ใช้ ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การศึกษานี้สรุปได้ว่าการสกัดผลหมากด้วยวิธีดีฟยูเทกติคโดยใช้ L-proline-urea ในอัตราส่วน 1:2 ปริมาณน้ำร้อยละ 30 โดยปริมาตร และใช้คลื่นความถี่สูงในการสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที มีความเหมาะสมต่อการสกัดผลหมากเนื่องจากได้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 70 ดังนั้นวิธีดีฟยูเทกติคเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจในการสกัดสารสำคัญในหมาก เป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีประสิทธิภาพ สามารถเพิ่มมูลค่าให้กับสารสกัดหมาก และนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในเครื่องสำอางหรือประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ ในอนาคตต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงหมู่ฟังก์ชันหรือองค์ประกอบทางเคมีในตัวทำละลายดีฟยูเทกติค สามารถใช้วิธี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) เพื่อดูอันตรกิริยาของดีฟยูเทกติคได้

2. มีหลายปัจจัยที่ทำให้ดีฟยูเทกติคมีสมบัติและประสิทธิภาพในการสกัดที่แตกต่างกันควรจะศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยเหล่านั้น เช่น อัตราส่วนโมล ปริมาณน้ำที่ใช้ ชนิดของ HBA:HBD เป็นต้น

รายการอ้างอิง

Byun, N. Y., Heo, M. R., & Yim, S. H. (2021). Correlation of anti-wrinkling and free radical antioxidant activities of Areca nut with phenolic and flavonoid contents. *Food Science and Technology*, *41*, 1041-1049.

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Analytical chemistry*, *85*(13), 6272-6278.

Doldolova, K., Bener, M., Lalikoğlu, M., Aşçı, Y. S., Arat, R., & Apak, R. (2021). Optimization and modeling of microwave-assisted extraction of curcumin and antioxidant compounds from turmeric by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, *353*, 129337.

Hikmawanti, N. P. E., Ramadon, D., Jantan, I., & Mun'im, A. (2021). Natural deep eutectic solvents (NADES): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development. *Plants*, *10*(10), 2091.

Hoang, H. T., Moon, J. Y., & Lee, Y. C. (2021). Natural Antioxidants from Plant Extracts in Skincare Cosmetics: Recent Applications, Challenges and Perspectives. *Cosmetics*, *8*(4), 106.

Kocak, M. S., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Kocak, S., Uren, M. C., & Tepe, B. (2016). *Salvia cadmica*: Phenolic composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*, *85*, 204-212.

Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2018). Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *Journal of natural products*, *81*(3), 679-690.

Murador, D. C., de Souza Mesquita, L. M., Vannuchi, N., Braga, A. R. C., & de Rosso, V. V. (2019). Bioavailability and biological effects of bioactive compounds extracted with natural deep eutectic solvents and ionic liquids: Advantages over conventional organic solvents. *Current opinion in food science*, *26*, 25-34.

Peng, W., Liu, Y. J., Wu, N., Sun, T., He, X. Y., Gao, Y. X., . . . Wu, C. J. (2015). *Areca catechu* L. (Arecaceae): A review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Journal of ethnopharmacology*, *164*, 340-356.

Wang, R., Pan, F., He, R., Kuang, F., Wang, L., & Lin, X. (2021). Arecanut (*Areca catechu* L.) seed extracts extracted by conventional and eco-friendly solvents: Relation between phytochemical compositions and biological activities by multivariate analysis. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *25*, 100336.