การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในบัวบกด้วยการสกัดแบบหมักร่วมกับการกวนและให้ความร้อน

STUDY ON FREE RADICAL SCAVENGING OF *Centella asiatica* BY MACERATION EXTRACTION COMBINED WITH STIRRING AND HEATING

นนทพัทธ์ ธัญญาวุฒิ

NONTAPAT THANYAWOOT

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2564

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในบัวบกด้วยการสกัดแบบหมักร่วมกับการกวนและให้ความร้อน

STUDY ON FREE RADICAL SCAVENGING OF *Centella asiatica* BY MACERATION EXTRACTION COMBINED WITH STIRRING AND HEATING

นนทพัทธ์ ธัญญาวุฒิ

NONTAPAT THANYAWOOT

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2564

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON FREE RADICAL SCAVENGING OF *Centella asiatica* BY MACERATION EXTRACTION COMBINED WITH STIRRING AND HEATING

NONTAPAT THANYAWOOT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF ENGINEERING IN FOOD ENGINEERING

SCHOOL OF ENGINEERING

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2021

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริญญานิพนธ์ปีการศึกษา 2564

สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในบัวบกด้วยการสกัดแบบหมักร่วมกับการกวนและให้ความร้อน

Study on free radical scavenging of *Centella asiatica* by maceration extraction combined with stirring and heating.

ผู้จัดทำ

1. นายนนทพัทธ์ ธัญญาวุฒิ 61010532

.....

(ผศ. ดร.ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(ผศ. ดร.เจษฎา ชัยโฉม)

หัวหน้าภาควิชาวิศวกรรมอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริญญานิพนธ์เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในบัวบกด้วยการสกัดแบบหมักร่วมกับการกวนและให้ความร้อน

โดย นายนนทพัทธ์ ธัญญาวุฒิ 61010532

ปริญญานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาวิศวกรรมศาสตร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2564

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร.ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ

บทคัดย่อ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในบัวบกด้วยการสกัดแบบแช่ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิในการสกัดแบบแช่ ต่อความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของบัวบก โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 39.5%, 62.5% และ 85.5% และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ 35 °C, 45 °C และ 55 °C ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 85.50% อุณหภูมิ 55.60 °C มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอยู่ที่ 346.29 TE µg/g และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า สารที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 85.50% อุณหภูมิ 34.40 °C มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอยู่ที่ 23.65 TE µg/g และทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay พบว่า สารที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 39.50% อุณหภูมิ 55.60 °C มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดอยู่ที่ 343.20 TE µg/g

คำสำคัญ : อนุมูลอิสระ, Maceration extraction, DPPH, ABTS, Total phenolic compounds

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title STUDY ON FREE RADICAL SCAVENGING OF *Centella asiatica* BY MACERATION EXTRACTION COMBINED WITH STIRRING AND HEATING.

By Mr. Nontapat Thanyawoot 61010532

Thesis for Bachelor's Degree of Engineering

Department of Food Engineering

School of Engineering

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Year 2021

Advisor Asst. Prof. Dr. Teerin Chysirichote

Abstarct

The effect of maceration extract condition on the antioxidant capacity and total phenolic compounds was studied in this rese. Three levels of ethanol concentration 39.5%, 62.5% and 85.5% was used as solvent. The extraction was performed at 35 °C, 45 °C and 55 °C. The antioxidant activity was tested by DPPH and ABTS methods. It was found that the extract with 85.50% ethanol concentration, temperature 55.60 °C had the highest antioxidant activity at 346.29 TE µg/g. by DPPH method, and 34.4 °C at 23.65 TE µg/g. by ABTS Method. The total phenolic compounds were analyzed by Folin-Ciocalteu assay showed that the extract with 39.50% ethanol concentration at 55.60 °C had the highest total phenolic content at 343.20 TE µg/g.

Keywords : Free radicals, Maceration extraction, DPPH, ABTS, Total phenolic compounds

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความอนุเคราะห์ของ ผศ. ดร.ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ที่สละเวลาให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ การแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น รวมไปถึงการอบรมสั่งสอนและให้ความรู้ และยังสละทรัพย์สินเพื่อทำการซื้ออุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นสำหรับโครงงานนี้ จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณบุญนำ ผลโพธิ์ เจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาวิศวกรรมอาหาร ในการให้ความช่วยเหลือในการดำเนินเรื่องต่าง ๆ คุณวราภรณ์ มาไพศาลทรัพย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมอาหาร ที่คอยช่วยเหลือในการยืมอุปกรณ์ คอยช่วยเหลือในการใช้ห้องปฏิบัติการ สอนในการดูแลและใช้งานอุปกรณ์ต่าง ๆ และอาจารย์ประจำภาควิชาวิศวกรรมอาหารทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำและการสั่งสอนตลอดระยะเวลาในการศึกษานี้

ขอขอบคุณครอบครัว ที่คอยให้ความสนับสนุนทางด้านการเรียนให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณเพื่อนทุกคน ที่คอยให้กำลังใจและการสนับสนุนด้านต่าง ๆ จนสำเร็จการศึกษาไปได้ด้วยดี

นนทพัทธ์ ธัญญาวุฒิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ	I
Abstarct	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูปภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 จุดประสงค์ของโครงงาน	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 บัวบก	3
2.1.1 ข้อมูลทั่วไป	3
2.1.2 สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ	4
2.2 วิธีการสกัด	6
2.3 อนุมูลอิสระ	8
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)	8
2.5 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds)	9
2.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	9
2.6.1 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH method	9
2.6.2 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS method	10
2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด	10
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการ	12
3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ	12
3.1.1 อุปกรณ์สำหรับการเตรียมผงบัวบก	12
3.1.2 อุปกรณ์สำหรับการสกัด	12
3.1.3 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	12
3.1.4 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.5 วัสดุสำหรับการทดลอง 13
3.2 สารเคมี 13
3.2.1 สารเคมีสำหรับการสกัดบัวบก 13
3.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 13
3.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด 13
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย 14
3.3.1 การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design 14
3.3.3 การเตรียมสารสกัดจากบัวบก 15
3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 15
3.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด 16
3.3.6 การวิเคราะหทางสถิติ 16
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง 17
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay 17
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay 19
4.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Cioalteu assay 21
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 23
5.1 สรุปผลการทดลอง 23
5.2 ข้อเสนอแนะ 23
บรรณานุกรม 24
ภาคผนวก 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แผนการทดลองโดยใช้วิธี central composite design 14
ตารางที่ 2 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์การถดถอยของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay 17
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay 18
ตารางที่ 4 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์การถดถอยของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay 19
ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay 20
ตารางที่ 6 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์การถดถอยของการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Cioalteu assay 21
ตารางที่ 7 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Cioalteu assay 22
ตารางที่ ก.1 ค่าดูดกลืนแสงของสารด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay 29
ตารางที่ ก.2 ค่าดูดกลืนแสงของสารด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay 30
ตารางที่ ก.3 ค่าดูดกลืนแสงของสารด้วยวิธี Folin-Cioalteu assay 31
ตารางที่ ข.1 Grouping DPPH versus EtOH concentration (%)*Temperature (℃) Information Using the Tukey Method and 95% Confidence 33
ตารางที่ ข.2 Grouping ABTS versus EtOH concentration (%)*Temperature (℃) Information Using the Tukey Method and 95% Confidence 33
ตารางที่ ข.3 Grouping Total Phenolic versus EtOH concentration (%)*Temperature (℃) Information Using the Tukey Method and 95% Confidence 33 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะของใบบัวบก 4
รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมี Asiaticoside 4
รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมี Asiatic acid 5
รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมี Madecassic acid 5
รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมี Madecassoside 6
รูปที่ 6 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH 9
รูปที่ 7 ภาพคอนทัวร์ พล็อตของผลความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS radical scavenging assay 18
รูปที่ 8 ภาพคอนทัวร์ พล็อตของผลความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS radical scavenging assay 20
รูปที่ 9 ภาพคอนทัวร์ พล็อตของผลความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิต่อปริมาณฟีนอลิก ทั้งหมดโดยวิธี Folin- Ciocalteau assay 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อนุมูลอิสระ (free radicle) หมายถึง โมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (unpaired electrons) ที่มีความไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยา กับสารชีวโมเลกุลในร่างกายโดยการดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาทดแทนที่ขาดหายไป ส่งผลให้ระบบต่างๆในร่างกายขาดความสมดุลโดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง โดยอนุมูลอิสระเกิดได้จากปัจจัยภายในร่างกายและเกิดได้จากปัจจัยภายนอก อนุมูลอิสระที่เกิดจากปัจจัยภายในร่างกาย เช่น เกิดจากกระบวนการเผาผลาญในร่างกาย การติดเชื้อ หรือความเครียด เป็นต้น (Rajalakshim and Narasimhan, 1996) โดยปัจจัยภายนอกที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น มลพิษต่าง ๆ จากโอโซน โลหะหนัก และควันบุรี่ โดยธรรมชาติของร่างกายสิ่งมีชีวิตมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อทำหน้าที่ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (ชารินันท์ และคณะ, 2022) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้จากธรรมชาติ ทั้งในจุลชีพ พืชและสัตว์ (เจนจิรา และประสงค์, 2011) และสารต้านอนุมูลอิสระยังมีที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylatedhydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone (ชารินันท์ และคณะ, 2022) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์ บางชนิดก่อให้เกิดสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งในกระบวนการเมแทบอไลต์และหากได้รับในปริมาณที่มากเกินไปจะก่อให้เกิดพิษในร่างกาย ซึ่ง ส่งผลต่อปอด ตับ และไต ซึ่งเมื่อเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่มีผลข้างเคียงต่ำต่อร่างกายของมนุษย์ และยังสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Papas, 1999)

บัวบก [*Centella asiatica* (L.) Urb.] ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในเขตร้อน ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นพืชที่ปลูกง่ายในทุกท้องถิ่น ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด หรือตัดแยกไหลที่มีรากและต้นอ่อน มีคุณค่าทางโภชนาการสูง สามารถรับประทานได้ทุกส่วน มีการนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์หลายรูปแบบ เช่น ผงชาบัวบก ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากสารสกัดบัวบก เป็นต้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในบัวบก คือ สารในกลุ่มไตรเทอร์ปีน(triterpene) ได้แก่ กรดเอเชียติก กรดมาเดคาสสิกเอเชียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ ในหลายงานวิจัยพบว่า สารในกลุ่มนี้สามารถรักษาบาดแผล (Somboonwong และคณะ, 2012) มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (Park และคณะ, 2017) และยังช่วยในการป้องกันและรักษาโรคความจำเสื่อมได้ (Veerendra และคณะ, 2002) จากหลายปีที่ผ่านมา พบว่ามีหลายงานวิจัยที่ทำการสกัดบัวบกด้วยวิธีการต่าง ๆ และพบว่า การสกัดแต่ละวิธี ปริมาณสารสำคัญที่พบได้ในการสกัดบัวบกมีความแตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดแบบหมัก โดยทำการศึกษาอุณหภูมิและความเข้มข้นของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ต่อความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในบัวบก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 จุดประสงค์ของโครงงาน

1.2.1 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิในการสกัดแบบหมัก ต่อความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

1.2.2 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิในการสกัดแบบหมักร่วมกับการกวน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้อุณหภูมิและความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดด้วยการหมักร่วมกับการกวน

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1.4.1 ศึกษาการสกัดบัวบกด้วยวิธีการหมักร่วมกับการกวนและการให้ความร้อน โดยใช้อุณหภูมิ 35°C, 45 °C และ 55 °C และความเข้มข้นของเอทานอล 39.5%, 62.5% และ 85.5%

1.4.2 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS

1.4.3 ศึกษาและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay

1.4.4 ทำการออกแบบการทดลองแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บัวบก

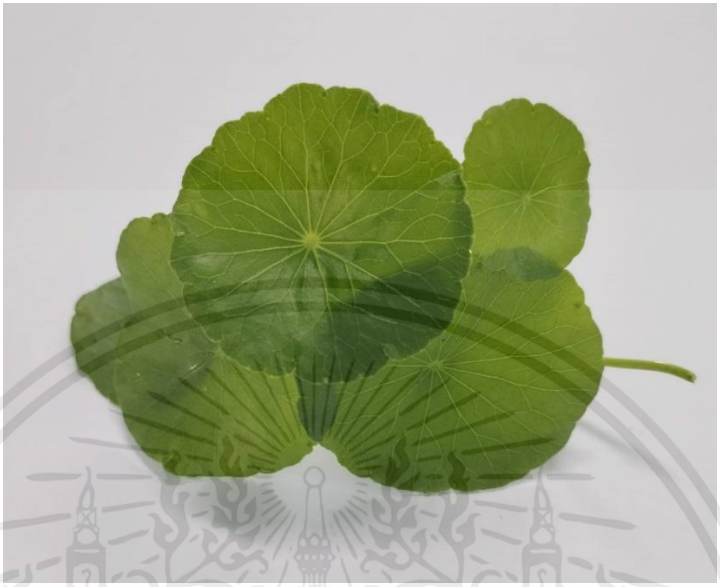
2.1.1 ข้อมูลทั่วไป

บัวบก (*Centella asiatica*) หรือที่เรียกกันในภาษาท้องถิ่นของแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย เช่น ผักแว่น ผักหนอก ปะหนะ หรือเอขาเด๊าะ เป็นพืชล้มลุกประเภทข้ามปีที่พบได้ทั่วโลกในพื้นที่เขตร้อนถึงเขตอบอุ่น แต่มักจะชอบขึ้นในพื้นที่ชื้น โดยส่วนของลำต้นจะเลื้อยไปตามดินที่มีความชื้นแฉะ สามารถนำไปทำการขยายพันธุ์ได้โดยตัดแยกไหลที่มีต้นอ่อนและราก หรือการเพาะเมล็ด พบมากในประเทศในแถบยุโรปเรื่อยมาจนถึงแอฟริกาใต้ อินเดีย ปากีสถาน และศรีลังกา บัวบกจัดอยู่ในวงศ์ Apiaceae หรือ Umbeljiferae ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชนี้คือ *Centella asiatica* (Linn.) Urban ในภาษาอังกฤษเรียกว่า Gotu Kola หรือ Asiatic Pennywort () บัวบกมีลักษณะเป็นพืชใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ ใบงอกเป็นกระจุกออกจากข้อ ข้อละ 2-10 ใบ ลักษณะใบมีรูปไตหรือค่อนข้างกลม ฐานใบโค้งเว้าเข้าหากัน ขอบหยักมนหรือหยักแหลม แผ่นใบสีเขียว มีขนเล็กน้อย ก้านใบสีเขียวยาว ลำต้นสั้นโค้งงอ มีส่วนของลำต้นที่แตกแขนงทอดไปตามดินแล้วออกราก ออกดอกเป็นช่อแบบช่อซี่ร่มตามซอกใบ มีประมาณ 2-5 ช่อ ช่อหนึ่งมีดอกย่อยประมาณ 4 – 5 ดอก ดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกมี 5 กลีบ สีม่วงเข้มอมแดงสลับกัน ก้านช่อดอกจะมีความยาวประมาณ 0.5-5 ซม. ริ้วประดับจะมีประมาณ 2-3 ใบ เกสรตัวผู้จะมีลักษณะที่สั้น กลีบสีม่วงแดงออกตามง่ามใบหรือซอกใบ มีผลแบนขนาดเล็ก สีดำ และมีเส้นผ่าศูนย์กลางยาวประมาณ 3-4 มม. (Bhavan, 1992)

บัวบกเป็นพืชสมุนไพรที่และเป็นตัวยาที่ใช้ในตำรับอายุรเวท มักนิยมรับประทานสดเป็นผักเครื่องเคียงกับอาหารต่าง ๆ และยังสามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ เช่น น้ำสมุนไพรบัวบก ผงชาบัวบก และสารสกัดบัวบกแบบแคปซูล โดยจะมีรสขมและเฝื่อน และสามารถใช้รักษาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย รักษาอาการถ่ายท้อง รักษาการปัสสาวะติดขัด ช่วยแก้ฝีแก้บวม แก้เจ็บคอ และยังมีส่วนที่สามารถช่วยสมานแผลได้ (คณะอนุกรรมการจัดทำตาราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย, 2554) บัวบกเป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณค่าทางโภชนาการมากหลายชนิด เนื่องจากพบสารอาหารหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกายภายในบัวบก เช่น กรดอะมิโนต่าง ๆ วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี แคลเซียม ฟอสฟอรัส และเหล็ก นอกจากนี้ยังมีสารสำคัญอีกมากมาย และยังมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (นวลศรีและอัญชนา, 2545) สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่พบในพืช ผัก และผลไม้ที่มีสารประกอบประเภทฟีนอลเป็นองค์ประกอบ โดยในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในผักและผลไม้กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Daduang, et al., 2011) ในบัวบกมีสารเอเชียติโคไซด์ที่เป็นสารสำคัญที่สกัดได้มากที่สุด โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

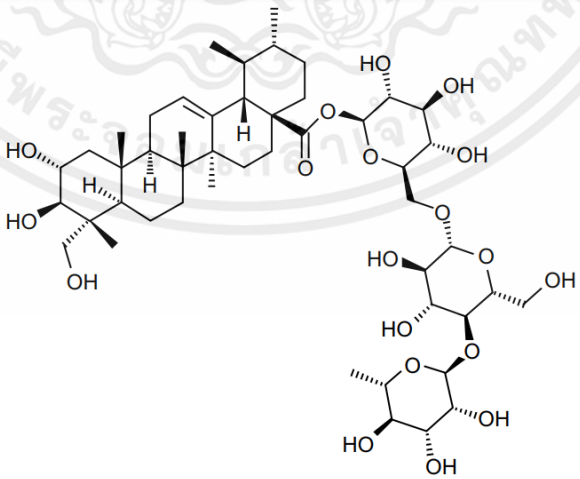
ทางด้านเภสัชวิทยามีการนำบัวบกมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ซึ่งมีฤทธิ์ในการรักษาโรคต่าง ๆ หลายโรค เช่น แผลเปื่อย โรคเรื้อน สมานแผล และสามารถต้านการอักเสบได้ (จิรพันธ์, 2553)



รูปที่ 1 ลักษณะของใบบัวบก

2.1.2 สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ

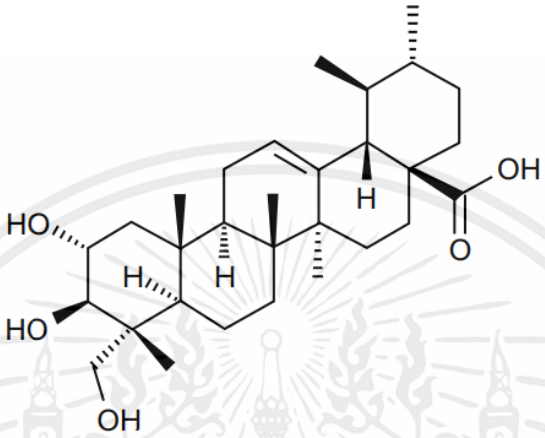
(1). Asiaticoside เป็นสารสำคัญที่พบในบัวบก ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคแผลเปื่อยและแผลเรื้อรัง โดยมีฤทธิ์ในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่และกระตุ้นการบำบัดของร่างกาย นอกจากนี้ Asiaticoside ยังมีคุณสมบัติในการปรับปรุงภูมิคุ้มกันของร่างกาย ลดการอักเสบ และช่วยลดอาการเครียด (Kimura, et al., 2018)



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมี Asiaticoside
ที่มา : Maramaldi and Togni, 2013.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

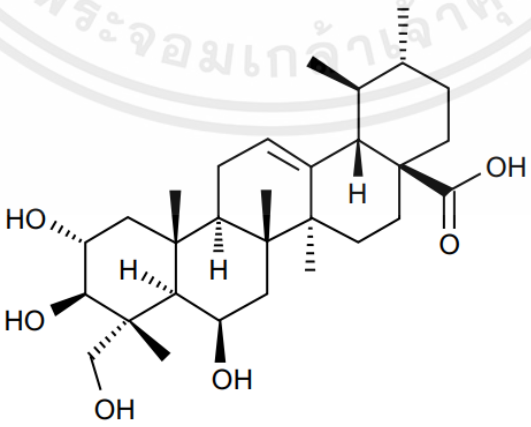
(2). Asiatic acid เป็นสารสกัดจากพืชบัวบก (*Centella asiatica*) ซึ่งเป็นสารสกัดสีเขียวเข้มที่มีคุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพที่สำคัญ มักนิยมนำมาใช้ในการผลิตเครื่องสำอางและเวชสำอาง เช่น ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้า ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยสาร Asiatic acid มีฤทธิ์ในการลดอาการอักเสบในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยการลดการสะสมของ NF-**K**B ซึ่งเป็นตัวควบคุมกระบวนการอักเสบ (Jung, et al., 2020)



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมี Asiatic acid

ที่มา : Maramaldi and Togni, 2013.

(3). Madecassic acid เป็นสารสกัดจากบัวบก (*Centella asiatica*) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของสารสกัดที่นิยมใช้ในการผลิตเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ดูแลผิวพรรณ เช่น ครีมที่ใช้ในการบำรุงผิวหน้า โดยมีคุณสมบัติในการช่วยเสริมสร้างเซลล์ผิวใหม่ ลดการอักเสบ และช่วยในการบำรุงรักษาผิวหน้าให้ชุ่มชื่นและกระชับมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการลดการอักเสบและมีสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ (Shukla, et al., 1999)

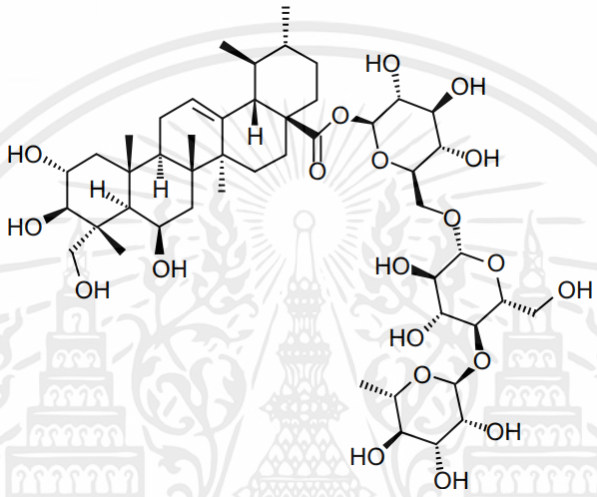


รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมี Madecassic acid

ที่มา : Maramaldi and Togni, 2013.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(4). Madecassoside เป็นสารสกัดจากพืช *Centella asiatica* ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของสารที่ใช้ในเครื่องสำอางและเป็นส่วนประกอบหลักของซีรั่มและครีมบำรุงผิว เมื่อถูกนำเข้าสู่ผิวหนัง madecassoside สามารถช่วยปรับสมดุลความชุ่มชื้นและสมดุลของผิวหนังได้ และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์สำหรับผิวหนัง โดยช่วยลดการอักเสบ และช่วยบำรุงผิวหนังให้เปล่งปลั่งและกระชับมากยิ่งขึ้น Madecassoside ยังมีสมบัติในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่และลดการระคายเคืองของผิวหนัง เช่นเดียวกับในการช่วยลดริ้วรอย (รัตนาภรณ์, 2556)



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมี Madecassoside

ที่มา : Maramaldi and Togni, 2013.

2.2 วิธีการสกัด

ตัวอย่างวิธีที่ใช้ในการสกัดสารจากสมุนไพร

(1). Maceration

การหมัก (Maceration) เป็นวิธีในการสกัดที่นิยมมากที่สุดในการสกัดสมุนไพร โดยจะนำสมุนไพรที่ผ่านการบดหยาบหรือละเอียด จากนั้นนำใส่ลงในภาชนะปิด เช่น ขวดปากกว้างหรือขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติมตัวทำละลาย (Solvent) ที่เหมาะสมกับสารที่ต้องการสกัดจากสมุนไพร เติมลงในภาชนะ ทำการปิดปากให้สนิท ทิ้งไว้เป็นเวลา 3-7 วัน ทำการเขย่าหรือกวนเป็นบางเวลา จากนั้นนำมากรองแล้วบีบเอาสารสกัดออก โดยทั่วไปจะนำสารที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกจนหมด จากนั้นจึงนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ข้อเสียของวิธีนี้คือสิ้นเปลืองตัวทำละลาย เนื่องจากในการสกัดด้วยการหมักจำเป็นที่จะต้องใช้ตัวทำละลายเป็นจำนวนมาก (อารีรัตน์, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2). Infusion

การชง (infusion) วิธีนี้เป็นการสกัดสมุนไพรโดยการใช้ตัวทำละลายผสมกับสมุนไพรในรูปของผงที่ผ่านการทำการบดละเอียด ทำการแช่ในระยะเวลาสั้น ๆ โดยการใช้น้ำร้อนหรือน้ำเย็นร่วมกับวิธีนี้ วิธีนี้เหมาะสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ละลายน้ำได้ง่าย (อารีรัตน์, 2560)

(3). Digestion

การตุ๋น (digestion) เป็นวิธีการสกัดโดยใช้ความร้อนร่วมด้วย ความร้อนที่ใช้จะอยู่ในระดับปานกลาง ทำการสกัดโดยนำสมุนไพรที่ผ่านการบดหยาบหรือละเอียด ใส่ในภาชนะ จากนั้นเติมตัวทำละลาย นำภาชนะใส่เตาอบหรือในวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส การใช้ความร้อนในตลอดกระบวนการนี้เพื่อช่วยในการลดความหนืดของตัวทำละลายในการสกัดและเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) วิธีนี้เหมาะกับการสกัดสารในสมุนไพรที่สามารถละลายน้ำได้ (Abubakar and Haque, 2020)

(4). Decoction

การต้ม (decoction) เป็นวิธีในการสกัดโดยให้ความร้อนอย่างต่อเนื่อง โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสำหรับการสกัดในกระบวนการนี้ ใช้สมุนไพรที่ผ่านการทำแห้ง นำมาบดให้เป็นผงและนำใส่ลงภาชนะ จากนั้นให้ความร้อนตลอดกระบวนการเพื่อเป็นการเร่งระยะเวลาในการสกัด กระบวนการนี้โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 15 นาทีในการสกัด วิธีนี้เหมาะกับพืชสมุนไพรที่สามารถละลายน้ำได้และสามารถทนความร้อนได้ดี (Abubakar and Haque, 2020)

(5). Percolation

เพอร์โคเลชัน (percolation) วิธีการนี้ใช้เครื่องมือที่เรียกว่า เพอร์โคเลเตอร์ (percolator) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยการนำสมุนไพรมาหมักหรือแช่ในตัวทำละลาย ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หมักหรือแช่ไว้จนกระทั่งสมุนไพรมีการดูดตัวทำละลายเข้าไปภายในจนอิ่มตัว หลังจากนั้นนำสมุนไพรมาบรรจุลงเพอร์โคเลเตอร์ (percolator) เล็กน้อย ทำการเติมตัวทำละลายให้อยู่เหนือสมุนไพร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วจึงเริ่มเอาสารสกัดออก ทำการหมั่นเติมตัวทำละลายโดยไม่ให้ตัวทำละลายแห้ง จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้นำไปกรองและทำการระเหยแห้ง (อารีรัตน์, 2560)

(6). Soxhlet extraction

การสกัดด้วยซอกเลต (Soxhlet extraction) วิธีการนี้จะให้ความร้อนแก่ตัวทำละลาย จนตัวทำละลายระเหยขึ้นสู่ด้านบน จากนั้นจะถูกควบแน่นด้วยระบบหล่อเย็น ทำให้ตัวทำละลายไหลลงสผ่านสารที่ทำการสกัด วิธีการนี้จะเป็นระบบหมุนเวียน โดยจะทำการสกัดซ้ำ ๆ จนกระทั่งสารที่สกัดได้มีความเข้มข้นมากพอ (อารีรัตน์, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(7). Microwave-assisted extraction

การใช้ไมโครเวฟช่วยสกัด (Microwave-Assisted Extraction, MAE) วิธีนี้เป็นวิธีการสกัดโดยการใช้คลื่นไมโครเวฟ คลื่นไมโครเวฟมีความถี่ตั้งแต่ 300 MHz จนถึง 300 GHz โดยคลื่นจะทำให้เกิดการเสียดสีของโมเลกุลที่มีขั้วทำให้เกิดความร้อน ความร้อนที่เกิดขึ้นจะช่วยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่เข้าสู่สารได้ง่ายขึ้น วิธีนี้เหมาะในการใช้กับตัวทำละลายที่มีขั้ว หากใช้ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะเกิดความร้อนเพียงเล็กน้อย วิธีนี้จึงไม่นิยมในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ข้อดีของวิธีนี้คือลดการใช้ตัวทำละลายและลดระยะเวลาในการสกัดให้เหลือน้อยที่สุด (Abubakar and Haque, 2020)

2.3 อนุมูลอิสระ

สารอนุมูลอิสระ (Free radicals) คือองค์ประกอบที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่เต็มที่ในโครงสร้าง ซึ่งทำให้สารนี้มีความไม่เสถียรและมีความกัดกร่อนทางเคมี อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้จากกระบวนการออกซิเดชัน (Oxidation) หรือจากปัจจัยภายนอกที่เข้าสัมผัสกับสาร ซึ่งอาจเป็นสารเคมี รังสี หรือความร้อนสูง

สารอนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนไม่เต็มที่ เมื่อมีการเกิดของสารอนุมูลอิสระขึ้น สารอนุมูลอิสระจะมีความต้องการที่จะเติมอิเล็กตรอนให้เต็มที่ ดังนั้น สารอนุมูลอิสระจะเป็นตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) และมีความสามารถในการกัดกร่อนหรือทำลายโครงสร้างของสารอื่นๆ ภายในระบบชีวภาพ เมื่อสารอนุมูลอิสระมีปริมาณมากเกินไปหรือไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ภายในร่างกาย อาจทำให้เกิดผลเสียต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะ เช่น การเสื่อมสภาพของเซลล์ อัตราการเกิดโรคต่างๆ เพิ่มขึ้น และกระบวนการเกิดเป็นมะเร็งได้เสียหายได้ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ เช่น hydroxyl (OH), superoxide (O_2•–), nitric oxide (NO•), nitrogen dioxide (NO_2•), peroxyl (ROO•) และ lipid peroxyl (LOO•). (Pham-Huy, et al., 2008)

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือสารที่มีคุณสมบัติที่ช่วยยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ทำให้เกิดสารที่ไม่มีอันตรายต่อเซลล์ร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันหรือซ่อมแซมความเสียหายของเซลล์ร่างกายที่เกิดจากออกซิเจนได้ สารต้านอนุมูลอิสระยังเป็นสารเคมีที่มีหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น รวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้กระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ซึ่งช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ได้ สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ (Natural Antioxidant) เช่น Amino Acid, Ascorbic Acid, Carotenoid, Flavonoid, Melanoidin, Other Organic Acid, Peptides, Tannins, Tocopherols เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากสารสังเคราะห์ (SyntheticAntioxidant)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น Tert-butyl-4 - hydroxyanisol (BHA),Tert-butyl-4 - hydroxytoluene(BHT) และ Tert-butyl-hydroquinone (TBHQ) เป็นต้น (Valko, et al., 2007)

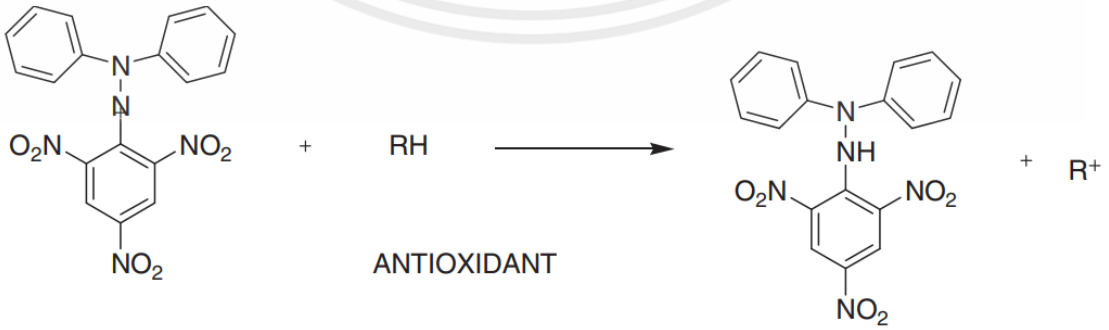
2.5 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds)

ฟีนอลิก เป็นเมทาบอไลต์ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการป้องกันโรคในพืช สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบและป้องกันความเสียหายจากรังสีอัลตราไวโอเลต นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการป้องกันการสร้างสารก่อมะเร็ง สารประกอบฟีนอลิกถูกจำแนกเป็นกลุ่มย่อยตามโครงสร้างทางเคมี ซึ่งอยู่ในกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม และสารในกลุ่มฟีนอลิกเป็นหนึ่งในกลุ่มย่อยที่มีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและพบในพืชหลายส่วน เช่น เมล็ด ผล ดอก และใบ ตัวอย่างเช่น พบสารในกลุ่มฟีนอลิกในเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว (Myrtsi, et al., 2023) และพบสารในกลุ่มฟีนอลิกในใบของใบชา (Lin, et al., 1996) สารประกอบฟีนอลิกมักพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืช แต่ชนิดและปริมาณของสารเหล่านี้จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและส่วนของพืชที่นำมาใช้

2.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

2.6.1 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH method

การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) โดยวัดการลดลงของค่าการดูดกลืนแสง DPPH เป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่มีความเสถียร ในการทดสอบจะทำการทดสอบโดยผสมสาร DPPH กับสารสกัด หากสารสกัดมีฤทธิ์ในการกำจัดหรือสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ จะทำให้สีของ DPPH เปลี่ยนไป ซึ่งหากมีฤทธิ์ในการกำจัดหรือสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากจะเปลี่ยนสีของ DPPH เป็นสีเหลือง โดยทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยจะแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าดูดกลืนแสง (Yamasaki et al., 1994)



รูปที่ 6 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ที่มา : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1658365514001277

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS method

การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) หลักการของวิธีนี้จะคล้ายกับวิธี DPPH วิธีการนี้จะทำการจับอนุมูลอิสระของ ABTS โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยค่าดูดกลืนแสงของ ABTS ที่ใช้คือ 734 นาโนเมตร ซึ่งถ้าสารมีฤทธิ์ในการกำจัดหรือสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมาก จะลดค่าดูดกลืนแสงลงมาก (ศรินทร์ และคณะ, 2557)

2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents) ทดลองโดยวิธี Folin-Ciocalteu phenol colorimetric assay โดยจะใช้สารละลายโฟลิน (Folin-ciocalteu) และโซเดียมคาร์บอเนต วิธีนี้อาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นของสารประกอบจำพวกฟีนอล จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เมื่อตัวอย่างสารที่นำมาทดสอบมีปริมาณฟีนอลิก สารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองอ่อนไปเป็นสีน้ำเงิน โดยตัวอย่างสารที่มีปริมาณฟีนอลิกสูง สารละลายจะมีสีน้ำเงินเข้มมากขึ้น (ศรินทร์ และคณะ, 2557)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุกัญญา และคณะ (2020) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาอบแห้งต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของบัวบก ทำการทดสอบโดยใช้อุณหภูมิอบแห้งที่ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 8, 10 และ 12 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2- diphenyl-1- picrylhydrazyl radical scavenging activity (DPPH) และวิธี 2,2-azino-bisfree radical scavenging activity (ABTS) พบว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 8 และ 10 ชั่วโมง มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งสูงที่สุด การอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส เวลา 10 ชั่วโมง มีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงที่สุด ผลของการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่เวลา 10 ชั่วโมง มีผลในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด

Rahman และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของบัวบก รวมถึงศึกษาปริมาณโพลีฟีนอล, ฟลาโวนอยด์, แคโรทีน, แทนนิน และวิตามินซี และผลกระทบของขั้วตัวทำละลายในการสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น 50% และ 100% และน้ำ เป็นตัวทำละลายในการสกัด ทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าการใช้ตัวทำละลายด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 50% มีปริมาณโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์สูงที่สุด ขณะที่แคโรทีนและแทนนินมีปริมาณปานกลาง แต่มีวิตามินซีน้อยที่สุด และผลของการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าการใช้ตัวทำละลายด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 50% สูงกว่าการใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น 100% และน้ำในการสกัดอย่างมีนัยสำคัญ

Yahya และ Nurrosyidah (2020) ได้ทำการศึกษา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรบัวบกโดยใช้ DPPH (2,2-Diphenyl -1-pikrilhidrazil) หลังจากนั้นทำการวัดค่า IC50 ทำการสกัดบัวบก (*Centella asiatica* (L.) Urban) ด้วยวิธี soxhletation โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 96% ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH (2.2 Diphenyl-1-Pikrihydrazil) ทำการเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรบัวบกมีค่า IC50 เท่ากับ 78.20 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 อุปกรณ์สำหรับการเตรียมผงบัวบก

1) ตู้อบ Tray dry
2) เครื่องบด
3) ตะแกรงร่อนเบอร์ 50

3.1.2 อุปกรณ์สำหรับการสกัด

1) Magnetic stirrer และ bar
2) บีกเกอร์
3) เทอร์โมมิเตอร์
4) แคลมป์
5) ปิเปต
6) หลอดทดลอง
7) Syring
8) สายยางซิลิโคน
9) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
10) แท่งแก้วคนสาร
11) อลูมิเนียมฟอยล์
12) Test Tube Rack
13) กระดาษกรอง Whatman No.1
14) กรวย
15) ผ้าขาวบาง
16) ขวดสีชา

3.1.3 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

1) Spectrophotometer (Biochrom, Libra S12, United Kingdom)
2) คิวเวต
3) ไมโครปิเปต
4) ไมโครทิวป์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) บีกเกอร์

6) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

7) แท่งแก้วคนสาร

3.1.4 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

1) Spectrophotometer (Biochrom, Libra S12, United Kingdom)

2) คิวเวต

3) ไมโครปิเปต

4) ไมโครทิวป์

5) บีกเกอร์

6) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

7) แท่งแก้วคนสาร

3.1.5 วัสดุสำหรับการทดลอง

1) บัวบกสด

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับการสกัดบัวบก

1) น้ำกลั่น

2) เอทานอล (Ethanol, C_2H_6O) (CHEMIPAN, Thai)

3.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

1) น้ำกลั่น

2) เอทานอล (Ethanol, C_2H_6O) (CHEMIPAN, Thai)

3) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich®, USA)

4) 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (Sigma-Aldrich®, USA)

5) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma-Aldrich®, USA)

3.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

1) Folin & ciocalteu's phenol reagent (Loba Chemie Pvt. Ltd, India)

2) Sodium carbonate anhydrous (NA_2CO_3) (Univar Solutions Inc., USA)

3) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma-Aldrich®, USA)

4) เอทานอล (Ethanol, C_2H_6O) (CHEMIPAN, Thai)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) น้ำกลั่น

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ออกแบบการทดลองแบบ central composite design ด้วยโปรแกรม Minitab โดยมี 2 ปัจจัยในการทดลอง ได้แก่ เวลา (Time) และอุณหภูมิ (Temperature) แผนการทดลองที่ทำการออกแบบการทดลองแบบ central composite design ดังตารางที่ 1 โดยทำการทดลองซ้ำแต่ละกลุ่มเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

ตารางที่ 1 แผนการทดลองโดยใช้วิธี central composite design

RunOrder	EtOH concentration (%)	Temperature (°C)
1	39.5	34.4
2	85.5	34.4
3	39.5	55.6
4	85.5	55.6
5	30.0	45.0
6	95.0	45.0
7	62.5	30.0
8	62.5	60.0
9	62.5	45.0
10	62.5	45.0
11	62.5	45.0
12	62.5	45.0
13	62.5	45.0

3.3.2 การเตรียมผงบัวบก

นำบัวบกสดมาล้างทำความสะอาด จากนั้นทำการทิ้งให้สะเด็ดน้ำ ใช้ส่วนก้านและใบ นำบัวบกที่ได้ทำการเตรียมไว้ใส่ถาดอบแห้ง ใช้เครื่องอบลมร้อน (tray dryer) นำอบที่ 60 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (สุกัญญา และคณะ, 2019) หลังจากอบแห้ง นำบัวบกแห้งบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ทำการร่อนผ่านตะแกรงร่อนเบอร์ 50 ทำการเก็บผงบัวบกในภาชนะปิดสนิท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การเตรียมสารสกัดจากบัวบก

ทำการสกัดตัวอย่าง ดัดแปลงจากวิธีการของ Atreyi and Uma (2017) ทำการสกัดผงบัวบกด้วยวิธีการแช่โดยทำการกวนและให้ความร้อนด้วยเครื่อง magnetic stirrer with hot plate ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายความเข้มข้นต่าง ๆ ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) โดยทำการชั่งผงบัวบก 10 กรัมและเติมตัวทำละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปสกัดเป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง โดยทุก ๆ 15 นาที จะทำการดูดสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ทำการเก็บตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยขวดสีชา ปิดฝาและนำเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีของ Singh et al. (2002) ทำการเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ปิเปตสารละลายบัวบก 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงนำสารละลายที่เตรียมไว้นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งแสดงค่าร้อยละการยับยั้ง คำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(Ac - As)/Ac] \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ Ac = ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

As = ค่าดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

นำค่าดูดกลืนแสงที่คำนวณได้มาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox โดยใช้ Trolox ที่ความเข้มข้น 250, 125, 62.5 และ 32.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจากวิธีของ Zhou et al. (2019) โดยผสมสารละลาย ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์และสารละลายโพแทสเซียม เพอร์ซัลเฟตเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 14-16 ชั่วโมง จะได้ ABTS stock solution ก่อนการใช้งาน เจือจาง ABTS stock solution ด้วยน้ำกลั่น วัดค่าดูดกลืนแสงของ สารด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าในช่วง 0.700±0.002 จากนั้นผสม ABTS stock solution ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร กับสารละลายบัวบก 0.6 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้ Trolox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (positive control) และคำนวณหาร้อยละการยับยั้งด้วยสมการ (1) เช่นเดียวกับวิธี DPPH โดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจากวิธีการของ Miliauskas และคณะ (2004) เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยเอทานอล 95 % ใช้สารละลายตัวอย่าง 1 ส่วนต่อเอทานอล 95 % 9 ส่วน ใส่ลงหลอดไมโครทิวป์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในแต่ละความเข้มข้น จากนั้นเตรียมสารละลายโฟลินความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร (10% v/v Folin-Ciocalteau reagent) ปิเปตสารละลายโฟลิน ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครทิวป์ที่มีสารละลายตัวอย่างในแต่ละหลุม เติมสารละลาย Sodium carbonate ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 (W/V) จากนั้นนำไปเขย่าให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 50, 100, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร

3.3.6 การวิเคราะหทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะหความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) โดยใชโปรแกรมวิเคราะหทางสถิติ Minitab Statistical Software ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์การทดลอง

4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (trolox) ดังตารางที่ 2 พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลจากการสกัดด้วยความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์การถดถอยเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษา ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางที่ 2 มีคา F-Value เทากับ 4472.25 ค่า degree of freedom (DF) เทากับ 39 มีคานัยสำคัญของการทดสอบ (p-value) เท่ากับ 0.000 แสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่ศึกษามีผลต่อปัจจัยอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และผลจากตารางที่ 3 สารที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 85.50% อุณหภูมิ 55.60 °C ที่เวลา 90 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอยู่ที่ 346.29 TE µg/g สารที่สกัดด้วยเอทานอล 85.50% อุณหภูมิ 34.40 °C ที่เวลา 30 นาที และสารที่สกัดด้วยเอทานอล 39.50% อุณหภูมิ 55.60 °C ที่เวลา 15 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรองลงมา ที่ 342.95 TE µg/g และ 342.71 TE µg/g ตามลำดับ และสารที่สกัดเอทานอลความเข้มข้น 95% อุณหภูมิ 45 °C ที่เวลา 15 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดอยู่ที่ 319.23 TE µg/g

ตารางที่ 2 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์การถดถอยของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	3	4439232	1479744	4472.25	0.000*
EtOH concentration (%)	1	139910	139910	422.85	0.000*
Temperature (°C)	1	334427	334427	1010.74	0.000*
EtOH concentration (%) * Temperature (°C)	1	98116	98116	296.54	0.000*
Error	36	11911	331		
Total	39	4451144			

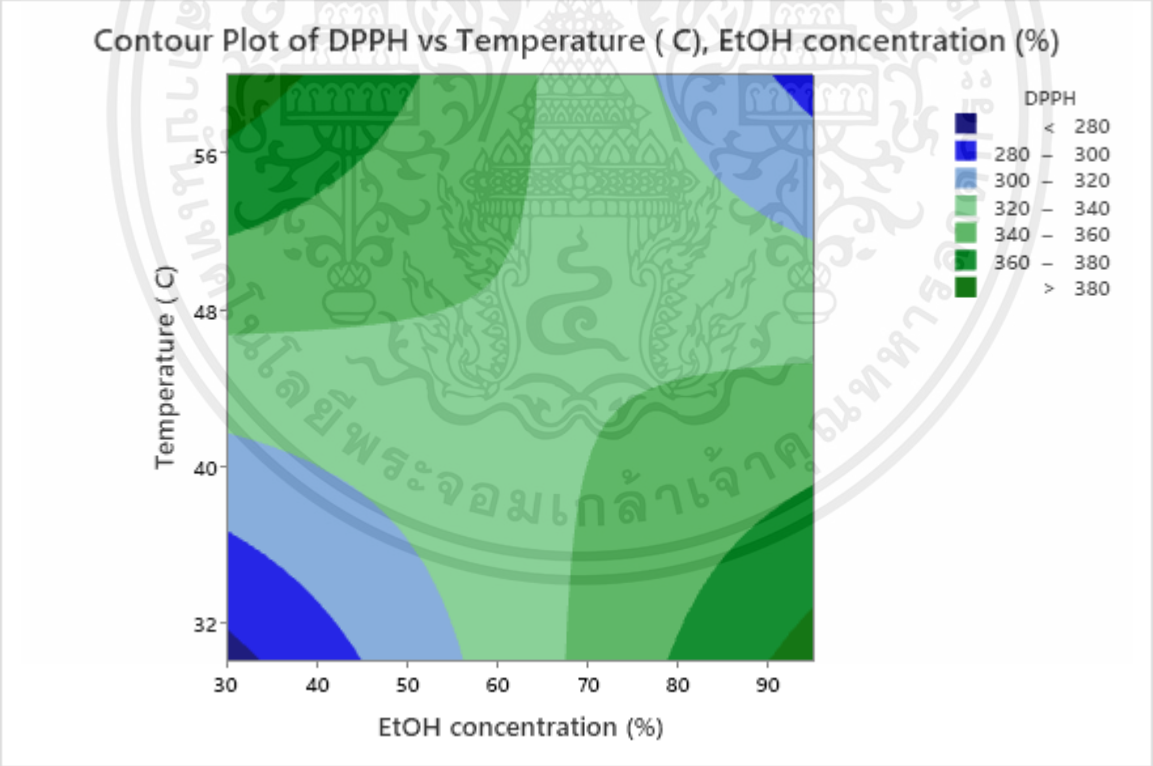
หมายเหตุ * (P<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

EtOH concentration (%)	Temperature (°C)	DPPH
85.50	55.60	346.29±2.26[a]
85.50	34.40	342.95±1.99[ab]
39.50	55.60	342.71±1.26[ab]
62.50	30.00	341.43±2.34[bc]
39.50	34.40	340.96±1.26[bc]
62.50	45.00	339.56±0.49[c]
62.50	60.00	333.71±2.06[d]
30.00	45.00	325.79±0.93[e]
95.00	45.00	319.23±1.13[f]

หมายเหตุ [a,b,c,d,e,f] มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 7 ภาพคอนทัวร์ พล็อตของผลความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (trolox) ดังตารางที่ 4 พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลจากการสกัดด้วยความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์การถดถอยเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษา ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางที่ 4 มีคา F-Value เทากับ 4543.66 ค่า degree of freedom (DF) เทากับ 39 มีคานัยสำคัญของการทดสอบ (p-value) เท่ากับ 0.000 แสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่ศึกษามีผลต่อปัจจัยอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และผลจากตารางที่ 5 สารที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 85.50% อุณหภูมิ 34.40 °C ที่เวลา 60 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอยู่ที่ 23.65 TE µg/g สารที่สกัดด้วยเอทานอล 85.50% อุณหภูมิ 55.6 °C ที่เวลา 45 นาที และสารที่สกัดด้วยเอทานอล 39.50% อุณหภูมิ 55.60 °C ที่เวลา 15 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรองลงมา ที่ 23.44 TE µg/g และ 23.17 TE µg/g ตามลำดับ และสารที่สกัดเอทานอลความเข้มข้น 62.50% อุณหภูมิ 60 °C ที่เวลา 75 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดอยู่ที่ 20.98 TE µg/g

ตารางที่ 4 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์การถดถอยของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	3	19654.5	6551.49	4543.66	0.000*
EtOH concentration (%)	1	668.1	668.09	463.34	0.000*
Temperature (°C)	1	1414.8	1414.8	981.2	0.000*
EtOH concentration (%) * Temperature (°C)	1	448.1	448.14	310.8	0.000*
Error	36	51.9	1.44		
Total	39	19706.4			

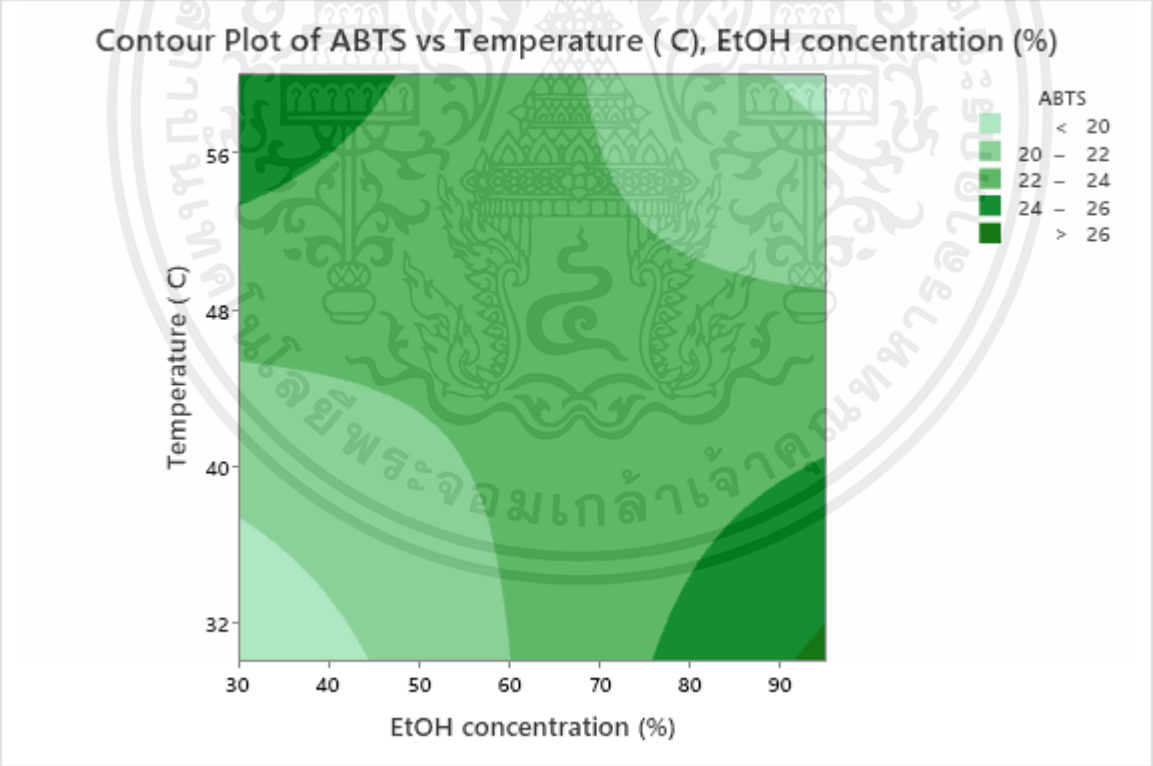
หมายเหตุ * (P<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay

EtOH concentration (%)	Temperature (°C)	ABTS
85.50	34.40	23.65±1.99[a]
85.50	55.60	23.44±2.26[a]
39.50	55.60	23.17±1.26[ab]
30.00	45.00	22.91±0.93[ab]
95.00	45.00	22.82±1.13[ab]
62.50	30.00	22.51±2.34[b]
39.50	34.40	22.34±1.26[b]
62.50	45.00	22.05±0.49[c]
62.50	60.00	20.98±2.06[d]

หมายเหตุ [a,b,c,d] มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 8 ภาพคอนทัวร์ พล็อตของผลความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิ ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Cioalteu assay

ผลจากการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Cioalteu assay เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (trolox) ดังตารางที่ 6 พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลจากการสกัดด้วยความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์การถดถอยเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษา ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางที่ 6 มีคา F-Value เทากับ 511.34 ค่า degree of freedom (DF) เทากับ 39 มีคานัยสำคัญของการทดสอบ (p-value) เท่ากับ 0.000 แสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่ศึกษามีผลต่อปัจจัยอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และผลจากตารางที่ 7 สารที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 39.50% อุณหภูมิ 55.60 °C ที่เวลา 60 นาที มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดอยู่ที่ 343.20 TE µg/g สารที่สกัดด้วยเอทานอล 62.50% อุณหภูมิ 60 °C ที่เวลา 75 นาที และสารที่สกัดด้วยเอทานอล 62.50% อุณหภูมิ 30 °C ที่เวลา 75 นาที มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดรองลงมา ที่ 337.83 TE µg/g และ 316.31 TE µg/g ตามลำดับ และสารที่สกัดเอทานอลความเข้มข้น 95% อุณหภูมิ 45 °C ที่เวลา 90 นาที มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดต่ำที่สุดอยู่ที่ 126.46 TE µg/g

ตารางที่ 6 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์การถดถอยของการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Cioalteu assay

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	3	3177166	1059055	511.34	0.000*
EtOH concentration (%)	1	43932	43932	21.21	0.000*
Temperature (°C)	1	522440	522440	252.25	0.000*
EtOH concentration (%) * Temperature (°C)	1	96427	96427	46.56	0.000*
Error	36	74562	2071		
Total	39	3251728			

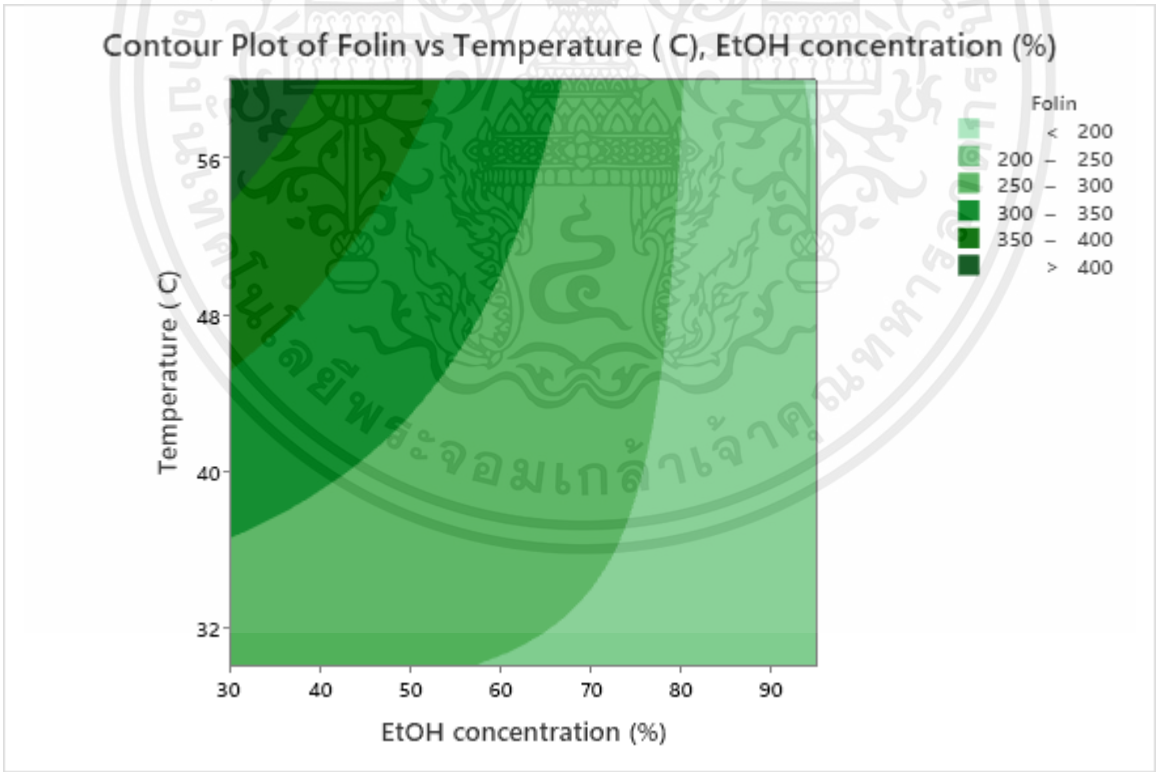
หมายเหตุ * (P<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Cioalteu assay

EtOH concentration (%)	Temperature (°C)	Total Phenolic Content
39.5	55.6	343.20±59.26[a]
62.5	60.0	337.83±14.67[a]
62.5	30.0	316.31±22.95[ab]
30.0	45.0	311.08±23.73[ab]
62.5	45.0	303.17±12.22[ab]
39.5	34.4	257.90±4.86[bc]
85.5	55.6	257.30±2.39[bc]
85.5	34.4	205.33±19.58[c]
95.0	45.0	126.46±7.57[d]

หมายเหตุ [a,b,c,d,e,f] มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 9 ภาพคอนทัวร์ พล็อตของผลความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิ ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin- Ciocalteau assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ความเข้มข้นของเอทานอล การใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน และระยะเวลาในการสกัด ส่งผลต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของบัวบก และส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด รวมไปถึงวิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน โดยจะเห็นได้ว่า การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และวิธี ABTS radical scavenging assay ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีความแตกต่างกัน โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดและต่ำที่สุดจากทั้ง 2 วิธีในการวิเคราะห์เกิดจากปัจจัยที่ต่างกัน ทั้งนี้ค่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจจะมาจากปัจจัยอื่น ตัวอย่างเช่น อุปกรณ์ที่ใช้อาจมีความคลาดเคลื่อนในการตวงสาร อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดแต่ละครั้งที่ไม่เท่ากัน เนื่องจากการควบคุมอุณหภูมิที่ไม่สารถทำให้คงที่ตลอดการสกัดได้ อาจทำให้ค่าที่ได้เกิดข้อผิดพลาดก็เป็นได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) ในการทำการทดลองตามที่ได้ออกแบบการทดลองสามารถออกแบบการทดลองด้วยวิธีอื่น เพื่อให้เหมาะสมกับการทดลองและได้ค่าที่แม่นนี้ได้

2) สามารถใช้ความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิที่แตกต่างจากการทดลองนี้ เนื่องจากปัจจัยทั้ง 2 นี้มีผลต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของบัวบก เพื่อเป็นผลการศึกษาเพิ่มเติมได้

3) เนื่องจากในการใช้เครื่องมือ ทั้งในการสกัดและการวิเคราะห์ ผู้ใช้งานยังไม่มีความชำนาญมากพอจากการมีเวลาในการทดลองที่น้อยเนื่องจากเกิดข้อผิดพลาดในการวางแผนให้ดี ซึ่งอาจจะให้เกิดข้อผิดพลาดของผลการทดลองได้ ดั้งนั้นก่อนทำการทดลองควรวางแผนและตรวจสอบข้อมูลให้ครบถ้วนก่อนที่จะเริ่มทำการปฏิบัติในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

คณะอนุกรรมการจัดทำตาราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย. 2554. “บัวบก” วารสารการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก. 9: 57-61.

จิรพันธ์ ศรีทองกุล. 2553. “อิทธิพลความแก่ใบ ความเข้มแสง และอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเอเชียติโคไซด์และคุณภาพบัวบก [Centella asiatica(L.) Urban].” วิทยานิพนธ์คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชนา เจนวิถีสุข. 2545. “แอนติออกซิเดนท์: สารต้านมะเร็งในผักสมุนไพรไทย”. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์. 281 น.

รัตนาภรณ์ ธนะจิตต์. 2556. “สารสกัด Centella asiatica และสรรพคุณทางการแพทย์” วารสารการแพทย์แผนไทยและการพึ่งพิง. 2(3): 1-12.

ศรินทร์ ทองธรรมชาติ, สุชนา วานิช, นงลักษณ์ ศรีแก้ว. 2557. “การศึกษาปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบย่านาง” คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.

สุกัญญา จันทร์สุนะ, ลลิตา เจริญทรัพย์, เยาวพา จิระเกียรติ กุล และพรชัย หาระโคตร. 2562. “ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการอบแห้งต่อปริมาณสารต้านอนุมูล อิสระและความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ.” คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ : ปทุมธานี.

สุกัญญา จันทร์สุนะ, ลลิตา เจริญทรัพย์, เยาวพา จิระเกียรติกุล และพรชัย หาระโคตร. 2020. “ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการอบแห้งต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของใบบัวบก [*Centella asiatica* (L.) Urb.]” Thai Science and Technology Journal. 28(12): 2261-2272.

อารีรัตน์ ซื่อดี. 2560. “Microwave-Assisted Extraction of Active Compounds from Medicinal Plants” วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย. 11(1): 1-14.

Abdullahi R. Abubakar and Mainul Haque. 2020. “Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes” Journal of pharmacy & bioallied sciences. 12(1): 1-10.

Atreyi Sarkar and Uma Ghosh. 2017. “effect of extraction temperature and technique on phenolic compounds.” Research Journal of Recent Sciences. 6(2) : 10-15.

Bhavan, B. V. 1992. “Selected Medicinal Plants of India.” Tata Press. 1992.

Daduang, J., Vichitphan, S., Daduang, S., Hongsprabhas, P. and Boonsiri, P. 2011. “High phenolics and antioxidants of some tropical vegetables related to antibacterial and anticancer activities” African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 5(5): 608-615.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Eleni D. Myrtsi, Epameinondas Evergetis, Sofia D. Koulocheri and Serkos A. Haroutounian. 2023. “Bioactivity of Wild and Cultivated Legumes: Phytochemical Content and Antioxidant Properties.” Antioxidants 2023. 12(4): 852.

G. Miliauskas, P.R. Venskutonis and T.A. van Beek. 2004. “Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts” Food Chemistry. 85(2): 231-237.

Giada Maramaldi and Stefano Togni. 2013. “Anti-inflammaging and antiglycation activity of a novel botanical ingredient from African biodiversity (Centevita™)” Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology. 7: 1-9.

Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Samukawa, K., & Satake, N. 2018. “Anti-inflammatory Effect of Titrated Extract of Centella asiatica in Phthalic Anhydride-induced Allergic Dermatitis Animal Model.” Journal of traditional and complementary medicine. 8(3): 418-425.

Lien Ai Pham-Huy, Hua He, and Chuong Pham-Huy. 2008. “Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health” International journal of biomedical science : IJBS. 4(2): 89-96.

Lin LY, Juan MI, Chen LY, Liang CY, Lin KJ. 1996. “Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells.” J Agric Food Chem. 44: 1387–1394.

Mijanur Rahman, Shahdat Hossain, Asiqur Rahaman, Nusrat Fatima, Taslima Nahar, Borhan Uddin And Mafroz Ahmed Basunia. 2013. “Antioxidant Activity of Centella asiatica (Linn.) Urban: Impact of Extraction Solvent Polarity” Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 1(6): 27-32.

Mook-Jung, I., Shin, J. E., Yun, S. H., Huh, K., Koh, J. Y., Park, H. K., Jew, S. S., and Jung, M. W. 1999. “Protective effects of asiaticoside derivatives against beta-amyloid neurotoxicity.” J. Neurosci. Res. 58: 417-425.

Shukla, A., Rasik, A. M., Jain, G. K., Shankar, R., Kulshrestha, D. K., & Dhawan, B. N. 1999. “In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from Centella asiatica.” Journal of ethnopharmacology. 65(1): 1-11.

Singh, R.P., Chidambara, K.N. and Jayaprakasha, G.K.. 2002. “Studies on the activity of pomegranate (Punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models, J. Agric.” Food Chem. 50 : 81-86.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. 2007. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease" The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 39(1): 44-84.

Yahya, M. A., & Nurrosyidah, I. H. 2020. "Antioxidant activity ethanol extract of gotu kola (Centella asiatica (L.) Urban) with DPPH method (2,2-Diphenyl-1-Pikrilhidrazil)." Journal of Halal Product and Research (JHPR). 3(2): 106–112.

Yamasaki K, Hashimoto A, Kokusenya Y, Miyamoto T, Sato T. 1994. "Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs." Chem Pharm Bull (Tokyo). 42(8): 1663-1665.

Zhou, S.-D., Xu, X., Lin, Y.-F., Xia, H.-Y., Huang, L., & Dong, M.-S. 2019. "On-line screening and identification of free radical scavenging compounds in Angelica dahurica fermented with Eurotium cristatum using an HPLC-PDATriple-TOF-MS/MS-ABTS system." Food Chemistry. 272: 670–678.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ข้อมูลดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1 ค่าดูดกลืนแสงของสารด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	39.5%, 34.4 ℃			85.5%, 34.4 ℃			39.5%, 55.6 ℃		
15 นาที	0.084	0.102	0.109	0.11	0.087	0.096	0.087	0.08	0.082
30 นาที	0.091	0.099	0.101	0.076	0.113	0.084	0.122	0.103	0.1
45 นาที	0.085	0.089	0.091	0.106	0.087	0.096	0.14	0.1	0.119
60 นาที	0.103	0.102	0.097	0.11	0.1	0.096	0.112	0.089	0.088
75 นาที	0.105	0.115	0.099	0.102	0.117	0.095	0.11	0.121	0.101
90 นาที	0.096	0.09	0.103	0.114	0.113	0.101	0.142	0.13	0.102
	85.5%, 55.6 ℃			30.0%, 45.0 ℃			95.0%, 45.0 ℃		
15 นาที	0.082	0.09	0.101	0.132	0.139	0.131	0.154	0.164	0.148
30 นาที	0.1	0.101	0.1	0.14	0.14	0.135	0.161	0.157	0.151
45 นาที	0.087	0.072	0.089	0.14	0.14	0.136	0.167	0.178	0.158
60 นาที	0.104	0.092	0.072	0.147	0.136	0.14	0.179	0.164	0.157
75 นาที	0.087	0.098	0.07	0.147	0.151	0.145	0.179	0.153	0.159
90 นาที	0.104	0.074	0.074	0.134	0.149	0.134	0.186	0.158	0.183
	62.5%, 30.0 ℃			62.5%, 60.0 ℃			62.5%, 45.0 ℃		
15 นาที	0.095	0.093	0.096	0.126	0.11	0.117	0.099	0.09	0.107
30 นาที	0.099	0.085	0.097	0.117	0.102	0.113	0.092	0.094	0.106
45 นาที	0.092	0.079	0.09	0.111	0.116	0.116	0.092	0.095	0.105
60 นาที	0.093	0.087	0.092	0.111	0.114	0.115	0.089	0.092	0.103
75 นาที	0.094	0.087	0.093	0.114	0.118	0.118	0.09	0.097	0.095
90 นาที	0.091	0.082	0.091	0.113	0.102	0.115	0.095	0.096	0.099
	62.5%, 45.0 ℃			62.5%, 45.0 ℃			62.5%, 45.0 ℃		
15 นาที	0.103	0.094	0.101	0.097	0.1	0.098	0.091	0.109	0.109
30 นาที	0.099	0.104	0.103	0.093	0.099	0.102	0.099	0.1	0.107
45 นาที	0.094	0.097	0.092	0.091	0.097	0.103	0.09	0.102	0.106
60 นาที	0.1	0.089	0.094	0.096	0.095	0.105	0.095	0.096	0.098
75 นาที	0.094	0.086	0.099	0.094	0.096	0.098	0.101	0.097	0.095
90 นาที	0.092	0.086	0.092	0.096	0.092	0.095	0.101	0.096	0.104
	62.5%, 45.0 ℃								
15 นาที	0.096	0.098	0.104						
30 นาที	0.101	0.104	0.105						
45 นาที	0.093	0.103	0.094						
60 นาที	0.099	0.102	0.095						
75 นาที	0.092	0.093	0.104						
90 นาที	0.098	0.091	0.094						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 ค่าดูดกลืนแสงของสารด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	39.5%, 34.4 ℃			85.5%, 34.4 ℃			39.5%, 55.6 ℃		
15 นาที	0.048	0.047	0.043	0.031	0.026	0.025	0.034	0.034	0.015
30 นาที	0.102	0.071	0.073	0.018	0.028	0.02	0.126	0.091	0.047
45 นาที	0.047	0.054	0.056	0.022	0.027	0.022	0.128	0.051	0.044
60 นาที	0.098	0.087	0.089	0.021	0.022	0.017	0.124	0.098	0.055
75 นาที	0.086	0.083	0.084	0.021	0.018	0.022	0.045	0.091	0.075
90 นาที	0.05	0.066	0.081	0.028	0.024	0.024	0.035	0.065	0.07
	85.5%, 55.6 ℃			30.0%, 45.0 ℃			95.0%, 45.0 ℃		
15 นาที	0.021	0.041	0.031	0.065	0.025	0.035	0.044	0.033	0.035
30 นาที	0.028	0.029	0.035	0.18	0.143	0.093	0.057	0.036	0.038
45 นาที	0.027	0.022	0.026	0.111	0.134	0.07	0.063	0.043	0.043
60 นาที	0.027	0.034	0.03	0.123	0.057	0.115	0.052	0.04	0.041
75 นาที	0.035	0.03	0.023	0.039	0.069	0.262	0.046	0.026	0.039
90 นาที	0.043	0.024	0.026	0.102	0.073	0.056	0.048	0.044	0.044
	62.5%, 30.0 ℃			62.5%, 60.0 ℃			62.5%, 45.0 ℃		
15 นาที	0.04	0.053	0.052	0.085	0.073	0.093	0.055	0.055	0.054
30 นาที	0.046	0.052	0.049	0.079	0.086	0.106	0.052	0.05	0.057
45 นาที	0.046	0.054	0.046	0.07	0.091	0.1	0.057	0.062	0.063
60 นาที	0.035	0.058	0.047	0.072	0.121	0.096	0.062	0.066	0.065
75 นาที	0.037	0.046	0.052	0.054	0.095	0.095	0.061	0.06	0.055
90 นาที	0.032	0.055	0.051	0.066	0.096	0.119	0.053	0.057	0.059
	62.5%, 45.0 ℃			62.5%, 45.0 ℃			62.5%, 45.0 ℃		
15 นาที	0.051	0.056	0.054	0.06	0.069	0.067	0.057	0.06	0.06
30 นาที	0.049	0.053	0.057	0.051	0.054	0.06	0.052	0.051	0.055
45 นาที	0.051	0.059	0.056	0.061	0.058	0.052	0.063	0.052	0.063
60 นาที	0.056	0.051	0.064	0.054	0.058	0.049	0.066	0.054	0.061
75 นาที	0.056	0.055	0.051	0.064	0.05	0.056	0.062	0.05	0.049
90 นาที	0.052	0.052	0.059	0.06	0.05	0.051	0.056	0.059	0.057
	62.5%, 45.0 ℃								
15 นาที	0.063	0.062	0.068						
30 นาที	0.052	0.051	0.056						
45 นาที	0.061	0.054	0.056						
60 นาที	0.062	0.065	0.061						
75 นาที	0.05	0.064	0.057						
90 นาที	0.059	0.054	0.057						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.3 ค่าดูดกลืนแสงของสารด้วยวิธี Folin-Cioalteu assay

	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	39.5%, 34.4 ℃			85.5%, 34.4 ℃			39.5%, 55.6 ℃		
15 นาที	0.048	0.047	0.043	0.031	0.026	0.025	0.034	0.034	0.015
30 นาที	0.102	0.071	0.073	0.018	0.028	0.02	0.126	0.091	0.047
45 นาที	0.047	0.054	0.056	0.022	0.027	0.022	0.128	0.051	0.044
60 นาที	0.098	0.087	0.089	0.021	0.022	0.017	0.124	0.098	0.055
75 นาที	0.086	0.083	0.084	0.021	0.018	0.022	0.045	0.091	0.075
90 นาที	0.05	0.066	0.081	0.028	0.024	0.024	0.035	0.065	0.07
	85.5%, 55.6 ℃			30.0%, 45.0 ℃			95.0%, 45.0 ℃		
15 นาที	0.021	0.041	0.031	0.065	0.025	0.035	0.044	0.033	0.035
30 นาที	0.028	0.029	0.035	0.18	0.143	0.093	0.057	0.036	0.038
45 นาที	0.027	0.022	0.026	0.111	0.134	0.07	0.063	0.043	0.043
60 นาที	0.027	0.034	0.03	0.123	0.057	0.115	0.052	0.04	0.041
75 นาที	0.035	0.03	0.023	0.039	0.069	0.262	0.046	0.026	0.039
90 นาที	0.043	0.024	0.026	0.102	0.073	0.056	0.048	0.044	0.044
	62.5%, 30.0 ℃			62.5%, 60.0 ℃			62.5%, 45.0 ℃		
15 นาที	0.04	0.053	0.052	0.085	0.073	0.093	0.055	0.055	0.054
30 นาที	0.046	0.052	0.049	0.079	0.086	0.106	0.052	0.05	0.057
45 นาที	0.046	0.054	0.046	0.07	0.091	0.1	0.057	0.062	0.063
60 นาที	0.035	0.058	0.047	0.072	0.121	0.096	0.062	0.066	0.065
75 นาที	0.037	0.046	0.052	0.054	0.095	0.095	0.061	0.06	0.055
90 นาที	0.032	0.055	0.051	0.066	0.096	0.119	0.053	0.057	0.059
	62.5%, 45.0 ℃			62.5%, 45.0 ℃			62.5%, 45.0 ℃		
15 นาที	0.051	0.056	0.054	0.06	0.069	0.067	0.057	0.06	0.06
30 นาที	0.049	0.053	0.057	0.051	0.054	0.06	0.052	0.051	0.055
45 นาที	0.051	0.059	0.056	0.061	0.058	0.052	0.063	0.052	0.063
60 นาที	0.056	0.051	0.064	0.054	0.058	0.049	0.066	0.054	0.061
75 นาที	0.056	0.055	0.051	0.064	0.05	0.056	0.062	0.05	0.049
90 นาที	0.052	0.052	0.059	0.06	0.05	0.051	0.056	0.059	0.057
	62.5%, 45.0 ℃								
15 นาที	0.063	0.062	0.068						
30 นาที	0.052	0.051	0.056						
45 นาที	0.061	0.054	0.056						
60 นาที	0.062	0.065	0.061						
75 นาที	0.05	0.064	0.057						
90 นาที	0.059	0.054	0.057						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 Grouping DPPH versus EtOH concentration (%)*Temperature (℃) Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

E*T	N	Mean	Grouping					
4753.31	3	346.29	A					
2939.98	3	342.95	A	B				
2197.52	3	342.712	A	B				
1875.00	3	341.43		B	C			
1359.19	3	340.958		B	C			
2812.50	15	339.555			C			
3750.00	3	333.71				D		
1350.00	3	325.787					E	
4275.00	3	319.227						F

ตารางที่ ข.2 Grouping ABTS versus EtOH concentration (%)*Temperature (℃) Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

E*T	N	Mean	Grouping			
2939.98	3	23.6478	A			
4753.31	3	23.4399	A			
2197.52	3	23.168	A	B		
1350.00	3	22.912	A	B		
4275.00	3	22.816	A	B		
1875.00	3	22.512		B	C	
1359.19	3	22.3411		B	C	
2812.50	15	22.0487			C	
3750.00	3	20.977				D

ตารางที่ ข.3 Grouping Total Phenolic versus EtOH concentration (%)*Temperature (℃) Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

E*T	N	Mean	Grouping			
2197.52	3	343.2	A			
3750.00	3	337.83	A			
1875.00	3	316.3	A	B		
1350.00	3	311.1	A	B		
2812.50	15	303.17	A	B		
1359.19	3	257.90		B	C	
4753.31	3	257.30		B	C	
2939.98	3	205.3			C	
4275.00	3	126.46				D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลาย DPPH stock solution (ความเข้มข้น 0.1 mM)

ทำการชั่ง DPPH น้ำหนัก 0.0788 g นำมาละลายในเมทานอล และทำการปรับปริมาตรเป็น 200 ml ด้วยเมทานอล

การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 250, 125, 62.5 และ 32.25 µg/ml เพื่อเทียบกับ DPPH assay

ทำการชั่ง Trolox น้ำหนัก 0.01 g นำมาละลายในเมทานอลและทำการปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยเมทานอล เมื่อได้โทรลอกซ์ความเข้มข้น 100 µg/ml นำมาเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 250, 125, 62.5 และ 32.25 µg/ml ตามลำดับ

การเตรียมสารละลาย ABTS stock solution

ทำการชั่ง ABTS น้ำหนัก 0.4608 g นำมาละลายในน้ำกลั่นและทำการปรับปริมาตรเป็น 120 ml ด้วยน้ำกลั่น จะได้ ABTS solution ความเข้มข้น 7 mM จากนั้นทำการชั่ง $K_2S_2O_8$ น้ำหนัก 0.0397 g นำมาละลายในน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรเป็น 60 ml จะได้ $K_2S_2O_8$ solution ความเข้มข้น 2.45 mM หลังจากนั้นนำสารทั้ง 2 ผสมเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 2 : 1 จะได้เป็น ABTS stock solution

การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 25, 20, 15, 10 และ 5 µg/ml เพื่อเทียบกับ ABTS assay

ทำการชั่ง Trolox น้ำหนัก 0.01 g นำมาละลายในเมทานอลและทำการปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยเมทานอล เมื่อได้โทรลอกซ์ความเข้มข้น 1000 µg/ml นำมาเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 25, 20, 15, 10 และ 5 µg/ml ตามลำดับ

การเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก

1. ใช้สาร Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 25 ml จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น ทำการปรับปริมาตรเป็น 250 ml

2. ทำการชั่ง Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) น้ำหนัก 18.75 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นและทำการปรับปริมาตรเป็น 250 ml

การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 500, 250, 100 และ 50 µg/ml เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณฟีนอลิกจากกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

1. ทำการชั่ง Trolox น้ำหนัก 0.01 g นำมาละลายในเมทานอลและทำการปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยเมทานอล เมื่อได้โทรลอกซ์ความเข้มข้น 1000 µg/ml นำมาเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 125, 62.5 และ 32.25 µg/ml ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นนทพัทธ์ ธัญญาวุฒิ

รหัสนักศึกษา 61010532

วัน เดือน ปีเกิด 17 กุมภาพันธ์ 2543

ที่อยู่ 123/2 ม.6 ต.คลองตะเกรา อ.ท่าตะเกียบ จ.ฉะเชิงเทรา 24160

ประวัติการศึกษา 2561-ปัจจุบัน ปริญญาตรี ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้