

การสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยและ  
การประยุกต์ในน้ำส้ม



นางสาวฐิติรัตน์ ศิริจันทร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF MAKIANG *Cleistocalyx nervosum* var.  
*paniala* SEEDS AND APPLICATION IN ORANGE JUICE

Miss Thitirat Sirichan



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การสกัดเมล็ดมะเขีเยง *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยและการประยุกต์  
ในน้ำส้ม

โดย

นางสาวฐิติรัตน์ ศิริจันทร์

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.กิติพงศ์ อัศตรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวนิช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.กิติพงศ์ อัศตรกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวินี ดีแท้)

ฐิติรัตน์ ศิริจันทร์ : การสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยและการประยุกต์ในน้ำส้ม (ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF MAKIANG *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* SEEDS AND APPLICATION IN ORANGE JUICE) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.กิตติพงศ์ อัครกุล, 188 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย (ultrasound-assisted extraction, UAE) ซึ่งพิจารณาจากสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ ปริมาณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl หรือ DPPH และ ferric-reducing antioxidant power หรือ FRAP) โดยออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design, BBD) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้พื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) ประกอบกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ในด้านจุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) เพื่อนำมาประยุกต์ในน้ำส้ม โดยปัจจัยการสกัดที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยความเข้มข้นเอทานอล (50, 70 และ 90% v/v) เวลา (25, 35 และ 45 นาที) อุณหภูมิ (30, 50 และ 70 °C) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (30, 40 และ 50%) และเตรียมตัวอย่างโดยใช้อัตราส่วนผงมะเกี๋ยงต่อเอทานอลเท่ากับ 1:5 (w/v) จากผลการทดลองพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ ความเข้มข้นเอทานอล 69% v/v เวลา 31 นาที อุณหภูมิ 52 °C และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 40% โดยสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะนี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 552.93 mg GAE/100 g dry wt. และ 17.82 mg QCE/100 g dry wt. ตามลำดับ และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 1769.70 และ 2168.82 mM trolox/100 g dry wt. ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับ การสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration, extraction, ME) พบว่าสารสกัดจาก UAE มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจาก ME อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) จึงเลือกสารสกัดจาก UAE มาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ โดยสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงจาก UAE มีค่า MIC และ MBC ของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella Typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Escherichia coli* อยู่ในช่วง 0.39-12.5 mg/mL และ 0.78- มากกว่า 100 mg/mL ตามลำดับ โดยสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด เมื่อพิจารณาจากสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงจาก UAE แล้วจึงเลือกใช้สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL ใส่ในน้ำส้ม โดยศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงต่อสมบัติทางประสาทสัมผัส และผลต่อสมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ของน้ำส้มคั้นสดระหว่างการเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน โดยเปรียบเทียบกับ น้ำส้มพาสเจอไรซ์ (80 °C 15 วินาที) เมื่อพิจารณาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระพบว่า น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำส้มคั้นสดและน้ำส้มพาสเจอไรซ์ ตามลำดับ และน้ำส้มทุกตัวอย่างมี pH และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดลดลง แต่มีค่าความแตกต่างของสี ( $\Delta E^*$ ) เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา และแลคติกแบคทีเรีย พบว่าน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัด 1.56 mg/mL น้ำส้มใส่สารสกัด 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอไรซ์ มีอายุการเก็บ 3, 9, 21 และมากกว่า 30 วันตามลำดับ และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่า คะแนนความชอบด้านกลิ่นของน้ำส้มใส่สารสกัด 1.56 mg/mL มีคะแนน (6.31±0.92) มากกว่าน้ำส้มใส่สารสกัด 3.125 mg/mL (5.01±1.06) และน้ำส้มพาสเจอไรซ์ (4.80±1.93) แต่มีคะแนนน้อยกว่าน้ำส้มควบคุม (8.11±0.65 คะแนน) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และคะแนนความชอบด้านสีของน้ำส้มใส่สารสกัดทั้งสองความเข้มข้น (1.56 และ 3.125 mg/mL) มีคะแนนความชอบด้านสี (5.10±1.42 และ 4.09±1.58 ตามลำดับ) น้อยกว่าน้ำส้มคั้นสด (7.73±0.82) และน้ำส้มพาสเจอไรซ์ (6.90±1.39) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่น้ำส้มคั้นสดมีคะแนนความชอบโดยรวม (7.51±1.21) มากกว่าน้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL (5.10±1.43 และ 3.73±1.38 ตามลำดับ) และน้ำส้มพาสเจอไรซ์ (5.43±1.87) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) จากการพิจารณาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ และสมบัติทางประสาทสัมผัสพบว่าสารสกัดมะเกี๋ยงสามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกในการประยุกต์ใช้ในน้ำส้มคั้นสดได้

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก .....

# # 5771965323 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: MAKIANG SEED / ULTRASOUND- ASSISTED EXTRACTION / ANTIOXIDANT PROPERTIES / ANTIMICROBIAL ACTIVITIES

THITIRAT SIRICHAN: ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF MAKIANG *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* SEEDS AND APPLICATION IN ORANGE JUICE. ADVISOR: KITIPONG ASSATARAKUL, Ph.D., 188 pp.

The objectives of this study were to optimize the antioxidant properties (total phenolic compound, flavonoid content and antioxidant activity by 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl or DPPH and ferric-reducing antioxidant power or FRAP assays) of Makiang (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) seed by using ultrasound-assisted extraction (UAE). A Box-Behnken design (BBD) and response surface methodology (RSM) were employed to optimize the extraction variables for antioxidant properties. Antimicrobial activities of Makiang seed extracts (minimal inhibitory concentration, MIC and minimal bactericidal concentration, MBC) were also evaluated for the application of Makiang seed extracts in fresh orange juice. Four independent variables including ethanol concentration (50, 70 and 90% v/v), extraction time (25, 35 and 45 min), extraction temperature (30, 50, 70 °C) and amplitude (30, 40 and 50%) were studied. Makiang seed extraction was performed with the solid-liquid (Makiang powder:ethanol) ratio of 1:5 (w/v). The optimum extraction conditions were as follows: ethanol concentration of 69% v/v, extraction time of 31 min, extraction temperature of 52 °C and amplitude of 40%, under the optimal conditions, total phenolic compound and flavonoid content were 552.93 mg GAE/100 g dry wt. and 17.82 mg QCE/100 g dry wt., respectively and antioxidant activities by DPPH and FRAP assays were 1769.70 and 2168.82 mM trolox/100 g dry wt., respectively. Moreover, this study was found antioxidant properties of extracts from UAE were significantly higher than those from maceration extraction (ME) ( $p \leq 0.05$ ). Thus, the extracts from UAE were used to evaluate the antimicrobial activities and the results showed that extracts had MIC and MBC values of *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella* Typhimurium, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* ranging from 0.39-12.5 mg/mL and 0.78 - more than 100 mg/mL, respectively. In this study *S. aureus* was the most sensitivity microorganism. When considering antioxidant properties and antimicrobial activities, the suitable extracts concentration for application in fresh orange juice were 1.56 and 3.125 mg/mL. and then study the effect of Makiang seed extracts on sensory properties and chemical, physical, and microbiological properties of fresh orange juice compared to pasteurized orange juice (80 °C 15 second) during storage at 4 °C for 30 days. The results showed that orange juice with extracts (1.56 and 3.125 mg/mL) had the higher antioxidant properties than fresh orange juice (control) and pasteurized orange juice. Antioxidant properties, pH and total soluble solid of all samples decreased with increasing storage time; however,  $\Delta E^*$  value of all samples increased with increasing storage time. When considering number of total bacteria, yeast and mold and lactic acid bacteria, shelf life of fresh orange juice, orange juice with extracts 1.56 and 3.125 mg/mL, and pasteurized orange juice were 3, 9, 21 and more than 30 days, respectively. According to sensory evaluation, odor score of orange juice with extract 1.56 mg/mL ( $6.31 \pm 0.92$ ) was significantly higher than orange juice with extract 3.125 mg/mL ( $5.01 \pm 1.06$ ) and pasteurized orange juice ( $4.80 \pm 1.93$ ), but less than fresh orange juice ( $8.11 \pm 0.65$ ) ( $p \leq 0.05$ ). Moreover, color scores of orange juice with extract 1.56 and 3.125 mg/mL ( $5.10 \pm 1.42$  and  $4.09 \pm 1.58$ ) were significantly less than fresh orange juice ( $7.73 \pm 0.82$ ) and pasteurized orange juice ( $6.90 \pm 1.39$ ) ( $p \leq 0.05$ ). Overall score of fresh orange juice ( $7.51 \pm 1.21$ ) was the highest score compared to other samples ( $p \leq 0.05$ ). It can be concluded from this study that extracts could be used in fresh orange juice.

Department: Food Technology

Student's Signature .....

Field of Study: Food Technology

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2016

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้โดยการสนับสนุนทุนวิจัยจาก “ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (THE 90th ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) ) และสำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก อาจารย์ ดร.กิติพงศ์ อัครสกุล อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ และคอยอบรมสั่งสอน ให้ข้อคิดในการทำงานเสมอมา ผู้วิจัยตระหนักถึง ความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ซาลีดา บรมพิชัยชาติกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาวินี ดีแท้ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และกรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบ กลับกรองและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารและทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาแนะนำเสมอมา ตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบคุณบิดา มารดา น้องสาว และครอบครัวที่คอยห่วงใย เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนเสมอมา

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป .....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 มะเกี๋ยง (Ma-kiang) .....	3
2.1.1 ลักษณะของมะเกี๋ยง .....	4
2.1.2 การใช้ประโยชน์จากผลมะเกี๋ยงในด้านผลิตภัณฑ์อาหาร .....	7
2.1.3 เมล็ดมะเกี๋ยง .....	9
2.2 สารประกอบฟีนอลิก.....	11
2.2.1 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids).....	17
2.2.2 กรดฟีนอลิก (phenolic acids) .....	18
2.2.3 สติลเบิน (stilbenes) .....	18
2.2.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant).....	19
2.2.5 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial).....	20
2.2.6 วิธีสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากพืช .....	28
2.3 การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยในการสกัดหรือ ultrasound-assisted extraction (UAE).....	30
2.3.1 คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound).....	30
2.3.2 ปรากฏการณ์คาวิตีชัน.....	31

2.3.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัด.....	33
2.3.4 ประโยชน์ของการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย .....	37
2.4 น้ำส้ม .....	39
น้ำส้ม เป็นผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคมากที่สุด เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูงประกอบด้วยวิตามินซี วิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 โฟสเฟอรัส แคลเซียม โพสฟอรัส เหล็ก และใยอาหาร นอกจากนี้ยังมีลักษณะสัมผัสที่ดีสำหรับผู้บริโภคอีกทั้งสามารถหาซื้อได้สะดวก (Aneja <i>et al.</i> , 2014)..	
2.4.1 จุลินทรีย์ที่พบในน้ำส้ม .....	40
2.5 การนำสารสกัดไปประยุกต์ในน้ำผลไม้.....	41
2.6 การหาสภาวะที่เหมาะสม .....	41
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย .....	44
3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ (ME) .	47
3.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย (UAE).....	48
3.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง .....	48
3.4 การศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงต่อสมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ ของน้ำส้มคั้นสด ระหว่างการเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน.....	49
3.5 การศึกษาผลของสารสกัดมะเกี๋ยงต่อสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มคั้นสด .....	49
3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	50
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	51
4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ (ME) .	51
4.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย (UAE).....	69
4.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง .....	104



4.4 การศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดมะเข็งต่อสมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ ของ น้ำส้มคั้นสด ระหว่างการเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน.....	105
4.5 การศึกษาผลของสารสกัดมะเข็งต่อสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มคั้นสด.....	120
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	122
รายการอ้างอิง .....	124
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ.....	136
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมี.....	137
ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์ทางชีวภาพ.....	156
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab .....	162
ภาคผนวก จ การประเมินทางประสาทสัมผัส.....	186
ภาคผนวก ฉ โครมาโทแกรม .....	187
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	188

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันเมล็ดมะเกี๋ยง .....	10
ตารางที่ 2 การจำแนกสารประกอบฟีนอลิกจากจำนวนคาร์บอนในโมเลกุล .....	15
ตารางที่ 3 ความแตกต่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ .....	25
ตารางที่ 4 แสดงความมีชีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ .....	34
ตารางที่ 5 ระดับของปัจจัยต่างๆ ในการสกัดโดยใช้วิธีการสกัดแบบแช่ .....	46
ตารางที่ 6 ระดับของปัจจัยต่างๆ ในการสกัดโดยใช้วิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย. ....	47
ตารางที่ 7 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่.....	51
ตารางที่ 8 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ที่ภาวะต่างๆ ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ .....	56
ตารางที่ 9 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ .....	60
ตารางที่ 10 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่.....	64
ตารางที่ 11 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย .....	69
ตารางที่ 12 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ 76	
ตารางที่ 13 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย .....	82
ตารางที่ 14 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย .....	88
ตารางที่ 15 ค่า MIC ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ .....	98
ตารางที่ 16 ค่า MBC ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ .....	101

ตารางที่ 17 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี UAE และ  
ME..... 105



## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะผลมะเกี๋ยง.....	3
รูปที่ 2 โครงสร้างของแอนโทไซยานิน.....	6
รูปที่ 3 ผลิตภัณฑ์จากมะเกี๋ยง.....	8
รูปที่ 4 ลักษณะเมล็ดมะเกี๋ยง.....	10
รูปที่ 5 ชนิดสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืช.....	13
รูปที่ 6 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก.....	14
รูปที่ 7 การจัดกลุ่มประเภทของสารประกอบฟีนอลิกที่มาจากอาหาร.....	16
รูปที่ 8 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์.....	17
รูปที่ 9 โครงสร้างของกรดฟีนอลิก.....	18
รูปที่ 10 โครงสร้างของสตีลปิน.....	19
รูปที่ 11 กลไกในการทำลายแบคทีเรียของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืช.....	22
รูปที่ 12 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก.....	24
รูปที่ 13 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ.....	25
รูปที่ 14 โครงสร้างผนังเซลล์ของฟังไจ.....	26
รูปที่ 15 กลไกในการทำลายฟังไจของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืช.....	27
รูปที่ 16 การสกัดแบบมาเซอเรชัน (maceration).....	28
รูปที่ 17 เพอร์โคเลชัน (percolation).....	29
รูปที่ 18 การสกัดด้วยซอกซ์เลตเอ็กซ์แทรกเตอร์ (soxhlet extractor).....	30
รูปที่ 19 คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound).....	30
รูปที่ 20 องค์ประกอบของคลื่นอัลตราโซนิก.....	31
รูปที่ 21 การเกิดควาเวชัน.....	32

รูปที่ 22 การเกิดควาวิเตชันและชะสาร์ภยในเนื้อเยื่อจากรการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยสกัด....	33
รูปที่ 23 การสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม (A) และ การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย (B).....	39
รูปที่ 24 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot).....	43
รูปที่ 25 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และ เวลา (นาทื) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาทื) (C) ต่อปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแช่.....	53
รูปที่ 26 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยที่ใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเมล็ด มะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่.....	55
รูปที่ 27 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และ เวลา (นาทื) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาทื) (C) ต่อปริมาณ สารฟลาโวนอยด์.....	57
รูปที่ 28 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยที่ใช้ในการสกัดสารฟลาโวนอยด์จากเมล็ดมะเกี๋ยงด้วย วิธีการสกัดแบบแช่.....	59
รูปที่ 29 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และ เวลา (นาทื) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาทื) (C) ต่อต่อฤทธิ์ การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัด เมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแช่.....	61
รูปที่ 30 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากสารสกัด เมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่.....	63
รูปที่ 31 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และ เวลา (นาทื) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาทื) (C) ต่อต่อฤทธิ์ การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ด มะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแช่.....	65
รูปที่ 32 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จากสารสกัด เมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่.....	67

- รูปที่ 33 ภาพที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆ ต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ ..... 68
- รูปที่ 34 อิทธิพลของเวลา (นาทีก) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (A), อุณหภูมิ (°C) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (C) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย..... 71
- รูปที่ 35 อิทธิพลของอุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาทีก) (A), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาทีก) (C) ต่อปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้ คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย ..... 72
- รูปที่ 36 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยที่ใช้ในการสกัดต่อสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจาก เมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย ..... 75
- รูปที่ 37 อิทธิพลของเวลา (นาทีก) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (A), อุณหภูมิ (°C) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%)และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (C) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย ..... 78
- รูปที่ 38 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (A), อุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาทีก) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาทีก) (C) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย ..... 79
- รูปที่ 39 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยที่ใช้ในการสกัดต่อสารฟลาโวนอยด์จากเมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย ..... 82
- รูปที่ 40 อิทธิพลของเวลา (นาทีก) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (A), อุณหภูมิ (°C) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%)และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (C) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย .... 84

รูปที่ 41 อิทธิของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาท) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาท) (C) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้ คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย.....	85
รูปที่ 42 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย.....	88
รูปที่ 43 อิทธิพลของเวลา (นาท) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (A), อุณหภูมิ (°C) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (C) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย ....	90
รูปที่ 44 อิทธิของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาท) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาท) (C) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย .....	91
รูปที่ 45 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย.....	94
รูปที่ 46 ภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย .....	95
รูปที่ 47 องค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ .....	103
รูปที่ 48 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำส้มระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	106
รูปที่ 49 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของน้ำส้มระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C .....	107
รูปที่ 50 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของน้ำส้มระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	110
รูปที่ 51 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของน้ำส้มระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	111
รูปที่ 52 ค่าความเป็นกรดต่างของน้ำส้มระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C .....	111
รูปที่ 53 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ของน้ำส้มระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	112
รูปที่ 54 ค่า L* ของน้ำส้มระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C .....	114

	หน้า
รูปที่ 55 ค่า $a^*$ ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	114
รูปที่ 56 ค่า $b^*$ ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	115
รูปที่ 57 ค่า $\Delta E^*$ ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	115
รูปที่ 58 ปริมาณจุลินทรีย์ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	116
รูปที่ 59 ปริมาณยีสต์และราของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	117
รูปที่ 60 ปริมาณแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4 °C.....	118
รูปที่ 61 คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างน้ำส้ม .....	121





## บทที่ 1

### บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคหันมาใส่ใจสุขภาพมากขึ้น กล่าวคือมีความต้องการอาหารที่มีคุณภาพ ใกล้เคียงกับของสด รวมทั้งยังคงคุณค่าของสารอาหารต่างๆ แต่เนื่องจากการใช้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปอาหารส่งผลให้สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการและเกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านลักษณะสัมผัส ส่งผลให้มีการประยุกต์ใช้วิธีการที่ไม่อาศัยความร้อนมาใช้ในกระบวนการแปรรูป ดังนั้นเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการหาวิธีอื่นๆ มาทดแทนการใช้ความร้อน และมีงานวิจัยรายงานว่าสารสกัดจากพืชสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารได้โดยสามารถช่วยเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำมาใส่ในอาหารเพื่อทดแทนการใช้ความร้อน ประกอบกับประเทศไทยอุดมไปด้วยผักและผลไม้พื้นบ้านที่มีคุณค่าทางโภชนาการ ฤทธิ์ทางยาหรือสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) จึงมีการศึกษาสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของผักและผลไม้พื้นบ้านกันอย่างกว้างขวาง โดยหนึ่งในนั้นคือ มะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) ซึ่งเป็นพืชในอันดับ Myrtales จัดอยู่ในวงศ์ Myrtaceae พบมากทางภาคเหนือของประเทศไทยโดยเฉพาะในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และน่าน เป็นพืชที่อยู่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มะเกี๋ยงได้รับความสนใจและมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ผลมะเกี๋ยงนิยมนำมาบริโภคทั้งในรูปผลสดและผลิตภัณฑ์แปรรูป เช่น มะเกี๋ยงแช่อิ่ม ชามะเกี๋ยง แยมมะเกี๋ยง และสีสผสมอาหารจากมะเกี๋ยง (แอนโทไซยานิน) เป็นต้น โดยเนื้อมะเกี๋ยงเป็นส่วนที่ใช้ในการแปรรูป ทำให้มีวัตถุดิบเหลือทิ้งเป็นเมล็ดที่ไม่สามารถนำมาแปรรูปได้ และมีงานวิจัยรายงานว่าสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงมีสารที่สำคัญอยู่หลายชนิด โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งมีสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถเพิ่มอายุในการเก็บรักษา และเนื่องจากเป็นสารจากธรรมชาติจึงทำให้ผู้บริโภคมีความมั่นใจในความปลอดภัยมากกว่าสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี อีกทั้งมีสรรพคุณที่ใช้ดึงดูดกลุ่มผู้บริโภคคือ บำรุงร่างกาย ป้องกันริ้วรอยและที่สำคัญมีคุณสมบัติในการป้องกันโรคและต้านทานการเกิดมะเร็ง จากเหตุผลข้างต้นจึงเลือกเมล็ดมะเกี๋ยงมาใช้ในงานวิจัยนี้เพราะนอกจากอุดมไปด้วยสารสำคัญแล้วยังเป็นการลดของเสียจากกระบวนการแปรรูปด้วย ประกอบกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยในการสกัดหรือ ultrasound assisted extraction (UAE) เป็นเทคโนโลยีที่นำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย

และเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้สกัดผลิตภัณฑ์จากพืช เพราะมีข้อดีคือ ลดระยะเวลาในการสกัด ลดค่าใช้จ่าย ลดการใช้อุณหภูมิและพลังงาน เป็นต้น ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง นอกจากนี้ น้ำส้มคั้นเป็นน้ำผลไม้ที่ได้รับความนิยมสูงในผู้บริโภคเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีลักษณะสัมผัสที่ดีประกอบด้วยสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงมี terpene alcohol ที่มีกลิ่นหอม พบมากในน้ำมันมะกรูด (bergamot oil) ที่ได้จากเปลือกผลไม้สุกประเภทส้มหรือมะนาว ซึ่งเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาประยุกต์ในน้ำส้มน่าจะไม่ทำให้กลิ่นเปลี่ยนแปลงไปมาก

งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมทั้งสมบัตการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารที่สกัดได้และนำมาประยุกต์ในน้ำส้ม



## บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

### 2.1 มะเกี๋ยง (Ma-kiang)

มะเกี๋ยง จัดเป็นพืชในอันดับ Myrtales อยู่ในวงศ์ Myrtaceae ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* ชื่อวิทยาศาสตร์เดิมของมะเกี๋ยงคือ *Eugenia paniala* Roxb. โดยจากการศึกษาทบทวนพรรณไม้ในสกุล *Eugenia* และ *Cleistocalyx* ได้จัดให้พืช *Eugenia paniala* Roxb. รวมอยู่ในสกุล *Cleistocalyx* และ *operculatus* เช่นเดียวกับต้นหว่าขาว (หว่าน้ำ หรือหว่าส้ม) และเมื่อมีการทบทวนพืชในวงศ์ Myrtaceae ใหม่อีกครั้ง จึงเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์ของ หว่าขาวและมะเกี๋ยงเป็น *Cleistocalyx nervosum* โดยจำแนกออกเป็นสองพันธุ์คือ *Cleistocalyx nervosum* var. *nervosum* หรือ หว่าขาว และ *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* หรือ มะเกี๋ยง ซึ่งพืชสองชนิดพันธุ์นี้มีความแตกต่างกันที่การจัดเรียงหรือจำนวนของดอกในช่อดอกย่อย ขนาดของฐานดอกรูปถ้วย (hypanthium) รวมทั้งขนาดและรูปร่างของผล โดยที่มะเกี๋ยงมักมีดอก จำนวน 3 ดอก ติดอยู่รวมกันเป็นกลุ่มช่อดอกย่อย มีฐานดอกรูปถ้วยขนาดใหญ่กว่า 4 มิลลิเมตร ผล รูปไข่ขอบขนาน (oval-oblong) และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางผลมากกว่า 1.5 เซนติเมตร ส่วนหว่าขาวมักมีจำนวนดอกในแต่ละช่อดอกย่อยมากกว่า 4 ดอก ฐานดอกรูปถ้วยมีขนาดเล็กกว่า 4 มิลลิเมตร ผลรูปกลม (globose) และเส้นผ่าศูนย์กลางผลน้อยกว่า 1.5 เซนติเมตร โดยผลมะเกี๋ยงแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลักษณะผลมะเกี๋ยง

ที่มา: สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง (2545)

ปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานแน่ชัดเกี่ยวกับถิ่นกำเนิดมะเกี๋ยง แต่มีการรายงานว่าพบมะเกี๋ยงในประเทศ พม่า อินเดีย และเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง ลำพูน น่าน และพะเยา เป็นต้น โดยมะเกี๋ยงเติบโตได้ดีในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 350 - 550 เมตร โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีความชุ่มชื้นตลอดปีและไม่มีน้ำท่วมขัง เช่น ริมห้วย หนองบึง เป็นต้น นอกจากนี้มะเกี๋ยงยังเป็นพืชที่อยู่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่สนับสนุนให้มีการปลูกมากขึ้น (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2545)

### 2.1.1 ลักษณะของมะเกี๋ยง

#### 2.1.1.1 ลักษณะผลมะเกี๋ยง

ผลสดของมะเกี๋ยงจะมีเนื้อนุ่ม (berry) ลักษณะเป็นรูปไข่ขอบขนาน (ovate-oblong) โดยเส้นผ่านศูนย์กลางผลมีขนาด 10-18 มิลลิเมตร ยาว 15-24 มิลลิเมตร ผลอ่อนสีเหลืองปนเขียว ผลแก่มีเปลือกบางสีแดงแดงปนม่วงถึงม่วงปนดำ เนื้อผลสีขาวหนา 3-5 มิลลิเมตร เนื้อผลชั้นในเป็นเยื่อบางหุ้มรอบเมล็ด ในผลหนึ่งๆ มีเมล็ดเพียง 1 เมล็ด ผลรสชาติเปรี้ยวและฝาด มีสีม่วงแดงเนื่องจากสารแอนโทไซยานินและมีกลิ่นหอมเฉพาะ (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2545)

#### 2.1.1.2 ลักษณะเมล็ดมะเกี๋ยง

เมล็ดมะเกี๋ยงมีลักษณะเป็นรูปไข่หรือกลม เส้นผ่าศูนย์กลางมีขนาด 8-10 มิลลิเมตร ภายในเมล็ดมีหลายเอ็มบริโอ (polyembryony) เรียงตามขวางของเมล็ด เปลือกเมล็ดสีน้ำตาลอ่อน ภายในสีเขียว เมล็ดสามารถงอกเป็นต้นอ่อนได้ตั้งแต่วัยผลมีอายุ 56 วัน เมล็ดมีความงอกสูงที่สุดในระยะผลสุกแก่ ภายหลังจากหลุดร่วงจากต้นจะสูญเสียความงอกอย่างรวดเร็ว (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2545)

#### 2.1.1.3 ลักษณะลำต้นมะเกี๋ยง

มะเกี๋ยงเป็นไม้ยืนต้นมี ลำต้นตรงสูง 15-20 เมตร เมื่อโตเต็มที่อาจมีเส้นรอบวงของลำต้นมากกว่า 1.5 เมตร เปลือกลำต้นสีเทาหรือน้ำตาลปนเทา เปลือกนอกค่อนข้างเรียบ หรือแตกเป็นร่องตื้นตามแนวยาว เปลือกชั้นนอกอ่อนหลุดออกเป็นแผ่นบาง เปลือกชั้นในสีน้ำตาลอ่อนปนชมพู เมื่อแห้งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เรือนยอดมีลักษณะเป็นพุ่มทรงกระบอกถึงค่อนข้างกลม (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2545)

#### 2.1.1.4 ลักษณะใบมะเกี๋ยง

ใบมะเกี๋ยงมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เกิดบนกิ่งอ่อนออกตรงกันข้ามเป็นคู่ (opposite) มีจำนวนใบกิ่งละ 4-6 คู่ ขนาดกว้าง 8-12 เซนติเมตร ยาว 20-30 เซนติเมตร แผ่นใบรูปขอบขนาน (oblong) ถึงรูปรีขอบขนาน (oblong-elliptic) หรืออาจเป็นรูปใบหอก (lanceolate) ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย หลังใบเกลี้ยงสีเขียวเข้มเป็นมัน ท้องใบเรียบสีเขียวอ่อน ก้านใบสีเขียว เขียวปนน้ำตาลน้ำตาลปนแดง (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2545)

#### 2.1.1.5 ลักษณะดอกมะเกี๋ยง

ช่อดอกมะเกี๋ยงเกิดบนกิ่งที่มีอายุ 2 - 5 ปี ลักษณะเป็นช่อกระจุกแยกแขนง (cymose-panicle) แกนกลางของก้านช่อดอก (rachis) มีสีเขียว ลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยม มีก้านแขนงแยกออกเป็นคู่ และเรียงตั้งฉากสลับกันขึ้นไป ส่วนปลายก้านแขนงมักมีดอกติดอยู่จำนวน 3 ดอก ดอกมะเกี๋ยงเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีลักษณะสมมาตร ไม่มีก้านดอกหรือก้าน ดอกตูมรูปร่างคล้ายบอลลูกประกอบด้วยฐานดอกกรวย (hypanthium) สีเหลือง มีวงกลีบเลี้ยง (calyx) สีเหลืองปิดอยู่ด้านบนคล้ายหมวกกลม (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2545)

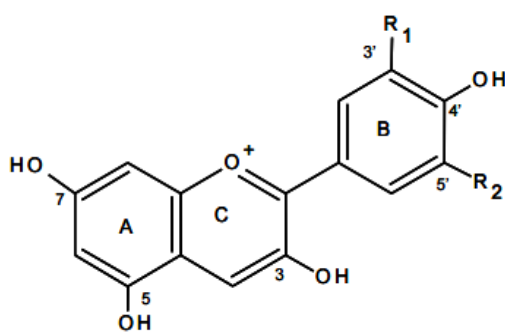
ผลมะเกี๋ยงมีคุณค่าทางโภชนาการอย่างมาก เนื่องจากเป็นพืชวงศ์เดียวกับหัว ซึ่งงานวิจัยพบว่าผลหัวมีฤทธิ์ในทางยาหลาย ๆ ด้าน โดยจากการศึกษาในเบื้องต้นมีการรายงานว่าแอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่พบมากในผลมะเกี๋ยงสูงสามารถใช้สารนี้เป็นยาป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน เนื่องจากสารนี้ช่วยในการกระตุ้นการเพิ่มระดับของ HDL (high density lipoprotein) ในกระแสเลือด ซึ่ง HDL นี้ มีหน้าที่ทำลายไขมันที่เกาะตามผนังหลอดเลือด ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ในส่วนเปลือกของมะเกี๋ยงพบสารในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) แทนนิน (tannin) และแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารกลุ่มเดียวกับที่พบในเปลือกและเมล็ดองุ่น (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2545)

การศึกษาสารสกัดจากผลมะเกี๋ยงที่มีต่อการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดจากผลมะเกี๋ยงมีสารพฤกษเคมีที่สำคัญอยู่หลายชนิด ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี

Taya และคณะ (2014) ศึกษาผลของสารสกัดมะเกี๋ยงต่อการเกิดมะเร็งตับจากภาวะเครียดออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำด้วยสารเคมีในหนูขาว โดยนำเนื้อมะเกี๋ยงมาคั้นน้ำ และทำให้เข้มข้น โดยผลการศึกษาพบว่ามะเกี๋ยงสด 100 กรัมประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด  $181.16 \pm 0.59$  mg gallic acid equivalent/g dry weight basis (mg GAE/g dry wt.) และปริมาณฟลาโวนอยด์  $54.86 \pm 3.45$  mg catechin equivalents/g dry weight basis (mg CAE/g dry wt.) และแอนโทไซยานินที่พบมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ cyanidin-3,5-diglucoside, cyanidin-3-glucoside และ cyanidin-5-glucoside ตามลำดับ และสารที่สกัดได้ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันในหนูขาว และจากการตรวจสอบสารสกัดจากส่วนเนื้อของผลมะเกี๋ยงสดโดยอาศัยวิธีโครมาโทกราฟี

แบบกระดาษ และ โครมาโทกราฟีผิวบาง พบว่าผลมะเข็ญประกอบด้วยกรดอินทรีย์ 2 ชนิดคือ กรดซิตริก และกรดมาลิก 1.69 และ 0.17% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (ทวีพร อุณจักร, 2530)

ในปัจจุบันมีผลการศึกษาวิจัยมากมายแสดงให้เห็นว่า ผลไม้ในกลุ่มของเบอร์รี่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลากหลาย โดยพบรงควัตถุหรือสารสี (pigment) ที่สำคัญคือ แอนโทไซยานิน ที่ละลายอยู่ใน cell sap ของพืชที่อยู่ในรูปของไกลโคไซด์ที่ให้สีแดง ม่วง และน้ำเงิน โดยสีของแอนโทไซยานินสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามภาวะความเป็นกรด-ด่าง สามารถใช้เป็นสารให้สี (coloring agent) ธรรมชาติในอาหาร สารสกัดแอนโทไซยานินมีสมบัติเป็นโภชนเภสัช (nutraceutical) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) โดยช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ ช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและเส้นเลือดอุดตันในสมอง ด้วยการยับยั้งไม่ให้เลือดจับตัวเป็นก้อน ชะลอความเสื่อมของดวงตา ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) โครงสร้างพื้นฐานในโมเลกุลของแอนโทไซยานินคือแอนโทไซยานิดินที่ไม่เสถียรในธรรมชาติ มีหมู่น้ำตาลมาจับ ในตำแหน่งที่ 3 หรือ 3, 5 ของแอนโทไซยานิดิน ซึ่งเป็นไกลโคไซด์ของ 2-phenylbenzopyrylium หรือ flavylium cation ที่มีด้วยกันหลายชนิด แต่มีอยู่ 6 ชนิดเท่านั้นที่พบมาก ซึ่งได้แก่ เพลาโกนิดินไซยานิดิน เดลฟินิดิน พิโอนิดิน เพทูนิดิน และมอลวิดิดิน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2 (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553; อรุษา เขาวนลิขิต, 2554)



Anthocyanidins	Substitutes	
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Pelargonidin	H	H
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

รูปที่ 2 โครงสร้างของแอนโทไซยานิน

ที่มา: Jing *et. al* (2014)

อดิศักดิ์ หมั่นเก็ญ และคณะ (2548) ศึกษาการหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัด แอนโทไซยานินจากผลมะเข็ญโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมด้วยในการสกัด โดยศึกษาภาวะในการสกัด 3 ปัจจัยคือ กำลังไมโครเวฟ (300 - 600 วัตต์) เวลาในการสกัด (120 - 240 วินาที) และความเข้มข้นของตัวทำละลาย (ความเข้มข้นเอทานอล 50 - 70% v/v) โดยเตรียมตัวอย่างใช้อัตราส่วนมะเข็ญสดต่อตัวทำละลาย 1:3 (w/v) และออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

(Box-Behnken design) จากผลการทดลองพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากมะเขี๋ยง คือ กำลังไมโครเวฟ 439.36 วัตต์ เวลาที่ใช้ในการสกัด 182.58 วินาที และความเข้มข้นเอทานอล 60.37% v/v ซึ่งจะมีปริมาณแอนโทไซยานินจากมะเขี๋ยงสูงสุด (3,130.67 mg/100 g มะเขี๋ยงสด)

แอนโทไซยานิน มักพบในปริมาณมากที่บริเวณใกล้ผิวของผลมะเขี๋ยงสุก เนื่องจากคุณค่าทางโภชนาการและลักษณะเด่นด้านสีของผลมะเขี๋ยงสุกทำให้ปัจจุบันมีการนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางและเครื่องดื่ม จากเหตุผลดังกล่าวจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับแอนโทไซยานินในผลมะเขี๋ยงมากขึ้น โดย Jansom และคณะ (2008) ศึกษาสารสีในผลมะเขี๋ยงสุกโดยการทำการสกัดด้วยเอทานอล ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวภายใต้ภาวะสุญญากาศและโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี spectroscopy โดยพบสาร cyanidin-3-glucoside ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดในกลุ่มแอนโทไซยานิน

นอกจากผลมะเขี๋ยงสุก ได้มีการศึกษาการสกัดส่วนอื่นๆ ของมะเขี๋ยง โดย Manosroi และคณะ (2015) ศึกษาการลดริ้วรอยของสารสกัดจากใบมะเขี๋ยงแก่ ซึ่งศึกษาตัวทำละลายได้แก่ น้ำ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม โดยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย (sonication) และการต้ม จากการทดลองพบว่า การสกัดด้วยวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยและใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และสารสกัดดังกล่าวไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังซึ่งสามารถประยุกต์ใช้เป็นสารลดริ้วรอยได้

## 2.1.2 การใช้ประโยชน์จากผลมะเขี๋ยงในด้านผลิตภัณฑ์อาหาร

โดยทั่วไปมะเขี๋ยงนิยมนำมาบริโภคทั้งในรูปผลสดและผลิตภัณฑ์แปรรูปดังแสดงในรูปที่ 3 และจากคุณค่าทางโภชนาการของมะเขี๋ยงทำให้มีการศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารจากผลมะเขี๋ยงที่หลากหลาย โดยพบว่าสามารถทำผลิตภัณฑ์อาหารจากมะเขี๋ยงได้หลากหลายชนิด และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เช่น น้ำมะเขี๋ยงพร้อมดื่ม ไวน์มะเขี๋ยง เนคตาร์มะเขี๋ยง มะเขี๋ยงแช่อิ่ม-แห้ง ชา มะเขี๋ยง แยมมะเขี๋ยง เยลลี่มะเขี๋ยง มะเขี๋ยงหยี โยเกิร์ตมะเขี๋ยง มะเขี๋ยงดอง และสีกผสมอาหารจากผลมะเขี๋ยง (แอนโทไซยานิน) เป็นต้น



### รูปที่ 3 ผลิตภัณฑ์จากมะเกี๋ยง

ที่มา: สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง (2545)

นอกจากนี้ยังได้มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาและพัฒนาเพื่อนำมะเกี๋ยงมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อสุขภาพ โดย อิศพงษ์ อุประวรรณ และสมชาย จอมดวง (2557) ได้ศึกษา ผลของความเข้มข้นของสารละลายซูโครสและอุณหภูมิในการอบแห้งของผลมะเกี๋ยงแช่อิ่มอบแห้งต่อสารออกฤทธิ์ชีวภาพ จากผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของสารละลายซูโครสมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมดและค่าความสามารถของปริมาณสารที่ทำการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง (the half maximal inhibitory concentration;  $IC_{50}$ ) ของผลิตภัณฑ์ แต่ไม่มีผลต่อปริมาณแทนนิน แอนโทไซยานิน และความสามารถในการรีดิวซ์ อุณหภูมิในการอบแห้งมีผลต่อทุกสมบัติที่ศึกษา โดยผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุดจากการศึกษาครั้งนี้ คือ ผลิตภัณฑ์มะเกี๋ยงที่แช่อิ่มในสารละลายซูโครสความเข้มข้น 60 °Brix และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน และแอนโทไซยานิน เท่ากับ  $372.11 \pm 3.74$ ,  $301.05 \pm 6.26$  และ  $14.37 \pm 1.97$  mg/100 g dry wt. ตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการรีดิวซ์ เท่ากับ  $5.73 \pm 0.06$  mmol.ferrous sulfate/100 g dry wt. และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $18.75 \pm 0.00$  g/L ในขณะที่ ปัทมาพร โสภณ (2549) ได้ศึกษา สมบัติทางกายภาพและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลมะเกี๋ยง ในระหว่างกระบวนการผลิตเครื่องดื่มผงและการเก็บรักษา โดยนำเนื้อมะเกี๋ยงที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมะเกี๋ยงมาทำเป็นมะเกี๋ยงผงเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม และพบว่าเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดและการรวมตัวระหว่างแอนโทไซยานินกับ โพลีแซคคาไรด์ในมอลโตเดกซ์ทรินในระหว่างกระบวนการผลิตส่งผลให้มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น และตลอดช่วงระยะเวลาในการเก็บรักษาเครื่องดื่มมะเกี๋ยงผงมีความคงตัวสูง จึงมีศักยภาพในการพัฒนาต่อไปในระดับอุตสาหกรรม โดยเนื้อมะเกี๋ยงผงมีปริมาณใยอาหารทั้งหมด 78.46% โดยน้ำหนัก ซึ่งคาดว่าสามารถนำมาประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเส้นใย เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารและมูลค่าของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ รัฐวิธรา ไยสำลี (2552) ศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์เซอร์เบทจาก



มะเกี๋ยง โดยสกัดน้ำมันมะเกี๋ยงด้วยการตีปน และพบว่าอัตราส่วนการเจือจางของน้ำมันมะเกี๋ยงสกัดต่อน้ำที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ค่าความหนืด ปริมาณกรดทั้งหมดเทียบกับกรดซิตริกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และพบว่า การเจือจางของน้ำมันมะเกี๋ยงสกัดต่อน้ำในอัตราส่วน 1:2 และใช้น้ำมันมะเกี๋ยงบด 5% ของส่วนผสมทั้งหมด มีคะแนนยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อนำมาหาชนิดและปริมาณของสารให้ความคงตัวต่อคุณภาพเซอร์เบทมะเกี๋ยงพบว่า สารครีโมแดน G 550-M 0.20% ของส่วนผสมทั้งหมด มีสมบัติทางกายภาพและเคมีดีที่สุด และป็นมณี ขวัญเมือง (2549) ศึกษาการหมักสาโทโดยเติมน้ำมันมะเกี๋ยงเข้มข้น 0 10 20 และ 30% v/v โดยผลการทดลองพบว่า การหมักที่เติมน้ำมันมะเกี๋ยง 10 20 และ 30% v/v มีกิจกรรมการหมักเกิดได้เร็วกว่าภาวะที่ไม่ใช้น้ำมันมะเกี๋ยง (0% v/v) เพราะในน้ำผัก-ผลไม้ไม่มีสารหลายชนิดที่ส่งเสริมการเจริญของยีสต์ทำให้กิจกรรมการหมักเกิดได้เร็วขึ้น โดยลักษณะของสาโทมะเกี๋ยงที่ได้มีสีชมพู เนื่องจากในระหว่างการหมักสารสีบางส่วนเกิดการสลายตัว ซึ่งสาโทที่ได้มีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี (% v/v) ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนสาโท และผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้การยอมรับผลิตภัณฑ์สาโทชนิดนี้เพราะมีสีส้มและรสชาติต่างจากสาโทที่หมักโดยเติมน้ำต้มเพียงอย่างเดียว ในขณะที่ จิราวรรณ ถูกจิตร (2554) ได้ศึกษาการผลิตน้ำผลไม้เข้มข้นพร้อมดื่มจากน้ำมันมะเกี๋ยงผสมน้ำหมอน โดยการระเหยภายใต้ภาวะสุญญากาศ และพบว่า การผสมน้ำมันมะเกี๋ยงสกัดเข้มข้น 60% v/v น้ำหมอนสกัดเข้มข้น 30% v/v และน้ำตาล 10% v/v ได้น้ำผลไม้เข้มข้นที่ได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบมากที่สุด และจากการบรรจุขวดฝาเกลียวขนาด 45 mL ต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือดเป็นเวลา 4 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ปลอดภัย แต่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระลดลงเล็กน้อย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 2.1.3 เมล็ดมะเกี๋ยง

เมื่อนำน้ำมันมะเกี๋ยงมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารแล้ว จะมีเมล็ดมะเกี๋ยงเป็นเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูป โดยลักษณะของเมล็ดมะเกี๋ยงจะแสดงดังรูปที่ 4 ซึ่งสามารถสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ และมีส่วนประกอบที่สำคัญของน้ำมันเมล็ดมะเกี๋ยงแสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารพวก terpene alcohol ที่มีกลิ่นหอม และพบมากในน้ำมันมะกรูด (bergamot oil) ที่ได้จากเปลือกผลไม้สุกประเภทส้มหรือมะนาว โดยเป็นที่รู้จักในอีกรูปหนึ่งคือ cariadrol (disomer) ซึ่งใช้มากในอุตสาหกรรมน้ำหอมและแต่งกลิ่น นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารสำหรับสังเคราะห์สารหอมระเหยและแต่งกลิ่น (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2545)



รูปที่ 4 ลักษณะเมล็ดมะเกี๋ยง

ที่มา: สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง (2545)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันเมล็ดมะเกี๋ยง

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
linalool	47.26
R-terpinene	6.19
R-ionone	3.75
caryophyllene	3.75
terpinen-4-ol	3.59
linonene	3.04
linalool (3,7-dimethy 1-1, 6-octadien-3-0)	32.42

ที่มา: สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง (2545)

#### 2.1.3.1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง

เนื่องจากคุณค่าทางโภชนาการ และสมบัติด้านการต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดมะเกี๋ยง จึงทำให้มีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นเพื่อเพิ่มมูลค่าและลดส่วนเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปของผลิตภัณฑ์มะเกี๋ยง โดย พิมพร สีสภาพพิสิฐ และคณะ (2547) ได้ศึกษาสารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อใช้ทางยา เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง ของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยง ด้วยการนำเมล็ดมะเกี๋ยงบดแห้งไปแช่กับเอทานอล 95% v/v (เป็นการสกัดหยาบ) และนำไปประเหยแห้งจนได้สารสกัดเข้มข้นยวสีเหลืองปนน้ำตาล เมื่อนำไปตรวจสอบทางฟลักซ์เคมีเบื้องต้น พบว่า สารสกัดที่ได้มีองค์ประกอบของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) แทนนิน (tannin) ซาโปนิน (saponin) และแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthraquinone glycosides) และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบ

ผิวบาง (thin layer chromatography, TLC) พบว่ามีสารกลุ่มเคอควิซิทิน (quercetin) แคมพ์เฟอร์อล (kaempferol) และฟีนอลคาร์บอกซีลิกแอซิด (phenol carboxylic acids) หรือสารอนุพันธ์อื่นๆ ในกลุ่มนี้ ในขณะที่ พิชญอร์ ไหมสุทธิกุล (2551) ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยเอทานอลเปรียบเทียบกับแอลฟา-โทโคเฟอรอล และ butylated hydroxytoluene หรือ BHT โดยทำการวัดค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยอนุมูลของ 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation (ABTS<sup>•+</sup>) ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างในน้ำมันที่ผ่านการ strip โดยทำการวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (PV), conjugated diene (CD), hydroperoxide value, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และ p-anisidine value (p-AV) และพบว่า สารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้ดีกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอล และค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันมีแนวโน้มเช่นเดียวกับค่า กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงสามารถเป็น แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติได้

#### 2.1.3.2 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง

นอกจากฤทธิ์ด้านการต้านอนุมูลอิสระแล้ว เมล็ดมะเกี๋ยงยังมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้าน จุลินทรีย์ด้วย โดยพิมพร สีลาพรพิสิฐ และคณะ (2551) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การ ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อสิว *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ของสาร สกัดเมล็ดมะเกี๋ยง โดยพบว่า การสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต มีฤทธิ์ต้านเชื้อทั้งสองชนิดนี้ดีที่สุด ซึ่งมีฤทธิ์ ดีกว่า benzoyl peroxide ในความเข้มข้นที่เท่ากัน และเมื่อทำให้สารบริสุทธิ์โดยเทคนิคทาง โครมาโทกราฟี พบว่า สาร gallic acid และ ellagic acid เป็นองค์ประกอบหลักและฤทธิ์การต้าน เชื้อ *P. acnes* และ *S. aureus* ที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นผลจากสารดังกล่าว และการศึกษาครั้งนี้เป็นการ รายงานผลครั้งแรกของสาร chalcone คือ 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy- 3',5'- dimethylchalcone (DMC) ว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *P. acnes* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดสิว

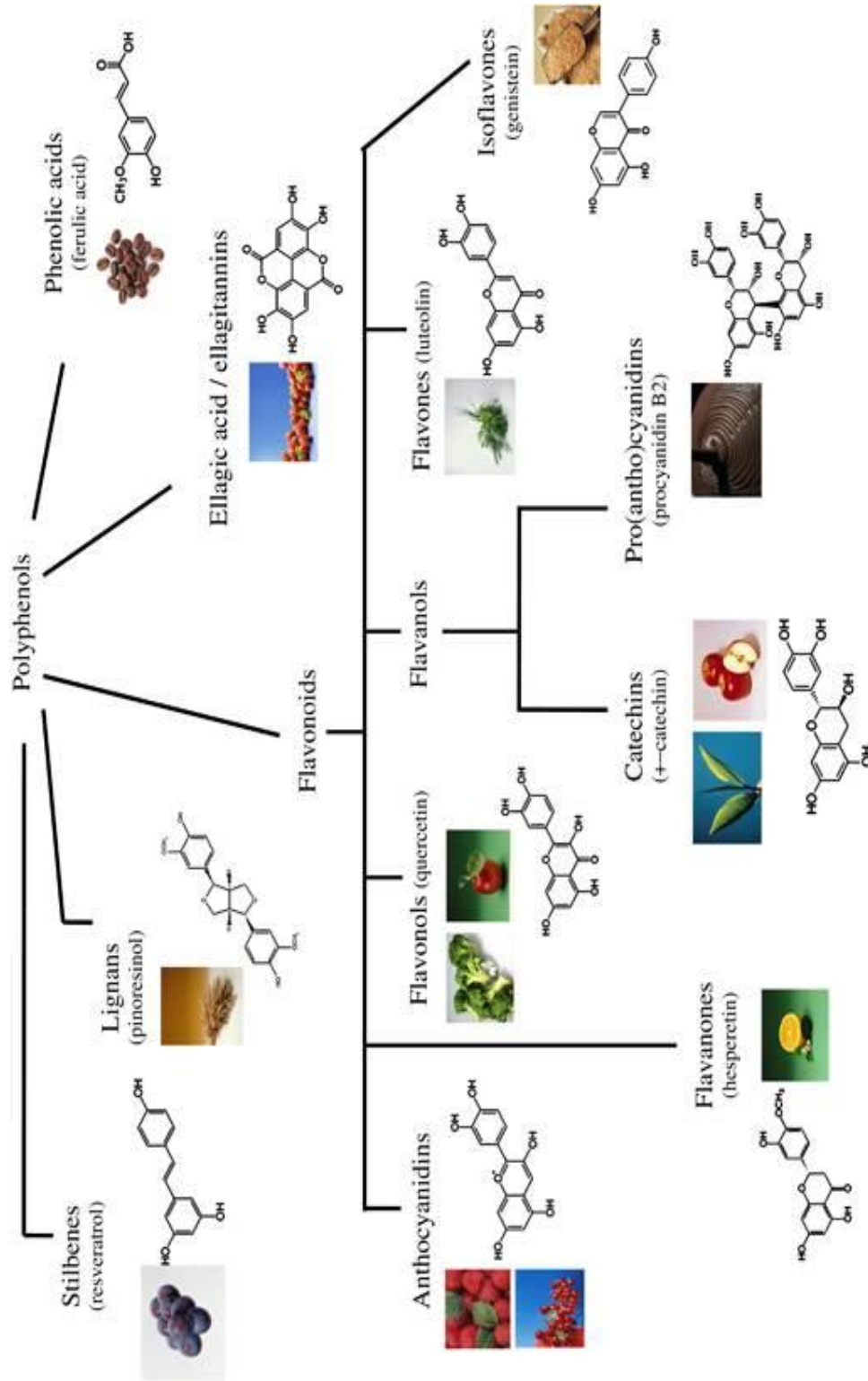
## 2.2 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบจากพืชที่ถูกสร้างขึ้นด้วยกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ สารเมแทบอลิท์ปฐมภูมิ (primary metabolite) ซึ่งเป็นสารที่ได้มาจากกระบวนการ สังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) และการหายใจ (respiration) ที่มีสารประกอบต่างๆ เกิดขึ้น และมีการสร้างพลังงานได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดอะมิโน โปรตีน เพียวรีน และ ไพริมิดีน และ สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารที่ได้มาจากการนำสารเมแทบอลิท์

ปฐมภูมิ มาเข้าสู่กระบวนการชีวสังเคราะห์ เพื่อสร้างสารชนิดต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิต ได้แก่ อัลคาลอยด์ (alkaloids) ฟีนอลิก (phenolics) อะซีโทจีนิน (acetogenins) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoids) เป็นต้น (Randhir, Lin and Shetty, 2004)

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) หรือสารประกอบฟีนอลเป็นสารเคมีกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พืชสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต พบมากในอาหารและเครื่องดื่มที่มาจากพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง และเมล็ดธัญพืช เป็นต้น การบริโภคผักผลไม้โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ และเครื่องดื่ม เช่น ไวน์แดง ชา ที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก จึงมีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพเนื่องจากมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

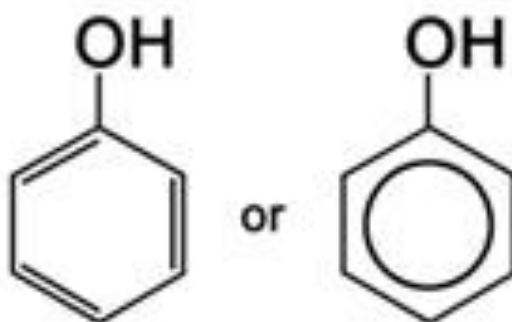




รูปที่ 5 ชนิดสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืช

ที่มา: Singh, Holvoet and Mercenier (2011)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในอาหารและเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูป โดยเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งถูกสร้างมาจากวิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) วิถีของชิคิเมท (shikimate pathway) และวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid pathway) ในส่วนต่างๆของพืช มีสูตรเคมีคือ  $C_6H_5OH$  สารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดจะพบได้ตามแหล่งที่แตกต่างกันดังรูปที่ 5 โดยโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซี (OH) ต่ออยู่กับวงแหวนเบนซีน (Randhir, Lin and Shetty, 2004) ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก

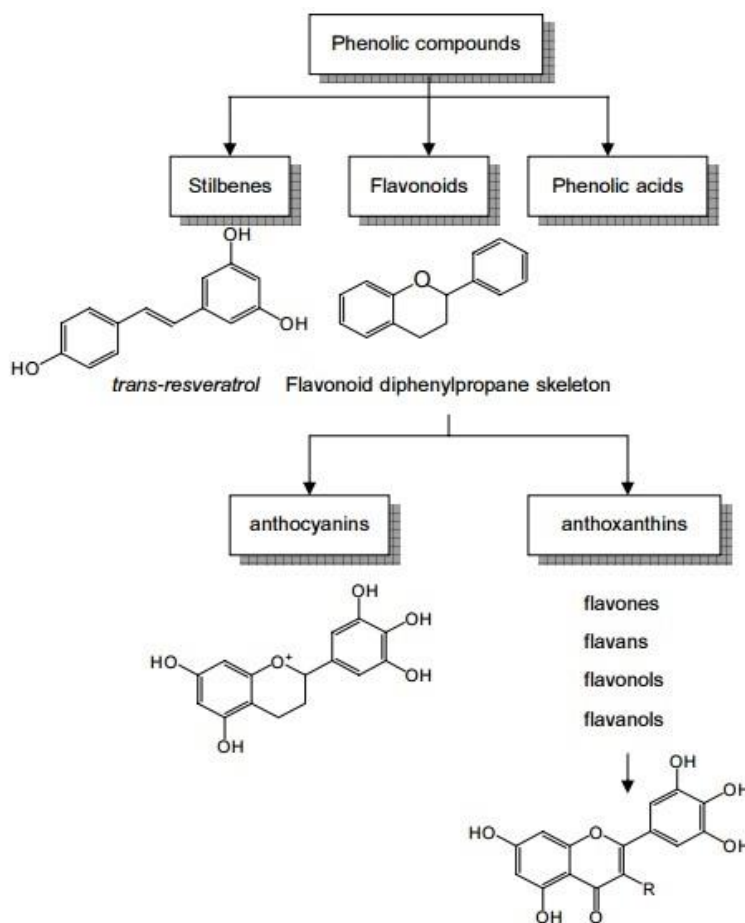
ที่มา: Miguel-Chávez (2017)

เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารเคมีที่มีขนาดใหญ่และหลากหลาย ดังนั้นจึงสามารถจำแนกได้หลายวิธี ซึ่ง Harborne และ Simmonds (1964) จำแนกสารประกอบฟีนอลิกจากจำนวนของคาร์บอนในโมเลกุลได้ดังตารางที่ 2 (Vermerris and Nicholson, 2009)

**ตารางที่ 2** การจำแนกสารประกอบฟีนอลิกจากจำนวนคาร์บอนในโมเลกุล

โครงสร้าง	สารประกอบฟีนอลิก
C6	simple phenolics
C6 - C1	phenolic acids and related compounds
C6 - C2	acetophenones and phenylacetic acids
C6 - C3	cinnamic acids, cinnamyl aldehydes, cinnamyl alcohols
C6 - C3	coumarins, isocoumarins, and chromones
C15	chalcones, aurones, dihydrochalcones
C15	flavans
C15	flavones
C15	flavanones
C15	flavanonols
C15	anthocyanidins
C15	anthocyanins
C30	biflavonyls
C6-C1-C6, C6-C2-C6	benzophenones, xanthenes, stilbenes
C6, C10, C14	quinones
C18	betacyanins Lignans, neolignans dimers or oligomers Lignin polymers Tannins oligomers or polymers Phlobaphenes polymers

สามารถจัดกลุ่มประเภทของสารประกอบฟีนอลิกที่จากพืชและอาหารได้ตั้งรูปที่ 6 ซึ่งได้แก่ กลุ่มกรดฟีนอลิกที่มาจาก hydroxybenzoicacids ได้แก่ gallic acid และกรดฟีนอลิกที่มาจาก hydroxycinnamic acid ได้แก่ caffeic, ferulic และ coumaric acid กลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มใหญ่ซึ่งประกอบด้วยกลุ่ม ฟลาโวนส์ไอโซ ฟลาโวนส์ ฟลาโวนอลส์ แอนโทไซยานินส์ และ ฟลาวานอลส์ และกลุ่มสติลบิน (stilbenes) (ลือชัย บุตคุป, 2555)



รูปที่ 7 การจัดกลุ่มประเภทของสารประกอบฟีนอลิกที่มาจากอาหาร

ที่มา: ลือชัย บุตคุป (2555)

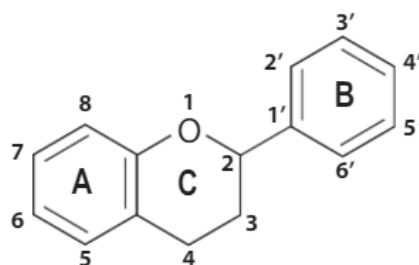
ในปัจจุบันมีการใช้พืชหรือผลไม้ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณสูงในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะการป้องกัน โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความจำเสื่อม โรคมะเร็ง อีกทั้งใช้ในการชะลอความเสื่อมของเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยที่ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในพืช ผัก และผลไม้ โดยสุวรรณณี แสนทวีสุข และคณะ (2555) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรบางชนิด โดยศึกษาปัจจัย A วิธีการสกัด 2 ระดับ (ผงหยาบและสกัดด้วยเอทานอล 70% v/v) ปัจจัย B ชนิดของพืชสมุนไพรพื้นบ้าน 5 ระดับ (ใบบัวบก, ใบขี้เหล็ก, ใบตำลึง, ใบแมงลัก, และใบกระเพรา) จากการศึกษาพบว่า ใบบัวบกที่สกัดด้วยเอทานอล 70% v/v มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดคือ 56.254 mg/g ( $p < 0.01$ ) และมีค่า  $IC_{50}$  ที่ดีที่สุดคือ 2.510 mg/g นอกจากนี้ เนตรนภา เมยกลาง และ เฉลิม เรืองวิริยะชัย (2547) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl



scavenging capacity หรือ DPPH และวิธี 1, 10-Phenantroline หรือ Phen ในเครื่องต้มน้ำผลไม้ ผลการศึกษาพบว่าเครื่องต้มน้ำสมอไทยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด (2765.00±0.00 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง) รองลงมาคือ เครื่องต้มน้ำมะตูม กลิ่นตะไคร้และใบเตย (1749.76±0.02 µg GAE/ mL) และ น้ำองุ่นแดง (1501.80±0.02 µg GAE/ mL) ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ Phen พบว่า เครื่องต้มน้ำสมอไทยมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือ น้ำองุ่นแดงและเครื่องต้มน้ำมะตูมกลิ่น ตะไคร้และใบเตย ตามลำดับ

### 2.2.1 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากที่สุดในอาหารและเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืช เช่น ผัก และผลไม้ โดยโครงสร้างของหลักฟลาโวนอยด์ มีสูตรโมเลกุล คือ C<sub>15</sub> (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) โดยมีวงแหวน A และ B (phenyl ring) จับกับไพแรนหรือไพโรน (C) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ ring C ทำให้มีการจำแนกฟลาโวนอยด์ ออกเป็นกลุ่มต่างๆ และการเกิด hydroxylation ที่ ring A และ B ทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปไกลโคไซด์ โดยมีหมู่ไฮดรอกซิลหนึ่งหมู่หรือมากกว่าในโมเลกุลจะจับอยู่กับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส แรมโนส อะราบิโนส และไซโลส ฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ แอนโทไซยานินส์ (anthocyanins) ซึ่งจะพบในรูปของอนุพันธ์ต่างๆ พบมากในสีของดอกไม้ ผัก และผลไม้ และแอนโทแซนทินส์ (anthoxanthins) ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่ไม่มีสีประกอบด้วยกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มฟลาโวนส์ ฟลาแวนส์ ไอโซฟลาโวนส์ ฟลาโวนอลส์ ฟลาวานอลส์ และอนุพันธ์ที่อยู่ในรูปของไกลโคไซด์ โดยชนิดของฟลาโวนอยด์ที่พบส่วนใหญ่คือ ไมริเซติน (myricetin) ฟิเซติน (fisetin) เคอซีติน (quercetin) และเคมเฟอร์อล (kaempferol) (ลือชัย บุตคุป, 2555)

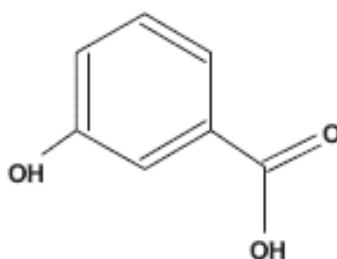


รูปที่ 8 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์

ที่มา: Lillo, Lea and Ruoff (2008)

### 2.2.2 กรดฟีนอลิก (phenolic acids)

กรดฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นโดยพืช สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด ได้แก่ กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) ซึ่งเป็นกรดฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่สุดพบทั่วไปในพืช กรดฟีนอลิกที่พบมาก ได้แก่ p-coumaric, caffeic, ferulic และ sinapic acids โดยปกติเกิดขึ้นจากหลายๆ รูปแบบ เช่นเกิดจากการย่อยของเอนไซม์ หรือการเชื่อมกันของเอสเทอร์ของ hydroxyacids ตัวอย่างเช่น quinic, shikimic และ tartaric acid และกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids) ซึ่งมีโครงสร้างโดยทั่วไปคือ C6-C1 เป็นอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิก ความแปรผันโครงสร้างของกรดนี้ขึ้นอยู่กับการเกิดปฏิกิริยา hydroxylation และ methylation ของวงแหวนอะโรมาติก เช่น phydroxybenzoic, vanillic, syringic และ protocatechuic acid ในธรรมชาติพบอยู่ในรูปที่จับกับลิกนิน ตัวอย่างกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก เช่น กรดซาลิไซลิก (2-hydroxybenzoate) และกรดแกลลิก ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ อยู่ในโมเลกุล ซึ่งมีส่วนร่วมในการสร้าง hydrolysable gallotannins 9 ทำให้ได้ hexahydroxydiphenic acid และ dilactone, ellagic acid (ลือชัย บุตคุป, 2555)

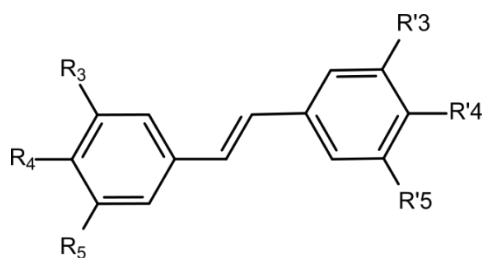


รูปที่ 9 โครงสร้างของกรดฟีนอลิก

ที่มา: ลือชัย บุตคุป (2555)

### 2.2.3 สติลบีน (stilbenes)

สติลบีน สามารถจำแนกได้จากโครงสร้างที่เป็น นิวเคลียส คือ 1,2-diphenylethylene และบริเวณหมู่ไฮดรอกซีที่วงแหวนจะถูกแทนที่ด้วยโมโนเมอร์หรือโอลิโกเมอร์ สติลบีนส์ที่รู้จักกันดีคือ ทรานส์เรสเวราทรอล (trans-resveratrol) โดยในธรรมชาติทรานส์เรสเวราทรอลถูกสร้างขึ้นโดยพืชเพื่อป้องกันเชื้อโรค แมลง และแสงแดด จึงจัดเป็นสารไฟโตอเล็กซิน (phytoalexins) และจากการศึกษา พบว่าทรานส์เรสเวราทรอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ (ลือชัย บุตคุป, 2555)



รูปที่ 10 โครงสร้างของสตีลبيين

ที่มา: ลีอชัย บุตุคุป (2555)

## 2.2.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

### 2.2.4.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอม หรือโมเลกุล พบได้ทั่วไปทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามากและสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไป เพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา นอกจากนี้ในกรณีที่มีปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปที่ระบบจัดการได้ จะทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้นซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ ภายใต้สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่ (aging) และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (autoimmune disease) รวมไปถึงโรคมะเร็ง เป็นต้น (ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557)

### 2.2.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

หน้าที่สำคัญที่สุดของสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารคือ สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชันของอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่อง โดยสารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบเช่น ตักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง โดยทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้นซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate) กับโลหะ เพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (Sies, 2015) สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์

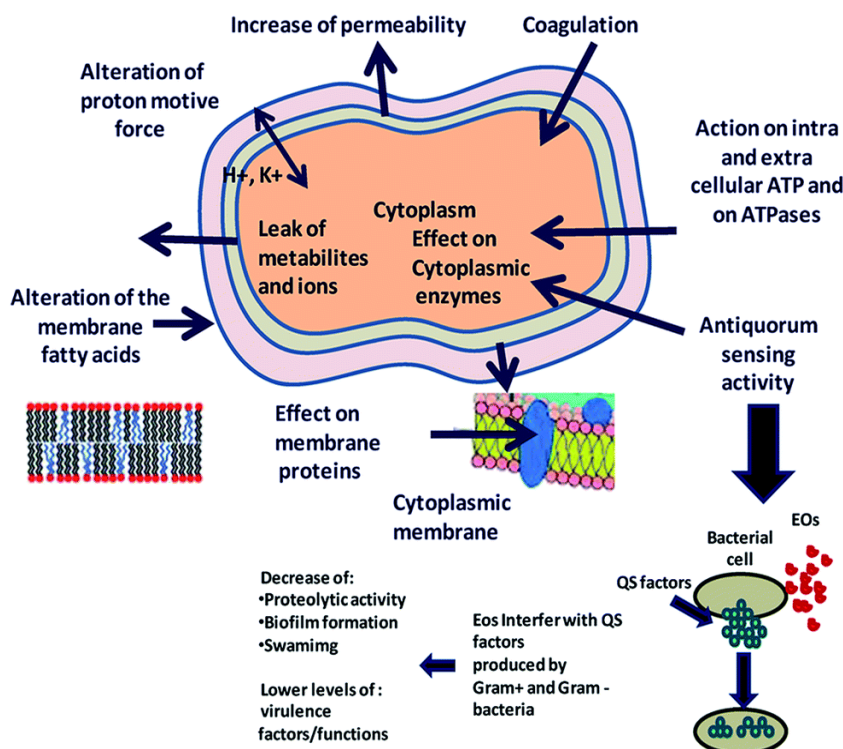
สารประกอบฟีนอลิกมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เนื่องจากเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidant) สามารถลดภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งต้านภาวะการอักเสบ ช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกันและช่วยปรับสมดุลระบบหมุนเวียนโลหิต เป็นต้น ในปัจจุบันสารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจ และมีการค้นคว้าวิจัยเพิ่มมากขึ้น โดย วาทีนี เสลร์ชาฎร์ (2559) ศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ (*Annona muricata*) ด้วยการแช่อย่างต่อเนืองด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล (ได้สารสกัดหยาบ 6 ตัวอย่าง) และนำไปศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl หรือ DPPH จากการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบของทุเรียนเทศ ประกอบด้วยสารที่มีความสำคัญทางเภสัชวิทยา 7 กลุ่มคือ อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ซึ่งสามารถสกัดได้ด้วยตัวทำละลายเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นได้สูงสุด 5 กลุ่ม และพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบในส่วนใบมีปริมาณมากกว่าเปลือกต้นของทุเรียนเทศ นอกจากนี้กมลลักษณ์ มาสำโรง และวรพจน์ สุนทรสุข (2557) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรสายพันธุ์ *Hylocercus undatus* (Haw) Britton & Rose โดยพบว่าเปลือกแก้วมังกรมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและเบต้าไซยานิน เท่ากับ 29.98 mg GAE/g dry wt. และ 0.88 mg/100 g dry wt. ตามลำดับ หลังการสกัดเปลือกแก้วมังกรด้วยน้ำกลั่นพบว่าสารสกัดที่ได้มีสีแดงเข้ม มีค่า pH ระหว่าง 4.0 – 4.5 นอกจากนี้สารสกัดเปลือกแก้วมังกรมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS<sup>+</sup> และแสดงความสามารถในการพอกจางสีเบต้าแคโรทีน โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.043 0.200 และ 1.966 mg/mL ตามลำดับ

### 2.2.5 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial)

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ซึ่งอาจเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว หรือหลายเซลล์ และอาจไม่สามารถจะมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์บางอย่างช่วยในการสังเกต เช่น กล้องจุลทรรศน์ เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของเซลล์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยได้แก่ จุลินทรีย์ที่โครงสร้างเป็นแบบเซลล์โพรแคริโอต (prokaryotic microorganisms) และจุลินทรีย์ที่โครงสร้างเป็นแบบเซลล์ยูแคริโอต (eukaryotic microorganisms) เช่น เชื้อรา สาหร่าย และโปรโตซัว ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นแบบเซลล์โพรแคริโอตโดยแตกต่างจากเซลล์ยูแคริโอตคือสารพันธุกรรม (genetic materials) จะไม่อยู่ภายในนิวเคลียส (nucleus) และไม่พบออร์แกเนลล์ที่มีเมมเบรนห่อหุ้ม (membranous organelles; membrane-enclosed organelles; membrane-bound

organelles) อยู่ภายในเซลล์ ในขณะที่เซลล์ยูแคริโอตที่มีสารพันธุกรรมอยู่ภายในนิวเคลียส และพบออร์แกเนลล์ที่เมมเบรนห่อหุ้ม (Fuerst, 2013)

นอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว สารประกอบฟีนอลิกยังเป็นแหล่งต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ โดยทั่วไปมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยมีการรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งเอนไซม์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ผนังเซลล์ได้ทำให้กรดอะมิโนรั่วไหลออกจากเซลล์ และสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ไปทำลายกลไกการทำงานภายในของเซลล์ ทำให้การผ่านเข้าออกของสารภายในเซลล์ผิดปกติก่อให้เกิดการเสียสมดุล ส่งผลให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Moreno *et al.*, 2006) โดย Nychas และ Tassou (1999) ได้รายงานถึงกลไกในการทำลายจุลินทรีย์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืช เช่น การยับยั้งหรือทำลายการสร้างผนังเซลล์โดยจุลินทรีย์มีผนังเซลล์เป็นส่วนนอกสุดของเซลล์ และเป็นชั้นที่แข็งแรง คงทน เพื่อทำหน้าที่ป้องกันสิ่งที่อยู่ภายในเซลล์ สารที่มีกลไกยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ส่วนใหญ่เป็นสารที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ peptidoglycan ของแบคทีเรีย อีกกลไกหนึ่งในการยับยั้งจุลินทรีย์คือการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มโปรตีน โดยทั่วไปเยื่อหุ้มเซลล์มีสมบัติ osmotic barrier ช่วยป้องกันไม่ให้สารต่างๆ เข้าหรือออกจากเซลล์ง่ายเกินไป นอกจากนี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบขนส่งเพื่อเลือกการนำส่งสารเข้าหรือออกจากเซลล์ ถ้าเยื่อหุ้มเซลล์นี้ถูกทำลายทำให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์รั่วไหลออกมา ซึ่งมีผลทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำให้เซลล์ตาย (Lambert *et al.*, 2001) ทำให้ไวระยะภายในเซลล์ตกตะกอน ซึ่งเซลล์แบคทีเรียมีองค์ประกอบของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกอยู่ภายในเซลล์ในสภาพปกติหรือเป็นธรรมชาติ โดยสารประกอบฟีนอลิกสามารถทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกเสียสภาพธรรมชาติ (denature) มีผลทำให้เกิดการตกตะกอน จับตัวเป็นก้อนแข็ง ซึ่งจะไม่สามารถแปรสภาพกลับเหมือนเดิมได้อีก เป็นต้น โดยกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์แสดงดังรูปที่ 11 (Burt, 2004)



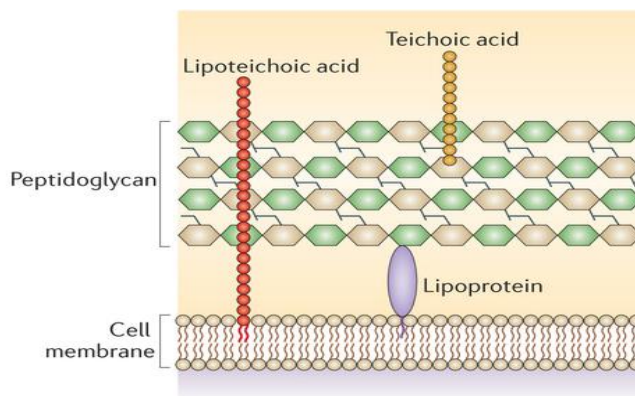
รูปที่ 11 กลไกในการทำลายแบคทีเรียของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืช  
ที่มา: Nazzaro *et al.* (2013)

Khawee และคณะ (2015) ศึกษาสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดของต้นด้วยตัวทำลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ (pH 3) เอทานอล และอะซีโตน แล้วทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญและฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี broth dilution และ agar diffusion assay โดยพบว่าสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดของต้นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากมากไปน้อยดังนี้คือ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ  $20.65 \pm 0.22$ ,  $19.61 \pm 0.02$ ,  $18.64 \pm 0.20$  และ  $17.96 \pm 0.12$  mm. ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์การยับยั้งหรือ minimal inhibitory concentration (MIC) และการฆ่าหรือ minimal bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดของต้นพบว่า การสกัดด้วยเอทานอลส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.25 และ 0.5 mg/mL ตามลำดับ และกมลลักษณ์ มาสำโรง และวรพจน์ สุนทรสุข (2557) ศึกษาความสามารถในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรสายพันธุ์ *Hylocercus undatus* (Haw) Britton & Rose ด้วยวิธี MIC และ MBC โดยจากการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นสารสกัด 50.93 mg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหารได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Clostridium*

*sporogenes* ATCC 19404 และ *Salmonella* Typhimurium DMST 16809 เนื่องจากเปลือกแก้วมั่งกรมีสารสำคัญคือ เบต้าไซยานินซึ่งจัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีส่วนช่วยด้านการเจริญของจุลินทรีย์ โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ผนังเซลล์ และสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ จึงสามารถเข้าไปทำลายกลไกการทำงานภายในของเซลล์ และมีรายงานว่าสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และราได้ นอกจากนี้สุคนธ์ ต้นดีไพบูลย์วุฒิ, เทียนชัย น่วมเศรษฐี และเพชรลดา เดชาเย็นง (2555) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเปลือกผลไม้ 5 ชนิด ได้แก่ ทูเรียนพันธุ์หอมทอง มังคุดสุก ส้มเขียวหวาน กลั้วน้ำว่าดิบ และหมากสงดิบ โดยสกัดด้วยน้ำร้อน เอทานอลเข้มข้น 95% v/v และอะซิโตน และพบว่า สารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วย อะซิโตนให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบ (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *S. typhimurium*) สูงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) น้อยกว่า 195.7 mg/mL รองลงมาคือ สารสกัดจากเปลือกทุเรียนด้วยอะซิโตน ซึ่งมีค่า MIC ของ *B. subtilis* และ *S. typhimurium* เท่ากับ 373 และ 273 mg/mL ตามลำดับ และมีค่า MIC ของ *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากันคือ 2,984 mg/mL สารสกัดจากเปลือกผลไม้ทุกชนิดที่สกัดด้วยอะซิโตนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนและสารสกัดด้วยเอทานอล และพบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ตรวจพบในเปลือกผลไม้ นอกจากนี้เปลือกผลไม้ทุกชนิดที่ทำการศึกษายับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันโดยแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อชั้นนอก (outer membrane) และ periplasmic space ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวก โดยสารไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อชั้นนอกจะเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารได้ดี ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีโครงสร้างเหล่านี้ ทำให้สารต่างๆ จึงซึมผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยความแตกต่างของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบแสดงดังตารางที่ 3

#### 2.2.5.1 แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria)

โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยส่วนของ peptidoglycan ที่มีความหนา เนื่องจากการเรียงซ้อนกันของสาย peptidoglycan หลายสายเข้าด้วยกัน บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกพบกรดอินทรีย์ คือ teichoic acids ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของ ribitol phosphate หรือ glycerol phosphate กรดอินทรีย์ชนิดนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิดย่อย คือ lipoteichoic acid ที่พบฝังตัวอยู่ตลอดชั้นของผนังเซลล์เรื่อยไปถึงส่วนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และ wall teichoic acid ที่พบบริเวณของผนังเซลล์เท่านั้น (Brown *et al.*, 2015)



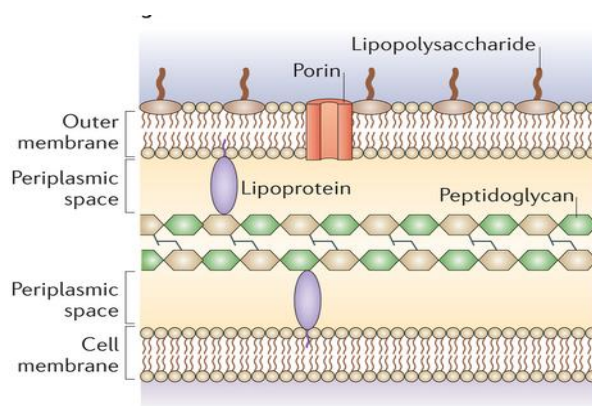
รูปที่ 12 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก

ที่มา: Brown *et al.* (2015)

#### 2.2.5.2 แบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria)

โครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยสาย peptidoglycan ที่เรียงตัวซ้อนกันเป็นชั้นบางๆ และไม่พบ teichoic acid เป็นองค์ประกอบ มีส่วนที่ปกคลุมชั้นของ peptidoglycan อยู่ด้านบนเรียกว่า outer membrane โดยองค์ประกอบของ outer membrane ส่วนใหญ่เป็น ไลโฟพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเกิดจากการเชื่อมยึดกันของ lipid และ polysaccharide ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) และ ไลโฟโปรตีน (lipoprotein) นอกจากนี้พบโปรตีนอีกหลายชนิด โดยชนิดที่สำคัญคือ porin ที่มีบทบาทในการควบคุมการผ่านเข้าและออกของสารต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย บทบาทหน้าที่ของ outer membrane คือช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรีย นอกจากนี้ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีช่องว่างระหว่าง outer membrane และเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า periplasmic space หรือ periplasm ซึ่งเป็นบริเวณที่พบเอนไซม์หลายชนิดที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารชีวโมเลกุล (biomolecules) ขนาดใหญ่หลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ ก่อนที่เซลล์จะขนส่งเข้าสู่ภายในเซลล์โดยการทำงานของโปรตีนอีกกลุ่มที่ชื่อว่า transport protein (Brown *et al.*, 2015)





รูปที่ 13 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ

ที่มา: Brown *et al.* (2015)

ตารางที่ 3 ความแตกต่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

คุณสมบัติของผนังเซลล์	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
ความซับซ้อน	น้อยกว่า	มากกว่า
ความหนา	20-80 nm	5-10 nm
พื้นผิว	เรียบ	เป็นลอน
Teichoic acid	พบ	ไม่พบ
Peptidoglycan content	90 % (multilayered)	5 –20 % (single-layered)
Outer Membrane	ไม่พบ	พบ
- Lipopolysaccharide	0 ( - )	13 %
- Protein content	0 ( - )	9 %
- Lipid and Lipoprotein content	0-3 %	58 %
Sensitive to penicillin	+	-
Digested by lysozyme	+	-

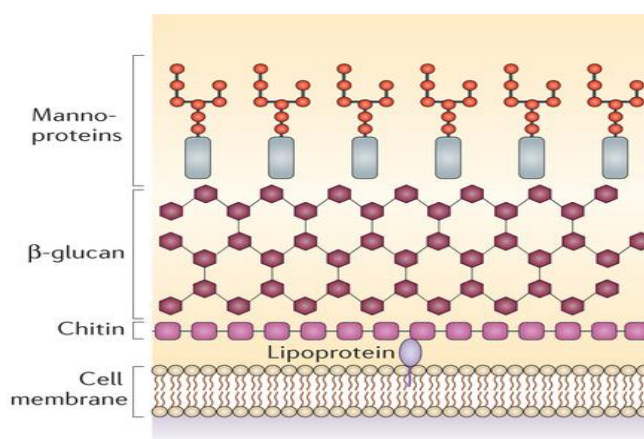
ที่มา: Panawala (2017)

เนื่องจากความแตกต่างกันด้านโครงสร้างของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้สารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ซึมผ่านได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียแกรมบวกที่มีโครงสร้างซับซ้อนน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบจะมีความสามารถในการต้านทานที่ต่ำกว่า โดยเบญจมาศ หนูแป้น และคณะ (2559) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบราน้ำ (*Limnophila*

*rugosa*) โดยสกัดด้วยน้ำ เมทานอล และเอทานอลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 4 ชนิด คือ (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Vibrio cholerae*) ด้วยวิธี agar well diffusion และพบว่า สารสกัดจากใบรณำน้ำมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้ โดยมีค่าบริเวณวงใส (clear zone) อยู่ในช่วง  $0.7 \pm 0.00$ - $1.4 \pm 0.71$  cm. ทั้งนี้สารสกัดจากใบรณำน้ำสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.5 และ 100 mg/mL ตามลำดับ โดยสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับ รองเดช ตั้งตระการพงษ์ และจุลจิตร ตั้งตระการพงษ์ (2556) ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดยี่หระ (*Ocimum gratissimum* L.) ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% v/v โดยทดสอบแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ด้วยวิธี agar disc diffusion จากผลการศึกษาพบว่า ยี่หระมีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. pyogenes*, *S. typhi*, *K. pneumoniae* และ *E. coli* โดยมีขนาดค่าเฉลี่ย inhibition zone คือ  $19.00 \pm 0.17$ ,  $17.83 \pm 0.05$ ,  $17.67 \pm 0.08$ ,  $15.17 \pm 0.04$ ,  $14.67 \pm 0.08$ , และ  $14.17 \pm 0.13$  mm. ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดยี่หระมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย โดยออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ

### 2.2.5.3 ฟังไจ (fungi)

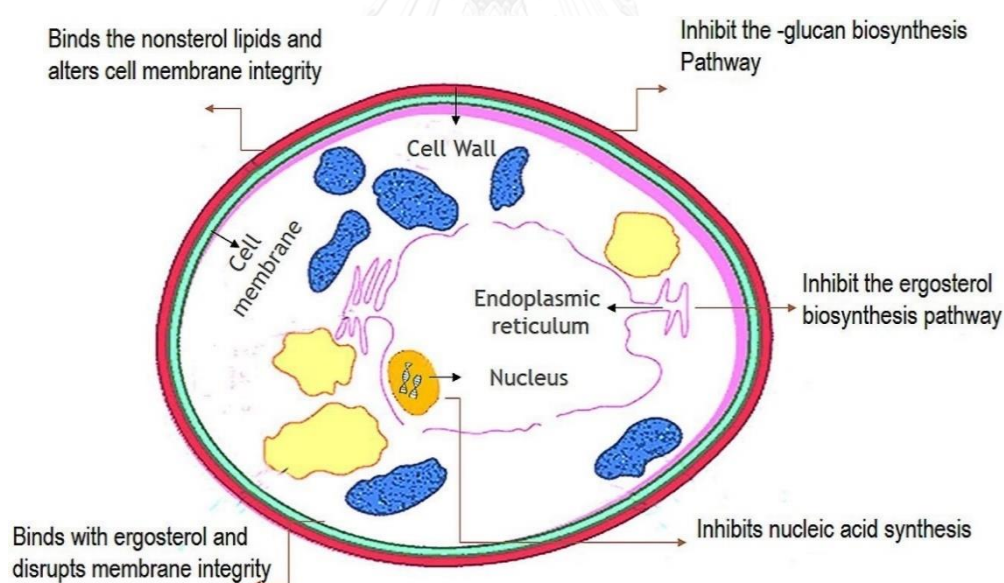
ฟังไจมีสัณฐานวิทยาเป็นเซลล์เดี่ยวหรือหลายเซลล์ประกอบด้วย ผนังเซลล์ และยีสต์ เป็นเซลล์ยูคาริโอต ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพวกไคติน (chitin; N-acetyl glucosamine) หรือเซลลูโลสกับไคติน นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ แตกต่างกันไปในแต่ละ (Brown *et al.*, 2015)



รูปที่ 14 โครงสร้างผนังเซลล์ของฟังไจ

ที่มา: Brown *et al.* (2015)

นอกจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแล้ว สารประกอบฟีนอลิกยังมีฤทธิ์ในการต้านฟังไจด้วย โดย Quiroga, Sampietro และ Vattuone (2001) ศึกษาฤทธิ์การต้านฟังไจของสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ ในอาร์เจนตินาด้วยเอทานอล โดยใช้วิธี disk diffusion และ broth dilution โดยศึกษาฟังไจหลายชนิดได้แก่ เห็ด (*Lenzites elegans*, *Ganoderma applanatum*, *Pycnoporus sanguineus* และ *Schizophyllum commune*) รา (*Fusarium oxysporum*, *Penicillium notatum*, *Trichoderma spp.* และ *Aspergillus niger*) และ ยีสต์ (*Saccharomyces carlsbergensis* และ *Rhodotorula spp.*) และพบว่าสารสกัดของพืชแต่ละชนิดมีสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกันที่มีผลต่อฟังไจชนิดต่างๆ โดย *Larrea divaricata*, *Zuccagnia punctata* และ *Larrea cuneifolia* สามารถต้านการเจริญของฟังไจได้ และสารสกัดจาก *Prosopanche americana* สามารถยับยั้งยีสต์ได้ โดยกลไกการยับยั้งยีสต์มีหลายกลไกได้แก่ ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ยับยั้งการสร้างกลูแคน ยับยั้งการสร้างเออร์โกสเตอรอล ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง (Patil *et al.*, 2015) ซึ่งกลไกต่างๆแสดงดังรูปที่ 15

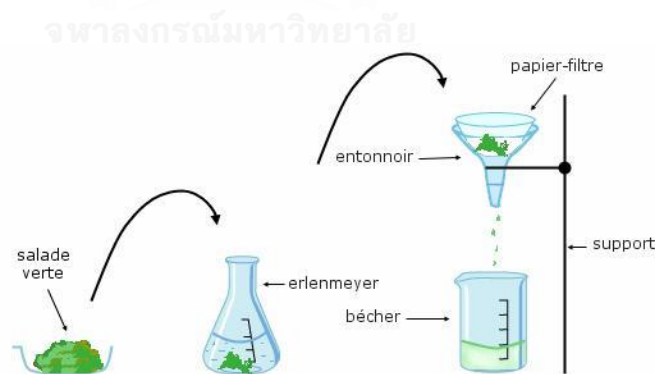


รูปที่ 15 กลไกในการทำลายฟังไจของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืช  
ที่มา: ดัดแปลงจาก Patil *et al.* (2015)

## 2.2.6 วิธีสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากพืช

ผักและผลไม้พื้นบ้านไทยหลายชนิดถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยา เนื่องจากมีฤทธิ์ทางยาต่างๆ มากมาย ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่มักพบเป็นส่วนใหญ่ คือ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากส่วนต่างของพืชทำได้หลายวิธี โดยทั่วไป การสกัดเบื้องต้นด้วยวิธีการสกัดไคหรือใช้ตัวทำละลายใดก็ตาม จะต้องประกอบเป็นของผสมหรือ สารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากพืชโดยใช้ตัวทำละลาย (solvent) โดยสารสกัดที่ได้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของพืชซึ่งจะมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเรียกว่า “สารสำคัญ” และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เรียกว่า “สารเฉื่อย” ซึ่งวิธีการสกัดสารสำคัญขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ โดยแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันออกไป

2.2.6.1 มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นวิธีสกัดสารสำคัญจากพืชโดยการแช่ตัวอย่างกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิดจนกระทั่งเนื้อเยื่ออ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในของตัวอย่างออกมาได้ ในระหว่างที่แช่ควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองเอาสารสกัดออกจากกากของพืช โดยวิธีนี้เหมาะสมกับพืชส่วนที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก โดยวิธีนี้มีข้อดีคือสารไม่ถูกความร้อน จึงเหมาะกับการสกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่เป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายมาก (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)

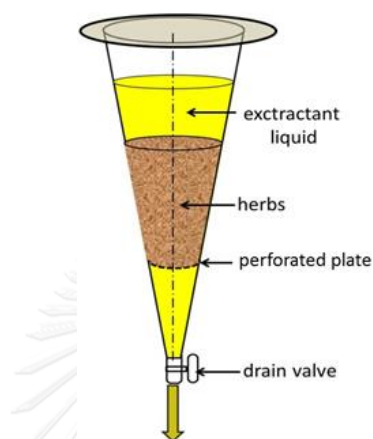


รูปที่ 16 การสกัดแบบมาเซอเรชัน (maceration)

ที่มา: Vanjb (2011)

2.2.6.2 เพอร์โคเลชัน (percolation) เป็นวิธีสกัดสารสำคัญจากพืชแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า “เพอร์โคเลเตอร์” ซึ่งจะนำวัตถุดิบมาแช่กับตัวทำละลายพอขึ้น ทิ้งไว้หนึ่งชั่วโมง เพื่อให้ฟองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ ตัวอย่างทีละชั้นลงในเพอร์โคเลเตอร์ ที่มีลักษณะเป็นคอลัมน์

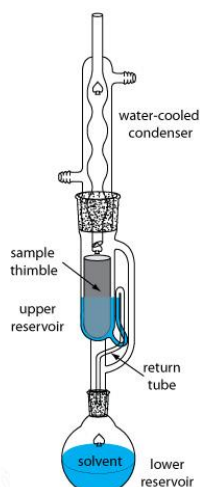
ปลายเปิดทั้งสองข้าง จากนั้นเติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือตัวอย่างประมาณ 0.5 cm. ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไซเอซสารสกัดออก โดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือตัวอย่างอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัด จนการสกัดสมบูรณ์ นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดไปกรอง วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้ความร้อน แต่มีข้อเสียคือ ใช้ตัวทำละลายมากและใช้เวลานานในการสกัด (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544) โดยการสกัดแบบมาเพอร์โคเลชันแสดงดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 เพอร์โคเลชัน (percolation)

ที่มา: Dévay (2013)

2.2.6.3 การสกัดด้วยซอกซ์เลตเอ็กซ์แทรกเตอร์ (soxhlet extractor) เป็นวิธีสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในภาชนะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (thimble) ซึ่งบรรจุตัวอย่างไว้ ตัวทำละลายจะผ่านวัตถุบดหลายรอบไปเรื่อยๆ จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อน มีข้อดีคือใช้ตัวทำละลายน้อย แต่มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน และตัวทำละลายที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกของตัวทำละลายแต่ละชนิด เนื่องจากมีจุดเดือดต่างกัน ซึ่งสามารถส่งผลให้สัดส่วนของตัวทำละลายแตกต่างกันไปจากเดิมและทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดลดลง (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544) โดยการสกัดด้วยซอกซ์เลตเอ็กซ์แทรกเตอร์แสดงดังรูปที่ 18



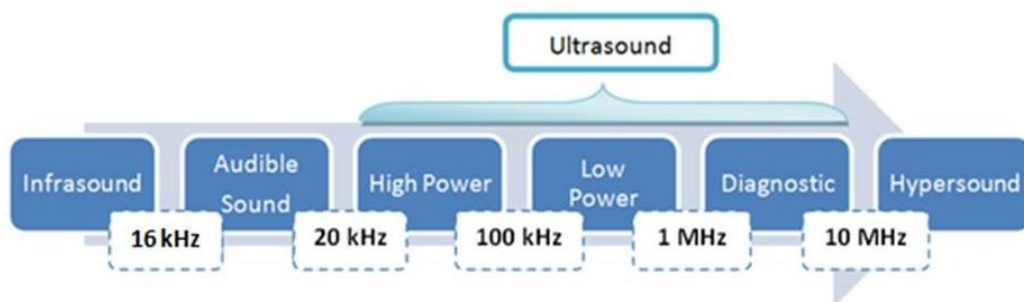
รูปที่ 18 การสกัดด้วยซอกซ์เลตเอกซ์แทรกเตอร์ (soxhlet extractor)

ที่มา: Harvey (2013)

## 2.3 การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยในการสกัดหรือ ultrasound-assisted extraction (UAE)

### 2.3.1 คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound)

คลื่นเสียงอัลตราซาวนด์หรืออัลตราโซนิกเป็นคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงเกินกว่าที่มนุษย์จะได้ยิน โดยมีความถี่สูงกว่า 16-18 kHz มีช่วงคลื่นอยู่ที่ 18 kHz-100 MHz และสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ power ultrasound (20 - 100 kHz) ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และ diagnostic ultrasound (2-10 MHz) ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่นำมาใช้ในทางการแพทย์



รูปที่ 19 คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound)

ที่มา: Manickam (2013)



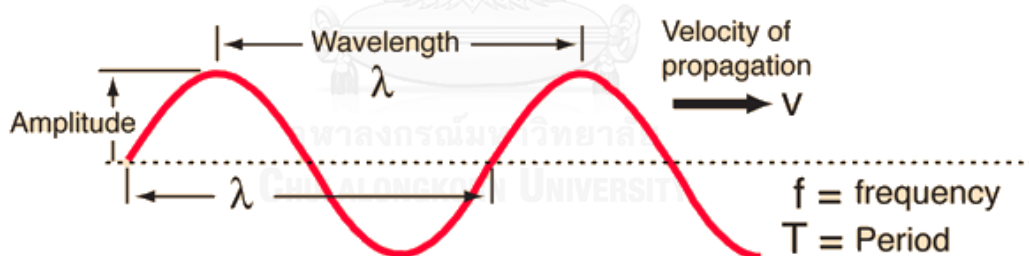
คลื่นอัลตราโซนิกมีองค์ประกอบต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 20 โดยมีองค์ประกอบดังนี้

- สันคลื่น คือ ตำแหน่งสูงสุดของคลื่น (C)
- ท้องคลื่น คือ ตำแหน่งต่ำสุดของคลื่น (R)
- แอมพลิจูด คือ ระยะจัดสูงสุดของคลื่นวัดจากตำแหน่งสมดุล
- คาบ (period) คือ ช่วงเวลาในการสั้น 1 รอบของอนุภาค มีหน่วยเป็นวินาที
- ความถี่ (frequency) คือ จำนวนรอบที่อนุภาคสั้นใน 1 วินาที มีหน่วยเป็นรอบต่อวินาที หรือ เฮิรตซ์ (Hertz, Hz) โดยที่คาบและความถี่มีความสัมพันธ์ดังนี้

$$f = \frac{1}{T} \quad \text{หรือ} \quad T = \frac{1}{f}$$

- ความยาวคลื่น (wavelength) คือ ระยะทางที่คลื่นไปได้ในช่วงเวลาของ 1 คาบ แทนด้วยแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) บางทีความยาวคลื่นคือระยะจากระหว่างจุด 2 จุดที่อยู่ติดกัน ซึ่งมีลักษณะเหมือนกัน
- อัตราเร็วคลื่นหรืออัตราเร็วเฟส คือ ระยะทางที่คลื่นเคลื่อนที่ได้ 1 ความยาวคลื่น ในเวลา 1 คาบ มีหน่วยเป็นเมตรต่อวินาที (m/s) โดย

$$v = \frac{S}{t} = \frac{\lambda}{T} = \lambda f$$



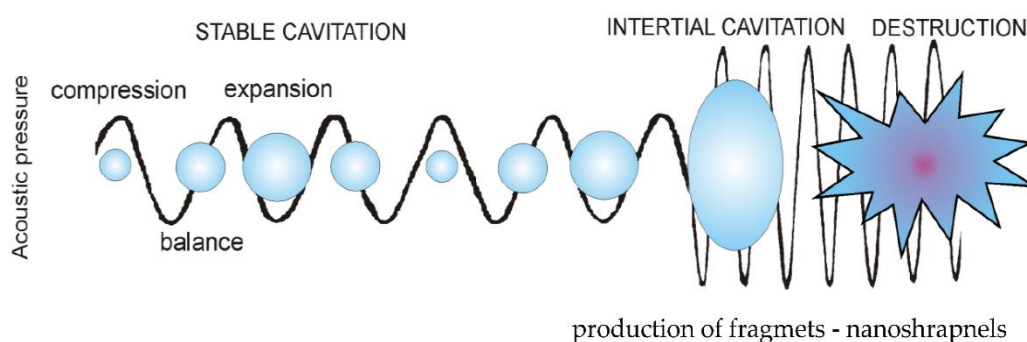
รูปที่ 20 องค์ประกอบของคลื่นอัลตราโซนิก

ที่มา: Nave (2000)

### 2.3.2 ปราบกฏการณ์ควาเวชัน

ควาเวชันคือ การเกิดโพรงอากาศในของเหลว โดยจะเกิดขึ้นเมื่อแรงดันในของเหลวที่อุณหภูมิกำลังลดลงต่ำกว่าจุดแรงดันไอ น้ำอ้อมตัว (จุดเดือด) ซึ่งการเกิดควาเวชันสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ควาเวชันแบบถาวร (stable cavitation) และควาเวชันแบบชั่วคราว (transient cavitation) โดยควาเวชันแบบถาวรจะเกิดขึ้นเมื่อฟองอากาศได้รับคลื่นอัลตราโซนิกเป็นจำนวน

หลายรอบของการสั่นแต่ไม่เกิดการแตกของฟองอากาศ และฟองอากาศอาจจะเพิ่มขนาดขึ้นจนถึงขนาดเรโซแนนซ์โดยมีความถี่ธรรมชาติเท่ากันกับความถี่ในการสั่นแบบบังคับและแตกออก ส่วนคาวิตेशनแบบชั่วคราวนั้นเกิดจากฟองแก๊สเกิดการสั่นและขยายขนาดเพิ่มขึ้นในลักษณะคงที่ในระยะเวลาหนึ่ง ก่อนที่จะแตกออกอย่างรวดเร็วเมื่อถึงขนาดหนึ่ง โดยการเกิดคาวิตेशनแสดงดังรูปที่ 21 (Vardanega, Santos and Meireles, 2014)

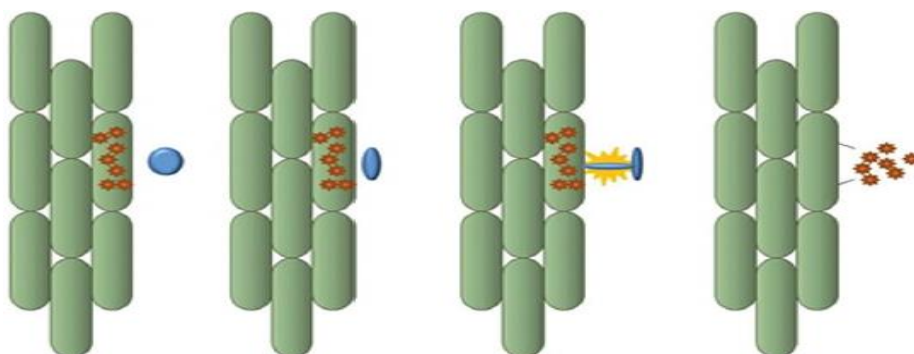


รูปที่ 21 การเกิดคาวิตेशन

ที่มา: Turánek *et al.* (2015)

การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยในการสกัดจะเกี่ยวข้องกับการเกิดคาวิตेशन โดยเกิดจากอัลตราโซนิกรานสตีวเซอร์จะแปลงพลังงานไฟฟ้าที่ได้จากแหล่งกำเนิด (power generator) มาเป็นพลังงานทางกลโดยการสั่นสะเทือนซึ่งทำให้เกิดคลื่นในช่วงอัลตราโซนิกรกระจายไปในตัวทำละลายและเกิดเป็นคลื่นและฟองอากาศ เมื่อคลื่นอัลตราโซนิกเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็นตัวทำละลายจะเกิดการถ่ายทอดพลังงานอย่างต่อเนื่องทำให้ความดันมีการเปลี่ยนแปลงคือ เมื่อความดันลดลงจะเกิดเป็นช่วงขยาย (rarefaction) ส่งผลให้ตัวทำละลายแตกตัวและเกิดฟองอากาศขึ้น ต่อมาเมื่อคลื่นเคลื่อนที่ผ่านไป ความดันจะเพิ่มขึ้นเกิดเป็นช่วงอัด (compression) ทำให้ฟองอากาศหดตัวลงและมีขนาดไม่แน่นอน เมื่อคลื่นในสารละลายมีความถี่เท่ากับความถี่เรโซแนนซ์ที่ฟองอากาศจะเกิดการแตกตัวในลักษณะที่พุ่งออกมาเป็นลำแคบๆ มีขนาดหนึ่งในสิบของขนาดฟองเรียกว่าเซนทรัลเจต (central jet) ผ่านผิวของตัวอย่างด้วยความดัน อุณหภูมิและความเร็วที่สูง ทำให้เกิดพลังงานสูงในบริเวณจุดที่เกิดคลื่นกระแทก (shock waves) ส่งผลให้เนื้อเยื่อฉีกขาดและสามารถละลายสารที่ต้องการสกัดในตัวอย่างออกมาได้ (mass transfer) (Vardanega *et al.*, 2014)





รูปที่ 22 การเกิดควิเตชันและชะสสารภายในเนื้อเยื่อจากการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยสกัด

ที่มา: Vardanega *et al.*, (2014)

### 2.3.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัด

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยเป็นสิ่งสำคัญต่อการสกัด เนื่องจากจะส่งผลให้การสกัดมีประสิทธิภาพสูงขึ้น นอกจากนี้ยังรวมถึงความเหมาะสมของระดับปัจจัยต่างๆ ด้วย โดยขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและสมบัติทางเคมีของสารที่ต้องการสกัด

#### 2.3.3.1 ชนิดของตัวทำละลาย

การสกัดนิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน โดยอาจสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่ำไปยังขั้วสูง ตัวถูกละลายจะสามารถละลายในตัวทำละลายได้เมื่อความเป็นขั้วของตัวทำละลายกับตัวถูกละลายมีค่าใกล้เคียงกัน (like dissolve like) ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วไม่เท่ากันจึงมีความสามารถในการละลายสารชนิดเดียวกันได้ไม่เท่ากัน ประสิทธิภาพของสารสกัดขึ้นอยู่กับ การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่างๆ จะแสดงดังตารางที่ 4 โดยน้ำ จะมีสภาพขั้วสูงสุด ซึ่งตัวทำละลายแต่ละชนิดควรมีสสมบัติในการละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี ไม่ระเหยง่ายหรือยากจนเกินไป ไม่ติดไฟง่าย ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย เช่น เฮกเซน เป็นตัวทำละลายที่มีราคาถูกเหมาะสมสำหรับสกัดสารที่ไม่มีขั้ว มักใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับการกำจัดไขมัน การสกัดสารจากส่วนต่างๆ ของพืชโดยทั่วไปการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีความแตกต่างกันตามแต่ลักษณะและองค์ประกอบของสาร (ประเสริฐ ศรีไพโรจน์, 2528; Ramamoorthy and Bono, 2007)

ตารางที่ 4 แสดงความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ความมีขั้ว	ตัวทำละลาย
มีขั้ว	Water
	Methanol
	Ethanol
	Acetone
	Ethyl acetate
	Ethyl ether
	Chloroform
	Dichloromethane
	Benzene
	Toluene
	Ethylene trichloride
	Carbon tetrachloride
ไม่มีขั้ว	Cyclohexane

ที่มา: ประเสริฐ ศรีโพธิ์ (2528)

การสกัดสารประกอบฟีนอลิก ชนิดของตัวทำละลายเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัด และฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น การต้านอนุมูลอิสระ และการต้านเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากตัวทำละลายแต่ละชนิดมีสภาพขั้วที่แตกต่างกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาการสกัดสารประกอบฟีนอลิก นิยมใช้เมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตต เฮกเซน อะซิโตน น้ำ และสารละลายผสมระหว่างน้ำกับตัวทำละลายดังกล่าว โดยตัวทำละลายที่นิยมใช้คือ เมทานอล เอทานอล และสารละลายที่ผสมกันระหว่างเมทานอลกับน้ำ และเอทานอลกับน้ำ เนื่องจากสภาพขั้วที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถสกัดองค์ประกอบทางเคมีได้แตกต่างกัน โดย อรชร ไอสันเทียะ และกาญจนา วงศ์กระจ่าง (2558) ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay และวิธี aluminium chloride colorimetric assay ตามลำดับ พบว่าระบบ 60% H<sub>2</sub>O/EtOH มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงสุด (510.5 mg GEA/g สารสกัดหยาบ และ 21.36 mg quercetageitin glucoside /g สารสกัดหยาบ ตามลำดับ) และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ผลที่ได้พบว่าระบบตัวทำละลาย 60% H<sub>2</sub>O/EtOH มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดโดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 5.84±0.05 µg/mL นอกจากนี้ พืชรินทร์ บุญหล้าและคณะ

(2557) ศึกษาการสกัดใบชะพลูแห้งด้วยการแช่ โดยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ petroleum ether, hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และ FRAP (ferric reducing antioxidant power) โดยพบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สารสกัดจาก hexane มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยให้ค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ  $29.63 \pm 0.56 \mu\text{g/mL}$  และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP การสกัดด้วย methanol มีฤทธิ์ดีที่สุดโดยมีค่า Fe (II) equivalent เท่ากับ  $0.56 \pm 0.12 \mu\text{mol/mg}$  และ ชลธิชา กาวี และคณะ (2558) ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกและเมล็ดองุ่นที่เป็นเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตไวน์และน้ำองุ่น โดยสกัดเปลือกและเมล็ดองุ่นด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ (pH 3) เอทานอล และอะซิโตน แล้ววิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกด้วยน้ำปรับ pH 3 และการสกัดเมล็ดองุ่นด้วยเอทานอลให้ปริมาณผลได้ (yields) สูงสุด เท่ากับ  $10.032 \pm 0.104$  และ  $9.765 \pm 0.144 \text{ w/w}$  ตามลำดับ และการสกัดด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงที่สุด โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเมล็ดและเปลือกมีค่าเท่ากับ  $34.2 \pm 0.001$  และ  $32.16 \pm 0.001 \text{ mg GAE/g dry wt.}$  ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่น พบว่าสารสกัดจากเมล็ดด้วยเอทานอล ให้ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเปลือก โดยค่าที่ได้มีความสัมพันธ์กับ  $IC_{50}$  และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด นอกจากนี้ จันทนา กาญจนกุล (2559) ศึกษาการสกัดผลมะม่วงหาว มะนาวโห่ (*Carissa carandas* L.) โดยใช้สารสกัดที่แตกต่างกันคือ เมทานอล เอทิลอะซิเตต และเฮกเซน โดยพบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดคือ มีปริมาณ  $83.17 \pm 0.03 \text{ mg GAE/g dry extract}$  รองลงมาเป็นสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตโดยมีปริมาณ  $57.40 \pm 0.02 \text{ mg GAE/g dry extract}$  และสารสกัดเฮกเซน ซึ่งมีปริมาณ  $21.94 \pm 0.06 \text{ mg GAE/g dry extract}$  ตามลำดับ และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดจากเอทิลอะซิเตตและสารสกัดเฮกเซน ตามลำดับ สารสกัดจากเมทานอลมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าการสกัดด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต อาจเป็นเพราะสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบมีสมบัติมีขั้วจึงละลายได้ดีในเมทานอล ดังนั้น การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม จึงมีความสำคัญในการสกัดสารแต่ละชนิด

### 2.3.3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิ เป็นปัจจัยสำคัญในการพิจารณาถึงการเพิ่มความหนาแน่นของการเกิดและหายไปของฟองอากาศในตัวกลางและสามารถส่งผลต่อการเกิดคาวิตีชัน โดย Ghafoor และคณะ (2009) ได้ศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเมล็ดองุ่น (*Vitis vinifera*) ในช่วงอุณหภูมิ 20-30 °C และวิเคราะห์ผลโดย response surface methodology (RSM) และพบว่า การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและจะมีปริมาณมากที่สุดที่อุณหภูมิสูงสุดของการศึกษา ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับ Zhang และคณะ (2014) ที่ศึกษาการสกัด schisandrin B จากเมล็ดอู๋เว่ยจื่อ (*Schisandra chinensis* Baill) ในช่วงอุณหภูมิ 30-70 °C และพบว่าปริมาณ schisandrin B จะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของอุณหภูมิ นอกจากนี้ Corbin และคณะ (2014) ได้ศึกษาการสกัด lignin (secoisolariciresinol diglucoside, SDG) flavonol (herbacetin diglucoside, HDG) และ hydroxycinnamic acids (p-coumaric, caffeic และ ferulic acid glucosides) ในช่วงอุณหภูมิ 25-60°C จากเมล็ดแฟลกซ์ (*Linum usitatissimum* L.) และพบว่า ปริมาณ lignin (secoisolariciresinol diglucoside, SDG) และ flavonol (herbacetin diglucoside, HDG) จะลดลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณ hydroxycinnamic acids (p-coumaric, caffeic และ ferulic acid glucosides) จะมากที่สุดที่อุณหภูมิปานกลางของการศึกษาคือ 40°C จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าปริมาณ yield เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเกิดจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นสามารถลดความหนืด (viscosity) เพิ่มการละลาย (solubility) อัตราการแพร่ (diffusion rate) และความดันไอ (vapor pressure) ทำให้การเกิดคาวิตีชันดีขึ้นส่งผลให้มีปริมาณผลได้สูงขึ้นและอาจจะลดลงเมื่อถึงอุณหภูมิหนึ่งเนื่องจากการทนต่อความร้อนลดลงประกอบกับสารที่ต้องการสกัดเริ่มหมดหรือเปลี่ยนสภาพไป (denature) ดังนั้นปริมาณผลได้ที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดได้ทั้งในกรณีที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นหรือลดลงโดยขึ้นอยู่กับสมบัติทางเคมีของสารนั้น

### 2.3.3.3 เวลา

เวลาเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสกัดเนื่องจากเป็นปัจจัยที่ทำให้ตัวทำละลายมีโอกาสสัมผัสกับตัวถูกละลาย ซึ่งมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับผลของเวลาต่อการสกัดมากมาย โดย รัตนา ม่วงรัตน์, พงศธร ถ้ำทอง และจรัสศรี หลวงพันธ์ (2559) ศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเปลือกกล้วยหอมทองแห้งด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติ และพบว่าที่อัตราส่วนระหว่างเปลือกกล้วยหอมทองแห้งต่อตัวทำละลายผสม (น้ำและเอทานอลในอัตราส่วนโดยน้ำหนักเท่ากับ 1:1) เท่ากับ 1:25 อุณหภูมิ 100 °C สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำภาวะดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาเวลาในการสกัด (5, 15, 30 และ 60 นาที) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาในการสกัดนานขึ้น (มากกว่า 15 นาที) ปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะมีปริมาณลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ghafoor และคณะ (2009) ที่ศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเมล็ดองุ่น (*Vitis vinifera*) ในช่วงเวลา 20-30 นาที และวิเคราะห์ผลโดย RSM จากการทดลองพบว่า การเพิ่มขึ้นของเวลาจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยจะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดที่เวลาหนึ่ง และจะค่อยๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น พบว่าในระยะเวลาช่วงแรกของการสกัดเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของเวลา จะเพิ่มโอกาสให้ตัวทำละลายได้สัมผัสกับตัวถูกละลายมากขึ้น แต่เมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งการสกัดจะเริ่มเข้าสู่สมดุลหรืออาจจะเกิดการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเนื่องจากได้รับปริมาณความร้อนเพิ่มขึ้น

#### 2.3.3.4 ความเข้มข้นของแอมพลิจูด

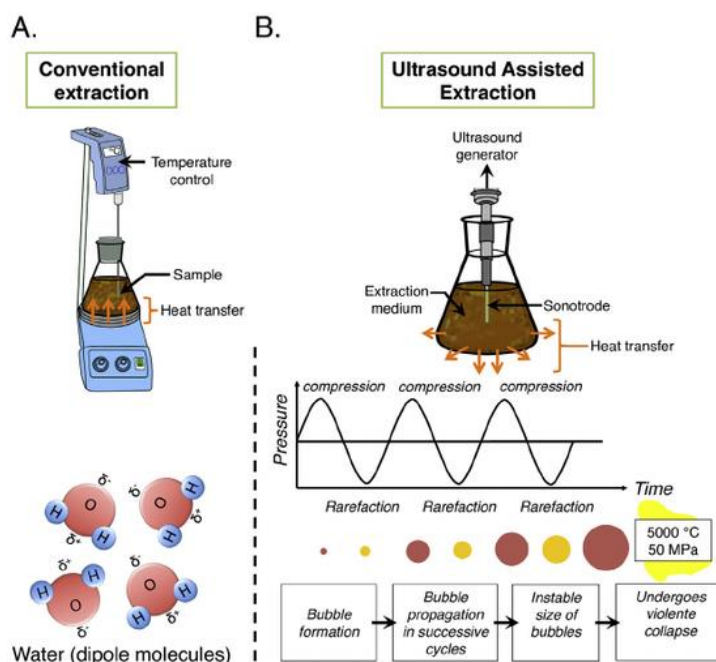
แอมพลิจูดเป็นปัจจัยที่สำคัญในการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยเนื่องจากเป็นปัจจัยที่มาจากคลื่นเสียงและมีความสัมพันธ์ต่อความรุนแรงในการเกิดควาเวชัน โดย Nayak และ Rastogi (2013) ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานิน และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดผลสดของ *Garcinia indica* โดยศึกษาความเข้มข้นของแอมพลิจูดในช่วง 10–90% และวิเคราะห์ผลด้วย RSM และพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินจะลดลงตามความเข้มข้นของแอมพลิจูดที่เพิ่มขึ้น และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแอมพลิจูดที่เพิ่มขึ้น ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ใช้ความเข้มข้นของแอมพลิจูดสูงถึง 90% เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของแอมพลิจูดทำให้การสั่นของคลื่นเสียงที่ส่งผ่านตัวทำละลายมีความรุนแรงขึ้นและเกิดฟองอากาศที่มีพลังงานสูงมาสัมผัสกับบริเวณผิวของเนื้อเยื่อ จึงมีโอกาสเกิดปรากฏการณ์ควาเวชัน (cavitation) มากขึ้น ซึ่งส่งผลให้เนื้อเยื่อเมล็ดฉีกขาดมากขึ้น ทำให้สารภายในเมล็ดละลายออกมาในตัวทำละลายสูงกว่าที่แอมพลิจูดต่ำ เพราะแอมพลิจูดต่ำมีการสั่นของคลื่นเสียงน้อยกว่า (Hemwimol *et al.*, 2006) แต่เมื่อความเข้มข้นของแอมพลิจูดเพิ่มจนถึงระดับหนึ่ง สารที่สกัดได้จะลดลง เนื่องจากสารพฤษเคมีบางชนิดสลายตัวในระหว่างกระบวนการสกัดเพราะแอมพลิจูดที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้เกิดการสั่นของคลื่นสูงและเกิดความร้อนขึ้นจึงสามารถทำลายสารพฤษเคมี ประสิทธิภาพในการสกัดจึงต่ำลง (Santos *et al.*, 2008)

#### 2.3.4 ประโยชน์ของการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

การสกัดแบบดั้งเดิมเป็นวิธีที่ง่ายแต่สิ้นเปลืองตัวทำละลายและเวลา ทำให้มีการพัฒนาวิธีการสกัดขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง โดยทางเลือกหนึ่งคือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยในการสกัดซึ่งเป็นการสกัดโดยไม่ใช้ความร้อน ส่งผลให้ตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดได้ดียิ่งขึ้น จึงมีประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) เพิ่มขึ้นเนื่องจากคลื่นอัลตราโซนิคสามารถ

ทำลายพื้นผิวบริเวณผนังเซลล์และภายในเซลล์ทำให้สารที่ต้องการสกัดสามารถถูกชะออกมาได้ง่ายขึ้น ตัวอย่างการสกัดด้วยวิธีนี้ เช่น การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ด ใบ และราก เป็นต้น โดยการสกัดด้วยเทคนิคนี้มีข้อดีคือ เพิ่มปริมาณผลได้ (yields) ลดปริมาณการใช้ตัวทำละลาย ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม มีคุณภาพสูง และลดการใช้อุณหภูมิและเวลาในการสกัด (Vardanega, Santos and Meireles, 2014)

Dent และคณะ (2015) ศึกษาภาวะการสกัด *Salvia officinalis* L. โดยการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยวิธีแช่และใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยที่ความเข้มข้นของเอทานอล 30% v/v โดยพบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย คือ กำลังไฟฟ้า 400 วัตต์ และเวลา 11 นาที โดยสารสกัดจากการสกัดด้วยวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และกรดโรสมารินิกสูงกว่าสารสกัดจากภาวะที่เหมาะสมของการแช่ที่ 60 °C เวลา 30 นาที จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าการสกัดด้วยวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยลดระยะเวลาในการสกัดอีกทั้งมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่าการแช่ นอกจากนี้ วรรณญา วงศ์วานิช และกิตติชัย บรรจง (2559) ศึกษาการสกัดน้ำมันจากเมล็ดองุ่นพันธุ์ชiraz (*Vitis vinifera* cv Shiraz) ด้วยวิธีการแช่เปรียบเทียบกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยสกัด และพบว่า เมล็ดองุ่นพันธุ์ชiraz มีปริมาณน้ำมัน 13.61% โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อนำมาสกัดน้ำมันเมล็ดองุ่นในภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีแช่ในอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อผงเมล็ดองุ่นเท่ากับ 6 ต่อ 1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักและใช้เวลาการสกัด 30 นาที ให้ปริมาณผลผลิต 11.13% โดยน้ำหนักแห้ง และสกัดด้วยวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยในอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อผงเมล็ดองุ่นเท่ากับ 2 ต่อ 1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ความถี่ 20 kHz กำลังไฟฟ้า 750 วัตต์ แอมพลิจูด 80% และเวลา 15 นาที ให้ปริมาณผลผลิต 11.42% โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งทั้งสองวิธีมีความสามารถในการสกัดประมาณ 80% ของปริมาณน้ำมันทั้งหมด การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยสกัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดน้ำมันเมล็ดองุ่น เนื่องจากช่วยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลาย 3 เท่า และลดระยะเวลาในการสกัดได้ 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแช่ ดังนั้น การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงจึงเป็นอีกหนึ่งเทคโนโลยีทางเลือกสำหรับกระบวนการสกัดน้ำมัน ซึ่งการสกัดด้วยวิธีดั้งเดิมและการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยจะแสดงดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 การสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม (A) และ การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย (B)

ที่มา: Barba *et al.* (2016)

## 2.4 น้ำส้ม

น้ำส้ม หมายถึง น้ำผลไม้ที่อยู่ในลักษณะพร้อมบริโภค ทำจากส่วนที่บริโภค ได้ของผลส้มที่แก่ สุก และสดพันธุ์ซิทรัส ซิเนนซิส ออสเบก (*Citrus sinensis* L. Osbeck) เช่น ส้มเกลี้ยง ส้มเซ่งหรือพันธุ์ซิทรัส เรทคิวลาตาบลังกโก (*Citrus reticulata* Blanco) เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มสายน้ำผึ้ง ส้มสีทอง ส้มผิวทอง ส้มสีทับทิมหรือพันธุ์อื่นที่เหมาะสม ด้วยกรรมวิธีที่เหมาะสม หรืออาจทำจากน้ำส้มเข้มข้นที่นำมาทำให้เจือจาง บรรจุในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทสามารถป้องกันไม่ให้อากาศและจุลินทรีย์จากภายนอกเข้าไป น้ำส้มต้องผ่านกรรมวิธีถนอมอาหารด้วยความร้อน และสามารถรักษาคุณภาพได้ที่อุณหภูมิปกติ คุณลักษณะที่ต้องการคือต้องมีสี กลิ่น และกลิ่นรส ที่ดีตามธรรมชาติของน้ำส้ม (พระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2550) สารที่ละลายน้ำต้องไม่น้อยกว่า 10 °Brix เมื่อวัดด้วยมาตรดัชนีหักเห (refractometer) ที่อุณหภูมิ 20±2 °C เอทานอลต้องไม่มากกว่า 3 g/kg น้ำมันหอมระเหย (essential oils) ต้องไม่มากกว่า 0.4 mg/kg การทดสอบให้ปฏิบัติตาม Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2005)

น้ำส้ม เป็นผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคมากที่สุด เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูงประกอบด้วยวิตามินซี วิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 โปแทสเซียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และใยอาหาร นอกจากนี้ยังมีลักษณะสัมผัสที่ดีสำหรับผู้บริโภคอีกทั้งสามารถหาซื้อได้สะดวก (Aneja *et al.*, 2014)

#### 2.4.1 จุลินทรีย์ที่พบในน้ำส้ม

น้ำส้มที่ผลิตไม่ถูกสุขลักษณะ มักพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาจทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ ซึ่งการปนเปื้อนอาจมาจากวัตถุดิบ หากส้มอยู่ในสภาพไม่ดีหรือเน่าเสีย จำนวนจุลินทรีย์จะมีมากขึ้น นอกจากนี้อาจเกิดการปนเปื้อนมาจากน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต อุปกรณ์ภาชนะที่ใช้กรรมวิธีการผลิตที่ไม่ ถูกสุขลักษณะ สุขอนามัยที่ไม่ดีของผู้ผลิต การเก็บรักษาในอุณหภูมิไม่เหมาะสม น้ำส้มจึงมีโอกาสเสียและไม่ปลอดภัยกับผู้บริโภคได้ โดยจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total viable count, TVC) ต้องไม่เกิน  $1.0 \times 10^5$  colony forming units/mL (CFU/mL) (Gulf Standards, 2000)

##### 2.4.1.1 ยีสต์

เนื่องจากน้ำส้มคั้นมีความเป็นกรดต่ำกว่าค่อนข้างต่ำ (ประมาณ 3.0-4.0) จึงเป็นข้อจำกัดของชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถรอดชีวิตหรือเจริญเติบโต ขณะเดียวกันน้ำส้มมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง ดังนั้น ยีสต์จึงมักเป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมเสียของน้ำส้มคั้น การเน่าเสียของน้ำส้มจากยีสต์มักเกิดกลิ่นหมัก มีเมือก หรือฝ้าที่บริเวณผิวหน้า รวมทั้งเกิดความขุ่นและแก๊สได้ ซึ่งการเสื่อมเสียที่เกิดจากยีสต์ในน้ำส้มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C สามารถพบได้ใน 1-2 สัปดาห์ขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อเริ่มต้น (Murdock and Hatcher, 1974) ตัวอย่างยีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Saccharomyces* spp., *Pichia* spp. และ *Torulopsis* spp. เป็นต้น โดยจำนวนยีสต์ที่พบในน้ำส้มต้องไม่เกิน 5,000 CFU/mL (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553)

##### 2.4.1.2 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย

น้ำส้ม เป็นน้ำผลไม้ที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงจึงมักเสียเนื่องจากแบคทีเรีย *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่ทนน้ำตาลและกรดได้ดี จึงมักก่อให้เกิดความเสื่อมเสียในน้ำผลไม้ที่มีความเป็นกรดสูงอย่างน้ำส้มได้ ซึ่งการเสื่อมเสียที่เกิดจาก *Lactobacillus* ในน้ำส้มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C สามารถพบได้ใน 12 วัน - 2 สัปดาห์ และ *Leuconostoc* สามารถพบได้ใน 13 วัน - 5 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อเริ่มต้น (Murdock and Hatcher, 1974) ซึ่งจำนวนที่พบในน้ำส้ม  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL จะทำให้เกิดการหมัก (Ding and Shah, 2008) และต้องมีจำนวนไม่เกิน  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL จึงจะอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Gulf Standards, 2000)



### 2.4.1.3 แบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียบางชนิดเช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. สามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน ภายใต้ภาวะกรด แม้จะหยุดเจริญเติบโตไปแล้วก็ตาม และมักจะพบในน้ำส้มที่ไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน นอกจากนี้ยังตรวจพบ *S. aureus* จากการสุ่มตรวจน้ำส้มที่ขายทั่วไป โดยจำนวนเชื้อก่อโรคที่พบในน้ำส้มต้องไม่เกิน  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL (Gulf Standards, 2000)

## 2.5 การนำสารสกัดไปประยุกต์ในน้ำผลไม้

จากกระแสของการห่วงใยรักษาสุขภาพที่มีมากและการมีวิถีชีวิตที่เร่งรีบ ไม่มีเวลาในการเลือกผลไม้สดมารับประทาน จึงทำให้น้ำผลไม้พร้อมดื่มที่สะดวกต่อการบริโภคได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น ประกอบกับในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidant) ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มได้ เนื่องจากช่วยเพิ่มคุณค่าทางอาหารและยืดอายุการเก็บรักษา โดย Delouee และ Urooj (2007) ศึกษาการใช้สารสกัดจากใบ *Moringa oleifera*, *Morus indica* และ *Mentha spicata* ในน้ำสับปะรด โดยวิเคราะห์การละลายและความเสถียร รวมถึงการทดสอบทางประสาทสัมผัส และพบว่าสารสกัดจาก *Morus indica* และ *Moringa oleifera* มีความเสถียรในน้ำสับปะรดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มากกว่า *Mentha spicata* และเมื่อนำมาทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าสารสกัดจาก *Morus indica* ได้รับความยอมรับมากกว่าสารสกัดจาก *Moringa oleifera* และเมื่อเติมสารสกัดจาก *Morus indica* ความเข้มข้น 0.25% w/v ในน้ำสับปะรด พบว่าน้ำสับปะรดมีอายุการเก็บรักษา 8 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 °C จากผลการวิจัยดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากธรรมชาติสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มได้

## 2.6 การหาสภาวะที่เหมาะสม

การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ วิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) เป็นวิธีการที่รวบรวมเทคนิคทั้งทางด้านคณิตศาสตร์และสถิติมาใช้ในการสร้างตัวแบบ และวิเคราะห์ปัญหาในกรณีที่ผลตอบสนองมีความสัมพันธ์กับปัจจัยหรือตัวแปรอิสระหลายตัวเพื่อหาระดับของปัจจัยที่ทำให้ผลตอบสนองมีค่าที่ดีที่สุด โดยเรียกแผนการทดลองว่าแผนแบบพื้นผิวตอบสนอง (response surface design) โดยขอบเขตที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ คือ ขอบเขตทรงกลม (spherical region) เนื่องจากทำให้แผนแบบพื้นผิวตอบสนองเป็นแผนแบบที่สามารถหมุนได้ (rotatable

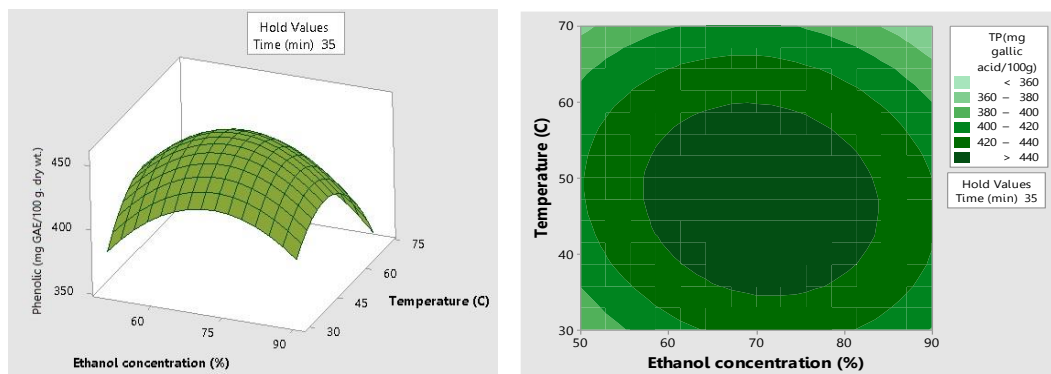
design) และ ความแปรปรวนของค่าทำนายไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อแผนแบบถูกหมุนรอบจุดศูนย์กลาง การนำเสนอแบบพื้นผิวตอบสนอง ต้องมีแผนการทดลองที่เหมาะสม กล่าวคือ มีตัวแปรอิสระ 2 ตัวขึ้นไป และเป็นตัวแปรเชิงปริมาณ นอกจากนี้ต้องมีตัวแปรตาม อย่างน้อย 1 ตัวขึ้นไปและเป็นตัวแปรเชิงปริมาณ ดังนั้นแผนการทดลองที่สามารถสร้างพื้นผิวตอบสนอง ได้ คือ factorial design, mixture design, central composite design (CCD), fractional factorial design (FFD), small composite design (SCD), Box-Behnken design (BBD), uniform shell design (USD) เป็นต้น แต่เนื่องจากในทางปฏิบัติมักไม่ทราบรูปแบบความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตอบสนอง ดังนั้นจึงต้องมีการประมาณรูปแบบความสัมพันธ์ดังกล่าวและพบว่านิยมใช้ตัวแบบกำลังสอง (second order model) เพราะมีความยุ่งยากและซับซ้อนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวแบบอื่นๆ ซึ่งสามารถแสดงตัวแบบกำลังสองได้ดังสมการที่ (1) (วาสิณี ประดับศรี, บุญอ้อม โฉมทิ และ อำไพ ทองธีรภาพ, 2558)

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

โดย	$Y$	คือ	ค่าผลตอบสนอง (ตัวแปรตาม)
	$b_0$	คือ	ค่าสัมประสิทธิ์ของโมเดลทดลอง
	$b_i$	คือ	ค่าสัมประสิทธิ์ของ linear effect
	$b_{ii}$	คือ	ค่าสัมประสิทธิ์ของ quadratic effect
	$b_{ij}$	คือ	ค่าสัมประสิทธิ์ของอิทธิพลร่วมระหว่างตัวแปร
	$X_i, X_j$	คือ	ตัวแปรอิสระ

สามารถพิสูจน์สมการตัวแบบที่สร้างได้ โดยการใช้จุดที่อยู่ในบริเวณช่วงที่เหมาะสมของตัวแปรอิสระทำการทดลองอีกครั้ง แล้ววัดค่าตัวแปรผลตอบสนอง เพื่อทวนสอบกับตัวแปรผลตอบสนองที่หาได้จากสมการ และตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลองถ้าแบบจำลองไม่เหมาะสม ให้เริ่มต้นทดลองเพื่อได้ข้อมูลมาสร้างสมการตัวแบบใหม่

เมื่อทำการประมวลผลทางสถิติจะได้กราฟโครงร่าง (contour plot) และกราฟพื้นผิวตอบสนอง (surface plot) เพื่อช่วยในการประมวลผลระหว่างอิทธิพลร่วม ดังแสดงในรูปที่ 24 เป็นตัวอย่างของการแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรในรูปกราฟิกสามมิติ



รูปที่ 24 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot)



### บทที่ 3

#### การดำเนินงานวิจัย

##### สารเคมี

2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich, USA)  
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) (Sigma Aldrich, USA)  
Aluminium chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) (Ajax Finechem, New Zealand)  
Caffeic acid (Sigma-Aldrich, Germany)  
Ethanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )  
Folin-ciocalteu reagent (Merck, Germany)  
Ferric chloride (POCH S.A., Poland)  
Ferulic acid (Sigma-Aldrich, Germany)  
Gallic acid (Ajax Finechem, Australia)  
Hydrochloric acid (HCl) (QReC, New Zealand)  
Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Fisher Scientific, UK)  
Potassium chloride (KCl) (Ajax Finechem, New Zealand)  
Quercetin (Sigma-Aldrich, Germany)  
Sodium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (Ajax Finechem, New Zealand)  
Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Daejung, Korea)  
Sodium chloride (NaCl) (Loba Chemie, India)  
Sodium hydroxide pellets (NaOH) (QReC, New Zealand)  
Sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) (Ajax Finechem, New Zealand)  
Tartaric acid (QReC, New Zealand)  
Tripyridyltriazine (TPTZ) (Merck, Germany)

##### อาหารเลี้ยงเชื้อ

Baird–Parker Agar (Himedia, India)  
MacConkey Agar (Himedia, India)  
Mueller Hinton Broth (Himedia, India)  
Potato Dextrose Agar (Himedia, India)

Salmonella Shigella Agar (Himedia, India)  
 Lactobacillus MRS Agar (MRS Agar) (Himedia, India)  
 Plate Count Agar (Himedia, India)  
 Lactobacillus MRS Broth (MRS Broth) (Himedia, India)  
 จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ขนาด 15x90 มม. (Himedia, India)

### เครื่องมือ

เครื่อง Autoclave (Tomy SX700, Japan)  
 เครื่อง Centrifuge (Hettich zentrifugen 19, Germany)  
 เครื่อง Chroma Meters (Model CR-400 series, Minolta, Japan)  
 เครื่อง Grinding mill (Lita, Thailand)  
 เครื่อง Hot air oven (Memmert, DO 6062, Germany)  
 เครื่อง Hotplate Stirrer (MS-H280-Pro, U.S.A)  
 เครื่อง pH meter (Mettler toledo, Switzerland)  
 เครื่อง Refractometer (Master-Alpha Series, Atago, USA)  
 เครื่อง Rotary Evaporator (Buchi Rotavapor R-200, U.S.A)  
 เครื่อง Ultrasound Probe (UP400S, Germany)  
 เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10 uv, USA)  
 เครื่อง Vacuum dryer (Model 273660, U.S.A)  
 เครื่อง Vacuum pump (Gast, U.S.A)  
 เครื่อง Vacuum sealer (Multivac, A300/16, Germany)  
 เครื่อง Vortex mixer (CTL, CTL-107, Japan)  
 เครื่อง Water bath (Memmert, WNB 22, Germany)  
 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler, NewClassic MF, Switzerland)  
 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (MS304S, Mettler Toledo, Switzerland)  
 ตู้บ่ม (Heraeus, B5042, Germany)  
 ตู้ปลอดเชื้อ (Model BioUltra4, TelStar, Spain)  
 เต้าไฟฟ้า (Imarflex, IF-404, China)

### การเตรียมตัวอย่างมะเกี๋ยง

มะเกี๋ยงสุกแช่แข็งจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง ถูกขนส่งมายังภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นแบ่งบรรจุแบบสุญญากาศในถุงออลูมิเนียมพอยล์ลามิเนต และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  โดยก่อนใช้ให้ลวกที่อุณหภูมิ  $80^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้มะเกี๋ยงแต่ละผลแยกออกจากกัน จากนั้นแยกส่วนที่เป็นเนื้อและเมล็ดออกจากกัน และทำแห้งส่วนที่เป็นเมล็ดไปโดยใช้เครื่องอบลมร้อน ที่อุณหภูมิ  $45^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีของ พิมพีใจ อาษา (2551) จากนั้นบดเมล็ดที่แห้งจนละเอียดโดยผ่านตะแกรงร่อน 60 mesh sieve และนำไปเก็บในถุงออลูมิเนียมพอยล์ลามิเนตบรรจุแบบภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  โดยดัดแปลงตามวิธีของ Tian และคณะ (2013) และ Wang และคณะ (2008)

### การสกัดโดยใช้วิธีการสกัดแบบแช่ (maceration extraction, ME)

นำผงมะเกี๋ยงที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมาศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ ซึ่งประกอบด้วย 3 ปัจจัยได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล (%) อุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) และเวลา (นาที) ที่ใช้ในการสกัด โดยแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ และออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design, BBD) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้พื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ระดับของปัจจัยต่างๆ ในการสกัดโดยใช้วิธีการสกัดแบบแช่

ปัจจัย	หน่วย	ระดับ		
		-1	0	1
ความเข้มข้นของเอทานอล (ethanol concentration)	%	50	70	90
อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (extraction temperature)	$^{\circ}\text{C}$	30	50	70
เวลาที่ใช้ในการสกัด (extraction time)	นาที	25	35	45

หลังจากการสกัดตามภาวะต่างๆ ข้างต้นแล้วนำภาชนะที่ใส่สารละลายมาทำให้เย็น จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่  $565 \times g$  เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนที่เป็นส่วนใส (supernatant) ไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นระเหยเอทานอลในส่วนที่เป็นของเหลว

ออกภายใต้ภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 °C ใน rotary evaporator และเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ตามวิธีของ Wang และคณะ. (2013)

### การสกัดโดยใช้วิธีการสกัดแบบใช้เครื่องเสียงความถี่สูงช่วย (ultrasound-assisted extraction, UAE)

ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากผงมะเกี๋ยง ซึ่งประกอบด้วย 4 ปัจจัยได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล (%) ความเข้มของแอมพลิจูด (%) อุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาที) ที่ใช้ในการสกัด โดยแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ และออกแบบการทดลองแบบ บ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design, BBD) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้พื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ระดับของปัจจัยต่างๆ ในการสกัดโดยใช้วิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

ปัจจัย	หน่วย	ระดับ		
		-1	0	1
ความเข้มข้นของเอทานอล (ethanol concentration)	%	50	70	90
ความเข้มของแอมพลิจูด (amplitude)	%	30	40	50
อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (extraction temperature)	°C	30	50	70
เวลาที่ใช้ในการสกัด (extraction time)	นาที	25	35	45

หลังจากการสกัดตามภาวะต่างๆ ข้างต้นแล้วนำภาชนะที่ใส่สารละลายมาทำให้เย็น จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 565 x g เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนที่เป็นส่วนใส (supernatant) ไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นระเหยเอทานอลในส่วนที่เป็นของเหลว ออกภายใต้ภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 °C ใน rotary evaporator และเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ตามวิธีของ Wang และคณะ (2013)

### ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ (ME)

วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงในภาวะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ดังนี้

- 3.1.1 ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds) โดย Folin-Ciocalteu colorimetry ตามวิธีของ Waterhouse (2002) (ภาคผนวก ข.3)
  - 3.1.2 ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content) โดย aluminium chloride colorimetry ดัดแปลงตามวิธีของ Maisuthisakul, Suttajit และ Pongsawatmanit (2007) (ภาคผนวก ข.4)
  - 3.1.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยทำปฏิกิริยากับ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ดัดแปลงตามวิธีของ Brand-Williams และคณะ (1995) (ภาคผนวก ค.1)
  - 3.1.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยวิธี ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงตามวิธีของ Benzie และ Strain (1996) (ภาคผนวก ค.2)
- 3.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย (UAE)
- วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงในภาวะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ดังนี้
- 3.2.1 สมบัติต่างๆ ตามข้อ 3.1.1-3.1.4
  - 3.2.2 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum inhibitory concentration (MIC) ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998) (ภาคผนวก ค.1)
  - 3.2.3 ฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum bactericidal concentration (MBC) ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998) (ภาคผนวก ค.2)

### 3.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง

วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากภาวะที่เหมาะสมที่สกัดด้วยวิธี ME และ UAE ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography: HPLC) ดัดแปลงตามวิธีการสกัดของ พิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2547) (ภาคผนวก ค.7-ค.10)



3.4 การศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดมะเขี๋ยงต่อสมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ ของน้ำส้มคั้นสด ระหว่างการเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน

เลือกสารสกัดจากภาวะที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากจากสมบัติการต้านอนุมูลอิสระประกอบกับฤทธิ์ในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ เพื่อใช้เติมลงในน้ำส้มคั้นสด โดยเติมสารสกัดเมล็ดมะเขี๋ยง (1.56 และ 3.125 mg/mL น้ำส้ม) ในน้ำส้มให้ได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 mL

วิเคราะห์สมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ ของน้ำส้มคั้นสดที่เติมสารสกัดเมล็ดมะเขี๋ยง (1.56 และ 3.125 mg/mL) น้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ (80 °C 15 วินาที) และน้ำส้มคั้นสด (ตัวอย่างควบคุม) ระหว่างการเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน โดยวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ทุก 3 วัน ดังนี้

- สมบัติตามข้อ 3.1.1-3.1.4
- ค่าสีด้วยเครื่องวัดสี Chroma Meter (Minolta, Model CR-300 series, Japan) ระบบ CIE LAB แล้ว คำนวณค่าความแตกต่างของสี ( $\Delta E^*$ ) (Total color difference) จากสูตร
 
$$\Delta E^* = [(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2]^{1/2}$$
 โดย กำหนดให้ subscript 1 คือ ค่าสีที่วัดเริ่มต้นในแต่ละตัวอย่าง  
 subscript 2 คือ ค่าสีที่วัดได้ในแต่ละครั้ง
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter (Mettler toledo, Switzerland) (ภาคผนวก ข.2)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total soluble solids) ด้วยเครื่อง Refractometer (Master-Alpha Series, Atago, USA) (ภาคผนวก ข.1)
- ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (total viable count, TVC) ตามวิธีของ AOAC (2005) (ภาคผนวก ค.3)
- ปริมาณยีสต์และรา ตามวิธีของ AOAC (2005) (ภาคผนวก ค.4)
- ปริมาณแลกติกแบคทีเรีย ตามวิธีของ AOAC (2005) (ภาคผนวก ค.5)

3.5 การศึกษาผลของสารสกัดมะเขี๋ยงต่อสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มคั้นสด

ประเมินสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มคั้นสดที่เติมสารสกัดเมล็ดมะเขี๋ยง (1.56 และ 3.125 mg/mL) น้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ (80 °C 15 วินาที) และน้ำส้มคั้นสด (ตัวอย่างควบคุม) ที่มีอุณหภูมิ 4 °C โดยใช้ผู้ทดสอบที่เป็นผู้บริโภคทั่วไปจำนวน 50 คน ในการยอมรับด้าน กลิ่น สี และความชอบ โดยรวม ใช้แบบทดสอบชนิด 9 point-hedonic scale และใช้สเกลแบบ scoring (แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในภาคผนวก จ) โดยกำหนดระดับคะแนนดังนี้

คะแนน 1	เท่ากับ	ไม่ชอบมากที่สุด
คะแนน 2	เท่ากับ	ไม่ชอบมาก
คะแนน 3	เท่ากับ	ไม่ชอบปานกลาง
คะแนน 4	เท่ากับ	ไม่ชอบเล็กน้อย
คะแนน 5	เท่ากับ	เฉยๆ
คะแนน 6	เท่ากับ	ชอบเล็กน้อย
คะแนน 7	เท่ากับ	ชอบปานกลาง
คะแนน 8	เท่ากับ	ชอบมาก
คะแนน 9	เท่ากับ	ชอบมากที่สุด

### 3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

สำหรับการหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงทั้งการสกัดด้วยวิธี UAE และ ME ออกแบบการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Box-Behnken design (BBD) และวิเคราะห์ด้วย response surface methodology (RSM) ซึ่งประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป MINITAB และการนำสารสกัดมาประยุกต์ใช้ในน้ำส้มออกแบบการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) สำหรับการประเมินผลด้านสมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ และออกแบบการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) สำหรับการประเมินผลทางประสาทสัมผัส วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistical Package for Social Sciences) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ (ME)

จากการศึกษาการสกัดสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธี ME ที่ภาวะต่างๆ พบว่า สารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ ปริมาณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP อยู่ในช่วง 361.33-474.44 mg GAE/100 g dry wt., 5.95-13.78 mg QCE/100 g dry wt., 886.32-1591.53 และ 718.61-1302.99 mM trolox/100 g dry wt. ตามลำดับ โดยผลการศึกษาของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ที่ได้แสดงดังต่อไปนี้

##### 4.1.1 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการทดลองพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะแตกต่างกันตามภาวะที่แตกต่างกัน (ความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ และเวลา ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

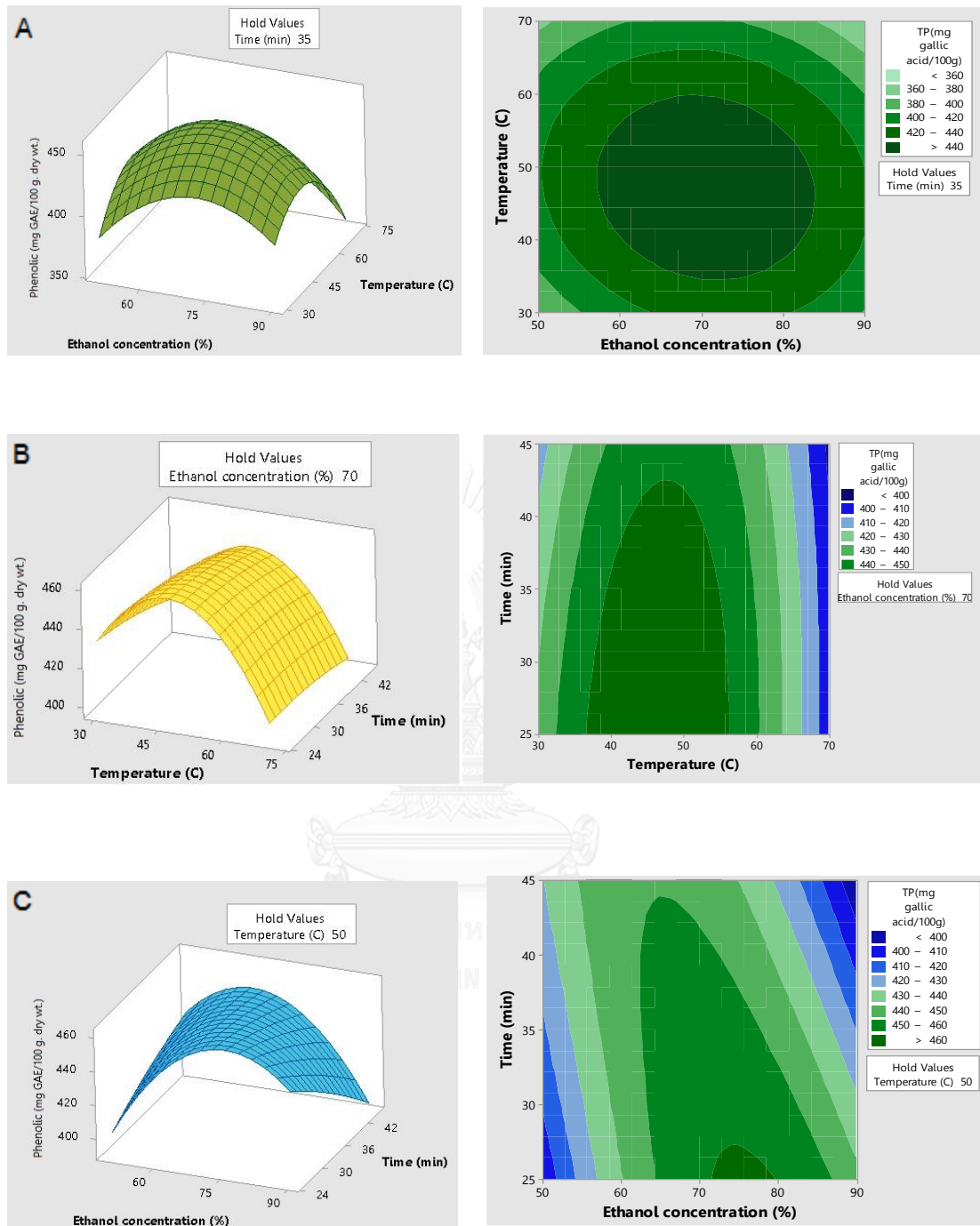
ลำดับที่	ความเข้มข้น ของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิใน การสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ปริมาณประกอบ สารฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/ 100 g dry wt.)
1	50	30	30.50±0.71	35	379.56±12.5005
2	90	30	30.00±0.00	35	391.56±4.23
3	50	70	70.50±0.71	35	382.22±1.02
4	90	70	70.00±0.00	35	361.33±11.72
5	70	30	30.50±0.71	25	400.89±9.58
6	70	70	70.00±0.00	25	448.00±7.51
7	70	30	30.50±0.71	45	424.67±15.07

ตารางที่ 7 (ต่อ) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ลำดับที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิในการสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ปริมาณประกอบสารฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100g)
8	70	70	70.50±0.71	45	392.89±24.35
9	50	50	50.50±0.71	25	435.11±20.03
10	90	50	50.00±0.71	25	397.33±11.57
11	50	50	50.50±0.71	45	421.78±20.24
12	90	50	50.00±0.00	45	395.33±25.96
13	70	50	50.50±0.71	35	445.11±19.16
14	70	50	50.00±0.00	35	474.44±41.05
15	70	50	50.00±0.00	35	451.56±25.67
16	70	50	50.00±0.00	35	453.78±12.15
17	70	50	50.00±0.00	35	451.11±12.33

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เนื่องจากความแตกต่างของภาวะการสกัดในตารางที่ 7 จึงสามารถแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังแสดงในรูปที่ 25



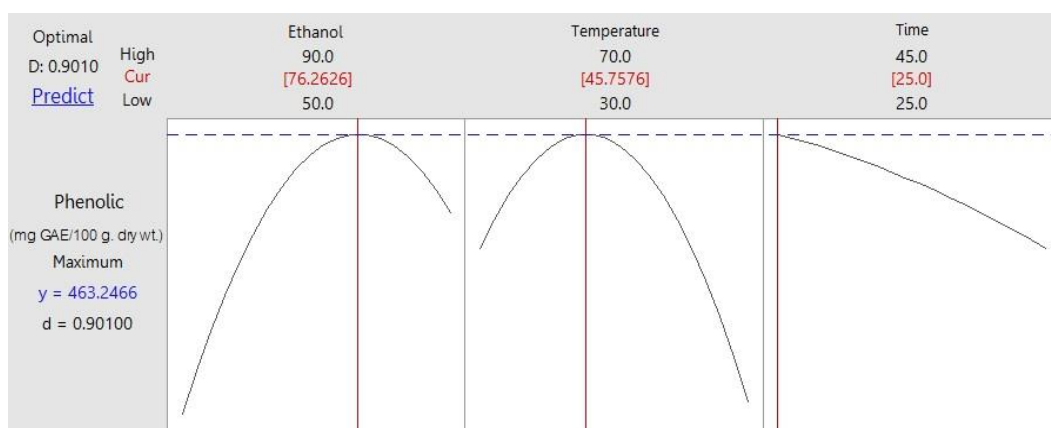
รูปที่ 25 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาที) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที) (C) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

รูปที่ 25 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยกำหนดให้เวลาอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่า สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณสูงในช่วงความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิ 58-83% v/v และ 30-59 °C ตามลำดับ และรูปที่ 25 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาท) โดยกำหนดให้ ความเข้มข้นของเอทานอลอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่า สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีปริมาณ สูงในช่วงอุณหภูมิ 32-59 °C และเวลา 25-43 นาที นอกจากนี้รูปที่ 25(C) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาท) โดยกำหนดให้อุณหภูมิอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษา พบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีปริมาณสูงในช่วงความเข้มข้นของเอทานอล 65-88% v/v และ เวลา 25-27 นาที

เมื่อวิเคราะห์ภาวะที่แตกต่างกันด้วยวิธี RSM ดังรูปที่ 25 สามารถทำนายค่าปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ภาวะต่างๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งพบว่าค่า  $R^2$  มีค่า เท่ากับ 95.48% และเมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) พบว่ามี p-value มีค่าเท่ากับ 0.71 ซึ่งมากกว่า 0.589 (ภาคผนวก ง) นอกจากนี้ผลการทวนสอบสมการทำนายปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบ โดยสุ่มภาวะการสกัดมา ตรวจสอบ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่า ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.1.1 (ภาคผนวก ง) ดังนั้น แสดงถึงสมการที่มีความแม่นยำเพียงพอในการทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดดัง สมการที่ (2)

$$\begin{aligned}
 \text{TP (mg GAE/100 g dry wt. )} = & - 512 + 17.17 \text{ Ethanol concentration (\%)} \\
 & + 10.46 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)} + 7.31 \text{ Time (min)} \\
 & - 0.0904 \text{ Ethanol concentration (\%)*Ethanol concentration (\%)} \\
 & - 0.1009 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)*Temperature (}^\circ\text{C)} \\
 & - 0.0243 \text{ Time (min)*Time (min)} \\
 & - 0.0206 \text{ Ethanol concentration (\%)*Temperature (}^\circ\text{C)} \\
 & - 0.0986 \text{ Ethanol concentration (\%)*Time (min)} \\
 & + 0.0142 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)*Time (min)}
 \end{aligned} \tag{2}$$

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองในรูปที่ 25 พบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเมล็ดมะเกี๋ยงคือ ความเข้มข้นเอทานอล 76% v/v อุณหภูมิ 46 °C และเวลา 25 นาที ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 463.24 mg GAE/100 g dry wt. ดังแสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 26 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยที่ใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเอทานอล และอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น แต่จะลดลงหลังจากความเข้มข้นเอทานอลมากกว่า 76% v/v และอุณหภูมิสูงกว่า 46 °C และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น

#### 4.1.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

จากการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ในการสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ พบว่าเมื่อสกัดด้วยภาวะที่ต่างกัน (ความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ และเวลา) ส่งผลให้สารสกัดมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 8

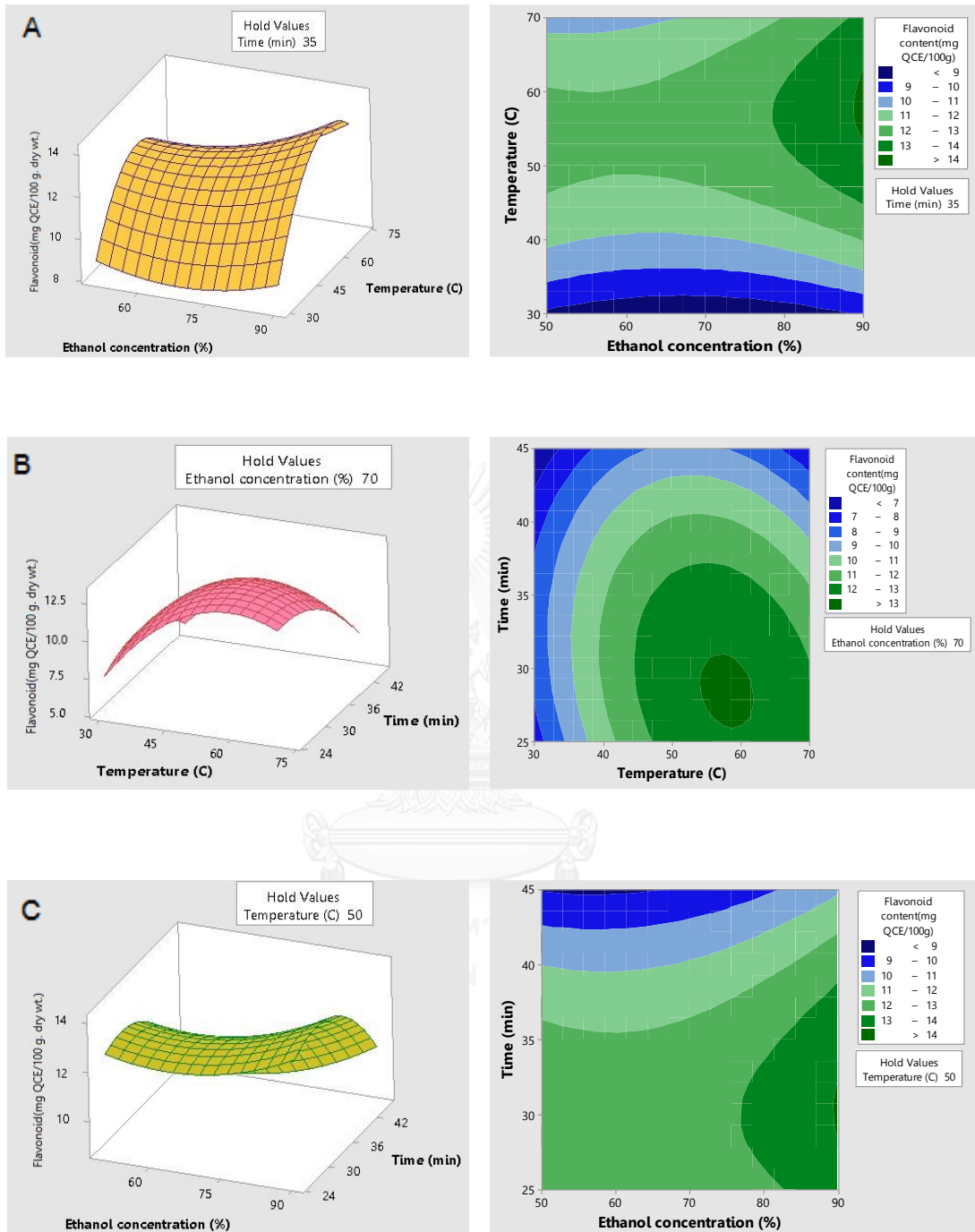
ตารางที่ 8 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ที่ภาวะต่างๆ ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ลำดับ ที่	ความเข้มข้น ของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิใน		ปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์ (mg QCE/ 100 g dry wt.)
			การสกัด (°C)	เวลา (นาที)	
1	50	30	30.50±0.71	35	8.32±1.08
2	90	30	30.00±0.00	35	9.47±0.25
3	50	70	70.50±0.71	35	10.23±1.06
4	90	70	70.00±0.00	35	13.78±0.62
5	70	30	30.50±0.71	25	12.84±0.19
6	70	70	70.00±0.00	25	12.08±0.50
7	70	30	30.50±0.71	45	9.56±0.25
8	70	70	70.50±0.71	45	10.58±0.68
9	50	50	50.50±0.71	25	7.77±0.62
10	90	50	50.00±0.71	25	12.28±1.68
11	50	50	50.50±0.71	45	5.95±0.93
12	90	50	50.00±0.00	45	6.86±0.81
13	70	50	50.50±0.71	35	11.84±0.56
14	70	50	50.00±0.00	35	12.26±0.81
15	70	50	50.00±0.00	35	13.16±0.68
16	70	50	50.00±0.00	35	10.88±1.06
17	70	50	50.00±0.00	35	13.25±0.19

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากความแตกต่างของภาวะการสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (ตารางที่ 8) สามารถแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังแสดงในรูปที่ 27





รูปที่ 27 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาที) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที) (C) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

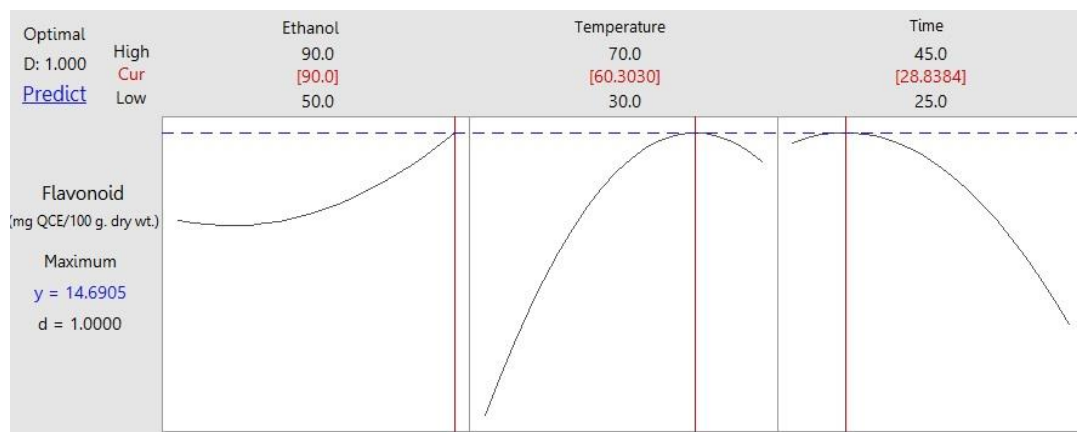
รูปที่ 27 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ โดยกำหนดให้เวลาอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่า สารฟลาโวนอยด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณสูงในช่วงความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิ 89-90% v/v และ 52-61 °C ตามลำดับ และรูปที่ 27 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาที) โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอลอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่า สารฟลาโวนอยด์มีปริมาณสูงในช่วงอุณหภูมิ 55-62 °C และเวลา 26-31 นาที นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที) (รูปที่ 27 C) โดยกำหนดให้อุณหภูมิอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าสารฟลาโวนอยด์มีปริมาณสูงในช่วงความเข้มข้นของเอทานอล 89-90% v/v และเวลา 28-32 นาที

จากการวิเคราะห์ภาวะที่แตกต่างกันด้วยวิธี RSM ดังรูปที่ 27 สามารถทำนายค่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ภาวะต่างๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งพบว่าค่า R<sup>2</sup> มีค่าเท่ากับ 93.82% และเมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) พบว่า p-value มีค่าเท่ากับ 0.609 ซึ่งมากกว่า 0.05 (ภาคผนวก ง) นอกจากนี้ผลการทวนสอบสมการทำนายปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ โดยสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.1.2 (ภาคผนวก ง) ดังนั้นสมการที่ได้จึงมีความแม่นยำเพียงพอในการทำนายปริมาณสารฟลาโวนอยด์ดังแสดงในสมการที่ (3)

$$\begin{aligned} \text{Flavonoid content (mg QCE/100 g dry wt.)} = & -13.6 - 0.333 \text{ Ethanol concentration (\%)} \\ & + 0.762 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)} + 1.041 \text{ Time (min)} \\ & + 0.00183 \text{ Ethanol concentration(\%)*Ethanol concentration(\%)} \\ & - 0.00637 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)*Temperature (}^\circ\text{C)} \\ & - 0.01505 \text{ Time (min)*Time (min)} \\ & + 0.00150 \text{ Ethanol concentration (\%)*Temperature (}^\circ\text{C)} \\ & + 0.00110 \text{ Ethanol concentration (\%)*Time (min)} \\ & - 0.00451 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)*Time (min)} \end{aligned} \quad (3)$$

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังรูปที่ 27 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟลาโวนอยด์จากเมล็ดมะเกี๋ยงคือ ความ

เข้มข้นเอทานอล 90% v/v อุณหภูมิ 60 °C และเวลา 29 นาที โดยมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 14.69 mg QCE/100 g dry wt. ดังแสดงในรูปที่ 28



รูปที่ 28 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยที่ใช้ในการสกัดสารฟลาโวนอยด์จากเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ และเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสารฟลาโวนอยด์จะมีปริมาณมากที่สุดที่ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดคือ 90% v/v แต่จะมีแนวโน้มลดลงหลังเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 60 °C และเวลานานกว่า 29 นาที

#### 4.1.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

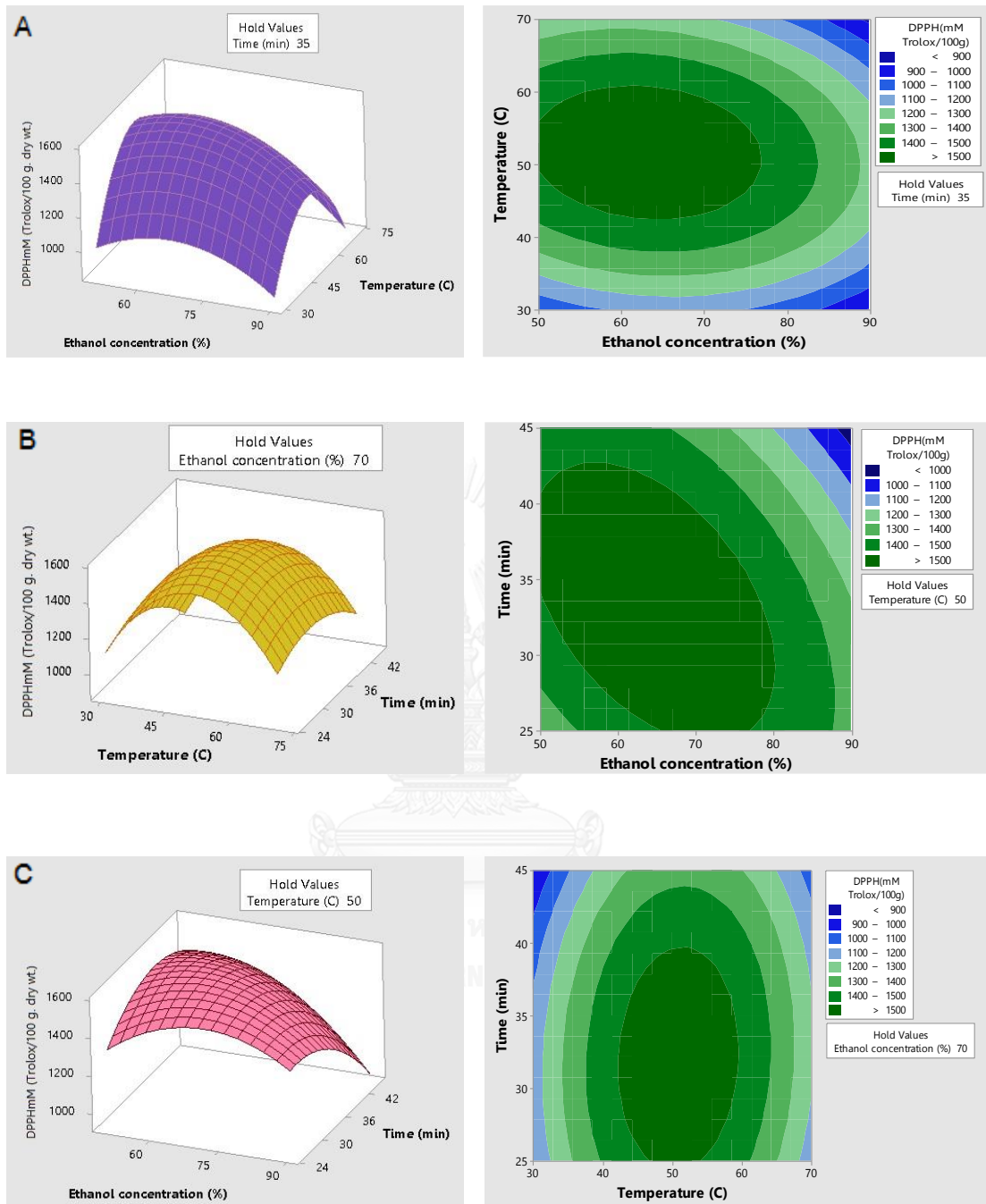
จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดที่ภาวะแตกต่างกัน (ความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ และเวลา) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ลำดับที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิในการสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.)
1	50	30	30.50±0.71	35	994.65±3.66
2	90	30	30.00±0.00	35	886.32±16.97
3	50	70	70.50±0.71	35	1219.65±3.94
4	90	70	70.00±0.00	35	893.61±6.10
5	70	30	30.50±0.71	25	1343.26±11.71
6	70	70	70.00±0.00	25	1372.78±44.50
7	70	30	30.50±0.71	45	1434.24±10.12
8	70	70	70.50±0.71	45	927.29±12.28
9	50	50	50.50±0.71	25	1104.38±94.38
10	90	50	50.00±0.71	25	973.47±11.52
11	50	50	50.50±0.71	45	985.97±13.75
12	90	50	50.00±0.00	45	1044.65±4.21
13	70	50	50.50±0.71	35	1548.13±14.77
14	70	50	50.00±0.00	35	1581.11±10.49
15	70	50	50.00±0.00	35	1591.53±2.41
16	70	50	50.00±0.00	35	1537.71±10.97
17	70	50	50.00±0.00	35	1543.27±13.23

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากความแตกต่างของภาวะการสกัดต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดังแสดงในตารางที่ 9 สามารถแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังแสดงในรูปที่ 29



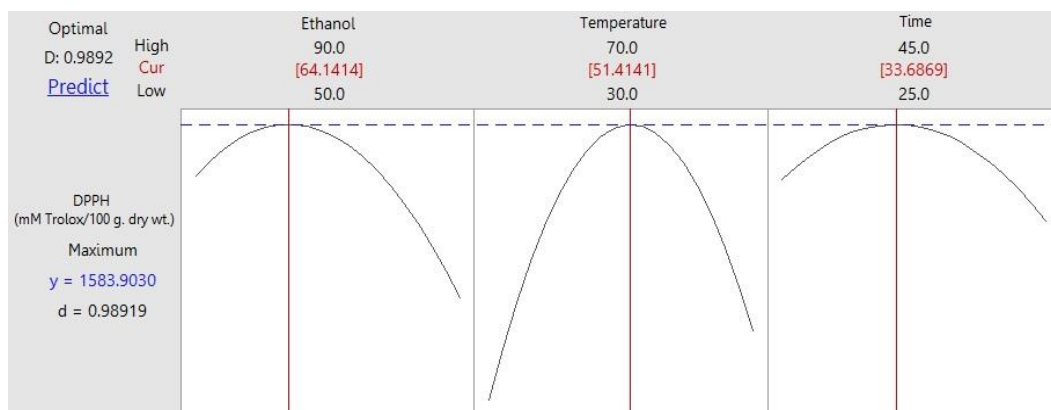
รูปที่ 29 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาที) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที) (C) ต่อต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

รูปที่ 29 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยกำหนดให้เวลาอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณสูงในช่วงความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิ 89-90% v/v และ 52-61 °C ตามลำดับ และรูปที่ 29 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาที) โดยกำหนดให้ ความเข้มข้นของเอทานอลอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีปริมาณสูงในช่วงอุณหภูมิ 55-62 °C และเวลา 26-31 นาที นอกจากนี้เมื่อพิจารณา ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที) โดยให้อุณหภูมิอยู่ที่ระดับกลาง (รูปที่ 29 C) พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีปริมาณสูงในช่วงความเข้มข้นของ เอทานอล 89-90% v/v และเวลา 28-32 นาที

จากการวิเคราะห์ภาวะที่แตกต่างกันด้วยวิธี RSM ดังแสดงในรูปที่ 29 สามารถทำนายค่าฤทธิ์ การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ภาวะต่างๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งพบว่ามีค่า R<sup>2</sup> มี ค่าเท่ากับ 99.53% เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) พบว่า p-value มี ค่าเท่ากับ 0.295 ซึ่งมากกว่า 0.05 (ภาคผนวก ง) นอกจากนี้ผลการทวนสอบสมการทำนายฤทธิ์การ ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดเมล็ดมะเขียงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ โดยสุ่มภาวะการ สกัดมาตรวจสอบ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ได้จากการทำนายและการทดลองมี ค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.1.3 (ภาคผนวก ง) ดังนั้นจึงมีความแม่นยำมากเพียงพอในการทำนายค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดังแสดง ในสมการที่ (4)

$$\begin{aligned}
 \text{DPPH (mM trolox/100 g dry wt.)} = & -5774 + 83.69 \text{ Ethanol concentration (\%)} \\
 & + 104.90 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)} + 117.6 \text{ Time (min)} \\
 & - 0.4223 \text{ Ethanol concentration (\%)*Ethanol concentration (\%)} \\
 & - 0.9822 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)*Temperature (}^\circ\text{C)} \\
 & - 1.220 \text{ Time (min)*Time (min)} \\
 & - 0.1361 \text{ Ethanol concentration (\%)*Temperature (}^\circ\text{C)} \\
 & - 0.6706 \text{ Ethanol concentration (\%)*Time (min)} \\
 & + 0.1454 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)*Time (min)}
 \end{aligned}
 \tag{4}$$

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยใช้กราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังแสดงในรูปที่ 29 พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงคือ ความเข้มข้นเอทานอล 64% v/v อุณหภูมิ 51 °C และเวลา 34 นาที โดยมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 1583.90 mM trolox/100 g dry wt. ดังแสดงในรูปที่ 30



รูปที่ 30 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีแนวโน้มเพิ่ม เมื่อความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ และเวลาเพิ่มขึ้น และมีแนวโน้มลดลงหลังจากความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า 60% v/v อุณหภูมิสูงกว่า 51 °C และเวลานานกว่า 37 นาที

#### 4.1.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

จากการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ในการสกัดต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดที่ภาวะแตกต่างกัน (ความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ และเวลา) ส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่าแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 10

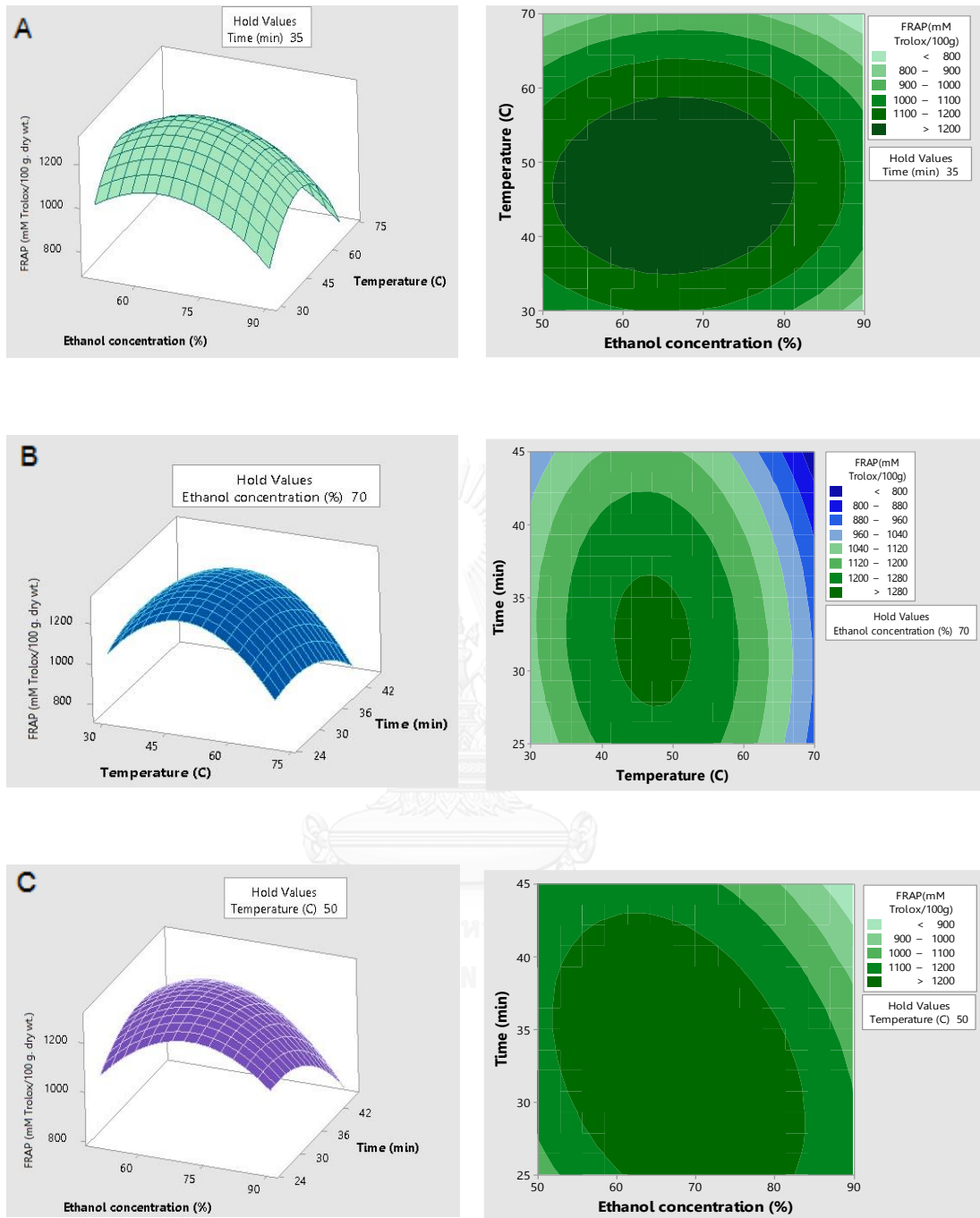
ตารางที่ 10 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ลำดับที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิในการสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.)
1	50	30	30.50±0.71	35	1007.50±74.75
2	90	30	30.00±0.00	35	815.14±77.00
3	50	70	70.50±0.71	35	838.75±84.82
4	90	70	70.00±0.00	35	718.61±3.35
5	70	30	30.50±0.71	25	1060.28±62.62
6	70	70	70.00±0.00	25	1153.68±38.71
7	70	30	30.50±0.71	45	1059.93±51.98
8	70	70	70.50±0.71	45	804.72±52.17
9	50	50	50.50±0.71	25	1023.13±36.81
10	90	50	50.00±0.71	25	791.18±11.85
11	50	50	50.50±0.71	45	1015.14±123.80
12	90	50	50.00±0.00	45	753.68±23.23
13	70	50	50.50±0.71	35	1242.92±8.53
14	70	50	50.00±0.00	35	1291.18±30.48
15	70	50	50.00±0.00	35	1292.22±40.75
16	70	50	50.00±0.00	35	1293.26±52.14
17	70	50	50.00±0.00	35	1302.99±6.10

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากความแตกต่างของภาวะการสกัดต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ดังแสดงในตารางที่ 10 สามารถแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังแสดงในรูปที่ 31





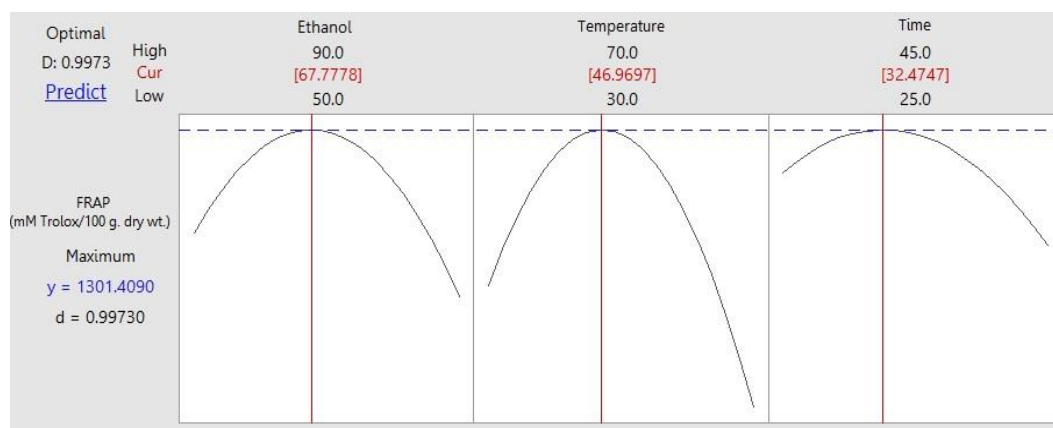
รูปที่ 31 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาที) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที) (C) ต่อต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

รูปที่ 31 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยกำหนดให้เวลาอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณสูงในช่วงความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิ 51-81% v/v และ 36-58 °C ตามลำดับ และรูปที่ 31 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาที) โดยกำหนดให้ ความเข้มข้นของเอทานอลอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีปริมาณสูงในช่วงอุณหภูมิ 42-52 °C และเวลา 27-36 นาที นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที) โดยให้อุณหภูมิอยู่ที่ระดับกลาง (รูปที่ 31 C) ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีปริมาณสูงในช่วงความเข้มข้นของเอทานอล 52-82% v/v และเวลา 25-43 นาที

จากการวิเคราะห์ภาวะที่แตกต่างกันด้วยวิธี RSM ดังแสดงในรูปที่ 31 สามารถทำนายค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ที่ภาวะต่างๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งพบว่าค่า R<sup>2</sup> มีค่าเท่ากับ 98.07% เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) พบว่า p-value มีค่าเท่ากับ 0.053 ซึ่งมากกว่า 0.05 (ภาคผนวก ง) นอกจากนี้ผลการทวนสอบสมการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.1.4 (ภาคผนวก ง) ดังนั้นสมการดังกล่าวจึงมีความแม่นยำมากเพียงพอในการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ดังแสดงในสมการที่ (5)

$$\begin{aligned}
 \text{FRAP (mM trolox/100 g dry wt.)} = & -4196 + 69.31 \text{ Ethanol concentration (\%)} \\
 & + 65.54 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)} + 98.9 \text{ Time (min)} \\
 & - 0.4234 \text{ Ethanol concentration (\%)*Ethanol concentration (\%)} \\
 & - 0.6754 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)*Temperature (}^\circ\text{C)} \\
 & - 0.955 \text{ Time (min)*Time (min)} \\
 & + 0.0451 \text{ Ethanol concentration (\%)*Temperature (}^\circ\text{C)} \\
 & - 0.436 \text{ Ethanol concentration (\%)*Time (min)} \\
 & - 0.152 \text{ Temperature (}^\circ\text{C)*Time (min)}
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

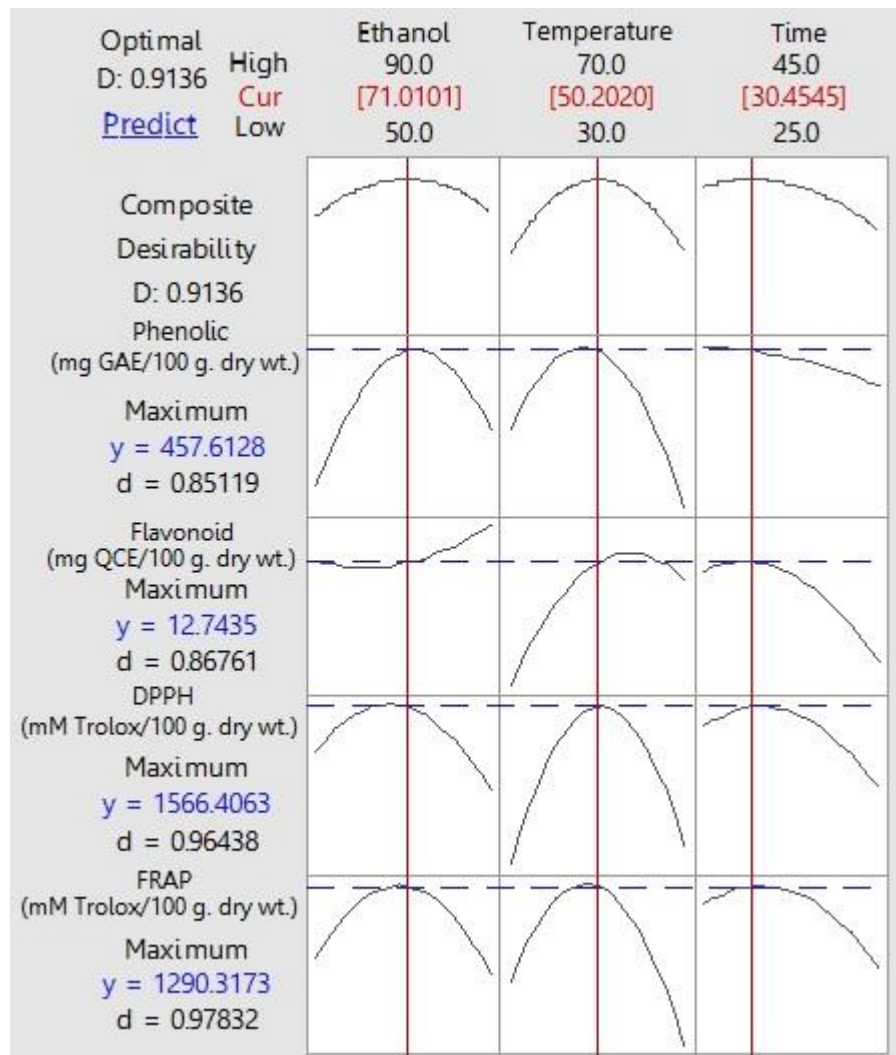
จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยใช้กราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังแสดงในรูปที่ 31 พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงคือ ความเข้มข้นเอทานอล 68% v/v อุณหภูมิ 47 °C และเวลา 32 นาที ซึ่งมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 1301.40 mM trolox/100 g dry wt. ดังแสดงในรูปที่ 32



รูปที่ 32 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ และเวลาที่เพิ่มขึ้น และจะลดลงหลังจากความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า 68% v/v อุณหภูมิสูงกว่า 47 °C และเวลานานกว่า 32 นาที

เมื่อพิจารณารูปที่ 26, 28, 30 และ 32 ร่วมกันพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงโดยใช้วิธีการแช่คือ ความเข้มข้นเอทานอล 71% v/v อุณหภูมิ 50 °C และเวลา 30 นาที โดยสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะนี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 457.61 mg GAE/100 g dry wt. และ 12.74 mg QCE/100 g dry wt. ตามลำดับ และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 1566.41 และ 1290.32 mM trolox/100 g dry wt. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 33



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 33 ภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆ ต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

## 4.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย (UAE)

จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธี UAE ที่ภาวะต่างๆ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิธี FRAP มีค่าอยู่ในช่วง 264.22-586.67 mg GAE/100 g dry wt., 9.88-19.94 mg QCE/100 g dry wt., 965.14-1771.04 และ 1442.92-2300.21 mM trolox/100 g dry wt. ตามลำดับ โดยผลการศึกษาของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ที่ได้แสดงดังต่อไปนี้

### 4.2.1 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการศึกษาผลของภาวะต่างๆ ในการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าปริมาณฟีนอลิกมีค่าแตกต่างกันตามภาวะที่แตกต่างกัน (ความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของแอมพลิจูด) ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

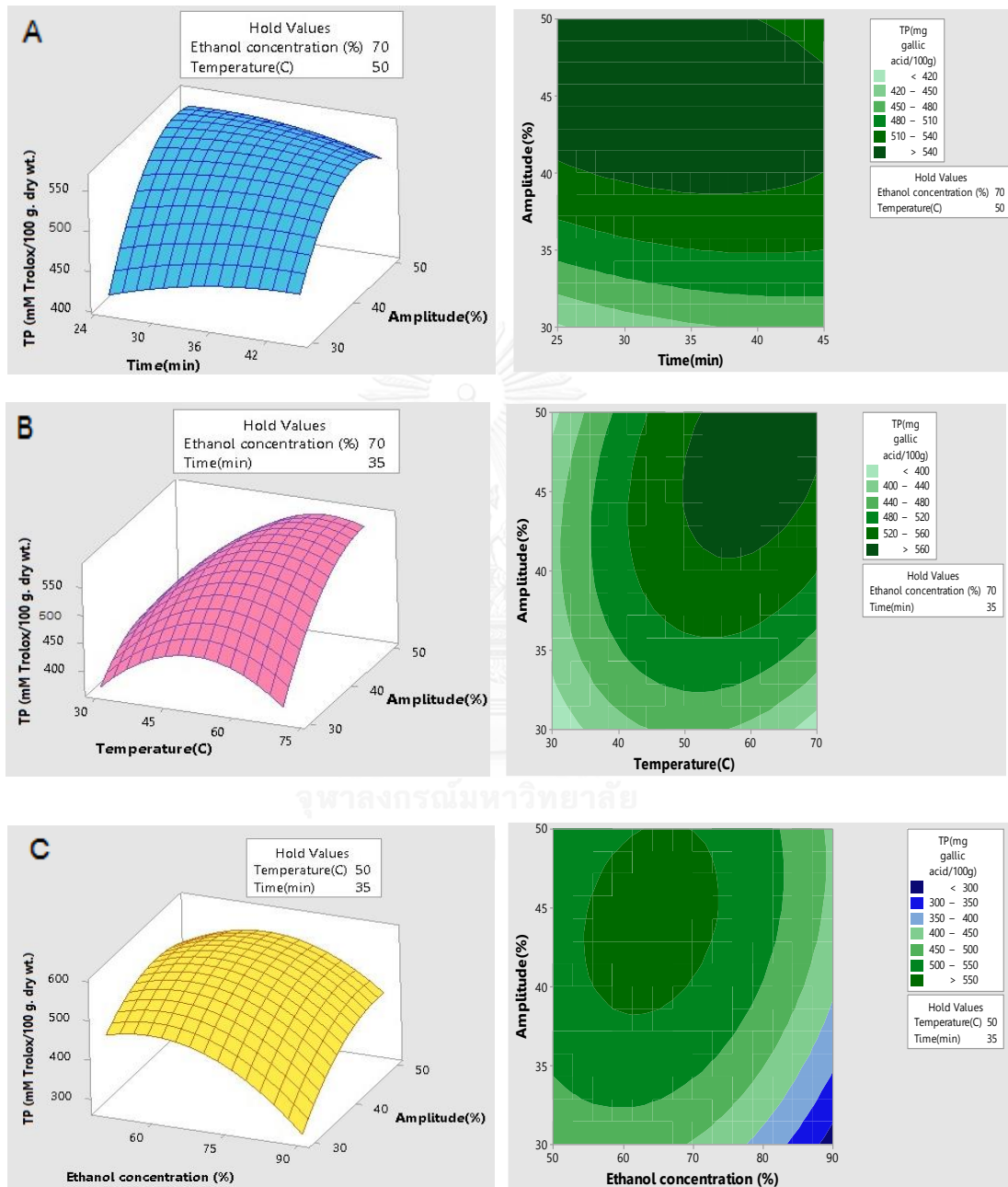
ลำดับที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิในการสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.)
1	50	30	36.00±1.41	35	40	408.22±7.67
2	90	30	33.50±2.12	35	40	278.44±8.28
3	50	70	76.50±2.12	35	40	480.89±5.00
4	90	70	72.50±0.71	35	40	407.11±2.34
5	70	50	53.50±0.71	25	30	467.11±13.00
6	70	50	57.00±1.41	45	30	452.67±15.14
7	70	50	54.50±0.71	25	50	554.00±1.33
8	70	50	59.00±1.41	45	50	473.78±15.78
9	50	50	55.50±0.71	35	30	442.22±14.24

ตารางที่ 11 (ต่อ) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

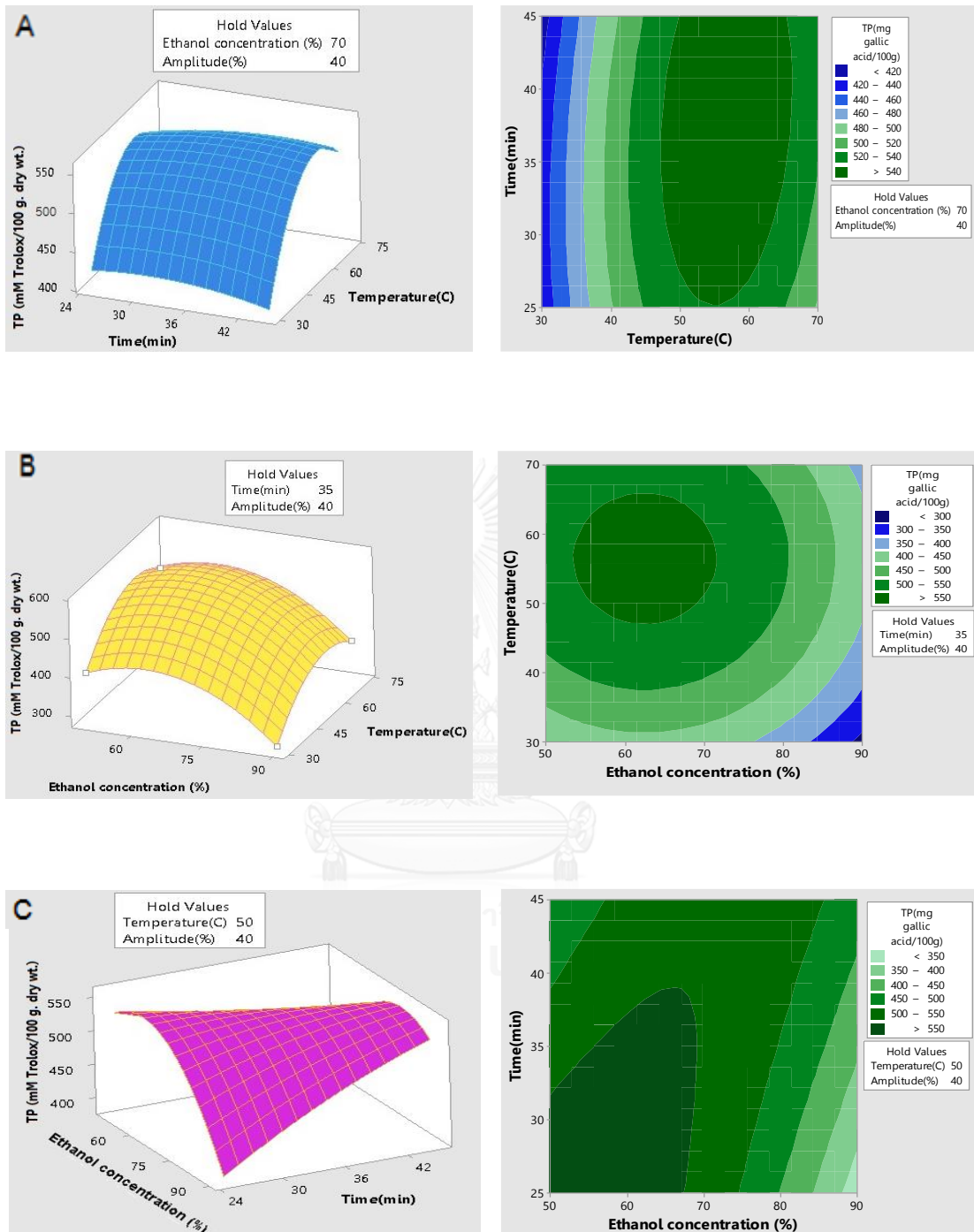
ลำดับที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิในการสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt )
10	90	50	52.50±0.71	35	30	264.22±12.33
11	50	50	59.50±0.71	35	50	529.56±11.59
12	90	50	56.50±0.71	35	50	470.89±14.99
13	70	30	39.00±1.41	25	40	454.67±7.05
14	70	70	74.50±0.71	25	40	469.56±15.41
15	70	30	38.00±0.00	45	40	454.44±12.69
16	70	70	74.50±0.71	45	40	510.00±19.00
17	50	50	54.50±0.71	25	40	570.44±15.00
18	90	50	52.50±0.71	25	40	288.89±13.35
19	50	50	59.50±0.71	45	40	469.11±22.74
20	90	50	58.00±0.00	45	40	474.00±10.39
21	70	30	38.00±0.00	35	30	331.78±14.33
22	70	70	75.00±0.00	35	30	395.33±14.89
23	70	30	37.50±0.71	35	50	354.67±15.93
24	70	70	77.50±0.71	35	50	586.67±7.86
25	70	50	57.50±0.71	35	40	585.56±3.67
26	70	50	60.00±2.83	35	40	532.89±14.67
27	70	50	59.00±1.41	35	40	505.56±10.84
28	70	50	60.00±0.00	35	40	551.56±14.91
29	70	50	59.00±1.41	35	40	562.67±8.08

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เนื่องจากความแตกต่างของภาวะการสกัดที่แสดงในตารางที่ 11 จึงสามารถแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังแสดงในรูปที่ 34 และ 35



รูปที่ 34 อิทธิพลของเวลา (นาที) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) (A), อุณหภูมิ (°C) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) (C) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย



รูปที่ 35 อิทธิพลของอุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาที) (A), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และ อุณหภูมิ (°C) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที) (C) ต่อปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเข็งด้วยวิธีการสกัดแบบใช้ คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย



รูปที่ 34 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (นาทีก) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) อยู่ในระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของแอมพลิจูดที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่ามากในช่วงความเข้มข้นของแอมพลิจูด 40-50% และรูปที่ 34 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอล และเวลาอยู่ในระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของแอมพลิจูดและอุณหภูมิเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่ามากในช่วงความเข้มข้นของแอมพลิจูด 42-50% และอุณหภูมิช่วง  $50-70^{\circ}\text{C}$  นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) โดยกำหนดให้เวลาและอุณหภูมิอยู่ระดับกลาง ดังแสดงในรูปที่ 34 (C) พบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีปริมาณมากที่ความเข้มข้นของเอทานอล และความเข้มข้นของแอมพลิจูดในช่วง 55-72% v/v และ 42-50% ตามลำดับ

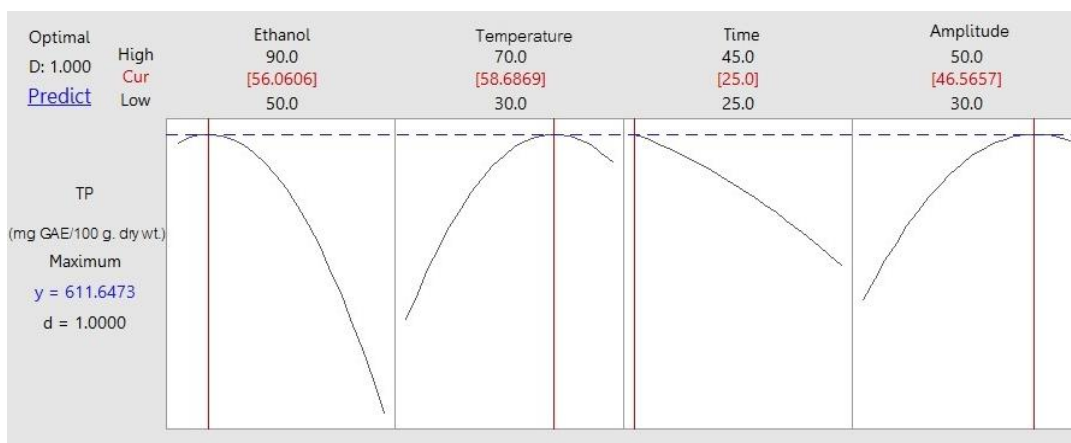
รูปที่ 35 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) และเวลา (นาทีก) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอลและแอมพลิจูดอยู่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าสูงในช่วงอุณหภูมิ  $48-65^{\circ}\text{C}$  และรูปที่ 35 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) โดยกำหนดความเข้มข้นของแอมพลิจูดและเวลาอยู่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าสูงในช่วงอุณหภูมิและความเข้มข้นของเอทานอลในช่วง  $48-65^{\circ}\text{C}$  และ 55-72% v/v ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาทีก) โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของแอมพลิจูดและอุณหภูมิอยู่ระดับกลาง ดังแสดงในรูปที่ 35 (C) พบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าสูงในช่วงความเข้มข้นของเอทานอลและเวลา 50-70% v/v และ 25-38 นาที ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ภาวะที่แตกต่างกันด้วยวิธี RSM ดังรูปที่ 34 และ 35 สามารถทำนายค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ภาวะต่างๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งพบว่า  $R^2$  (multiple correlation coefficient) มีค่าเท่ากับ 90.62% และเมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) พบว่า p-value มีค่าเท่ากับ 0.31 ซึ่งมากกว่า 0.05 (ภาคผนวก ง) นอกจากนี้ผลการทวนสอบสมการทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อน

ไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.2.1 (ภาคผนวก ง) ดังนั้นสมการที่ได้มีความแม่นยำเพียงพอในการทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดดังแสดงในสมการที่ (6)

$$\begin{aligned}
 \text{TP (mg GAE/100 g dry wt.)} = & -354 + 6.35 \text{ Ethanol concentration(\%)} \\
 & + 10.55 \text{ Temperature(}^\circ\text{C)} \\
 & - 13.7 \text{ Time(min)} + 29.6 \text{ Amplitude(\%)} \\
 & - 0.1988 \text{ Ethanol concentration (\%)*Ethanol concentration (\%)} \\
 & - 0.1839 \text{ Temperature(}^\circ\text{C)} * \text{Temperature(}^\circ\text{C)} \\
 & - 0.102 \text{ Time(min)*Time(min)} \\
 & - 0.497 \text{ Amplitude(\%)*Amplitude(\%)} \\
 & + 0.3581 \text{ Ethanol concentration (\%)*Time(min)} \\
 & + 0.1492 \text{ Ethanol concentration (\%)*Amplitude(\%)} \\
 & + 0.0508 \text{ Temperature(C)*Time(min)} \\
 & + 0.2106 \text{ Temperature(C)*Amplitude(\%)} \\
 & - 0.164 \text{ Time(min)*Amplitude(\%)} \quad (6)
 \end{aligned}$$

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองในรูปที่ 34 และ 35 พบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเมล็ดมะเกี๋ยงคือ ความเข้มข้นเอทานอล 56% v/v อุณหภูมิ 59 °C เวลา 25 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 47% ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 611.65 mg GAE/100 g dry wt. แสดงดังรูปที่ 36



**รูปที่ 36** จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยที่ใช้ในการสกัดต่อสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ และความเข้มข้นของแอมพลิจูดเพิ่มขึ้น และลดลงเมื่อความเข้มข้นเอทานอลมากกว่า 56% v/v อุณหภูมิสูงกว่า 59 °C และความเข้มข้นของแอมพลิจูดมากกว่า 47% ในขณะที่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลง

#### 4.2.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

จากการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ในการสกัดด้วยวิธี UAE ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์มีค่าแตกต่างกันตามภาวะที่แตกต่างกัน (ความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของแอมพลิจูด) ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่  
ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

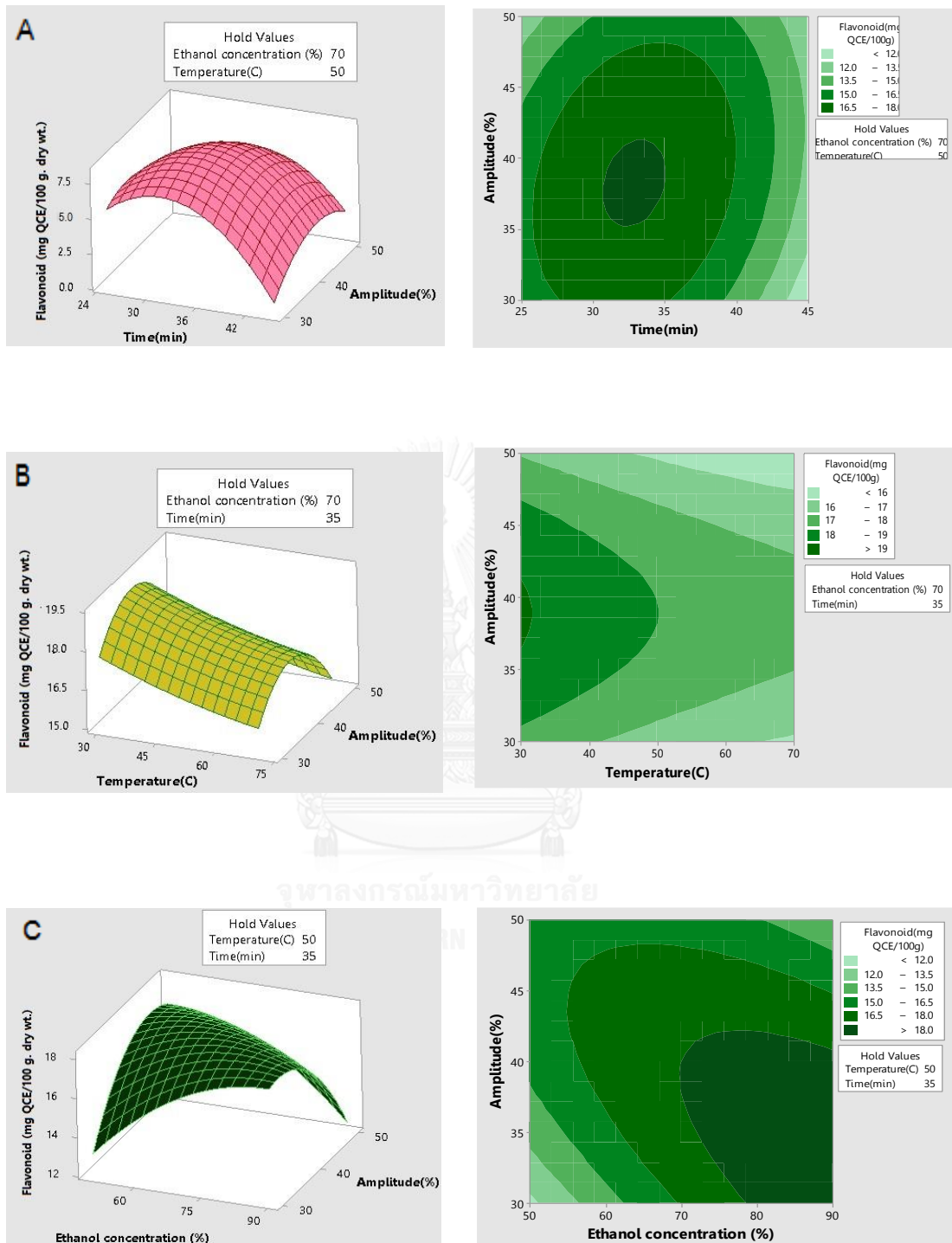
ลำดับ ที่	ความ เข้มข้นของ เอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิใน การสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น ของแอมพลี จูด (%)	ปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.)
1	50	30	36.00±1.41	35	40	15.59±1.08
2	90	30	33.50±2.12	35	40	19.47±0.62
3	50	70	76.50±2.12	35	40	14.27±0.74
4	90	70	72.50±0.71	35	40	16.60±0.31
5	70	50	53.50±0.71	25	30	14.66±0.06
6	70	50	57.00±1.41	45	30	9.88±0.747
7	70	50	54.50±0.71	25	50	12.37±0.06
8	70	50	59.00±1.41	45	50	12.17±0.87
9	50	50	55.50±0.71	35	30	12.87±1.62
10	90	50	52.50±0.71	35	30	19.94±0.62
11	50	50	59.50±0.71	35	50	15.42±1.12
12	90	50	56.50±0.71	35	50	13.14±1.06
13	70	30	39.00±1.41	25	40	16.63±3.36
14	70	70	74.50±0.71	25	40	16.33±2.05
15	70	30	38.00±0.00	45	40	15.07±0.81
16	70	70	74.50±0.71	45	40	12.22±0.50
17	50	50	54.50±0.71	25	40	10.61±0.50
18	90	50	52.50±0.71	25	40	18.59±1.31
19	50	50	59.50±0.71	45	40	13.31±0.93
20	90	50	58.00±0.00	45	40	11.55±0.68
21	70	30	38.00±0.00	35	30	17.56±0.06
22	70	70	75.00±0.00	35	30	15.77±0.19
23	70	30	37.50±0.71	35	50	17.33±0.62

ตารางที่ 12 (ต่อ) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

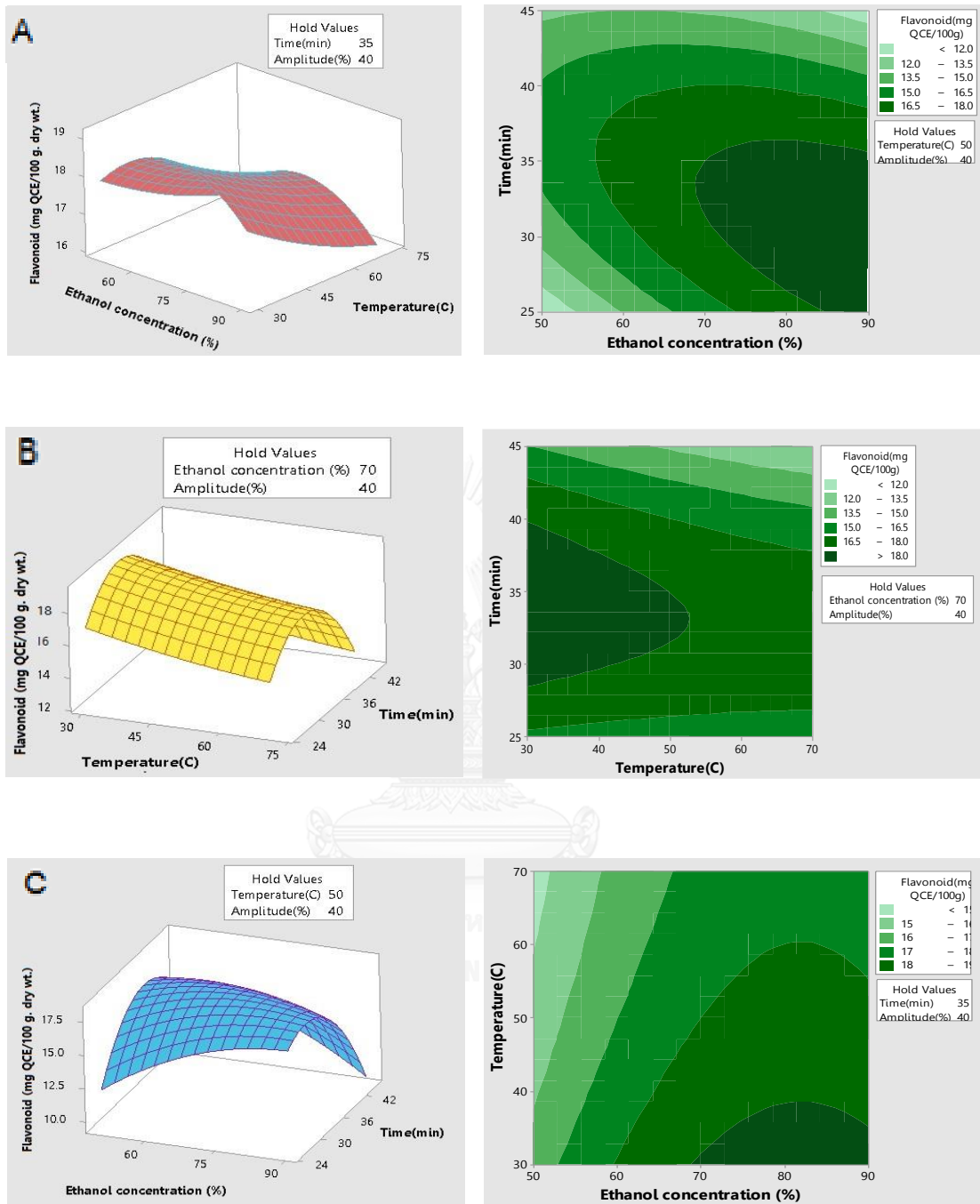
ลำดับ ที่	ความ เข้มข้นของ เอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิใน การสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น ของแอมพลี จูด (%)	ปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.)
24	70	70	77.50±0.71	35	50	15.57±0.06
25	70	50	57.50±0.71	35	40	17.62±1.62
26	70	50	60.00±2.83	35	40	18.59±1.62
27	70	50	59.00±1.41	35	40	18.33±0.62
28	70	50	60.00±0.00	35	40	17.95±2.12
29	70	50	59.00±1.41	35	40	17.48±0.81

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากความแตกต่างของภาวะการสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ดังแสดงในตารางที่ 12 สามารถแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังแสดงในรูปที่ 37 และ 38



รูปที่ 37 อิทธิพลของเวลา (นาที) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) (A), อุณหภูมิ (°C) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) (C) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเขียงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย



รูปที่ 38 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (A), อุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาทื) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาทื) (C) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

รูปที่ 37 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (นาที่) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) อยู่ในระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของแอมพลิจูดที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยจะมีปริมาณมากในช่วงความเข้มข้นของแอมพลิจูด 26-41% และเวลา 21-25 นาที และรูปที่ 37 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอล และเวลาอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของแอมพลิจูดและอุณหภูมิเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีค่ามากในช่วงความเข้มข้นของแอมพลิจูด 37-41% และอุณหภูมิช่วง  $30-31^{\circ}\text{C}$  นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) โดยกำหนดให้เวลาและอุณหภูมิอยู่ที่ระดับกลาง ดังแสดงในรูปที่ 37 (C) พบว่าปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์มีค่ามากที่สุดที่ความเข้มข้นของเอทานอล และความเข้มข้นของแอมพลิจูดในช่วง 70-90% v/v และ 20-43% ตามลำดับ

รูปที่ 38 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) โดยกำหนดความเข้มข้นของแอมพลิจูดและเวลาอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีค่าสูงในช่วงอุณหภูมิและความเข้มข้นของเอทานอลในช่วง  $25-36^{\circ}\text{C}$  และ 55-72% v/v ตามลำดับ และรูปที่ 38 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) และเวลา (นาที่) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอลและแอมพลิจูดอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีปริมาณสูงในช่วงอุณหภูมิ  $30-52^{\circ}\text{C}$  และเวลา 28-40 นาที นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที่) โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของแอมพลิจูดและอุณหภูมิอยู่ที่ระดับกลาง ดังแสดงในรูปที่ 38 (C) พบว่าสาร ฟลาโวนอยด์มีปริมาณสูงในช่วงความเข้มข้นของเอทานอลและเวลา 70-90% v/v และ 20-35 นาที ตามลำดับ

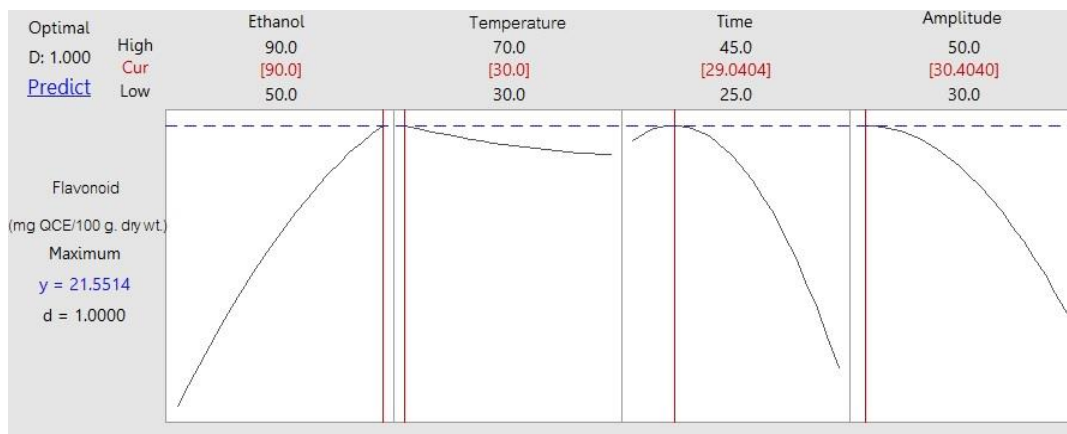
จากการวิเคราะห์ภาวะที่แตกต่างกันด้วยวิธี RSM ดังรูปที่ 37 และ 38 สามารถทำนายปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ภาวะต่างๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ โดยพบว่า  $R^2$  มีค่าเท่ากับ 96.21% และเมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) พบว่า p-value มีค่าเท่ากับ 0.15 ซึ่งมากกว่า 0.05 (ภาคผนวก ง) นอกจากนี้ผลการทวนสอบสมการทำนายปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเมล็ดมะเขี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าปริมาณปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.2.2



(ภาคผนวก ง) ดัชนีสมการที่ได้จึงมีความแม่นยำเพียงพอในการทำนายปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่แสดงในสมการที่ (7)

$$\begin{aligned}
 \text{Flavonoid (mg QCE/100 g dry wt.)} = & -115.1 + 1.384 \text{Ethanol concentration (\%)} \\
 & + 0.018 \text{Temperature (}^{\circ}\text{C)} + 2.840 \text{Time (min)} \\
 & + 1.804 \text{Amplitude (\%)} \\
 & - 0.002992 \text{Ethanol concentration (\%)} * \text{Ethanol concentration (\%)} \\
 & + 0.000464 \text{Temperature (}^{\circ}\text{C)} * \text{Temperature (}^{\circ}\text{C)} \\
 & - 0.03444 \text{Time (min)} * \text{Time (min)} \\
 & - 0.01783 \text{Amplitude (\%)} * \text{Amplitude (\%)} \\
 & - 0.01217 \text{Ethanol concentration (\%)} * \text{Time (min)} \\
 & - 0.01170 \text{Ethanol concentration (\%)} * \text{Amplitude (\%)} \\
 & - 0.00319 \text{Temperature (}^{\circ}\text{C)} * \text{Time (min)} \\
 & + 0.00004 \text{Temperature (}^{\circ}\text{C)} * \text{Amplitude (\%)} \\
 & + 0.01144 \text{Time (min)} * \text{Amplitude (\%)} \quad (7)
 \end{aligned}$$

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังรูปที่ 37 และ 38 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟลาโวนอยด์จากเมล็ดมะเกี๋ยงคือ ความเข้มข้นเอทานอล 90% v/v อุณหภูมิ 30 °C เวลา 29 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 30% โดยมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 21.55 mg QCE/100 g dry wt. ดังแสดงในรูปที่ 39 และพบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอทานอล เวลา และความเข้มข้นของแอมพลิจูดที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีค่ามากที่สุดที่ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดคือ 90% v/v แต่จะลดลงหลังจากเวลา 29 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูดมากกว่า 30% นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น โดยงานวิจัยนี้พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 30 °C



รูปที่ 39 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยที่ใช้ในการสกัดต่อสารฟลาโวนอยด์จากเมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

#### 4.2.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.)

จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธี UAE พบว่าที่ภาวะแตกต่างกัน (ความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของแอมพลิจูด) ส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงมีค่าแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

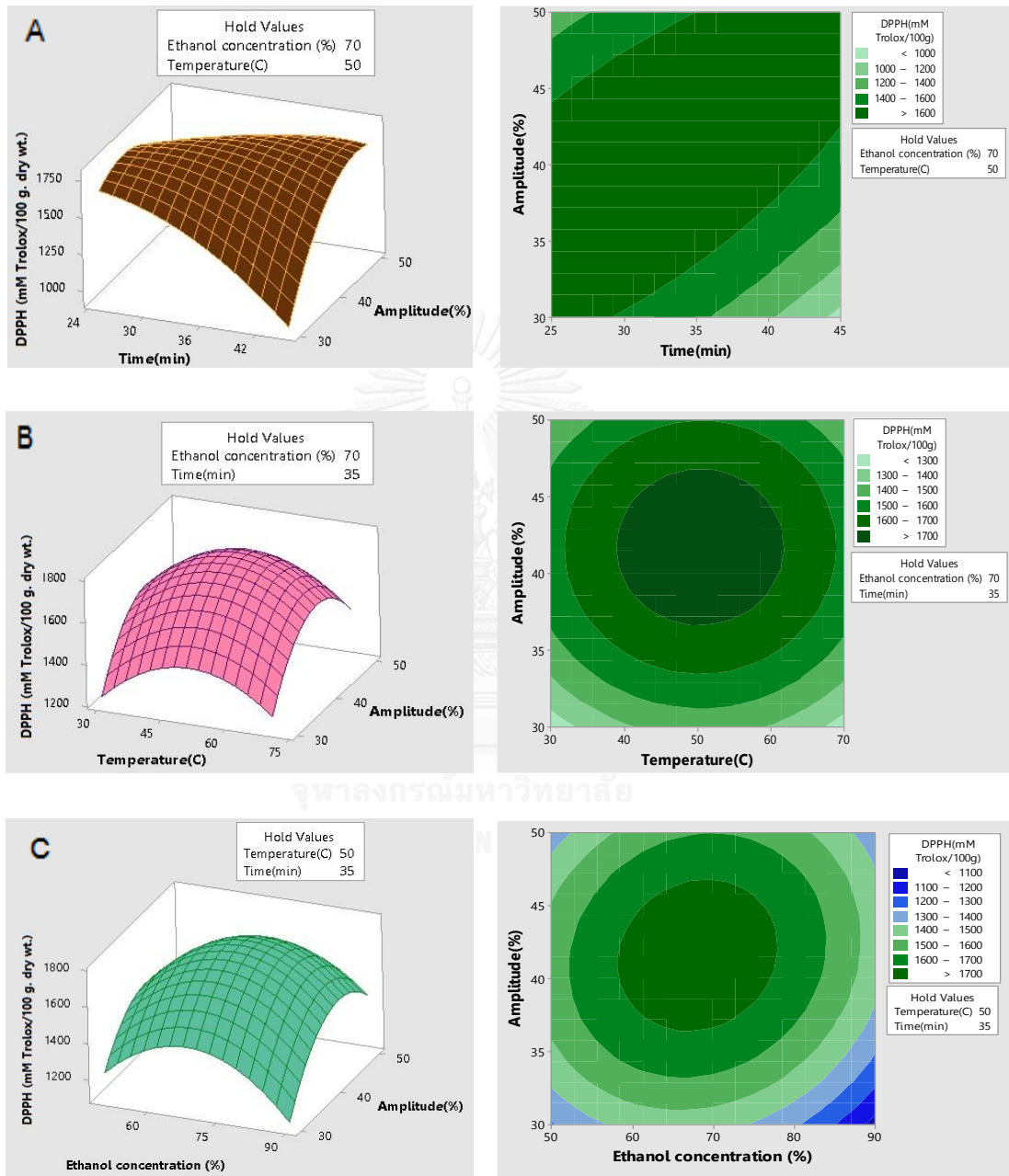
ลำดับที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิในการสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.)
1	50	30	36.00±1.41	35	40	1366.18±24.08
2	90	30	33.50±2.12	35	40	1270.69±11.14
3	50	70	76.50±2.12	35	40	1317.92±10.05
4	90	70	72.50±0.71	35	40	1256.46±9.39
5	70	50	53.50±0.71	25	30	1672.43±9.39
6	70	50	57.00±1.41	45	30	965.14±47.24

ตารางที่ 13 (ต่อ) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

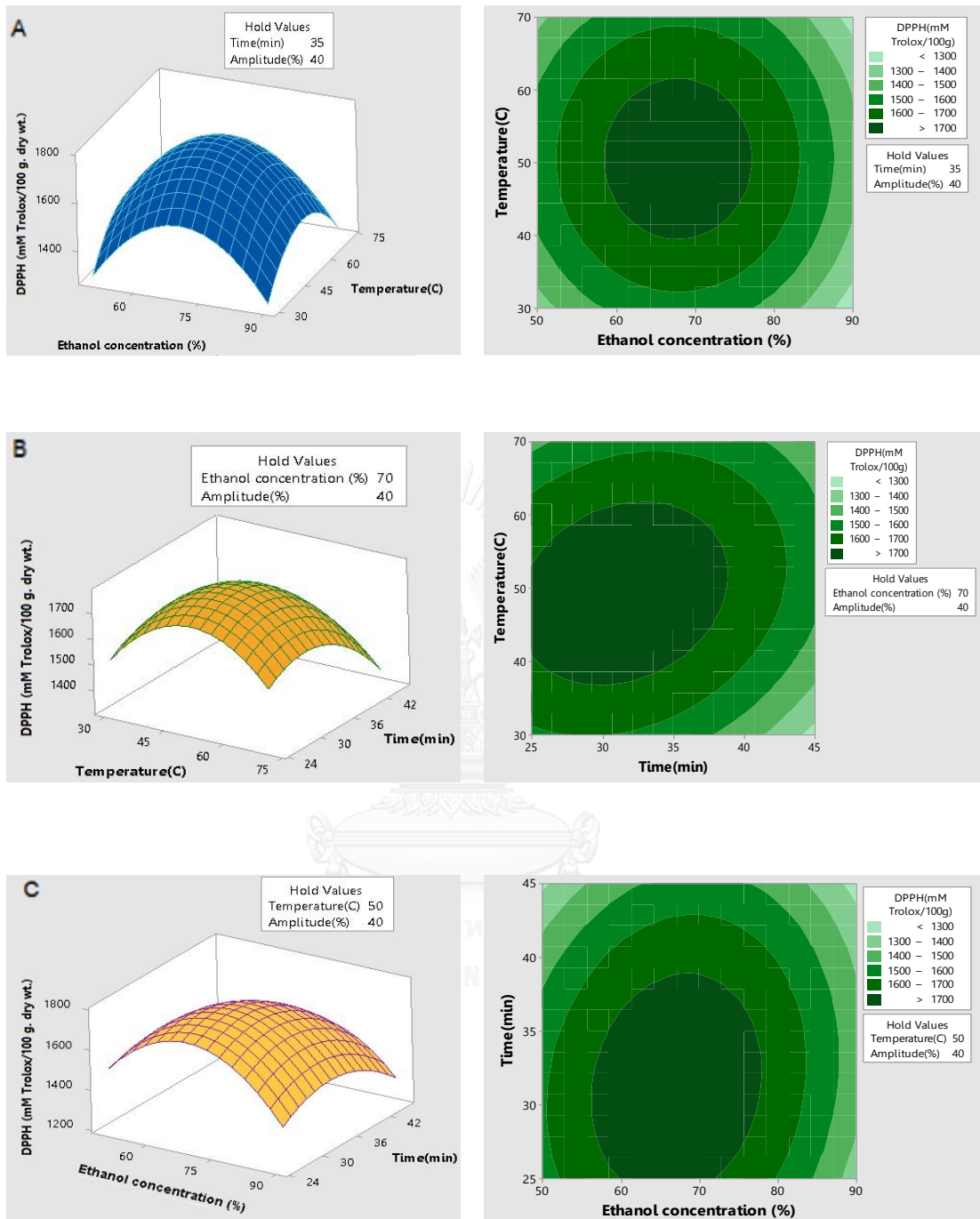
ลำดับที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิในการสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.)
7	70	50	54.50±0.71	25	50	1271.04±19.79
8	70	50	59.00±1.41	45	50	1625.56±6.70
9	50	50	55.50±0.71	35	30	1275.56±24.07
10	90	50	52.50±0.71	35	30	1033.54±16.76
11	50	50	59.50±0.71	35	50	1369.65±15.18
12	90	50	56.50±0.71	35	50	1348.47±33.42
13	70	30	39.00±1.41	25	40	1551.25±14.47
14	70	70	74.50±0.71	25	40	1479.03±14.44
15	70	30	38.00±0.00	45	40	1261.15±66.39
16	70	70	74.50±0.71	45	40	1448.47±31.82
17	50	50	54.50±0.71	25	40	1582.85±12.16
18	90	50	52.50±0.71	25	40	1352.99±12.73
19	50	50	59.50±0.71	45	40	1270.00±14.69
20	90	50	58.00±0.00	45	40	1233.89±5.34
21	70	30	38.00±0.00	35	30	1247.08±9.55
22	70	70	75.00±0.00	35	30	1270.00±22.53
23	70	30	37.50±0.71	35	50	1385.63±9.26
24	70	70	77.50±0.71	35	50	1413.40±13.43
25	70	50	57.50±0.71	35	40	1771.042±13.54
26	70	50	60.00±2.83	35	40	1741.88±13.05
27	70	50	59.00±1.41	35	40	1761.32±10.43
28	70	50	60.00±0.00	35	40	1758.89±14.89
29	70	50	59.00±1.41	35	40	1738.75±15.42

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากความแตกต่างของภาวะการสกัดต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดังแสดงในตารางที่ 13 สามารถแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังแสดงในรูปที่ 40 และ 41



รูปที่ 40 อิทธิพลของเวลา (นาที) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) (A), อุณหภูมิ (°C) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) (C) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย



รูปที่ 41 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาที) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที) (C) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

รูปที่ 40 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (นาทึ) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) อยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าความเข้มของแอมพลิจูดที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่เวลาเพิ่มขึ้นฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีแนวโน้มลดลง และรูปที่ 40 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอล และเวลาอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าความเข้มของแอมพลิจูดและอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยจะมีปริมาณมากในช่วงความเข้มของแอมพลิจูด 37-46% และอุณหภูมิช่วง  $40-60^{\circ}\text{C}$  นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) โดยกำหนดให้เวลาและอุณหภูมิอยู่ที่ระดับกลาง ดังแสดงในรูปที่ 40 (C) พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่ามากที่สุดที่ความเข้มข้นของเอทานอล และความเข้มของแอมพลิจูดในช่วง 60-79% v/v และ 27-46% ตามลำดับ

รูปที่ 41 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) โดยกำหนดความเข้มของแอมพลิจูดและเวลาอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่าสูงในช่วงอุณหภูมิและความเข้มข้นของเอทานอลในช่วง  $40-60^{\circ}\text{C}$  และ 60-78% v/v ตามลำดับ และรูปที่ 41 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) และเวลา (นาทึ) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอลและแอมพลิจูดอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีปริมาณสูงในช่วงอุณหภูมิ  $38-60^{\circ}\text{C}$  และเวลา 25-38 นาที นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาทึ) โดยกำหนดให้ความเข้มของแอมพลิจูดและอุณหภูมิอยู่ที่ระดับกลาง ดังแสดงในรูปที่ 41 (C) พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่าสูงในช่วงความเข้มข้นของเอทานอลและเวลา 58-78% v/v และ 25-37 นาที ตามลำดับ

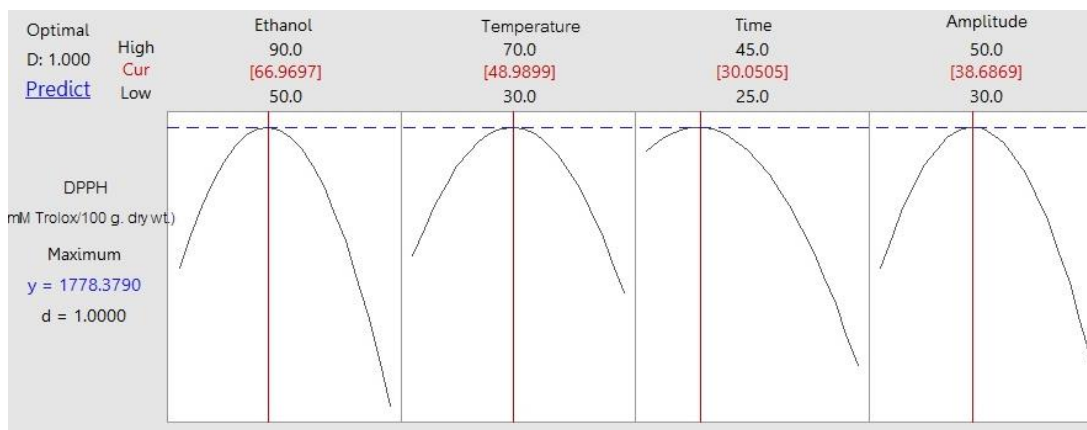
จากการวิเคราะห์ภาวะที่แตกต่างกันด้วยวิธี RSM ดังรูปที่ 40 และ 41 สามารถทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ภาวะต่างๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งพบว่า  $R^2$  มีค่าเท่ากับ 99.10% และเมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) พบว่า p-value มีค่าเท่ากับ 0.558 ซึ่งมากกว่า 0.05 (ภาคผนวก ง) นอกจากนี้ผลการทวนสอบสมการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่

ง.2.3 (ภาคผนวก ง) ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำเพียงพอต่อการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดังแสดงในสมการที่ (8)

$$\begin{aligned}
 \text{DPPH (mM trolox/100 g dry wt.)} = & -2199 + 69.30 \text{ Ethanol concentration (\%)} \\
 & +35.91 \text{ Temperature (}^{\circ}\text{C)} \\
 & -55.8 \text{ Time (min)} + 85.0 \text{ Amplitude(\%)} \\
 & -0.6548 \text{ Ethanol concentration(\%)*Ethanol concentration (\%)} \\
 & -0.4707 \text{ Temperature (}^{\circ}\text{C)*Temperature (}^{\circ}\text{C)} \\
 & -1.325 \text{ Time (min)*Time (min)} \\
 & -2.370 \text{ Amplitude (\%)*Amplitude(\%)} \\
 & +0.2422 \text{ Ethanol concentration (\%)*Time (min)} \\
 & +0.2760 \text{ Ethanol concentration (\%)*Amplitude (\%)} \\
 & +0.3244 \text{ Temperature (}^{\circ}\text{C)*Time (min)} \\
 & +0.0061 \text{ Temperature (}^{\circ}\text{C)*Amplitude (\%)} \\
 & +2.655 \text{ Time (min)*Amplitude (\%)} \quad (8)
 \end{aligned}$$

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยใช้กราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังรูปที่ 40 และ 41 พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงคือ ความเข้มข้นเอทานอล 67% v/v อุณหภูมิ 49 °C เวลา 30 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 38% โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่าเท่ากับ 1778.38 mM trolox/100 g dry wt. ดังแสดงในรูปที่ 42

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของแอมพลิจูดเพิ่มขึ้น และจะลดลงหลังจากความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่า 67% v/v อุณหภูมิมากกว่า 49 °C เวลานานกว่า 30 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูดมากกว่า 38%



รูปที่ 42 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

#### 4.2.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธี UAE พบว่าที่ภาวะแตกต่างกันส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง (ความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของแอมพลิจูด) มีค่าแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

ลำดับที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิในการสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.)
1	50	30	36.00±1.41	35	40	1900.90±52.93
2	90	30	33.50±2.12	35	40	1894.65±101.05
3	50	70	76.50±2.12	35	40	2107.50±152.77
4	90	70	72.50±0.71	35	40	2025.21±77.65
5	70	50	53.50±0.71	25	30	2233.19±61.70
6	70	50	57.00±1.41	45	30	1106.81±12.5001

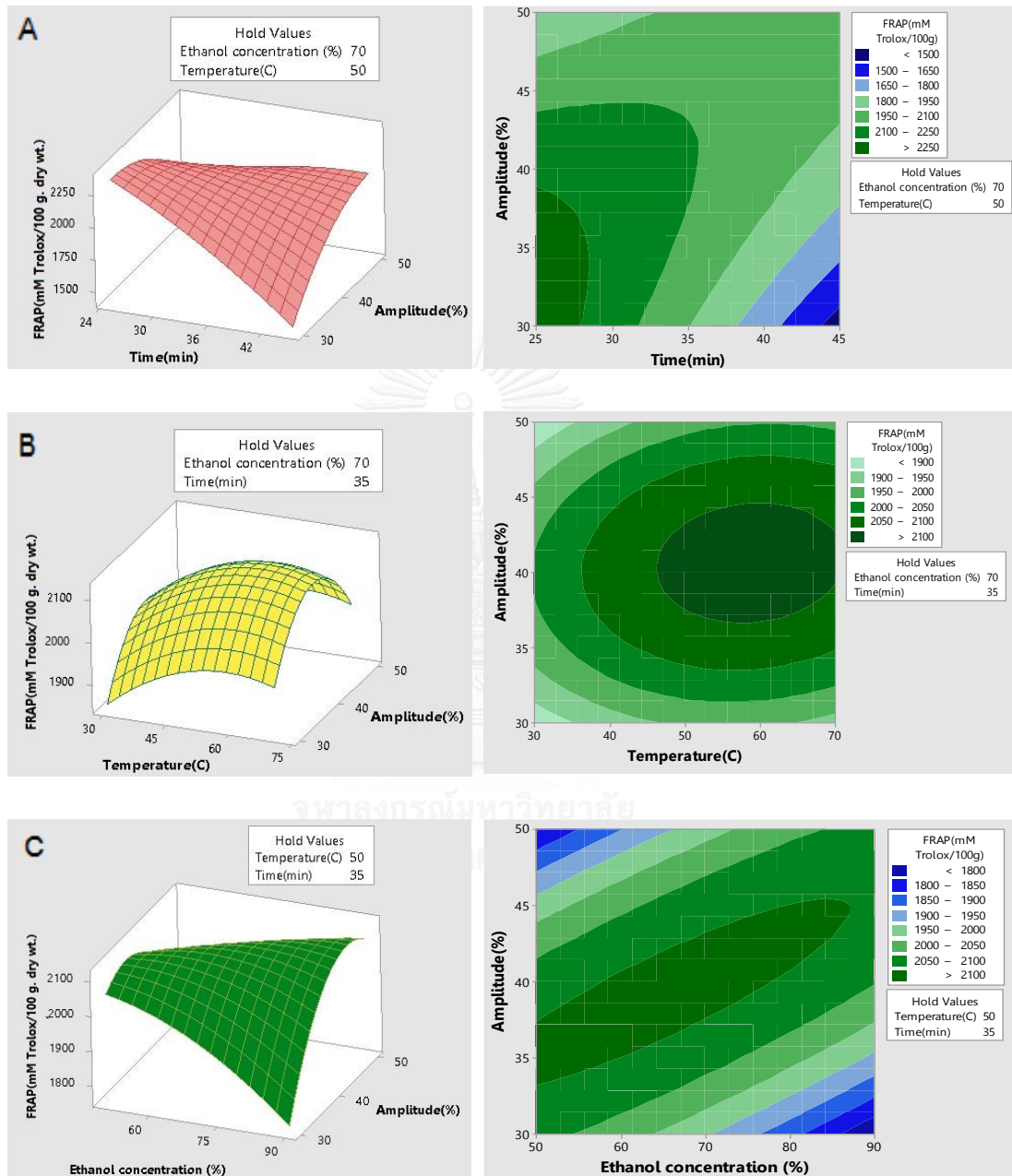


ตารางที่ 14 (ต่อ) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะต่างๆ ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

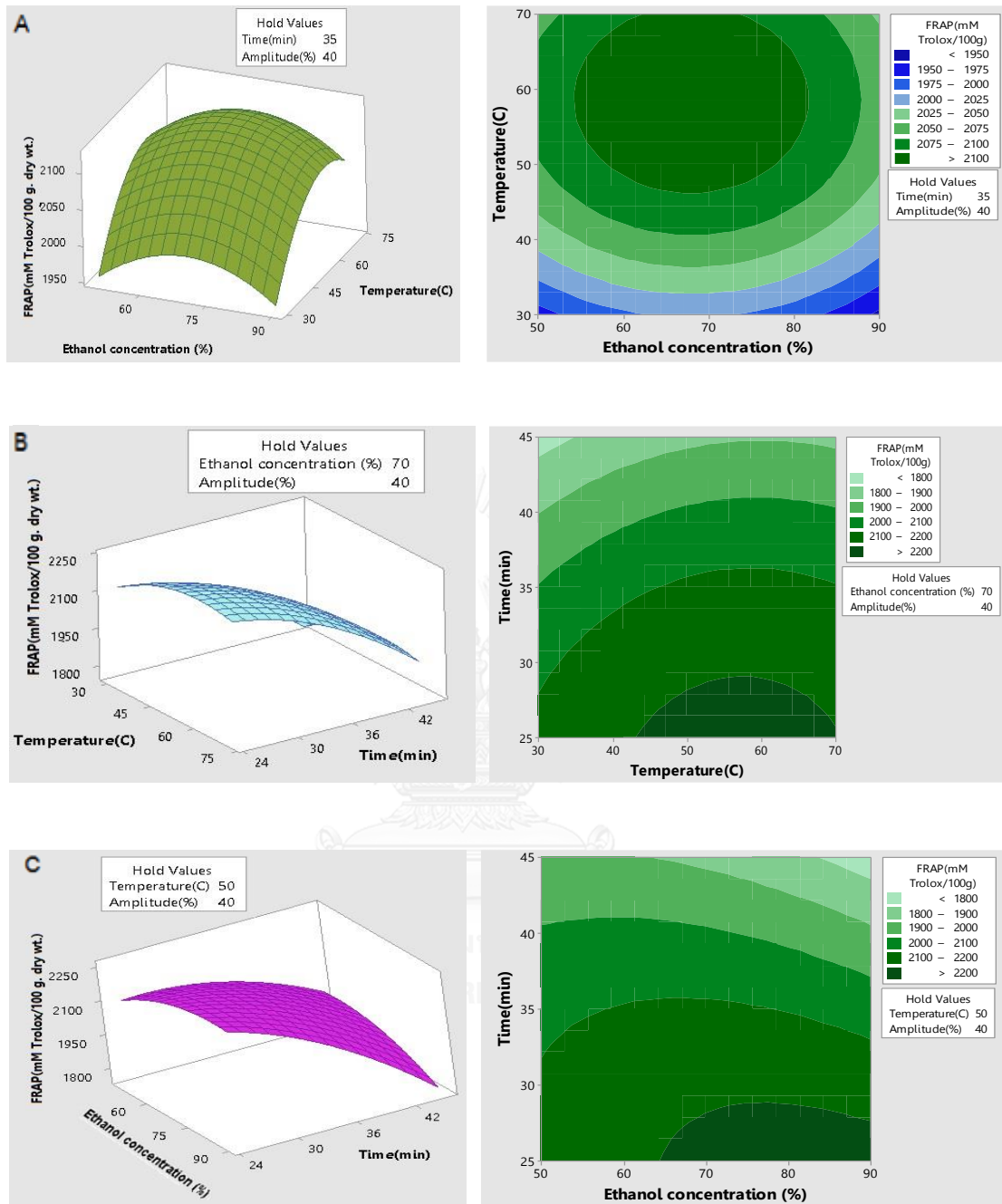
ลำดับที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิในการสกัด (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.)
7	70	50	54.50±0.71	25	50	1691.88±18.25
8	70	50	59.00±1.41	45	50	2050.56±117.92
9	50	50	55.50±0.71	35	30	2096.39±93.12
10	90	50	52.50±0.71	35	30	1760.28±35.79
11	50	50	59.50±0.71	35	50	1847.08±40.60
12	90	50	56.50±0.71	35	50	2099.86±52.67
13	70	30	39.00±1.41	25	40	2162.01±14.14
14	70	70	74.50±0.71	25	40	2233.19±11.27
15	70	30	38.00±0.00	45	40	1791.88±44.72
16	70	70	74.50±0.71	45	40	1901.25±71.08
17	50	50	54.50±0.71	25	40	2107.50±69.62
18	90	50	52.50±0.71	25	40	2266.53±944.95
19	50	50	59.50±0.71	45	40	1851.60±39.61
20	90	50	58.00±0.00	45	40	1724.17±10.57
21	70	30	38.00±0.00	35	30	1892.92±71.01
22	70	70	75.00±0.00	35	30	1912.71±11.27
23	70	30	37.50±0.71	35	50	1844.31±40.13
24	70	70	77.50±0.71	35	50	1930.42±44.72
25	70	50	57.50±0.71	35	40	2095.35±39.60
26	70	50	60.00±2.83	35	40	2078.68±70.68
27	70	50	59.00±1.41	35	40	2104.38±71.41
28	70	50	60.00±0.00	35	40	2149.86±69.66
29	70	50	59.00±1.41	35	40	2128.68±101.50

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากความแตกต่างของภาวะการสกัดต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ดังแสดงในตารางที่ 14 สามารถแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังแสดงในรูปที่ 43 และ 44



รูปที่ 43 อิทธิพลของเวลา (นาที) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (A), อุณหภูมิ (°C) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (C) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย



รูปที่ 44 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ (°C) (A), อุณหภูมิ (°C) และเวลา (นาที) (B), ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที) (C) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

รูปที่ 43 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (นาที่) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) อยู่ในระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของแอมพลิจูดและเวลาที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีค่าอยู่ในช่วง 30-38% และ 25-38 นาที่ ตามลำดับ และรูปที่ 43 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอล และเวลาอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของแอมพลิจูดและอุณหภูมิเพิ่มขึ้นส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีค่ามากในช่วงความเข้มข้นของแอมพลิจูด 37-44% และอุณหภูมิช่วง  $48-70^{\circ}\text{C}$  นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเอทานอล (%) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) โดยกำหนดให้เวลาและอุณหภูมิอยู่ที่ระดับกลาง ดังแสดงในรูปที่ 43 (C) พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีค่ามากที่สุดที่ความเข้มข้นของเอทานอล และความเข้มข้นของแอมพลิจูดในช่วง 33-37% v/v และ 50-89% v/v ตามลำดับ

รูปที่ 44 (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) โดยกำหนดความเข้มข้นของแอมพลิจูดและเวลาอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีค่าสูงในช่วงอุณหภูมิและความเข้มข้นของเอทานอลในช่วง  $48-70^{\circ}\text{C}$  และ 55-81% v/v ตามลำดับ และรูปที่ 44 (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ ) และเวลา (นาที่) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอลและแอมพลิจูดอยู่ที่ระดับกลาง ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีค่าสูงในช่วงอุณหภูมิ  $42-70^{\circ}\text{C}$  และเวลา 25-28 นาที่ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (%) และเวลา (นาที่) โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของแอมพลิจูดและอุณหภูมิอยู่ที่ระดับกลาง ดังแสดงในรูปที่ 44 (C) พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีค่าสูงในช่วงความเข้มข้นของเอทานอลและเวลา 65-90% v/v และ 25-28 นาที่ ตามลำดับ

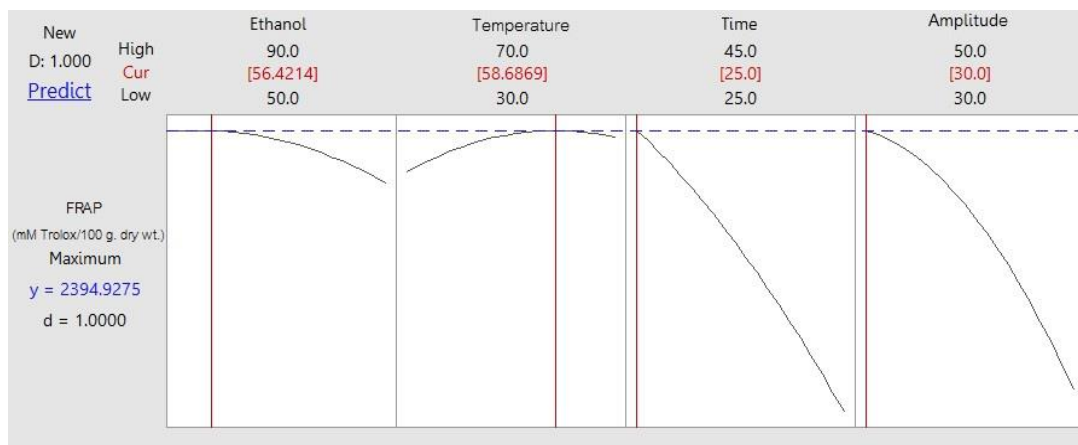
จากการวิเคราะห์ภาวะที่แตกต่างกันด้วยวิธี RSM ดังรูปที่ 43 และ 44 สามารถทำนายค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ที่ภาวะต่างๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งพบว่า  $R^2$  มีค่าเท่ากับ 96.62% และเมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) พบว่า p-value มีค่าเท่ากับ 0.558 ซึ่งมากกว่า 0.115 (ภาคผนวก ง) นอกจากนี้ผลการทวนสอบสมการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความ

คลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.2.4 (ภาคผนวก ง) ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำเพียงพอต่อการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ดังแสดงในสมการที่ (9)

$$\begin{aligned}
 \text{FRAP (mM trolox/100 g dry wt.)} = & 4031 - 0.72 \text{ Ethanol concentration (\%)} \\
 & + 12.08 \text{ Temperature (}^{\circ}\text{C)} \\
 & - 66.1 \text{ Time (min)} - 40.2 \text{ Amplitude (\%)} \\
 & - 0.1192 \text{ Ethanol concentration (\%)*Ethanol concentration (\%)} \\
 & - 0.1457 \text{ Temperature (}^{\circ}\text{C)*Temperature (}^{\circ}\text{C)} \\
 & - 0.625 \text{ Time (min)*Time (min)} \\
 & - 1.443 \text{ Amplitude (\%)*Amplitude (\%)} \\
 & - 0.358 \text{ Ethanol concentration (\%)*Time (min)} \\
 & + 0.736 \text{ Ethanol concentration (\%)*Amplitude (\%)} \\
 & + 0.048 \text{ Temperature (}^{\circ}\text{C)*Time (min)} \\
 & + 0.083 \text{ Temperature (}^{\circ}\text{C)*Amplitude (\%)} \\
 & + 2.885 \text{ Time (min)*Amplitude (\%)} \qquad \qquad \qquad (9)
 \end{aligned}$$

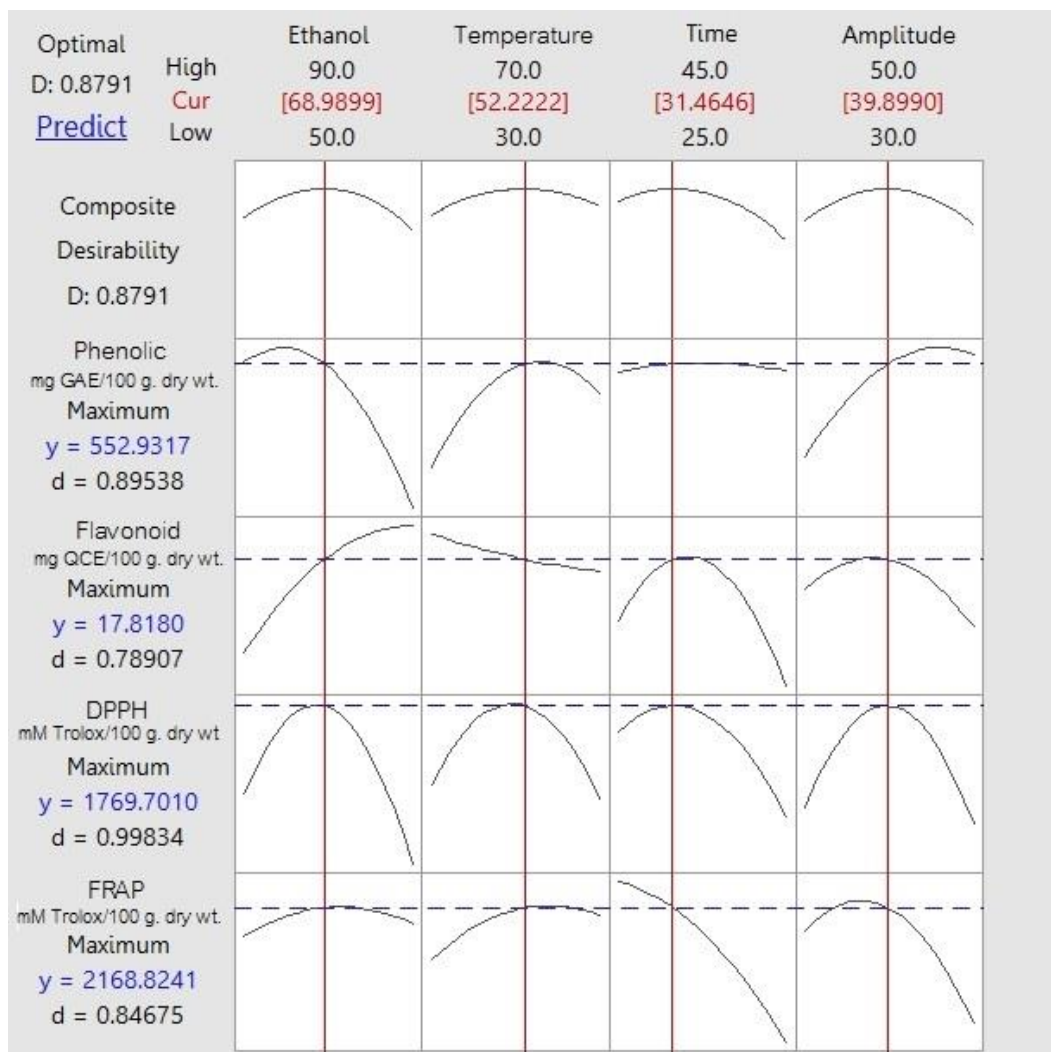
จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยใช้กราฟพื้นที่ผิวตอบสนองดังรูปที่ 43 และ 44 พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงคือ ความเข้มข้นเอทานอล 56% v/v อุณหภูมิ 59 °C เวลา 25 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 30% ซึ่งมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 2394.93 mM trolox/100 g dry wt. ดังแสดงในรูปที่ 45

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น และลดลงหลังจากความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า 56% v/v และอุณหภูมิสูงกว่า 59 °C และพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาและความเข้มข้นของแอมพลิจูดที่เพิ่มขึ้น



**รูปที่ 45** จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

เมื่อพิจารณารูปที่ 36, 39, 42 และ 45 ร่วมกัน พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยคือ ความเข้มข้นเอทานอล 69% v/v เวลา 31 นาที อุณหภูมิ 52 °C และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 40% โดยสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะนี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 552.93 mg GAE/100 g dry wt. และ 17.82 mg QCE/100 g dry wt. ตามลำดับ และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 1769.70 และ 2168.82 mM trolox/100 g dry wt. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 46



รูปที่ 46 ภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

จากผลการทดลองพบว่าสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP) จะมีความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดแตกต่างกัน กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งและจะลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของเอทานอลจะมีความสัมพันธ์กับสภาพขั้ว (polarity) ของสารประกอบฟีนอลิก โดยสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ที่มากที่สุดที่สภาพความเป็นขั้วอยู่ในระดับปานกลาง (Iloki-Assanga *et al.*, 2015) และในขณะที่สารฟลาโวนอยด์นั้นจะมีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นของเอทานอลมากที่สุด

ซึ่งในการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 90% v/v เนื่องจากสารฟลาโวนอยด์มีสภาพความเป็นขั้วสูงจึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วมาก (Pittela *et al.*, 2009) โดยเป็นไปตามกฎสารที่มีสภาพขั้วเหมือนกัน ย่อมละลายซึ่งกันและกันได้ดี (like dissolve like) จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นว่าในสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงนั้นประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอลิกที่มีสภาพขั้วแตกต่างกัน (Zhang *et al.*, 2007) และจากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระพบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะทำให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งและจะลดลง ในขณะที่สารฟลาโวนอยด์จะลดลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ถูกทำลายที่อุณหภูมิสูง (Sharma *et al.*, 2015) และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของแอมพลิจูดและเวลาเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของแอมพลิจูดสามารถส่งผลให้การสั่นของคลื่นเสียงที่ส่งผ่านตัวทำละลายมีความรุนแรงขึ้นและเกิดฟองอากาศที่มีพลังงานสูงมาสัมผัสกับบริเวณผิวของเนื้อเยื่อ จึงมีโอกาสเกิดปรากฏการณ์ควาเวชัน (cavitation) มากขึ้น ซึ่งส่งผลให้เนื้อเยื่อเมล็ดฉีกขาดมากขึ้น ทำให้สารภายในเมล็ดละลายออกมาในตัวทำละลายสูงกว่าที่การสกัดที่แอมพลิจูดต่ำ เพราะแอมพลิจูดต่ำมีการสั่นของคลื่นเสียงน้อยกว่า (Hemwimol *et al.*, 2006) แต่เมื่อความเข้มข้นของแอมพลิจูดเพิ่มจนถึงระดับหนึ่งสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจะลดลง เนื่องจากสารพิษเคมีบางชนิดสลายตัวในระหว่างกระบวนการสกัดเพราะแอมพลิจูดที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้เกิดการสั่นของคลื่นสูงและเกิดความร้อนขึ้นจึงสามารถทำลายสารพิษเคมีได้ ส่งผลให้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระลดลง ประสิทธิภาพในการสกัดจึงต่ำลง (Santos *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจะมีโอกาสเกิดฟองอากาศและปรากฏการณ์ควาเวชันมากกว่าที่เวลาน้อย ประกอบกับสารละลายสัมผัสที่ผิวของเมล็ดได้นานกว่าทำให้สารภายในเมล็ดถูกละลายและแพร่ออกมาได้มากกว่า จากสาเหตุดังกล่าวส่งผลให้สารพิษเคมีที่อยู่ภายในเมล็ดสามารถละลายออกมาได้มากขึ้น ทำให้มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นไปตามกฎข้อที่ 2 ของฟิค (Fick's second law) กล่าวคือ การเกิดการแพร่จากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงกว่าไปยังความเข้มข้นต่ำกว่าและความเข้มข้นจะเปลี่ยนไปตามระยะเวลา (Da Porto *et al.*, 2013) แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งแล้วสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจะมีค่าลดลง อันเป็นผลมาจากสารภายในเมล็ดแพร่ไปยังเอทานอลจนเข้าสู่ภาวะสมดุลการแพร่ ทำให้การแพร่เกิดได้น้อยลงประกอบกับสารพิษเคมีบางส่วนเริ่มถูกทำลายด้วยความร้อน (Pinelo *et al.*, 2006)

เนื่องจากการสกัดด้วย UAE เกิดควาเวชันซึ่งทำให้บริเวณผิวของเนื้อเยื่อถูกทำลายมากกว่าการสกัดด้วย ME ส่งผลให้เกิดการถ่ายโอนมวลและสารภายในสามารถละลายออกมาได้มากกว่า (Chemat *et al.*, 2017) จึงทำให้สารสกัดจาก UAE มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจาก ME อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dent และคณะ (2015) ที่ศึกษาภาวะการ



สกัด *Salvia officinalis* L. โดยการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยวิธีแช่และใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ช่วยที่ความเข้มข้นของเอทานอล 30% v/v โดยพบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย คือ กำลังไฟฟ้า 400 วัตต์ และเวลา 11 นาที โดยสารสกัดจากการสกัดด้วยวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และกรดโรสมารินิกสูงกว่าสารสกัดจากภาวะที่เหมาะสมของการแช่ที่ 60 °C เวลา 30 นาที จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าการสกัดด้วยวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยสามารถลดระยะเวลาในการสกัดอีกทั้งมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่าการแช่ นอกจากนี้ Safdar และคณะ (2016) ได้ศึกษาการสกัดเปลือกมะม่วงด้วยวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยเปรียบเทียบกับวิธีการแช่โดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1: 20 ความเข้มข้นของเอทานอล 80% v/v เวลา 45 นาที และอุณหภูมิ 53 °C ผลการศึกษาพบว่าการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงช่วยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าการสกัดด้วยการแช่ 20%

จากการศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดเมล็ดมะเขือในภาวะต่างๆ โดยการสกัดด้วยวิธี UAE และ ME พบว่าการสกัดด้วยวิธี UAE มีสมบัติทางเคมีดีกว่าการสกัดด้วยวิธี ME จึงเลือกการสกัดด้วยวิธี UAE มาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่อไป

#### 4.2.5 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum inhibitory concentration (MIC)

สารสกัดจากเมล็ดมะเขือที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยที่ภาวะต่างๆ สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* และ *Salmonella Typhimurium* ได้แตกต่างกัน ดังค่า MIC ที่แสดงในตารางที่ 15 โดยพบว่าสารสกัดเมล็ดมะเขือสามารถต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.39-12.50 mg/mL รองลงมาคือ *L. plantarum*, *S. Typhimurium*, *S. cerevisiae* และ *E. coli* ตามลำดับ เนื่องจากการศึกษาด้วยเทคนิค HPLC ของสารสกัดเมล็ดมะเขือด้วยวิธี UAE พบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้แก่ กรดแกลลิก และเคออสิทิน โดยสอดคล้องกับการศึกษาของของพิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2551) ซึ่งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เรียกอีสัว *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดเมล็ดมะเขือ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดดังกล่าวมีกรดแกลลิกและอัลจินิก เป็นองค์ประกอบหลักและมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *P. acnes* และ *S. aureus*

ตารางที่ 15 ค่า MIC ของสารสกัดเมล็ดมะเขือเทศที่ภาวะต่างๆ

No.	ความเข้มข้น ของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	แอมพลิจูด (%)	ความเข้มข้น				
					<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
1	50	30	35	40	3.13	6.25	1.56	6.25	1.56
2	90	30	35	40	0.39	6.25	3.13	6.25	1.56
3	50	70	35	40	1.56	12.50	1.56	12.50	6.25
4	90	70	35	40	1.56	6.25	1.56	6.25	6.25
5	70	50	25	30	0.78	6.25	1.56	6.25	6.25
6	70	50	45	30	3.13	6.25	1.56	12.50	6.25
7	70	50	25	50	0.78	3.13	1.56	6.25	6.25
8	70	50	45	50	3.13	6.25	1.56	1.56	12.50
9	50	50	35	30	25	12.50	3.13	6.25	6.25
10	90	50	35	30	1.56	6.25	1.56	3.13	1.56
11	50	50	35	50	1.56	6.125	1.56	6.25	1.56
12	90	50	35	50	6.25	6.25	3.13	3.13	1.56
13	70	30	25	40	3.13	3.13	3.13	6.25	6.25
14	70	70	25	40	3.13	3.13	3.13	1.56	3.13
15	70	30	45	40	3.13	6.25	3.13	3.13	6.25

ตารางที่ 15 (ต่อ) ค่า MIC ของสารสกัดเมล็ดมะเขือเทศที่ภาวะ

No.	ความเข้มข้น ของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	แอมพลิจูด (%)	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Saccharomyces cerevisiae	Lactobacillus plantarum	Salmonella Typhimurium
16	70	70	45	40	0.78	6.25	1.56	1.56	3.13
17	50	50	25	40	1.56	6.25	3.13	6.25	6.25
18	90	50	25	40	0.78	6.25	1.56	3.13	1.56
19	50	50	45	40	6.25	12.50	1.56	1.56	1.56
20	90	50	45	40	12.50	6.25	1.56	3.13	6.25
21	70	30	35	30	3.15	6.25	1.56	1.56	6.25
22	70	70	35	30	3.13	6.25	1.56	3.13	6.25
23	70	30	35	50	6.25	6.25	3.13	1.56	6.25
24	70	70	35	50	6.25	6.25	3.13	1.56	3.13
25	70	50	35	40	6.25	6.25	1.56	1.56	3.13
26	70	50	35	40	1.56	6.25	1.56	1.56	3.13
27	70	50	35	40	6.25	6.25	1.56	1.56	3.13
28	70	50	35	40	1.56	3.13	1.56	1.56	6.25
29	70	50	35	40	6.25	6.25	1.56	1.56	6.25

#### 4.2.6 ฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum bactericidal concentration (MBC)

ผลการศึกษาสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย ที่ภาวะต่างๆ มีฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์แตกต่างกัน ดังค่า MBC ที่แสดงในตารางที่ 16 และพบว่า สารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงสามารถต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* (0.78-12.50 mg/mL) ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *L. plantarum* และ *S. Typhimurium*, *S. cerevisiae* และ *E. coli* โดยมีค่า MBC อยู่ในช่วง 12.5-50, 25-100 และ 100- มากกว่า 100 mg/mL ตามลำดับ



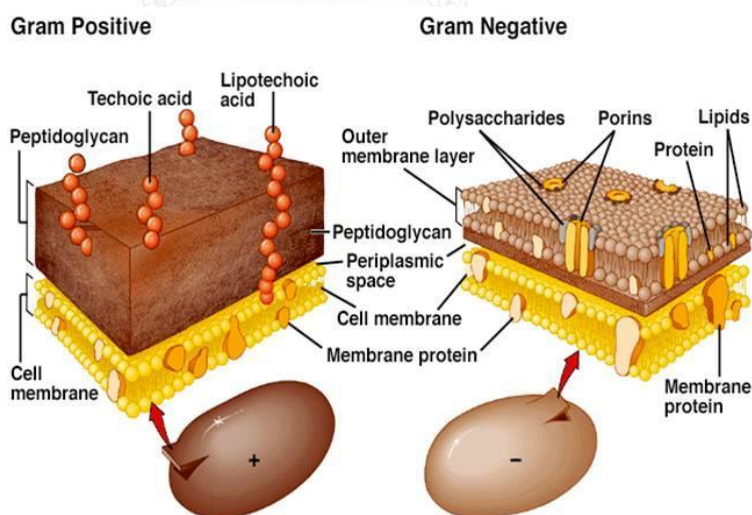
ตารางที่ 16 ค่า MBC ของสารสกัดเมล็ดมะเขือขี้เกีงที่ภาวะต่างๆ

No.	ความเข้มข้น ของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	แอมพลิจูด (%)	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Saccharomyces cerevisiae	Lactobacillus plantarum	Salmonella Typhimurium
1	50	30	35	40	6.25	100.00	50.00	12.50	50.00
2	90	30	35	40	0.78	100.00	50.00	12.50	25.00
3	50	70	35	40	6.25	100.00	50.00	50.00	50.00
4	90	70	35	40	3.13	100.00	50.00	50.00	25.00
5	70	50	25	30	1.56	100.00	50.00	25.00	50.00
6	70	50	45	30	6.25	>100.00	100.00	50.00	25.00
7	70	50	25	50	3.13	100.00	50.00	50.00	25.00
8	70	50	45	50	6.25	100.00	100.00	25.00	25.00
9	50	50	35	30	50.00	>100.00	100.00	50.00	50.00
10	90	50	35	30	6.25	100.00	100.00	50.00	25.00
11	50	50	35	50	6.25	100.00	50.00	50.00	25.00
12	90	50	35	50	12.50	100.00	50.00	50.00	25.00
13	70	30	25	40	6.25	100.00	50.00	50.00	50.00
14	70	70	25	40	6.25	100.00	50.00	25.00	12.50
15	70	30	45	40	6.25	100.00	50.00	25.00	50.00

ตารางที่ 16 (ต่อ) ค่า MBC ของสารสกัดเมล็ดมะเกลือที่ภาวะ

No.	ความเข้มข้น ของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	แอมพลิจูด (%)	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Saccharomyces cerevisiae	Lactobacillus plantarum	Salmonella Typhimurium
16	70	70	45	40	1.56	100.00	100.00	25.00	25.00
17	50	50	25	40	3.13	100.00	100.00	50.00	50.00
18	90	50	25	40	0.78	100.00	100.00	50.00	25.00
19	50	50	45	40	12.50	>100.00	25.00	25.00	25.00
20	90	50	45	40	12.50	100.00	100.00	50.00	50.00
21	70	30	35	30	6.25	100.00	50.00	50.00	25.00
22	70	70	35	30	6.25	100.00	50.00	50.00	50.00
23	70	30	35	50	12.50	100.00	100.00	50.00	50.00
24	70	70	35	50	12.50	100.00	100.00	50.00	25.00
25	70	50	35	40	12.50	100.00	50.00	50.00	25.00
26	70	50	35	40	3.13	100.00	25.00	50.00	25.00
27	70	50	35	40	12.50	100.00	50.00	25.00	50.00
28	70	50	35	40	3.13	100.00	50.00	25.00	25.00
29	70	50	35	40	12.50	100.00	50.00	25.00	50.00

เนื่องจากโครงสร้างของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันทำให้สารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์สามารถซึมผ่านได้แตกต่างกันซึ่งสามารถส่งผลต่อค่า MIC และ MBC ของเชื้อแต่ละชนิด โดยพบว่าสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงสามารถต้านการเจริญและฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *L. plantarum*, *S. Typhimurium*, *S. cerevisiae* และ *E. coli* ตามลำดับ เนื่องจาก *S. aureus* และ *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) ซึ่งมีโครงสร้างของผนังเซลล์ซับซ้อนน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ซึ่งในการทดลองนี้คือ *S. Typhimurium* และ *E. coli* ส่งผลให้แบคทีเรียแกรมบวกต้านทานต่อสารสกัดได้น้อยกว่า ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของเบญจมาศ หนูแป้น และคณะ (2559) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากไบริรน้ำ (*Limnophila rugosa*) โดยการสกัดด้วยน้ำ เมทานอล และเอทานอลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 4 ชนิด (*S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* และ *V. cholerae*) และพบว่าสารสกัดจากไบริรน้ำสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด และสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อชั้นนอก (outer membrane) และ periplasmic space ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวกและนอกจากนี้แบคทีเรียแกรมลบบังมีสารไลโปพอลิแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบของเยื่อชั้นนอกจึงเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารได้ดี ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกไม่มีโครงสร้างเหล่านี้ ดังแสดงในรูปที่ 47 สารต่างๆ จึงซึมผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและทำให้เกิดรูพรุนได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Shan *et al.*, 2007)



รูปที่ 47 องค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ

ที่มา: Hayat (2013)

สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด ได้แก่ กรดฟีนอลิก และสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อยีสต์ (antifungal activities) (Freiesleben and Jäger, 2014; Podsędek, Sosnowska

and Ander, 2003) และจากการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง ด้วยวิธี HPLC พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงมีกรดเคเฟอิก กรดแกลลิก และกรดเฟอร์รูลิกซึ่งเป็นสารในกลุ่ม hydroxycinnamic acids เควอซิทินซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นองค์ประกอบ ประกอบกับจากการศึกษาสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงของพิมพร สีลาพรพิสิฐ และคณะ (2547) ด้วยการ แห้ในเอทานอล 95% v/v และพบว่าสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงมีแทนนินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารดังกล่าว ข้างต้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งยีสต์โดยจะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้ไมโทคอนเดรียทำงานผิดปกติ ส่งผลให้สูญเสียความสมดุล จึงทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Freiesleben and Jäger, 2014) นอกจากนี้ การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงมีความสัมพันธ์กับค่าการแตกตัวของกรดหรือค่า pKa และ การละลายในไขมัน (lipophilicity) ของสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของ จุลินทรีย์มีองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดเป็นหลักจึงทำให้สารที่มีค่าการแตกตัวต่ำ (ค่า pKa สูง) มีความสามารถละลายในไขมันและสามารถผ่านเข้าออกและจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี ส่งผลให้มีฤทธิ์ใน การต้านจุลินทรีย์สูง ซึ่งโดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกจะมีค่า pKa อยู่ในช่วง 4-9 (Sánchez-Maldonado, Schieber and Gänzle, 2011) ซึ่งที่ pH เท่ากับ 7.4 และอุณหภูมิ 25°C เควอซิทิน กรดแกลลิก กรดเฟอร์รูลิก และกรดคาเฟอิก มีค่า pKa เท่ากับ 7.50, 4.41, 3.77 และ 4.62 ตามลำดับ (Kitson, 2004; Khatkar *et al.*, 2017; Poquet *et al.*, 2007; Moridani *et al.*, 2001) จากค่า pKa นี้ให้เห็นว่าเควอซิทินมีการแตกตัวต่ำส่งผลให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี

#### 4.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง

จากการศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากภาวะที่เหมาะสมที่สกัดด้วยวิธี ME และ UAE ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่า การสกัดด้วยวิธี UAE และ ME ได้สาร สกัดที่มีองค์ประกอบของกรดแกลลิก กรดคาเฟอิก กรดเฟอร์รูลิก และเควอซิทิน (ภาคผนวก ฉ) โดย การสกัดด้วยวิธี UAE มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทุกชนิดมากกว่าการสกัดด้วยวิธี ME อย่างมี นัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 17



ตารางที่ 17 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี UAE และ ME

ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก	การสกัดด้วยวิธี UAE	การสกัดด้วยวิธี ME	หน่วย
กรดแกลลิก	2033.34±30.73	1479.96±107.62	mg/100 g dry wt.
กรดเฟอร์ูลิก	1908.53±232.52	380.75±33.32	mg/100 g dry wt.
กรดคาเฟอิก	156.29±17.77	nd	mg/100 g dry wt.
เคอซิทิน	241.97±43.65	161.52±31.30	mg/100 g dry wt.

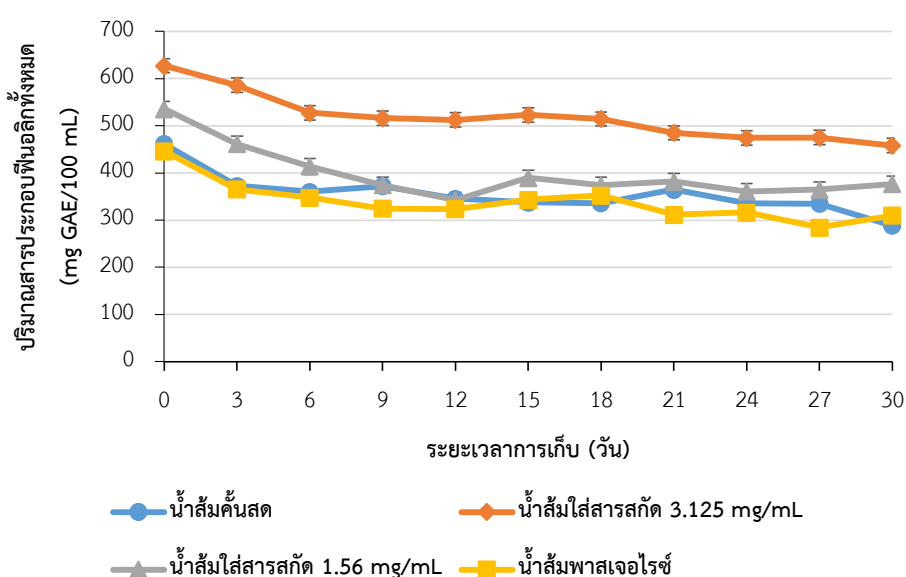
\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

โดยการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของพิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2547) ที่ได้ศึกษาสารพฤษเคมีจากเมล็ดมะเกี๋ยง ด้วยการนำเมล็ดมะเกี๋ยงบดแห้ง ไปแช่ในเอทานอล 95% v/v (เป็นการสกัดหยาบ) และนำไปประเหยแห้งจนได้สารสกัดเข้มข้นยวสีเหลืองปนน้ำตาล เมื่อนำไปตรวจสอบทางพฤษเคมีเบื้องต้นด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิบบาง (thin layer chromatography, TLC) พบว่ามีสารเคอซิทิน แคมพ์เฟอร์อล และฟีนอลคาร์บอกซิลิกแอซิดหรือสารอนุพันธ์อื่นๆ ในกลุ่มนี้

#### 4.4 การศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงต่อสมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ ของน้ำส้มคั้นสด ระหว่างการเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน

จากการศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของทั้งหมดของตัวอย่างน้ำส้มซึ่งประกอบไปด้วยน้ำส้มคั้นสด (ตัวอย่างควบคุม) น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ ระหว่างการเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน โดยน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ 461.67±56.10, 535.50±55.86, 627.50±53.03 และ 446.00±1.4 mg GAE/100 mL ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง ดังนั้นเมื่อนำสารสกัดมะเกี๋ยงมาใส่ในน้ำส้มจึงส่งผลให้น้ำส้มที่ใส่สารสกัดทั้งสองความเข้มข้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าน้ำส้มคั้นสดและน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ แสดงดังในรูปที่ 48 โดยน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ เนื่องจากความร้อนจากกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์สามารถทำให้สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสลายตัว (Wibowo *et al.*, 2015) และหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่า เมื่ออายุการเก็บเพิ่มขึ้นตัวอย่างน้ำส้มทุกตัวอย่างมีปริมาณ

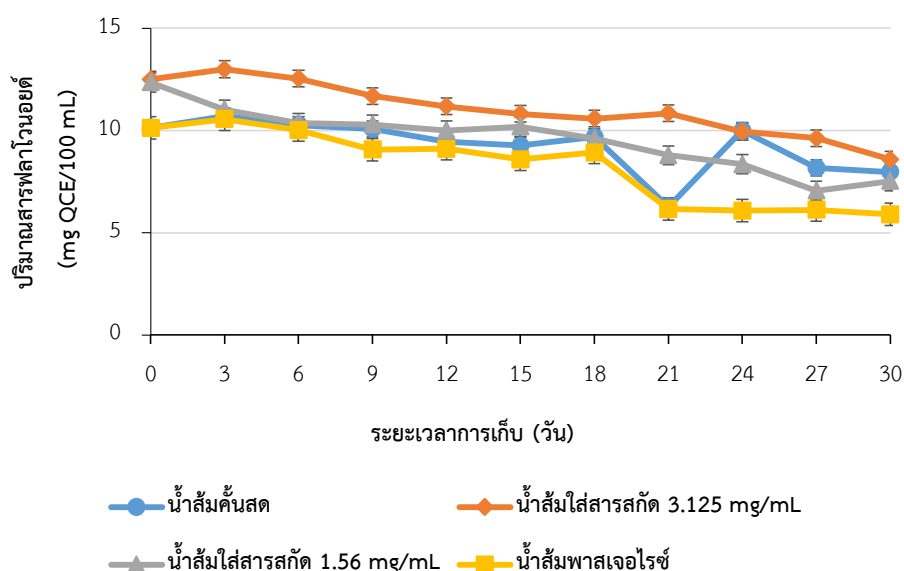
สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลง โดยน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใสสารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอไรซ์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (วันที่ 30) มีค่าเท่ากับ  $288.50 \pm 30.41$ ,  $458.00 \pm 12.73$ ,  $376.50 \pm 12.02$  และ  $310.00 \pm 0.00$  mg GAE/100 mL ตามลำดับ โดยการลดลงคิดเป็น 37.50, 29.69, 27.00 และ 30.49% ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เริ่มต้น ตามลำดับ ซึ่งการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเกิดจากการสลายตัวไประหว่างการเก็บ สอดคล้องกับการศึกษาของ Maragò และคณะ (2015) ที่ได้ศึกษา สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในระหว่างการเก็บของน้ำแอปเปิ้ลและน้ำทับทิม ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  และ อุณหภูมิห้อง) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และพบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ทุกอุณหภูมิของการเก็บมีปริมาณลดลง นอกจากนี้ Mgaya-Kilima และคณะ (2014) ได้ศึกษาระยะเวลาการเก็บของน้ำผลไม้ 3 ชนิด ได้แก่ น้ำกระเจี๊ยบ-มะม่วง น้ำกระเจี๊ยบ-มะละกอ และน้ำกระเจี๊ยบ-ฝรั่ง ที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ที่  $82.5^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 วินาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  และ  $28^{\circ}\text{C}$  ในขวดพลาสติกเป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 5$ ) โดยลดลงประมาณ 50 % ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเริ่มต้นในทุกตัวอย่าง



รูปที่ 48 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$

จากการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของตัวอย่างน้ำส้มแต่ละชนิดระหว่างการเก็บที่  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 วัน พบว่าน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใสสารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอไรซ์ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ  $10.14 \pm 0.49$ ,  $12.35 \pm 0.63$ ,  $12.50 \pm 0.89$  และ  $10.12 \pm 0.267$  mg QCE/100 mL ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงมี

ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูง ดังนั้นเมื่อนำสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงมาใส่ในน้ำส้มจึงส่งผลให้น้ำส้มมีสารฟลาโวนอยด์สูงขึ้น โดยปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในน้ำส้มแต่ละชนิดมีแนวโน้มเช่นเดียวกับสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน ดังแสดงในรูปที่ 49 โดยในวันที่ 30 ของการเก็บรักษา พบว่าสารฟลาโวนอยด์ในน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์มีค่าเท่ากับ  $7.97 \pm 0.46$ ,  $7.33 \pm 0.28$ ,  $8.58 \pm 0.53$  และ  $5.90 \pm 0.40$  mg/mL ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นการลดลงเท่ากับ 21.40, 40.65, 31.36 และ 41.69% ของสารฟลาโวนอยด์เริ่มต้น ตามลำดับ โดยการลดลงดังกล่าวเกิดจากสารฟลาโวนอยด์สลายตัวไประหว่างการเก็บ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Del Caro และคณะ (2004) ที่ศึกษาอายุการเก็บต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ของน้ำส้มจากส้มสายพันธุ์ต่างๆ (Palazzelli, Minneola, Salustiana and Shamouti) และน้ำอุ่นแดง โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 วัน จากผลการศึกษาพบว่า น้ำส้มจากส้มสายพันธุ์ Shamouti และ Salustiana และน้ำอุ่นแดงมีปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่ออายุการเก็บเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ El-Dengawy และคณะ (2016) ได้ศึกษาอายุการเก็บต่อคุณค่าทางโภชนาการของน้ำมะเขือเทศที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 เดือน โดยวิเคราะห์ผลที่เดือนที่ 0, 6, 12 และ 18 โดยผลการศึกษพบว่าน้ำมะเขือเทศมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ลดลงจาก 10.51 เหลือ 9.00 mg RE /kg หรือคิดเป็น 14.36 % ของสารฟลาโวนอยด์เริ่มต้น

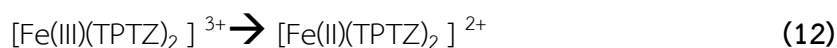


รูปที่ 49 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระหว่างการเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน พบว่าน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอไรซ์ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ  $468.42 \pm 38.30$ ,  $618.83 \pm 146.14$ ,  $929.46 \pm 20.33$  และ  $398.00 \pm 44.78$  mM trolox/100 mL ตามลำดับ และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ  $1439.46 \pm 27.40$ ,  $1809.88 \pm 148.20$ ,  $2252.58 \pm 54.21$  และ  $1399.04 \pm 39.77$  mM trolox/100 mL ตามลำดับ โดยน้ำส้มใส่สารสกัด 3.125 mg/mL มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP สูงสุด รองลงมาคือ น้ำส้มใส่สารสกัด 1.56 mg/mL น้ำส้มคั้นสด และน้ำส้มพาสเจอไรซ์ ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง ประกอบกับในน้ำส้มมีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ได้แก่ วิตามินซี ฟลาโวนอยด์ (hesperetin และ naringenin), แคโรทีนอยด์ (xanthophylls, cryptoxanthins, carotenes) เป็นต้น (Moridani *et al.*, 2001) จึงส่งผลให้น้ำส้มที่ใส่สารสกัดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำส้มคั้นสดและน้ำส้มพาสเจอไรซ์ และนอกจากนี้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดด้วย ทำให้น้ำส้มใส่สารสกัด 3.125 mg/mL มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีสูงกว่าน้ำส้มที่ใส่สารสกัด 1.56 mg/mL ในขณะที่น้ำส้มพาสเจอไรซ์มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดถูกทำลายไปบางส่วน ในระหว่างการให้ความร้อน โดยการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ใช้สาร DPPH• ซึ่งมีสีม่วงเป็นตัวแทนของอนุมูลอิสระ เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) จากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) หรืออนุมูลอิสระ (R•) ดังแสดงในสมการที่ (10) และ (11) ตามลำดับ จะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง และติดตามผลการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 515 nm



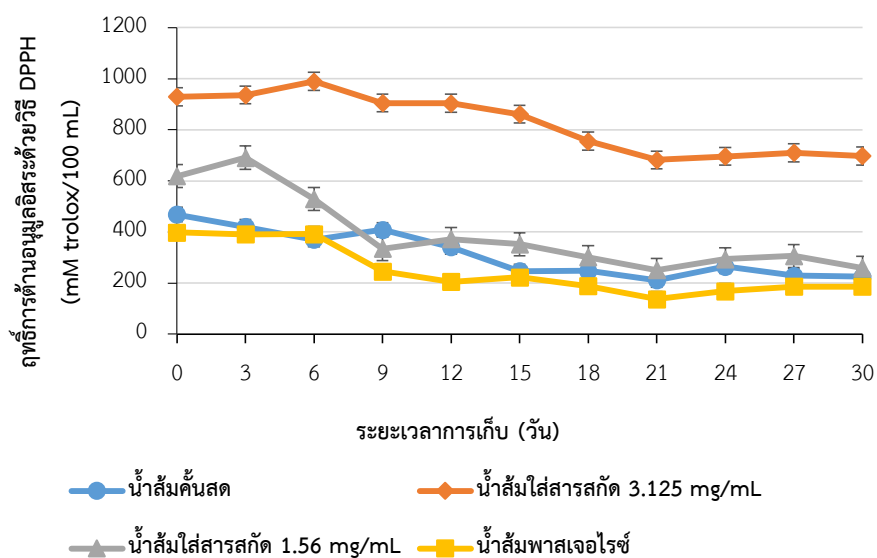
ในขณะที่ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน  $[\text{Fe(III)}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น  $[\text{Fe(II)}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  ดังแสดงในสมการที่ (12) ซึ่ง  $[\text{Fe(II)}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm (บุหรัน พันธุ์สุวรรณค์, 2556)



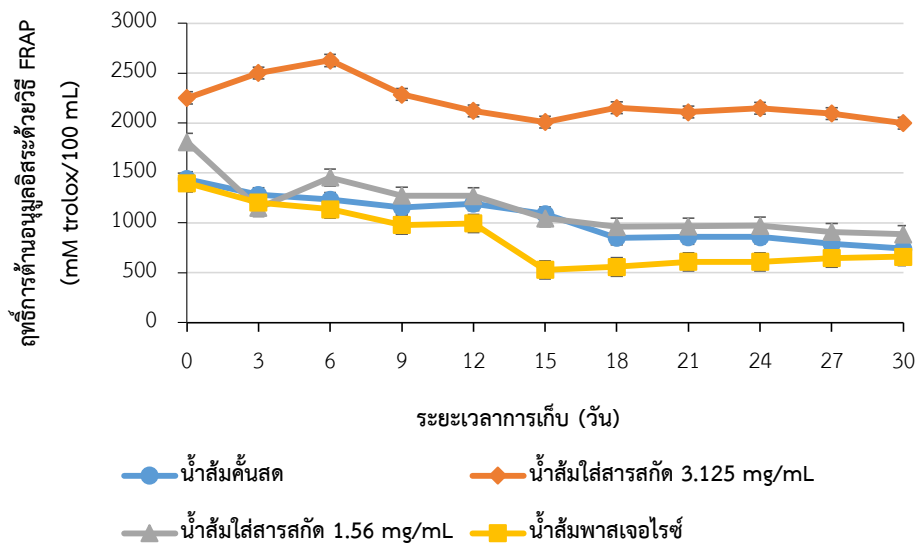
นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีแนวโน้มเช่นเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด กล่าวคือ เมื่ออายุการเก็บเพิ่มขึ้นตัวอย่างน้ำส้มทุกตัวอย่างมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลง แสดงดังในรูปที่ 50 และ 51 โดยในวันที่ 30 น้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอไรซ์ มีฤทธิ์การต้านอนุมูล

อิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ  $224.67 \pm 25.93$ ,  $259.04 \pm 98.70$ ,  $697.58 \pm 4.12$  และ  $186.13 \pm 7.95$  mM trolox/100 mL ตามลำดับ และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เท่ากับ  $740.92 \pm 10.61$ ,  $886.33 \pm 18.86$ ,  $1999.46 \pm 11.49$  และ  $608.83 \pm 52.44$  mM trolox/100 mL ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Saci, Meziat และ Louaileche (2015) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของน้ำแครอท และน้ำมะม่วง โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$  และ  $35^{\circ}\text{C}$  และตรวจวิเคราะห์ในวันที่ 0, 30, 60 และ 90 จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และนอกจากนี้ปฏิกิริยารีดักชันของกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ในระหว่างการเก็บรักษาเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลง เนื่องจากปฏิกิริยารีดักชันของกรดแอสคอร์บิกทำให้เกิดแก๊สออกซิเจนขึ้นระหว่างช่องว่างของน้ำส้มและภาชนะบรรจุ (headspace) และเนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นตัวรับอนุมูลอิสระ จึงไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีปริมาณลดลงและส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลงด้วย (Podsedek, Sosnowska and Anders, 2003) นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของอากาศภายในภาชนะบรรจุยังส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถเจริญและเพิ่มปริมาณได้ในน้ำส้มตั้งรูปที่ 58, 59 และ 60 เมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มขึ้นทำให้ pH ลดลงในระหว่างการเก็บ ดังแสดงในรูปที่ 52 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ibrahim (2016) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการเก็บรักษาของน้ำสับปะรด น้ำมะละกอและน้ำแตงโม ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  และอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยวิเคราะห์ผลในสัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 จากผลการศึกษาพบว่าค่า pH ของน้ำผลไม้ทุกชนิดที่ศึกษา ( $4^{\circ}\text{C}$  และอุณหภูมิห้อง) มีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยจากการศึกษาพบว่าน้ำส้มที่ใส่สารสกัด (ความเข้มข้น 3.25 และ 1.56 mg/mL) มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ  $4.31 \pm 0.00$  และ  $4.33 \pm 0.00$  ตามลำดับ) มีค่า pH ต่ำกว่าน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์และน้ำส้มคั้นสด (มีค่า pH เท่ากับ  $4.40 \pm 0.05$  และ  $4.78 \pm 0.12$  ตามลำดับ) เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีส่วนประกอบของกรดฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิก กรดคาเฟอิก เป็นต้น จึงส่งผลให้น้ำส้มที่ใส่สารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยมี pH ต่ำ (Tasnim *et al.*, 2010) และพบว่าวันที่ 30 ของการเก็บ น้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์มีค่า pH เท่ากับ  $4.40 \pm 0.05$ ,  $4.26 \pm 0.03$ ,  $4.21 \pm 0.00$  และ  $4.31 \pm 0.00$  ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเก็บรักษาส่งผลให้ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids) ลดลงจากปริมาณเริ่มต้น โดยน้ำส้มคั้นสด และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์มี

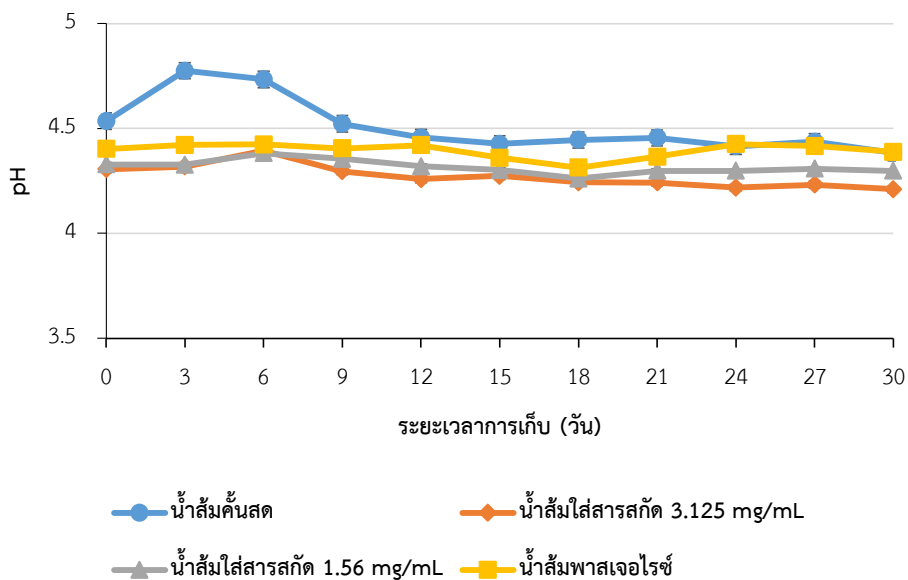
ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เริ่มต้นเท่ากับ  $12.00 \pm 0.00$  °Brix และน้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เริ่มต้นเท่ากับ  $12.50 \pm 0.00$  °Brix จากผลการศึกษาพบว่าน้ำส้มใส่สารสกัดทั้งสองความเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มากกว่าน้ำส้มคั้นสดและน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ เนื่องจากสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงสามารถเพิ่มปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และในวันที่ 30 ของการเก็บพบว่า น้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เท่ากับ  $10.33 \pm 0.24$ ,  $11.25 \pm 0.35$ ,  $11.25 \pm 0.35$  และ  $10.25 \pm 0.35$  °Brix ตามลำดับ ซึ่งการลดลงของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เป็นผลมาจากจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลในน้ำส้มเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานและใช้ในการเจริญเติบโต ทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 53 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Humayun และคณะ (2014) ที่ศึกษาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ในน้ำส้มที่เก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ  $7$  °C และวิเคราะห์ผลทุก 1 สัปดาห์ จากผลการศึกษาพบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ในน้ำส้ม มีปริมาณลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้นซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเจริญของจุลินทรีย์



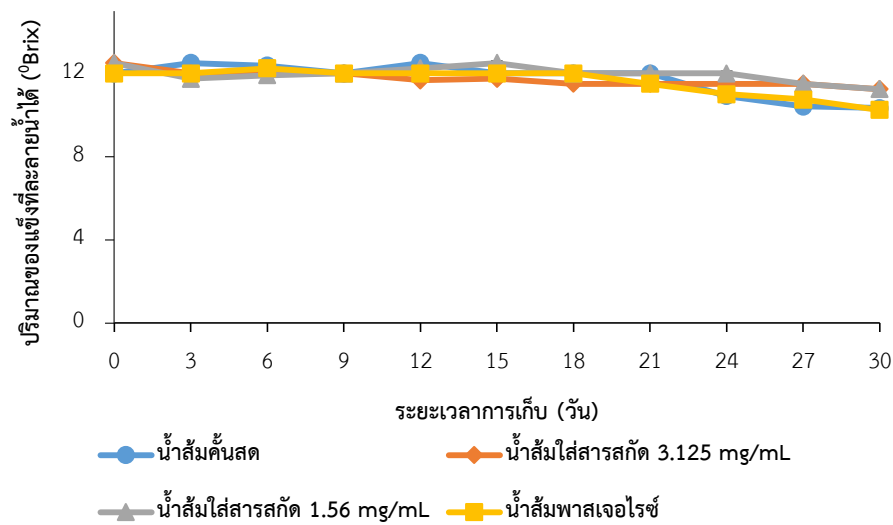
รูปที่ 50 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4$  °C



รูปที่ 51 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 52 ค่าความเป็นกรดต่างของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



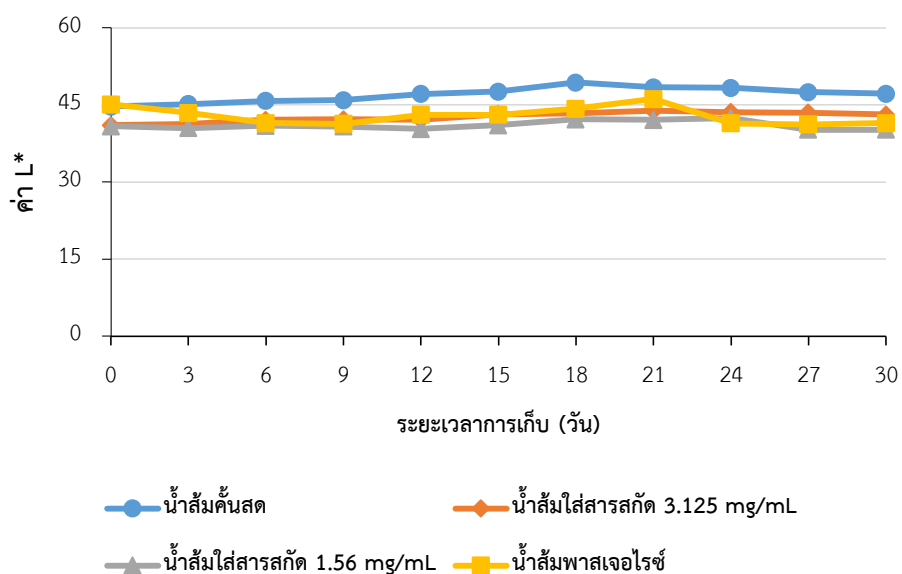
รูปที่ 53 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

สีเป็นสมบัติทางกายภาพที่มองเห็นได้ของอาหารและมีบทบาทต่อความพึงพอใจของผู้บริโภค (Wibowo *et al.*, 2015) จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสีของตัวอย่างน้ำส้มที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C ซึ่งประกอบด้วยน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ พบว่า น้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ มีค่า  $L^*$  เริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ  $47.18 \pm 0.07$ ,  $40.15 \pm 0.10$ ,  $43.82 \pm 0.18$  และ  $45.07 \pm 3.74$  ตามลำดับ และมีค่า  $a^*$  เริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ  $4.42 \pm 0.08$ ,  $3.87 \pm 1.28$ ,  $4.40 \pm 0.07$  และ  $5.86 \pm 0.47$  ตามลำดับ ซึ่งค่า  $a^*$  ของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 30 ค่า  $L^*$  ของน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ มีค่าเท่ากับ  $44.67 \pm 0.13$ ,  $40.85 \pm 1.17$ ,  $41.023 \pm 7.10$  และ  $41.44 \pm 0.12$  ตามลำดับ ในขณะที่ ค่า  $a^*$  ของน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ มีค่าเท่ากับ  $2.55 \pm 0.04$ ,  $1.78 \pm 0.04$ ,  $1.22 \pm 0.00$  และ  $1.22 \pm 0.02$  ตามลำดับ นอกจากนี้ น้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ มีค่า  $b^*$  เริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ  $23.64 \pm 0.03$ ,  $21.95 \pm 3.64$ ,  $22.37 \pm 0.23$  และ  $24.44 \pm 0.06$  ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า  $b^*$  และ  $\Delta E^*$  (ทุกตัวอย่างน้ำส้มมีค่า  $\Delta E^*$  เริ่มต้นที่ 0) พบว่าค่า  $b^*$  และ  $\Delta E^*$  ของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 30 และพบว่า ค่า  $\Delta E^*$  ของน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ เท่ากับ  $49.73 \pm 0.61$ ,  $25.56 \pm 1.04$ ,

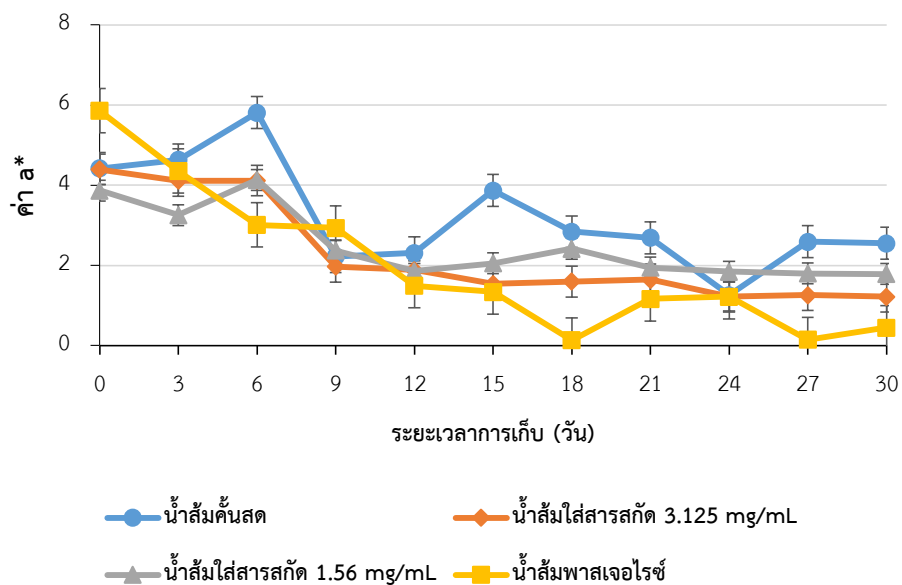


24.00±3.81 และ 47.11±2.83 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 54, 55, 56 และ 57 โดยค่า  $L^*$  เป็นค่าความสว่างของตัวอย่างน้ำส้ม (มีค่าอยู่ในช่วง 0-100 โดยถ้า  $L^*$  มีค่ามากแสดงว่าตัวอย่างมีความสว่างมาก) ค่า  $a^*$  เป็นค่าของสีเขียวและสีแดง ( $-a^*$  แสดงค่าสีเขียวและ  $+a^*$  แสดงค่าสีแดง) ค่า  $b^*$  เป็นค่าสีที่แสดงถึงสีเหลืองและน้ำเงิน ( $-b^*$  แสดงค่าสีน้ำเงิน และ  $+b^*$  แสดงค่าสีเหลือง) และค่า  $\Delta E^*$  เป็นค่าความแตกต่างของสีระหว่างตัวอย่างน้ำส้มก่อนเก็บรักษากับตัวอย่างน้ำส้มที่ผ่านการเก็บรักษาในแต่ละวัน (ถ้าค่า  $\Delta E^*$  มาก แสดงว่า ตัวอย่างมีสีแตกต่างจากค่าเริ่มต้นมาก) ซึ่งจากการวิเคราะห์ค่า  $L^*$  จากตัวอย่างน้ำส้มแต่ละชนิดพบว่ามีความสว่างลดลง และค่า  $a^*$  ลดลงแสดงว่ามีสีเป็นสีแดงมากกว่าสีเขียว นอกจากนี้ ค่า  $b^*$  ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแสดงถึงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นตัวอย่างน้ำส้มมีค่าสีเหลืองมากกว่าน้ำเงิน ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้ค่า  $\Delta E^*$  เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละวัน โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แสดงถึงความแตกต่างของตัวอย่างจากตอนเริ่มต้นมาก โดยการเปลี่ยนแปลงของค่าสีดังกล่าว เกิดจากแคโรทีนอยด์ที่เป็นสารสีหลักของน้ำส้มเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากมีโครงสร้างที่ไม่เสถียร และนอกจากนี้อาจเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในระหว่างการเก็บรักษาประกอบการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์ที่เกิดจากการสลายตัวของกรดแอสคอร์บิก และน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำส้ม จึงส่งผลให้สีของน้ำส้มเกิดการเปลี่ยนแปลงไประหว่างการเก็บรักษา (Wibowo *et al*, 2015) ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับ Lee และ Chen (1998) ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำส้มที่เก็บที่อุณหภูมิ 4–24 °C กับการสลายตัวของกรดแอสคอร์บิก โดยผลการศึกษาพบว่าสีที่เปลี่ยนแปลงไปของน้ำส้มมีความสัมพันธ์กับการสลายตัวของกรดแอสคอร์บิก โดยค่า  $L^*$   $a^*$  และ  $b^*$  มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลจากการสลายตัวของกรดแอสคอร์บิก ซึ่งส่งผลให้มีค่า  $\Delta E^*$  เพิ่มขึ้น และนอกจากนี้จากการศึกษาของ Choi, Kim และ Lee (2002) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารสีและสารแคโรทีนอยด์ในน้ำส้ม (*Citrus sinensis*) ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์และเก็บรักษาในขวดพลาสติกชนิด high-density polyethylene หรือ HDPE ที่อุณหภูมิ 4.5 °C เป็นเวลา 7 สัปดาห์ และพบว่าตัวอย่างน้ำส้มมีค่า  $\Delta E^*$  เพิ่มขึ้นโดยมีความสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณสารแคโรทีนอยด์

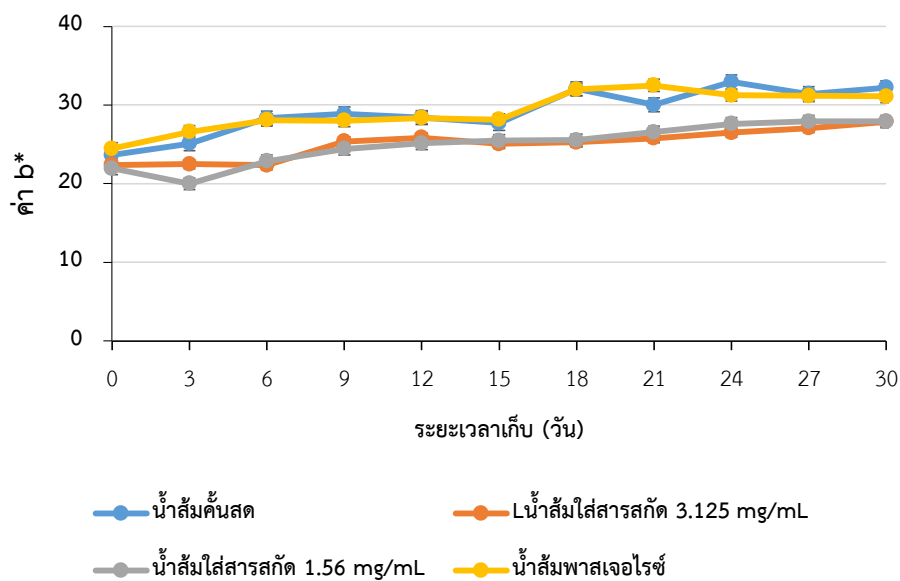
นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่า ค่า  $\Delta E^*$  ของน้ำส้มใส่สารสกัดต่างจากน้ำส้มคั้นสดและน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์เนื่องจากสีของสารสกัดส่งผลต่อสีของน้ำส้ม ดังนั้นอาจทำให้น้ำส้มที่ใส่สารสกัดมีอิทธิพลของค่า  $\Delta E^*$  มาจากสีของสารสกัดด้วย



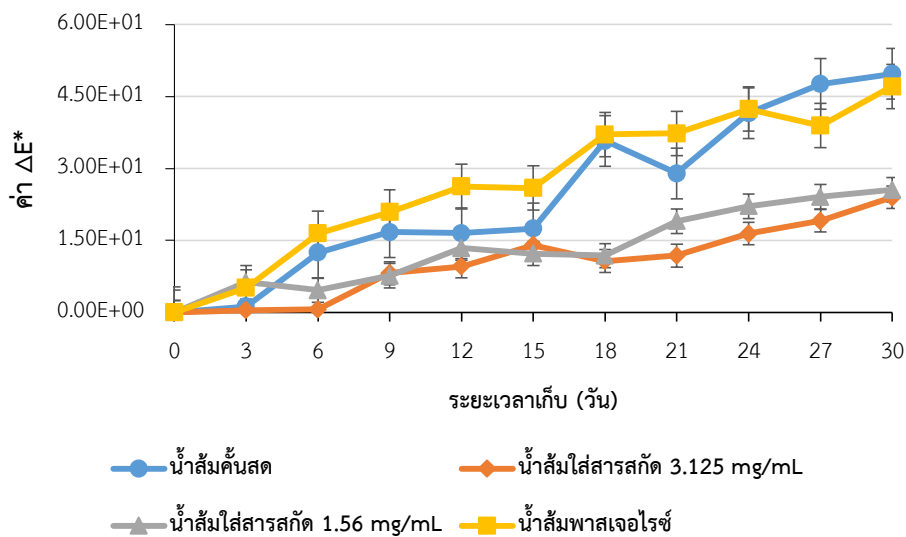
รูปที่ 54 ค่า L\* ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 55 ค่า a\* ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



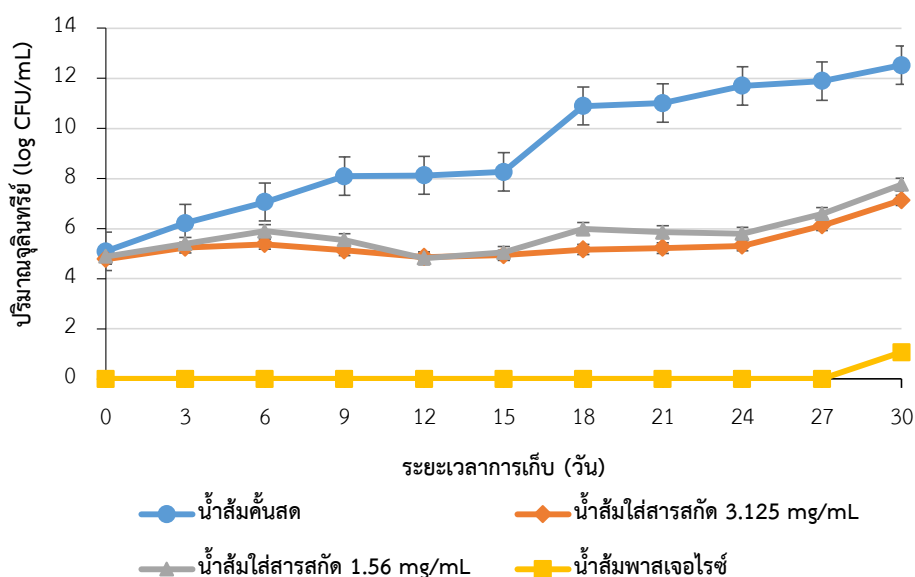
รูปที่ 56 ค่า  $b^*$  ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 57 ค่า  $\Delta E^*$  ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

น้ำส้มที่ผลิตไม่ถูกสุขลักษณะ มักพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาจทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ โดยการปนเปื้อนอาจมาจากวัตถุดิบ หากส้มอยู่ในสภาพไม่ดีหรือเน่าเสีย จำนวนจุลินทรีย์จะเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้อาจเกิดการปนเปื้อนมาจากกระบวนการผลิต น้ำส้มจึงมีโอกาสเสียและไม่ปลอดภัยกับผู้บริโภคได้ โดยปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total viable count, TVC) ต้องไม่เกิน

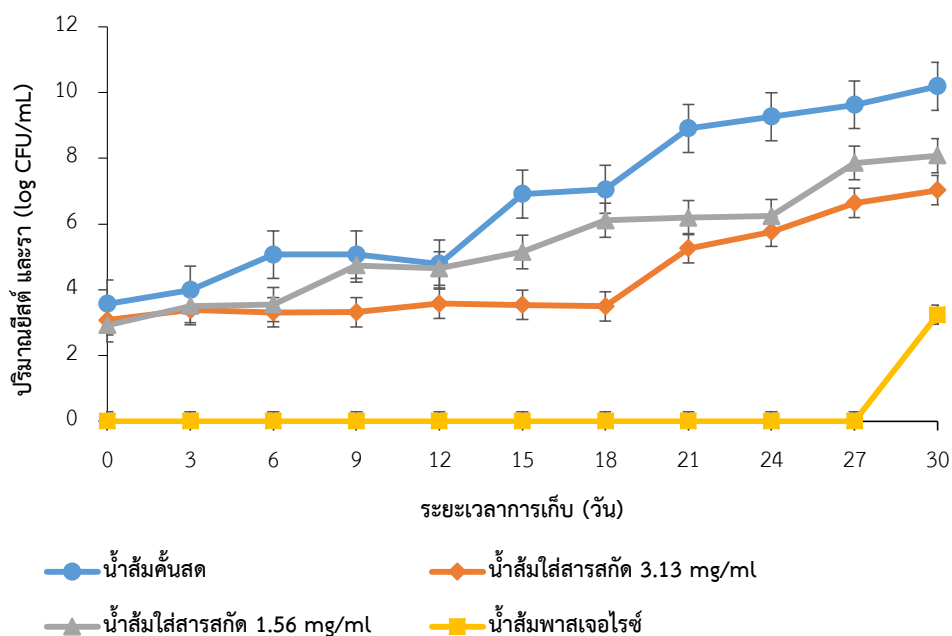
$1.0 \times 10^5$  CFU/mL (Gulf Standards, 2000) จากผลการทดลองพบว่าปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น (วันที่ 0) ของน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัด 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์เท่ากับ  $1.44 \pm 0.51 \times 10^3$ ,  $7.80 \pm 1.55 \times 10^3$ ,  $7.50 \pm 0.57 \times 10^3$  และ  $< 10$  CFU/mL ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาในการเก็บมากขึ้นพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ของน้ำส้มคั้นสด (ตัวอย่างควบคุม) น้ำส้มใส่สารสกัด 1.56 และ 3.125 mg/mL มีปริมาณจุลินทรีย์มากกว่า  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL ในวันที่ 3, 15 และ 21 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์เริ่มมีการเจริญของจุลินทรีย์ในวันที่ 30 ดังแสดงในรูปที่ 58



รูปที่ 58 ปริมาณจุลินทรีย์ของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

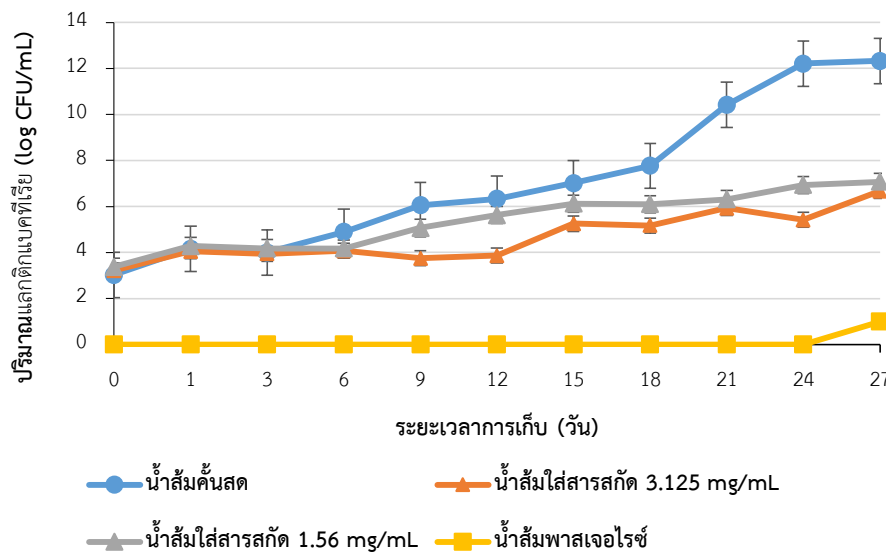
เนื่องจากน้ำส้มมีค่า pH ค่อนข้างต่ำ (pH ประมาณ 3.0-4.0) จึงเป็นข้อจำกัดของชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถรอดชีวิตหรือเจริญเติบโต ขณะเดียวกันน้ำส้มมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง ดังนั้นยีสต์จึงมักเป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมเสียของน้ำส้ม การเน่าเสียของน้ำส้มจากยีสต์มักเกิดกลิ่นหมัก มีเมือก รวมทั้งเกิดความขุ่นและแก๊สได้ (Murdock และ Hatcher, 1974) ตัวอย่างยีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Saccharomyces* spp., *Pichia* spp. และ *Torulopsis* spp. เป็นต้น โดยจำนวนยีสต์ที่พบในน้ำส้มต้องไม่เกิน 5000 CFU/mL (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553) จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณยีสต์เริ่มต้น (วันที่ 0) ของน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัด 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์มีค่าเท่ากับ  $1.32 \pm 0.47 \times 10^2$ ,  $1.35 \pm 0.01 \times 10^2$ ,  $8.60 \pm 0.70 \times 10^1$  และ  $< 10$  CFU/mL ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาในการเก็บมากขึ้นพบว่าปริมาณยีสต์ของน้ำส้มคั้นสด (ตัวอย่างควบคุม) น้ำส้มใส่สารสกัด 1.56 และ 3.125

mg/mL มีปริมาณยีสต์มากกว่า 5000 CFU/mL ในวันที่ 3, 9 และ 21 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์เริ่มมีการเจริญของยีสต์ในวันที่ 30 ดังแสดงในรูปที่ 59



รูปที่ 59 ปริมาณยีสต์และราของน้ำส้มระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

น้ำส้ม เป็นน้ำผลไม้ที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงจึงมักเสื่อมเสียจากแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติก เนื่องจากสามารถทนน้ำตาลและกรดได้ดี ซึ่งจำนวนที่พบในน้ำส้มโดยทั่วไปประมาณ  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL (Ding and Shah, 2008) และต้องมีจำนวนไม่เกิน  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL จึงจะอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Gulf Standards, 2000) จากผลการทดลองพบว่าปริมาณแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติก เริ่มต้น (วันที่ 0) ของน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใสสารสกัด 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ มีค่าเท่ากับ  $1.08 \times 10^1$ ,  $1.66 \times 10^1$ ,  $4.2 \times 10^2$  และ  $< 1$  CFU/mL ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาในการเก็บมากขึ้นพบว่าปริมาณแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกของน้ำส้มคั้นสด (ตัวอย่างควบคุม) น้ำส้มใสสารสกัด 1.56 และ 3.125 mg/mL มีปริมาณมากกว่า  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL ในวันที่ 9, 12 และ 21 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์เริ่มมีการเจริญของจุลินทรีย์ในวันที่ 30 ดังแสดงในรูปที่ 60



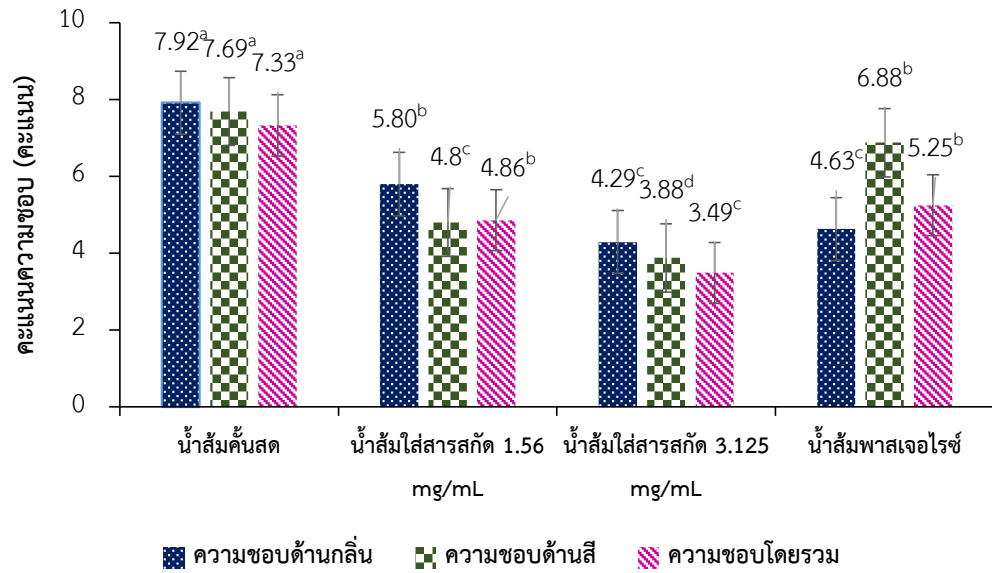
เมื่อพิจารณาอายุการเก็บของน้ำส้มตัวอย่างต่างๆ (น้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์) โดยใช้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา และแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกร่วมกับการพิจารณาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของน้ำส้มเป็นเกณฑ์ในการกำหนดอายุการเก็บ โดยทั่วไปเกณฑ์การเสื่อมเสียของน้ำส้มจะเกิดขึ้นเมื่อปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา และแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกมีปริมาณมากกว่า  $1 \times 10^5$ , 5,000 และ  $1 \times 10^5$  CFU/mL ตามลำดับ (Gulf Standards, 2000 ; กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553) เมื่อพิจารณาปริมาณยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์หลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในน้ำส้มประกอบกับการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น และลักษณะปรากฏ กล่าวคือ จุลินทรีย์สามารถสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) เมื่อขับออกนอกเซลล์จะส่งผลให้น้ำส้มขุ่น (Demain and Fang, 2011) ประกอบยีสต์ขับสารที่เป็นเมือก เหนียว ออกสู่นอกเซลล์ทำให้น้ำส้มมีลักษณะเป็นเมือก และนอกจากนี้ยีสต์ยังเปลี่ยนน้ำตาลในน้ำส้มเป็นแอลกอฮอล์ส่งผลให้มีกลิ่นหมักซึ่งลักษณะดังกล่าวไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Aneja *et al.*, 2014) จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างควบคุม (น้ำส้มคั้นสด) มีอายุการเก็บประมาณ 3 วัน ในขณะที่ตัวอย่างที่ใส่สารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ระดับความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL มีอายุการเก็บประมาณ 9 และ 21 วัน ตามลำดับ ในขณะที่น้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์มีอายุการเก็บมากกว่า 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา และแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 58, 59 และ 60 เนื่องจากน้ำส้มคั้นสดเป็นน้ำส้มที่ไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปทำให้เกิดการเสื่อมเสียได้ง่ายกว่าน้ำส้มตัวอย่างอื่นๆ ซึ่งโดยทั่วไปการเสื่อมเสียที่เกิดจากยีสต์ในน้ำส้มคั้นสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C สามารถพบได้ใน 1-2 สัปดาห์ขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อเริ่มต้น (Murdock and Hatcher, 1974) ในขณะที่น้ำส้มที่ใส่สารสกัดทั้งสองความเข้มข้น (1.56

และ 3.125 mg/mL) มีอายุการเก็บที่นานกว่าน้ำส้มคั้นสด เนื่องจากในสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (ในหัวข้อที่ 4.3) พบว่ามีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดังแสดงในหัวข้อที่ 4.2.5 แต่เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดที่ใส่ลงไปใต้น้ำส้มเป็นค่า MIC ที่เพียงยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เท่านั้นซึ่งไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าจุลินทรีย์ ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา และแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป โดยน้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 3.125 mg/mL มีอายุในการเก็บนานกว่าน้ำส้มใส่สารสกัด 1.56 mg/mL เนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (สุคนธ์ ต้นติไพบุลย์วุฒิ และคณะ, 2555) ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดมากกว่าจึงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Massini และคณะ (2016) ที่ศึกษาการนำสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ล (สารสกัดยับยั้งความเข้มข้นหลังจากกระเหยเอทานอลเท่ากับ 10-20 % w/v มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำมะเขือเทศและเก็บที่ 4 °C เป็นระยะเวลา 10 วัน และพบว่า น้ำมะเขือเทศที่ใส่สารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลมีอายุการเก็บที่นานกว่าน้ำมะเขือเทศควบคุม โดยน้ำมะเขือเทศควบคุมมีอายุการเก็บที่ 4 วัน ในขณะที่น้ำมะเขือเทศใส่สารสกัดมีอายุการเก็บรักษาที่มากกว่า 4 วัน และนอกจากนี้ Giner และคณะ (2011) ได้ศึกษาสารสกัดจาก *Lithospermum erythrorhizon*, *Rheum palmatum* และ *Thymus mastichina* ด้วยเอทานอล และประยุกต์ใช้ในน้ำมะเขือเทศ โดยใช้ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.8 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวได้มาจากการศึกษาค่า MIC ของ *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และศึกษาอายุการเก็บที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 16 วัน ด้วยการตรวจปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด โดยผลการศึกษาพบว่าในระยะเวลา 9 วันแรก สารสกัดต่างๆ ไม่ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างควบคุมกับตัวอย่างที่ใส่สารสกัดจากพืชแต่ละชนิด แต่หลังจากวันที่ 9 ยังมีการเจริญของจุลินทรีย์ ในขณะที่ตัวอย่างที่ใส่สารสกัดไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ตั้งแต่วันที่ 9-16 จากการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากพืชสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในน้ำผลไม้ได้โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และเพิ่มอายุการเก็บรักษา ในขณะที่น้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์เป็นน้ำส้มที่ผ่านการให้ความร้อนซึ่งสามารถทำลายจุลินทรีย์ในน้ำส้มได้ ทำให้มีอายุการเก็บที่นานขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปจะมีอายุการเก็บมากกว่า 100 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C (Leizerson and Shimoni, 2005)

#### 4.5 การศึกษาผลของสารสกัดมะเข็ญต่อสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มคั้นสด

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าคะแนนความชอบด้านกลิ่นของน้ำส้มคั้นสด และน้ำส้มใส่สารสกัดเมล็ดมะเข็ญปริมาณ 1.56 mg/mL มีค่าเท่ากับ  $8.11 \pm 0.65$  คะแนน และ  $6.31 \pm 0.92$  คะแนน ตามลำดับ โดยมีค่ามากกว่า 5 คะแนน ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ ชอบมาก และชอบเล็กน้อยตามลำดับ ในขณะที่น้ำส้มใส่สารสกัดเมล็ดมะเข็ญปริมาณ 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ มีคะแนนเท่ากับ  $5.01 \pm 1.06$  และ  $4.80 \pm 1.93$  คะแนน ตามลำดับ (อยู่ในเกณฑ์เฉยๆ) เนื่องจากในสารสกัดเมล็ดมะเข็ญมีสาร terpene alcohol ที่เป็นกลิ่นคล้ายคลึงกับน้ำส้มทำให้ผู้ทดสอบชื่นชอบ แต่เมื่อใส่ในปริมาณมากเกินไปอาจจะทำให้ผู้บริโภคได้กลิ่นของน้ำส้มที่ไม่เป็นธรรมชาติ ในขณะที่น้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปที่ใช้ความร้อนซึ่งความร้อนสามารถทำลายกลิ่นรสบางส่วนได้ ทำให้ผู้ทดสอบอาจจะรับรู้ได้เมื่อทดสอบตัวอย่าง ทำให้คะแนนความชอบด้านกลิ่นรสของน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์มีค่าน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม เมื่อพิจารณาคะแนนความชอบด้านสีพบว่า คะแนนความชอบของน้ำส้มคั้นสดและน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์มีค่าเท่ากับ  $7.73 \pm 0.82$  และ  $6.90 \pm 1.39$  คะแนน ตามลำดับ ซึ่งเป็นคะแนนที่อยู่ในเกณฑ์ ชอบมาก ในขณะที่คะแนนความชอบด้านสีของน้ำส้มที่เติมสารสกัด 1.56 และ 3.125 mg/mL มีคะแนนความชอบด้านสีเท่ากับ  $5.10 \pm 1.42$  และ  $4.09 \pm 1.58$  คะแนน ตามลำดับ ซึ่งเป็นคะแนนที่อยู่ในเกณฑ์ เฉยๆ และไม่ชอบเล็กน้อย ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากการใส่สารสกัดในปริมาณที่มากเกินไปอาจจะทำให้สีของน้ำส้มเปลี่ยนแปลง ดังนั้นควรระวังในเรื่องของปริมาณการใส่สารสกัดที่อาจส่งผลกระทบต่อความชอบด้านสี นอกจากนี้คะแนนความชอบโดยรวมของน้ำส้มคั้นสดมีค่าสูงสุด ( $7.51 \pm 1.21$  คะแนน) รองลงมาคือน้ำส้มที่เติมสารสกัด 1.56 mg/mL ( $5.10 \pm 1.43$ ) น้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ ( $5.43 \pm 1.87$ ) และน้ำส้มใส่สารสกัด 3.125 mg/mL ( $3.73 \pm 1.38$ ) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 61





รูปที่ 61 คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างน้ำส้ม

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ ความเข้มข้นเอทานอล 69% v/v เวลา 31 นาที อุณหภูมิ 52 °C และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 40% โดย โดยสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะนี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 552.93 mg GAE/100 g dry wt. และ 17.82 mg QCE/100 g dry wt. ตามลำดับ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 1769.70 และ 2168.82 mM trolox/100 g dry wt. ตามลำดับ ในขณะที่ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการแช่คือ ความเข้มข้นเอทานอล 71% v/v อุณหภูมิ 50 °C และเวลา 30 นาที โดยสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงที่ภาวะนี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 457.61 mg GAE/100 g dry wt. และ 12.74 mg QCE/100 g dry wt. ตามลำดับ และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 1566.41 และ 1290.32 mM trolox/100 g dry wt. ตามลำดับ โดยสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงจากวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงจากวิธีแช่จึงเลือกสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง มาใช้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ในการทดลองต่อไป

เมื่อศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยพิจารณาจากค่า MIC และค่า MBC แล้วพบว่า MIC และ MBC ของ *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella Typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Escherichia coli* อยู่ในช่วง 0.39-12.50 mg/mL และ 0.78-มากกว่า 100 mg/mL ตามลำดับ โดยสารสกัดสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด

ผลการศึกษานิตของสารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ได้จากการสกัดทั้งสองวิธีมีองค์ประกอบของกรดแกลลิก กรดคาเฟอิก กรดเฟอร์ูลิก และเคอควิทิโน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงจากวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยมีปริมาณของกรดแกลลิก กรดคาเฟอิก กรดเฟอร์ูลิก และเคอควิทิโนสูงกว่าสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงจากการสกัดด้วยวิธีการแช่

เมื่อพิจารณาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยแล้วจึงเลือกสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยความเข้มข้นเอทานอล 69% v/v เวลา 31 นาที อุณหภูมิ 52 °C และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 40% เนื่องจากมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และจากค่า MIC ปริมาณที่เหมาะสมในการนำสารสกัดมาใส่ในน้ำส้มคือ 12.50 mg/mL แต่เนื่องจากปริมาณดังกล่าวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านสีและกลิ่นรสไป

จากน้ำส้มควบคุมมาก จึงเลือกใช้สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ในการประยุกต์ใช้น้ำส้มโดยเปรียบเทียบกับน้ำส้มคั้นสดและน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์

จากการศึกษาผลของการเติมสารสกัด (1.56 และ 3.125 mg/mL) ต่อสมบัติทางเคมีกายภาพ และจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน และศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสโดยเปรียบเทียบกับน้ำส้มคั้นสดและน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ พบว่า น้ำส้มใส่สารสกัดความเข้มข้น 1.56 และ 3.125 mg/mL มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำส้มคั้นสดและน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ ตามลำดับ ค่า pH และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของทุกตัวอย่างลดลง ในขณะที่ค่าความแตกต่างของสี ( $\Delta E^*$ ) เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา และแลคติกแบคทีเรียร่วมกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของน้ำส้มเป็นเกณฑ์ในการกำหนดอายุการเก็บ พบว่าน้ำส้มคั้นสด น้ำส้มใส่สารสกัด 1.56 mg/mL น้ำส้มใส่สารสกัด 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ มีอายุการเก็บ 3, 9, 21 และมากกว่า 30 วัน ตามลำดับ และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าน้ำส้มใส่สารสกัด 1.56 mg/mL มีคะแนนความชอบด้านกลิ่นมากกว่าน้ำส้มใส่สารสกัด 3.125 mg/mL และน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ แต่น้อยกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และน้ำส้มใส่สารสกัดทั้งสองความเข้มข้นมีคะแนนความชอบด้านสีน้อยกว่าน้ำส้มคั้นสดและน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ นอกจากนี้ น้ำส้มคั้นสดมีคะแนนความชอบโดยรวมมากกว่าน้ำส้มใส่สารสกัดทั้งสองความเข้มข้นและน้ำส้มพาสเจอร์ไรซ์ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) จากการพิจารณาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ สมบัติทางด้านจุลินทรีย์ และสมบัติด้านประสาทสัมผัสพบว่าสารสกัดมะเข็ญสามารถนำมาประยุกต์ใช้น้ำส้มได้ โดยในการประยุกต์ใช้น้ำส้มควรระวังเรื่องการเปลี่ยนแปลงของสีเนื่องจากสีของสารสกัด

### ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ หากต้องการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมจริงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมร่วมกับการทดสอบในระดับเซลล์และสัตว์ทดลองต่อไป ทั้งนี้ การใส่สารสกัดเมล็ดมะเข็ญในน้ำส้มอาจมีทั้งจุดเด่นในด้านของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและข้อจำกัดของผลิตภัณฑ์ในด้านสี ซึ่งขึ้นอยู่กับการตัดสินใจและการยอมรับของผู้บริโภคเป็นหลัก

## รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิงภาษาไทย

- กมลลักษณ์ มาสำโรง และวราพจน์ สุนทรสุข. (2557). ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านแบคทีเรียของสารสกัดเปลือกแก้วมังกร. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 45(2), 269-272.
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2553). *ประกาศเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2* [ออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VARITY/dmscguide1.pdf> [12 มิถุนายน 2560].
- จันทนา กาญจน์กมล. (2558). ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่. ใน *การประชุมสวนสุนันทาวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 2*. หน้า 601-607. 26-27 พฤศจิกายน 2558. ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา กรุงเทพมหานคร.
- จิราวรรณ ถูกจิตร์. (2554). *การผลิตน้ำผลไม้เข้มข้นพร้อมดื่มจากน้ำมะเกี๋ยงผสมน้ำหม่อน โดยการรักษาภายใต้สุญญากาศ*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จิตติวรา ใยสำลี. (2552). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์เซอร์เบทจากมะเกี๋ยง*. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.
- ทวีพร อุณจักร. (2530). *การวิเคราะห์สกุลมะเกี๋ยงสูง (Eugenia paniala Roxb., Myrtaceae) ทางเคมี*. เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2544). *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ*. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- นิตยา รัตนาปนนท์. (2553). *เคมีอาหาร*. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์
- เนตรนภา เมยกลาง และ เฉลิม เรืองวิริยะชัย. (2547). การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ในเครื่องดื่มน้ำผลไม้. *วารสารวิจัย มช. (บค.)*, 14(4), 69.
- เบญจมาศ หนูแป้น, จาตุรนต์ ทิพย์วงศ์, กนกรัตน์ ไสสะอาด และ ไขนียะ สมะลา. (2559). สารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบราน้ำ. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*, 3, 26-33.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21(3), 275-286.
- ประเสริฐ ศรีไพโรจน์. (2528). *เทคนิคทางเคมี*. มหาสารคาม: ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม.

- ปัทมาพร โสภณิศา. (2549). *สมบัติทางกายภาพและสมบัติการต้านออกซิเดชันของผลมะเกี๋ยง ในระหว่างกระบวนการผลิตเครื่องดื่มผงและการเก็บรักษา*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ปิ่นมณี ขวัญเมือง. การหมักสาโทมะเกี๋ยง. (2549). ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44*. หน้า 242-249. 30 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2549. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร.
- พัชรินทร์ บุญกล้า, เมธิน ผดุงกิจ, อุดมศักดิ์ มหาวิวัฒน์ และ ธิติรัตน์ สมดี. (2557). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดใบชะพลู. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*, 10(3), 283-294.
- พิชญ์อร ไหมสุทธิกุล. (2551). *ผลของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยง (Cleistocalyx nervosum var paniala) ในการยับยั้งการหืนในต้นแบบน้ำมันถั่วเหลือง*. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย.
- พิมพ์ใจ อาษา. (2551). *องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านเชื้อ Propionibacterium acnes และ Staphylococcus aureus ของเมล็ดมะเกี๋ยง*. เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ, นิสิต กิตติพงษ์พัฒนา และอุดมภัณฑิ์ ขาลสุวรรณ. (2547). *การศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงเพื่อใช้ทางยา เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง [ออนไลน์]*. แหล่งที่มา:  
[http://dric.nrct.go.th/bookdetail.php?type=1&book\\_id=147149](http://dric.nrct.go.th/bookdetail.php?type=1&book_id=147149)  
 [20 มิถุนายน 2558] *พาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*
- พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ, สุมาลี พุกษากร และ อำไพ พฤติวรพงศ์กุล. (2551). *การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อสิว Propionibacterium acnes และ Staphylococcus aureus ของเมล็ดมะเกี๋ยง*. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- พระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 3635 (พ.ศ.2549) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 124 ตอนที่พิเศษ 49 ง (ลงวันที่ 25 เมษายน 2550)
- รองเดช ตั้งตระการพงษ์ และจุลจิตร ตั้งตระการพงษ์. (2556). ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดยี่ห่อ. *วารสารวิทยาศาสตร์ แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี*, 40-46.
- รัตนา ม่วงรัตน์, พงศธร ถ้ำทอง และ จรัสศรี หลวงพันธ์. (2559). การสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเปลือกกล้วยหอมทองโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติ. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)*, 8(15), 54-65.

- ลือชัย บุตุคูป. (2555). สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 31(4), 443-455.
- วรัญญา วงศ์วานิช และกิตติชัย บรรจง. (2559). ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดน้ำมันเมล็ดองุ่นด้วยวิธีการแช่ และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยสกัด. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 34(3), 9-21.
- วาทีณี เสลร์าชฎร์. (2559). การสกัด การตรวจสอบสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อแบคทีเรียของทุเรียนเทศ. *ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา*.
- วาทีณี ประดับศรี, บุญอ้อม โฉมที และอำไพ ทองธีรภาพ. (2558). การศึกษาแผนแบบพื้นผิวตอบสนองขนาดเล็กสำหรับตัวแบบกำลังสองเต็มและตัวแบบลดรูปในขอบเขตทรงกลม. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 23(3), 362-376.
- สุคนธ์ ต้นดีไพบุลย์วุฒิ, เทียนชัย น่วมเศรษฐี และ เพชรลดา เดชาเย็นง. (2555). ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้บางชนิด, *วารสารวิจัย มช.*, 17(6), 880-894.
- สุวรรณี แสนทวีสุข, ดวงใจ จงตามกลาง และ ทศน์วรรณ สมจันทร์ และ ปิติพงษ์ โตบันลือภพ. (2555). ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรบางชนิด. *แก่นเกษตร*, 40(2), 480-483.
- ศิริธร ศิริอมรรพธ. (2557). สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.
- สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรวิทยาลักษณ์นครลำปาง กระทรวงศึกษาธิการ. (2545). *มะเขี้ยวพิษในโครงการอนุรักษ์*. ลำปาง: ศิลปะการพิมพ์ลำปาง.
- อรชร ไอสันเทียะ และ กาญจนา วงศ์กระจ่าง. (2558). การศึกษาระบบตัวทำลายของการสกัดสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบ ฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดจากดอกดาวเรืองสด. *วารสารวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์*, 7(7), 29-39.
- อดิศักดิ์ หมั่นเกียง, นักรบ นาคประสม และ กาญจนา นาคประสม. (2559). การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากมะเขี้ยวโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมด้วยในการสกัด. ใน *การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 36*. หน้า 422-429. 29-31 ตุลาคม 2558. ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่.
- อรุษา เขาวนลิขิต. (2554). การสกัดและวิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*, 3(5), 27-36.
- อัศพงษ์ อุปะวรรณ และ สมชาย จอมดวง. (2557). ผลของความเข้มข้นของสารละลายซูโครสและอุณหภูมิในการอบแห้งของผลมะเขี้ยว (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) แช่อิ่มอบแห้งต่อสารออกฤทธิ์ชีวภาพ. ใน *การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 15*. หน้า 853-859. 28 มีนาคม 2557. ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

## รายการอ้างอิงภาษาอังกฤษ

- Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., Kumar, V., and Kaur, M. (2014). Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *International Journal of Food Science*.
- Arabshahi-Delouee, S., and Urooj, A. (2007). Application of phenolic extracts from selected plants in fruit juice. *International Journal of Food Properties*, 10, 479–488.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International* (18 Ed.). Washington DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Atav, R. (2013). The use of new technologies in dyeing of proteinous fibers. In M. Günay (Ed.), *Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing* (pp. Ch. 05). Rijeka: InTech.
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., and Orlie, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 96-109.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Micro*, 13(10), 620-630.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Chattopadhyay, K., and Chattopadhyay, B. D. (2008). Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. *Journal of research and education in indian medicine*, 127, 571-576.
- Chemat, F., et al. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.

- Choi, M. H., Kim, G. H., and Lee, H. S. (2002). Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Research International*, 35(8), 753-759.
- Corbin, C., et al. (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 176–185.
- Da Porto, C., Porretto, E., and Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1076-1080.
- Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V., and Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84(1), 99-105.
- Demain, A. L., and Fang, A. (2011). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 69). Netherlands.
- Dent, M., et al. (2015). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction techniques on mass fraction of phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 29(3), 475-484.
- Dévay, A. (2013). The Theory and Practice of Pharmaceutical Technology [online]. Retrieved from [http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011-0016\\_01\\_the\\_theory\\_and\\_practise\\_of\\_pharmaceutical\\_technology/ch14.html](http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011-0016_01_the_theory_and_practise_of_pharmaceutical_technology/ch14.html) [18 April 2017]
- Ding, W. K., and Shah, N. P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal*, 15(2), 219-232.
- El-Dengawy, R. A. H., El-said, S. M. M., El-Kadi, S. M. L., and Shalata, A. A. M. (2016). Effect the industrial process and the storage periods on the nutritional value. *Indian journal of nutrition*, 3(1), 121-124.
- Freiesleben, S. H., and Jäger, A. K. (2014). Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms—A Review. *Medicinal & Aromatic Plants*, 3(2).



- Fuerst, J. (2013). Microorganisms—A Forum for understanding microbial life in all its forms. *Microorganisms*, 1(1), 1-2.
- Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., , and Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4988-4954.
- Giner, M. J., et al. (2012). Antimicrobial activity of food-compatible plant extracts and chitosan against naturally occurring micro-organisms in tomato juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1917–1923.
- Gulf Standards. (2000). *Microbiological criteria for food stuffs-part 1*. Riyadh Saudi Arabia.
- Harvey, D. (2013). Soxhlet Extraction [online]. Retrieved from <http://community.asdlib.org/imageandvideoexchangeforum/2013/07/24/soxhlet-extraction/> [18 April 2017]
- Hayat, K. (2013). Why is it more difficult to treat gram negative bacteria. Retrieved from <http://medimoon.com/2013/04/why-is-it-more-difficult-to-treat-gram-negative-bacteria/> [20 May 2016]
- Hemwimol, S., Pavasant, P., and Shotipruk, A. (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(6), 543-548.
- Iloki-Assanga, S. B., et al. (2015). Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Research Notes*, 8(1), 396.
- Jing, P., et al. (2014). Characterization of phytochemicals and antioxidant activities of red radish brines during lactic acid fermentation. *Molecules*, 19(7), 9675-9688.
- Khatkar, A., Nanda, A., Kumar, P., and Narasimhan, B. (2017). Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of gallic acid derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S2870-S2880.

- Kitson, T. M. (2004). Spectrophotometric and kinetic studies on the binding of the bioflavonoid quercetin to bovine serum albumin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(10), 2165-2170.
- Lambert, R. J., Skandamis, P.N., Coote, P.J., and Nychas, G.J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
- Lee, H. S., and Chen, C. S. (1998). Rates of vitamin c loss and discoloration in clear orange juice concentrate during storage at temperatures of 4–24 °C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4723-4727.
- Leizerson, S., and Shimoni, E. (2005). Stability and sensory shelf life of orange juice pasteurized by continuous ohmic heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4012-4018.
- Lillo, C., Lea, U.S., and Ruoff, P. (2008). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell and Environment*, 31(5), 587-601.
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M., and Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100, 1409-1418.
- Manickam, S. (2013). What is pharmaceutical nanoemulsion? [Online]. Retrieved from <http://blogs.nottingham.ac.uk/malaysiaknowledgetransfer/2013/06/25/what-is-pharmaceutical-nanoemulsion/> [10 July 2017].
- Manosroi, J., Chankhampan, C., Kumguan, K., Manosroi, W. and Manosroi, A. (2015). In vitro anti-aging activities of extracts from leaves of Ma Kiang (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*). *Pharmaceutical Biology*, 53(6), 862–869.
- Maragò, E., et al. (2015). Phenolic profile and antioxidant activity in apple juice and pomace: effects of different storage conditions. *Fruits*, 70(4), 213-223.
- Massini, L., Rico, D., Martin-Diana, A., and Barry-Ryan, C. (2016). Quality markers of functional tomato juice with added apple phenolic antioxidants. *Beverages* 2016, 2(1).
- Mgaya-Kilima, B., Remberg, S. F., Chove, B. E., and Wicklund, T. (2014). Influence of storage temperature and time on the physicochemical and bioactive properties

- of roselle-fruit juice blends in plastic bottle. *Food Science & Nutrition*, 2(2), 181-191.
- Miguel-Chávez, R. S. (2017). Phenolic antioxidant capacity: A Review of the State of the Art. In M. Soto-Hernandez, M. Palma-Tenango, & M. d. R. Garcia-Mateos (Eds.), *Phenolic Compounds - Biological Activity* (pp. Ch. 04). Rijeka: InTech.
- Moridani, M. Y., Scobie, H., Jamshidzadeh, A., Salehi, P., and Brien, P. J. (2001). Caffeic acid, Chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(11), 1432.
- Moreno, S., Scheyer T., Romano C. and Vojnov, A. (2006). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Rosemary Extracts Linked to Their Polyphenol Composition. *Free Radical Research*, 40, 223-231.
- Murdock, D. I., and Hatcher, W. S. J. (1975). Growth of microorganisms in chilled orange juice. *Journal of milk and food technology*, 38(7), 393-396.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1998). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards document M100-S9*. Wayne, PA (USA): National Committee for Clinical Laboratory Standards
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1999). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards document M100-S9*. Wayne, PA (USA): National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Nave, R. (2000). Traveling wave relationship [online]. Retrieved from <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/wavrel.html> [18 April 2017]
- Nayak, C. A., Srinivas, P., and Rastogi, N. K. (2010). Characterisation of anthocyanins from *Garcinia indica* Choisy. *Food Chemistry*, 118(3), 719-724.
- Nychas, G., and Tassou, C. (1999). *Preservatives: traditional preservatives – oils and spices*. In Richard, K.R., *Encyclopedia of Food Microbiology*, . Oxford: Elsevier.
- Panawala, L. (2017). Difference between Gram positive and Gram negative bacteria [online]. Retrieved from

[https://www.researchgate.net/publication/315757324\\_Difference\\_Between\\_Gram\\_Positive\\_and\\_Gram\\_negative\\_Bacteria](https://www.researchgate.net/publication/315757324_Difference_Between_Gram_Positive_and_Gram_negative_Bacteria) [18 April 2017]

- Patil, S., Rao, R. S., Majumdar, B., and Anil, S. (2015). Clinical appearance of oral candida infection and therapeutic strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1391.
- Pinelo, M., Sineiro, J., and Núñez, M. a. J. (2006). Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, 77(1), 57-63.
- Pittella, F., Dutra, R., Junior, D., Lopes, M. T., and Barbosa, N. (2009). Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L) Urb. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3713.
- Podsedek, A., Sosnowska, D., and Anders, B. (2003). Antioxidative capacity of tomato products. *European Food Research and Technology*, 217(4), 296-300.
- Poquet, L., Clifford, M. N., and Williamson, G. (2007). Transport and Metabolism of Ferulic Acid through the Colonic Epithelium. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(1), 190.
- Quiroga, E. N., Sampietro, A.R. and Vattuone, M.A. (2001). Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(1), 89-96.
- Ramamoorthy, P. K., and Bono, A. (2007). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda Citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science & Technology*, 2, 70-80.
- Randhir, R., Lin, Y.T. & Shetty, K. (2004). Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13, 295-307.
- Saci, F., Meziant, L., and Louaileche, H. (2015). Effect of storage time and temperature on the health-promoting substances and antioxidant activity of two commercial fruit based-beverages. *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 1(2), 118-122.
- Safdar, M. N., Kausar, T., and Nadeem, M. (2016). Comparison of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from the mango peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, n/a-n/a.

- Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A., and Gänzle, M. G. (2011). Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *111*(5), 1176–1184.
- Santos, H. M., Lodeiro, C. and Capelo-Martínez, J.L. (2008). The Power of ultrasound [online]. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527623501.ch1/summary> [20 June 2017]
- Shan, B., Cai, Y.-Z., Brooks, J. D., and Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, *117*(1), 112-119.
- Sharma, K., et al. (2015). Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. *Journal of Food and Drug Analysis*, *23*(2), 243-252.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, *4*, 180-183.
- Singh, A., Holvoet, S. and Mercenier, A. (2011). Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clinical & Experimental Allergy*, *41*(10), 1346-1359.
- Tasnim, F., Hossain M., A., Hossain M., K., Lopa, D., and Formuzul Haque, K. M. (2010). Quality assessment of industrially processed fruit juices available in dhaka city, bangladesh. *Malaysian Journal of Nutrition*, *16*(3), 431-438.
- Taya, S., Punvittayagul, C., Inboot, W., Fukushima, S., and Wongpoomchai, R. (2014). Cleistocalyx nervosum extract ameliorates chemical-induced oxidative stress in early stages of rat hepatocarcinogenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(6), 2825-2830.
- Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B., and Martin Lo, Y. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(1), 202-208.
- Turánek, J., et al. (2015). Lipid-based nanoparticles and microbubbles – multifunctional lipid-based biocompatible particles for in vivo imaging and theranostics. In P. A. Serra (Ed.), *Advances in Bioengineering* (pp. Ch. 04). Rijeka: InTech.

- Vanjb, P. (2011). macération [online]. Retrieved from <http://tpe-parfum2012.e-monsite.com/blog/do/tag/maceration/> [2 June 2017]
- Vardanega, R., Santos, D.T. and Meireles, A.A. (2014). Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. *Pharmacognocny Review*, 8, 88-95.
- Vermeris, W., and Nicholson, R. (2009). *Phenolic compound biochemistry*. Germany: Springer
- Waterhouse, A. L. (2002). *Determination of total phenolics* (R. E. Wrolstad Ed.). New York: John Wiley and Sons.
- Wibowo, S., et al. (2015). Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage. *Food Chemistry*, 171, 330-340.
- Zhang, Y. B., Wang, Y.H., Zhang, D.Y., Zhou, L.L., and Guo, Y. X. (2014). Ultrasound-assisted extraction and purification of schisandrin B from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill seeds: Optimization by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 461-466.
- Zhang, Z.-S., et al. (2007). Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 57(1), 17-24.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## ภาคผนวก ก

### วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ

#### ก.1 ค่าสีของน้ำส้ม

วัดสีของน้ำส้มด้วยเครื่อง Chroma meter (Model CR-400 series, Minolta, Japan) ระบบ CIELAB และบันทึกค่า  $L^*$ ,  $a^*$  และ  $b^*$  โดยปรับมาตรฐานเครื่องก่อนการวัดตัวอย่างน้ำส้มทุกครั้ง

โดย ค่า  $L^*$  แสดงถึง ค่าความสว่าง (lightness) มีค่าตั้งแต่ 0-100

0 แสดงถึง สีดำ

100 แสดงถึง สีขาว

ค่า  $a^*$  แสดงถึง ค่าสีแดงและเขียว (redness/greenness)

+ $a^*$  แสดงถึง สีแดง

-  $a^*$  แสดงถึง สีเขียว

ค่า  $b^*$  แสดงถึง ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (yellowness/blueness)

+ $b^*$  แสดงถึง สีเหลือง

-  $b^*$  แสดงถึง สีน้ำเงิน

#### ก.2 ค่าความแตกต่างของสี ( $\Delta E^*$ ) น้ำส้ม

วัดสีของน้ำส้มด้วยเครื่อง Chroma meter (Model CR-400 series, Minolta, Japan) ระบบ CIELAB และบันทึกค่า  $L^*$ ,  $a^*$  และ  $b^*$  โดยปรับมาตรฐานเครื่องก่อนการวัดตัวอย่างน้ำส้มทุกครั้ง แล้วคำนวณค่าความแตกต่างของสี ( $\Delta E^*$ ) แสดงดังสมการที่ ก.1

$$\Delta E^* = [(L^*1-L^*2)^2 + (a^*1-a^*2)^2 + (b^*1-b^*2)^2]^{1/2}$$

สมการที่ ก.1

โดยกำหนดให้ subscript 1 คือ ค่าสีตัวอย่างน้ำส้มเริ่มต้น

subscript 2 คือ ค่าสีที่วัดได้ในแต่ละครั้ง



## ภาคผนวก ข

### วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

#### ข.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ด้วย เครื่อง Refractometer (Master-Alpha Series, Atago, USA) ที่ความเข้มข้น 0-32 °Brix

#### ข.2 ค่า pH

วัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter (Mettler toledo, Switzerland)

#### ข.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดย Folin-Ciocalteu ตามวิธีของ Waterhouse (2002)

##### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10 UV, USA)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler, NewClassic MF, Switzerland)

##### สารเคมี

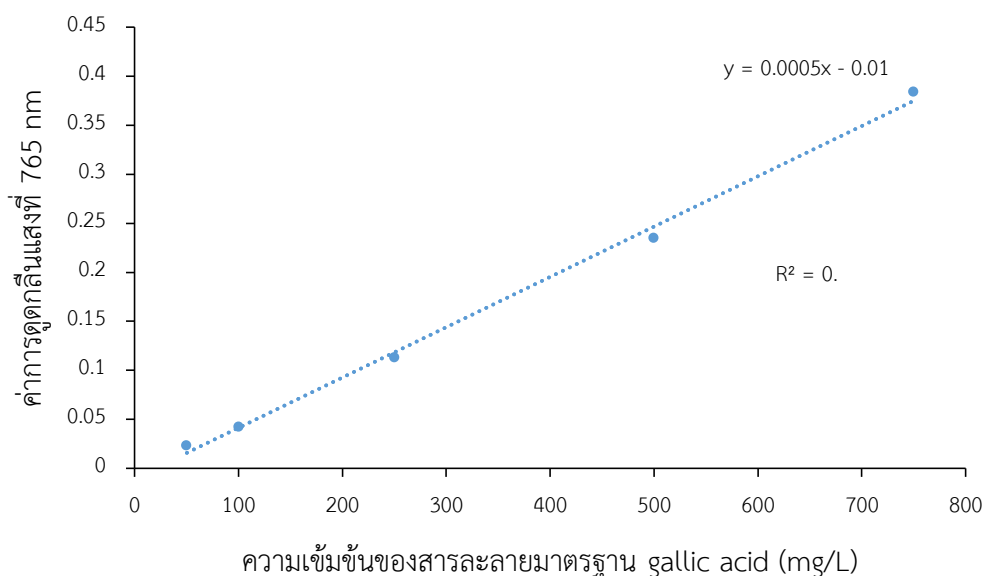
1. Gallic acid (Ajax Finechem, Australia)
2. สารละลาย Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Daejung, Korea)
3. สาร Folin-Ciocalteu (Merck, Germany)
4. Ethanol (A.R. grade, VWR Prolabo, France)

##### วิธีการเตรียมสารละลาย sodium carbonate อิมิตัว

1. ละลาย sodium carbonate 200 g ในน้ำ 800 mL แล้วนำไปให้ความร้อน เพื่อเพิ่มอัตราการละลาย
2. เมื่อ sodium carbonate ละลายจนหมดแล้ว ให้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม sodium carbonate ลงไปเล็กน้อย ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
3. เมื่อครบ 24 ชั่วโมงนำสารละลายมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 L ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 L ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid และการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ละลาย gallic acid 0.5 g ปริมาตร 10 mL ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 mL ด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL (มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 g/L)
2. ปิเปตสารละลาย gallic acid ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มา 1 2 5 10 และ 15 mL บรรจุลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL ด้วยน้ำกลั่น (ตัวอย่างมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 100 250 500 และ 750 mg/L ตามลำดับ)
3. ผสมสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 20  $\mu$ L มากับน้ำกลั่นปริมาตร 1.58 mL และสาร Folin-Ciocateau ปริมาตร 100  $\mu$ L ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 8 นาที จากนั้นจึงปิเปตสารละลาย sodium carbonate ปริมาตร 300  $\mu$ L ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
4. วัดค่าดูดกลืนแสงสารละลายมาตรฐานที่ความยาวคลื่นแสง 765 nm
5. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) แสดงดังรูปที่ ข.1



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

### วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 20  $\mu\text{L}$  ลงในหลอดทดลอง
2. ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 1.58 mL และสาร Folin-Ciocalteu ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  ลงใน หลอดทดลองผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 1-8 นาที
3. ปิเปตสารละลาย sodium carbonate ปริมาตร 300  $\mu\text{L}$  ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 765 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐาน รายงานค่าเป็น mg GAE/100 g dry wt.

### ข.4 ปริมาณฟลาโวนอยด์ตามวิธีของ Maisuthisakul, Suttajit, และPongsawatmanit (2007)

#### อุปกรณ์และเครื่องมือ

3. เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10 uv, USA)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler, NewClassic MF, Switzerland)

#### สารเคมี

1. Quercetin (Sigma-Aldrich, Germany)
2. Aluminium chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) (Ajax Finechem, New Zealand)
3. Sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) (Ajax Finechem, New Zealand)
4. Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Fisher Scientific, UK)

#### วิธีการเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ( $\text{NaNO}_2$ ) เข้มข้น 5% w/v

- ละลายโซเดียมไนไตรท์ 5 g ในน้ำ 100 mL

#### วิธีการเตรียมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ( $\text{AlCl}_3$ ) เข้มข้น 10% w/v

- อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ 10 g ในน้ำ 100 mL

#### วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin และการสร้างกราฟมาตรฐาน

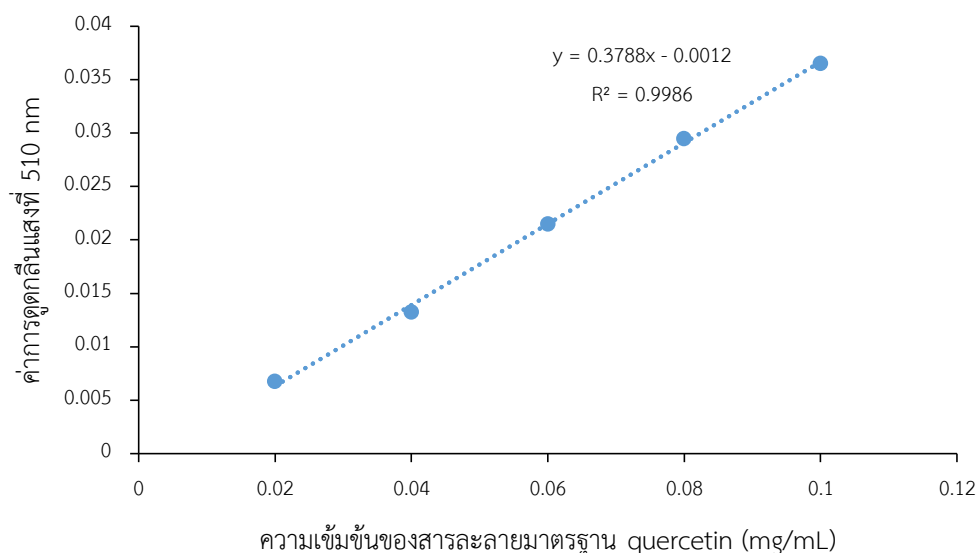
1. เตรียมสารละลาย quercetin ใน methanol และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 mg/mL
2. ปิเปตสารละลาย quercetin ในข้อ 1 ปริมาตร 0.5 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 mL และสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ( $\text{NaNO}_2$ ) เข้มข้น 5% w/v ปริมาตร 0.15 mL ผสมให้เข้ากัน

เติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ( $\text{AlCl}_3$ ) เข้มข้น 10% w/v ปริมาตร 0.15 mL ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

3. เติมน้ำกลั่น 2.2 mL ผสมให้เข้ากัน
4. วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ความยาวคลื่นแสง 510 nm
5. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) แสดงดังรูปที่ ข.2

#### วิธีวิเคราะห์

1. ละลายตัวอย่าง 1 mg ใน methanol 1 mL (ความเข้มข้น 1 mg/mL)
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างในข้อ 1 ปริมาตร 0.5 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 mL และสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ( $\text{NaNO}_2$ ) เข้มข้น 5% w/v ปริมาตร 0.15 mL ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
3. เติมน้ำกลั่น 2.2 mL ผสมให้เข้ากัน
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 510 nm คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์จากกราฟมาตรฐานของ quercetin แสดงดังรูปที่ ข.2 และรายงานค่าเป็น mg QCE/100 g dry wt.



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

## ข.5 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay ดัดแปลง จากวิธีของ Brand-Williams และคณะ. (1995)

### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10 UV, USA)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler, NewClassic MF, Switzerland)

### สารเคมี

1. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) (Sigma Aldrich, USA)
2. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich, USA)
3. Methanol (CH<sub>3</sub>OH) (Fisher Scientific, UK)

### วิธีการเตรียมสารละลาย DPPH

1. เตรียม stock solution โดยชั่ง DPPH มา 24 mg ละลายใน methanol 50 mL เติลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL และปรับปริมาตรด้วย methanol จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ DPPH เท่ากับ  $6 \times 10^{-4}$  M เก็บสารละลาย DPPH ที่อุณหภูมิ 4°C ไม่เกิน 5 วัน
2. เตรียม daily solution โดยปิเปตสารละลาย DPPH จากข้อ 1 มา 10 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 mL แล้วปรับให้มีปริมาตรเป็น 50 mL ด้วย methanol จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ DPPH เท่ากับ  $1.2 \times 10^{-4}$  M ใช้ Daily Solution ในการวิเคราะห์ต่อไป (ค่าดูดกลืนแสง daily solution ( $A_{\text{initial}}$ ) ควรมีค่าประมาณ 1.1 ถ้าหากค่าการดูดกลืนแสงมากหรือน้อยกว่า 1.1 ให้เติม methanol หรือสารละลาย DPPH จากข้อ 1 ตามลำดับ เพื่อปรับค่า  $A_{\text{initial}}$ )

### วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox

1. ชั่ง trolox มา 25 mg ละลายใน methanol ปริมาตร 10 mL แล้วใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL ผสมให้เข้ากัน สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10000  $\mu\text{M}$

2. นำสารละลาย trolox ความเข้มข้น 10000  $\mu\text{M}$  มาเจือจาง ดังแสดงในตารางที่ ข.1 ในการสร้างกราฟมาตรฐานจะใช้สารละลายมาตรฐาน trolox ที่ความเข้มข้น 82-417  $\mu\text{M}$

ตารางที่ ข.1 วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox

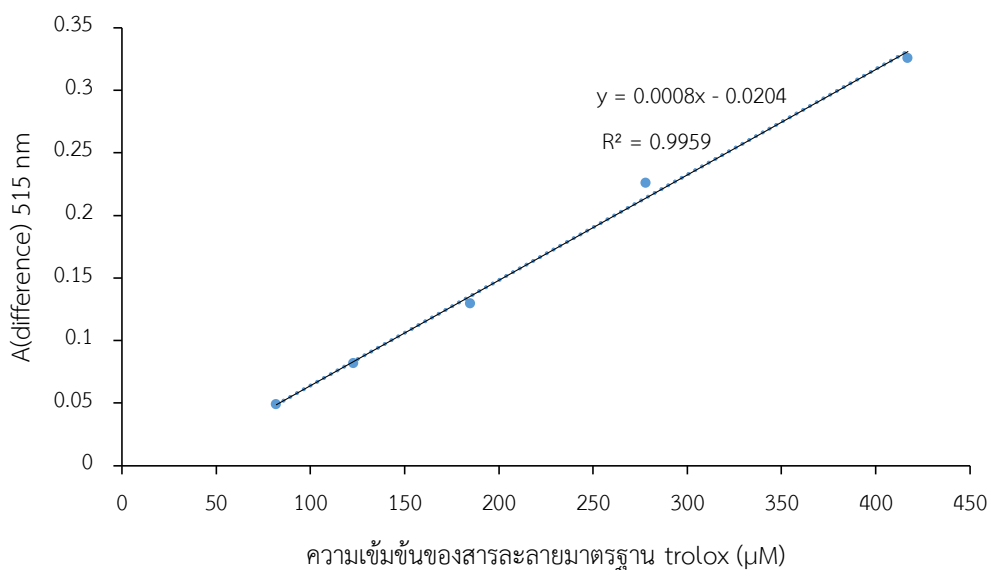
ความเข้มข้นเริ่มต้น ( $\mu\text{M}$ )	ปริมาตร trolox (mL)	ปริมาตร methanol (mL)	ความเข้มข้นสุดท้าย ( $\mu\text{M}$ )
10000	5	5	5000
5000	5	5	2500
2500	5	5	1250
1250	5	5	625
625	4	2	417
417	4	2	278
278	4	2	185
185	4	2	123
123	4	2	82

#### วิธีวิเคราะห์และการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตตัวอย่าง (ในการสร้างกราฟมาตรฐานจะใช้ trolox แทนตัวอย่าง) มา 20 mL ผสมกับสารละลาย DPPH 950  $\mu\text{L}$  ทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
2. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่นแสง 515 nm ใช้ methanol เป็นตัวอย่างอ้างอิง (เพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากับ 0)
3. ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ( $A_{\text{initial}}$  ควรมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.1) จะนำมาหักลบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากตัวอย่าง ( $A_{\text{final}}$  ควรมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.6-0.7) ได้เป็นผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{\text{difference}}$ )

$$A_{\text{difference}} = A_{\text{initial}} - A_{\text{final}}$$

4. นำ  $A_{\text{difference}}$  ที่ได้จากตัวอย่างไปคำนวณหาค่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยเทียบกับ  $A_{\text{difference}}$  ของกราฟมาตรฐานของ trolox ดังแสดงในรูปที่ ข.3 รายงานค่าเป็น mM trolox/100 g dry wt.



**รูปที่ ข.3** กราฟการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

**ข.6** ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay  
ดัดแปลงจากวิธีของ Benzie และ Strain, (1996)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10 UV, USA)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler, NewClassic MF, Switzerland)

สารเคมี

1. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) (Sigma Aldrich, USA)
2. Sodium acetate trihydrate (Ajax Finechem, Australia)
3. Tripyridyltriazine (TPTZ) (Merck, Germany)
4. Ferric chloride (POCH S.A., Poland)

5. Glacial acetic acid (A.R. grade, J.T. Baker Neutrasorb, USA)
6. 0.1 M. Hydrochloric acid (A.R. grade, Ajax Finechem, Australia)
7. Methanol (CH<sub>3</sub>OH) (Fisher Scientific, UK)

#### วิธีการเตรียมสารละลาย FRAP

1. เตรียมสารละลาย acetate buffer โดยผสม sodium acetate trihydrate 0.3 g และ glacial acetic acid ปริมาตร 1.6 mL แล้วปรับให้มีปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL
2. เตรียมสารละลาย ferric chloride โดยละลาย ferric chloride 270 mg ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 mL ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 mL
3. เตรียมสารละลาย TPTZ โดยเติม TPTZ ปริมาณ 31.2 mg ลงใน 0.04 M. hydrochloric acid ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL
4. เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสม acetate buffer 25 mL ferric chloride 2.5 mL และ TPTZ 2.5 mL ตามลำดับ

#### วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox

เตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามวิธีที่ระบุไว้ในภาคผนวก ข.3 ในการสร้างกราฟมาตรฐานที่จะใช้สารละลายมาตรฐาน trolox ที่ความเข้มข้น 82-625  $\mu$ M

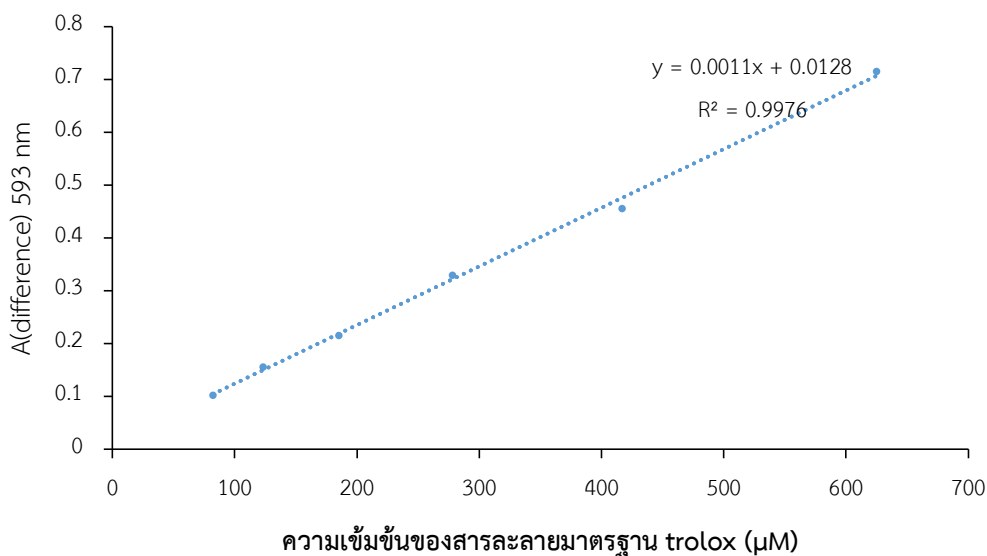
#### วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลาย FRAP มาให้ความร้อนที่ 37 °C ในอ่างให้ความร้อน ซึ่งจะให้น้ำตาลอมแดง
2. ปิเปตตัวอย่างมา 50 mL (ในการสร้างกราฟมาตรฐานจะใช้ trolox แทนตัวอย่าง) ผสมกับสารละลาย FRAP 950  $\mu$ L ในหลอดทดลอง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่นแสง 593 nm ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอย่างอ้างอิง (เพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากับ 0)
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากตัวอย่าง ( $A_{\text{final}}$ ) มาหักลบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย FRAP ( $A_{\text{initial}}$ ) ได้ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{\text{difference}}$ )

$$A_{\text{difference}} = A_{\text{final}} - A_{\text{initial}}$$



5. นำ  $A_{\text{difference}}$  ที่ได้จากตัวอย่างไปคำนวณหาค่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยเทียบกับ  $A_{\text{difference}}$  ของกราฟมาตรฐานของ trolox ดังแสดงในรูปที่ ข.4 รายงานค่าเป็น mM trolox/100 g dry wt.



รูปที่ ข.4 กราฟสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

ข.7 ปริมาณ gallic acid ด้วยเครื่อง HPLC ดัดแปลงตามวิธีการสกัดของพิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2547)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC (Prostar, Varian, Darmstadt, Germany)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (MS304S, Mettler Toledo, Switzerland)

สารเคมี

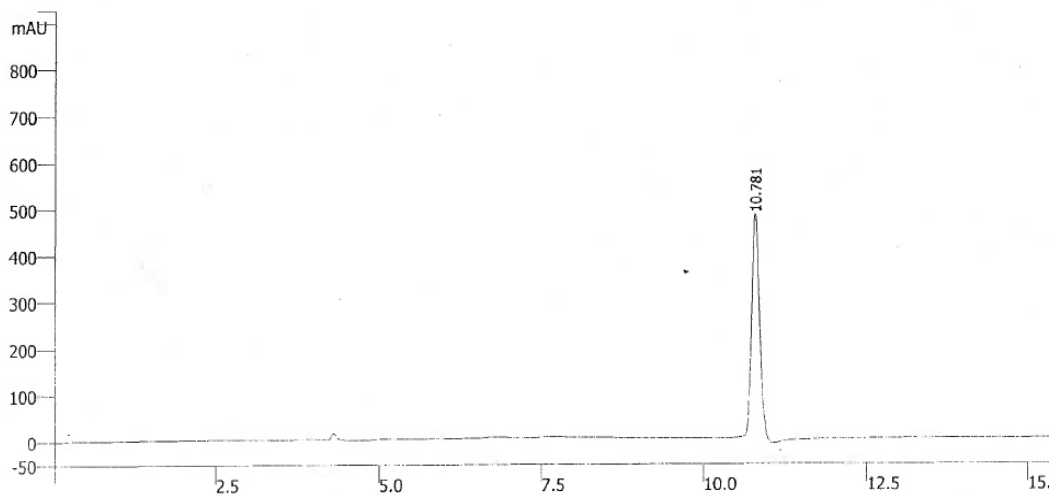
1. Gallic acid (Ajax Finechem, Australia)
2. Methanol HPLC grade (Fisher Chemical, UK)

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid และการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ละลาย gallic acid 2 mg ใน methanol HPLC grade 10 mL (มีความเข้มข้นเท่ากับ 200 ppm)
2. ปิเปตสารละลาย gallic acid ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 50 25 และ 12.5 ppm ตามลำดับ และกรองผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
3. ฉีดสารละลาย gallic acid เข้าเครื่อง HPLC หลังจากนั้นเครื่อง HPLC จะทำการตรวจวัดวิเคราะห์และประมวลผลออกมาในรูปแบบของโครมาโทแกรม โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ ดังนี้
  - คอลัมน์ : uBondapakC18 300×4.9 mm
  - อัตราเร็ว : 1mL/min
  - การตรวจหา : UV Absorbance ที่ 254 nm
  - ระยะเวลา : 20 นาที
  - วัฏภาคเคลื่อนที่ : 100 % H<sub>2</sub>O (pH 3) -100 % methanol แบบ gradient ดังนี้

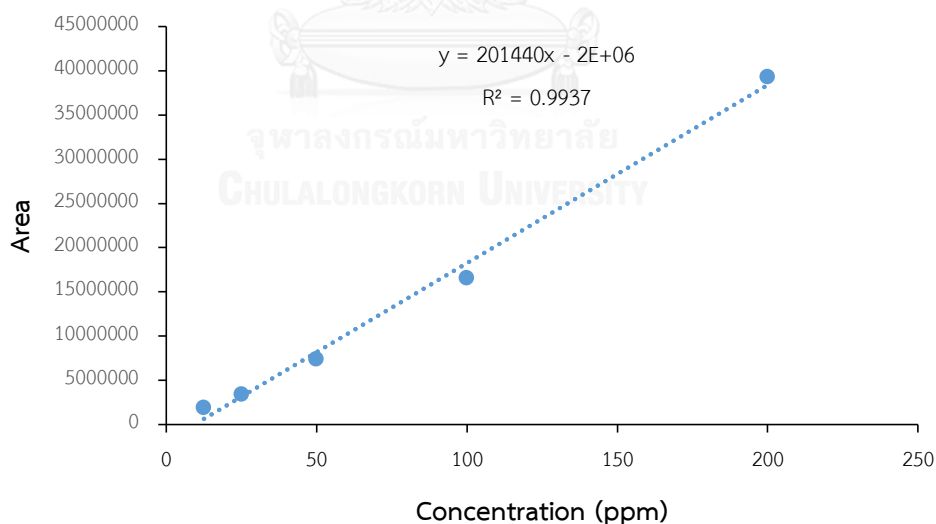
ระยะเวลา (นาที)	100 % H <sub>2</sub> O (pH3)	100 % methanol
0.00	100	-
20.00	-	100
25.00	100	-

จากการฉีดสารละลาย gallic acid เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมที่มีค่าหน่วงเวลา (retention time, RT) แสดงดังรูปที่ ข.5



รูปที่ ข.5 โครมาโทแกรม HPLC ของ gallic acid

4. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid (200, 100, 50, 25 และ 12.5 ppm) (แกน X) กับพื้นที่โครมาโทแกรมของ gallic acid (แกน Y) ดังแสดงในรูปที่ ข.6



รูปที่ ข.6 กราฟมาตรฐานของ gallic acid ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

วิธีวิเคราะห์

1. ละลายสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง 1 mg ใน methanol HPLC grade 1 mL (ความเข้มข้น 1 mg/mL)

2. กรองสารละลายในข้อ 1 ผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
3. ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC หลังจากนั้นเครื่อง HPLC จะทำการตรวจวัดวิเคราะห์และประมวลผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม โดยใช้ภาวะของการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการฉีดสารมาตรฐาน
4. นำโครมาโทแกรมที่ได้ไปเทียบค่าหน่วยเวลากับโครมาโทแกรมของ gallic acid และคำนวณหา gallic acid เทียบกับกราฟมาตรฐาน รายงานค่าเป็น mg /100 g dry wt.

#### ข.8 ปริมาณ quercetin ด้วย HPLC ตัดแปลงตามวิธีการสกัดของ พิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2547)

##### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC (Prostar, Varian, Darmstadt, Germany)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (MS304S, Mettler Toledo, Switzerland)

##### สารเคมี

1. Quercetin (Sigma-Aldrich, Germany)
2. Methanol HPLC grade (Fisher Chemical, UK)

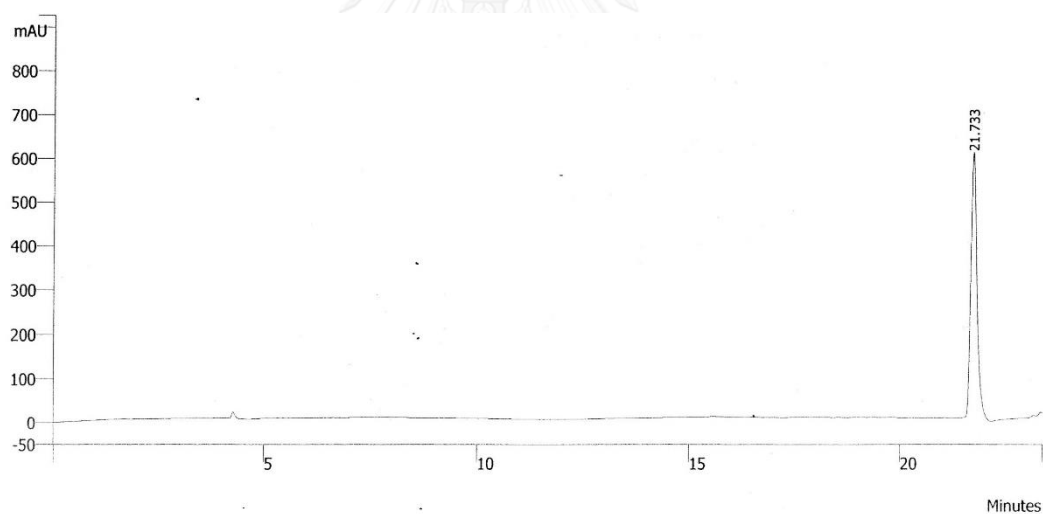
##### วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin และการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ละลาย quercetin 2 mg ใน methanol HPLC grade 10 mL (มีความเข้มข้นเท่ากับ 200 ppm)
2. ปิเปตสารละลาย quercetin ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 50 25 และ 12.5 ppm ตามลำดับ และกรองผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
3. ฉีดสารละลาย quercetin เข้าเครื่อง HPLC หลังจากนั้นเครื่อง HPLC จะทำการตรวจวัดวิเคราะห์และประมวลผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ ดังนี้

- คอลัมน์ : uBondapakC18 300×4.9 mm
- อัตราเร็ว : 1ml/min
- การตรวจหา : UV Absorbance ที่ 254 nm
- ระยะเวลา : 20 นาที
- วัฏภาคเคลื่อนที่ : 100 % H<sub>2</sub>O (pH 3) -100 % methanol แบบ gradient ดังนี้

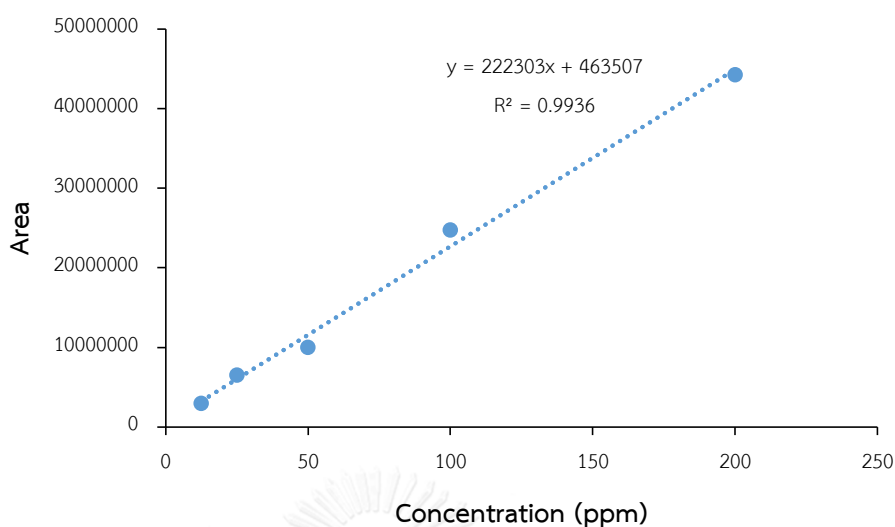
ระยะเวลา (นาที)	100 % H <sub>2</sub> O (pH3)	100 % methanol
0.00	100	-
20.00	-	100
25.00	100	-

จากการฉีดสารละลาย quercetin เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมที่มีค่าหน่วยเวลา (retention time, RT) แสดงดังรูปที่ ข. 7



รูปที่ ข.7 โครมาโทแกรม HPLC ของ quercetin

- สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin (200, 100, 50, 25 และ 12.5 ppm) (แกน X) กับพื้นที่โครมาโทแกรมของ quercetin (แกน Y) ดังแสดงในรูปที่ ข.8



**รูปที่ ข.8** กราฟมาตรฐานของ quercetin ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

#### วิธีวิเคราะห์

1. ละลายสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง 1 mg ใน methanol HPLC grade 1 mL (ความเข้มข้น 1 mg/mL)
2. กรองสารละลายในข้อ 1 ผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
3. ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC หลังจากนั้นเครื่อง HPLC จะทำการตรวจวัดวิเคราะห์และประมวลผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม โดยใช้ภาวะของการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับการฉีดสารมาตรฐาน
4. นำโครมาโทแกรมที่ได้ไปเทียบค่าหน่วยเวลากับโครมาโทแกรมของ quercetin และคำนวณหา quercetin เทียบกับกราฟมาตรฐาน รายงานค่าเป็น mg /100 g dry wt.

#### **ข.9 ปริมาณ caffeic acid ด้วย HPLC ดัดแปลงตามวิธีการสกัดของ พิมพร สีสลาพรพิสิฐ และคณะ (2547)**

##### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC (Prostar, Varian, Darmstadt, Germany)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (MS304S, Mettler Toledo, Switzerland)

## สารเคมี

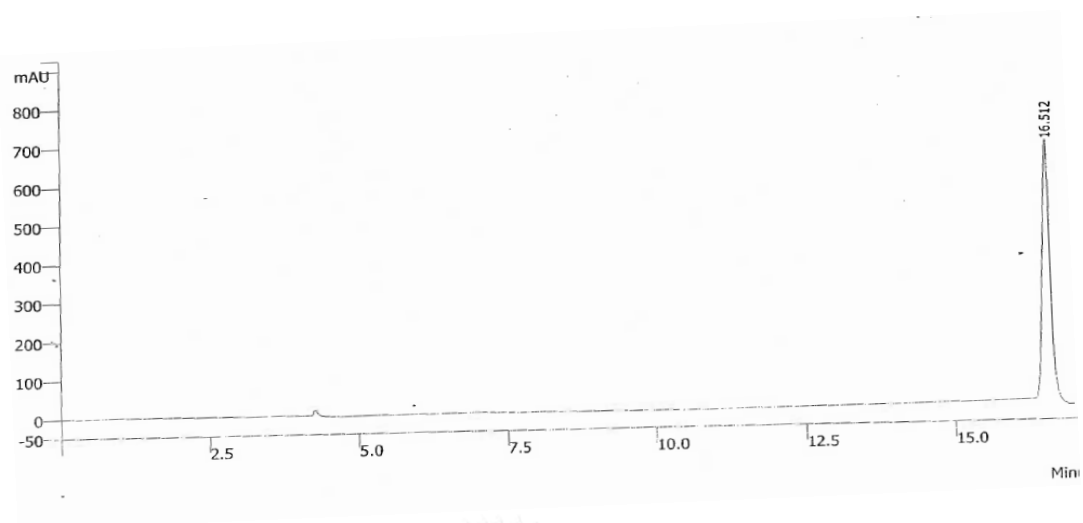
1. Caffeic acid (Sigma-Aldrich, Germany)
2. Methanol HPLC grade (Fisher Chemical, UK)

## วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน caffeic acid และการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ละลาย caffeic acid 2 mg ใน methanol HPLC grade 10 mL (มีความเข้มข้นเท่ากับ 200 ppm)
2. ปิเปตสารละลาย caffeic acid ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 50 25 และ 12.5 ppm ตามลำดับ และกรองผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
3. ฉีดสารละลาย caffeic acid เข้าเครื่อง HPLC หลังจากนั้นเครื่อง HPLC จะทำการตรวจวัดวิเคราะห์และประมวลผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ ดังนี้
  - คอลัมน์ : uBondapakC18 300×4.9 mm
  - อัตราเร็ว : 1ml/min
  - การตรวจหา : UV Absorbance ที่ 254 nm
  - ระยะเวลา : 20 นาที
  - วัฏภาคเคลื่อนที่ : 100 % H<sub>2</sub>O (pH 3) -100 % methanol แบบ gradient ดังนี้

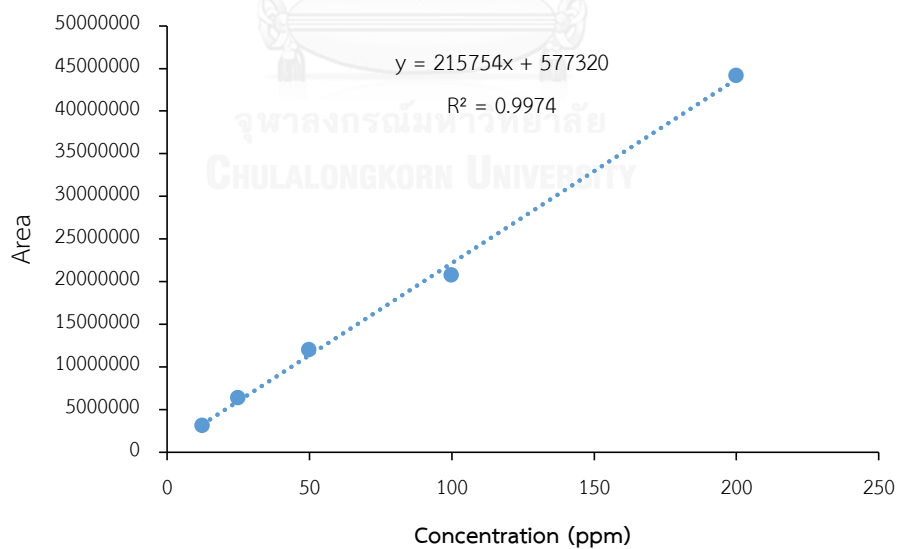
ระยะเวลา (นาที)	100 % H <sub>2</sub> O (pH3)	100 % methanol
0.00	100	-
20.00	-	100
25.00	100	-

จากการฉีดสารละลาย caffeic acid เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมที่มีค่าหน่วงเวลา (retention time, RT) แสดงดังรูปที่ ข. 9



รูปที่ ข.9 โครมาโทแกรม HPLC ของ caffeic acid

4. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน caffeic acid (200, 100, 50, 25 และ 12.5 ppm) (แกน X) กับพื้นที่โครมาโทแกรมของ caffeic acid (แกน Y) ดังแสดงในรูปที่ ข.10



รูปที่ ข.10 กราฟมาตรฐานของ caffeic acid ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC



### วิธีวิเคราะห์

1. ละลายสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง 1 mg ใน methanol HPLC grade 1 mL (ความเข้มข้น 1 mg/mL)
2. นำสารละลายในข้อ ไปกรองผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
3. ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC หลังจากนั้นเครื่อง HPLC จะทำการตรวจวัดวิเคราะห์และประมวลผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม โดยใช้ภาวะของการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับการฉีดสารมาตรฐาน
4. นำโครมาโทแกรมที่ได้ไปเทียบค่าหน่วยเวลากับโครมาโทแกรมของ caffeic acid และคำนวณหา caffeic acid เทียบกับกราฟมาตรฐาน รายงานค่าเป็น mg /100 g dry wt.

### ข.10 ปริมาณ ferulic acid ด้วย HPLC ตัดแปลงตามวิธีการสกัดของ พิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2547)

#### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC (Prostar, Varian, Darmstadt, Germany)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (MS304S, Mettler Toledo, Switzerland)

#### สารเคมี

1. Ferulic acid (Sigma-Aldrich, Germany)
2. Methanol HPLC grade (Fisher Chemical, UK)

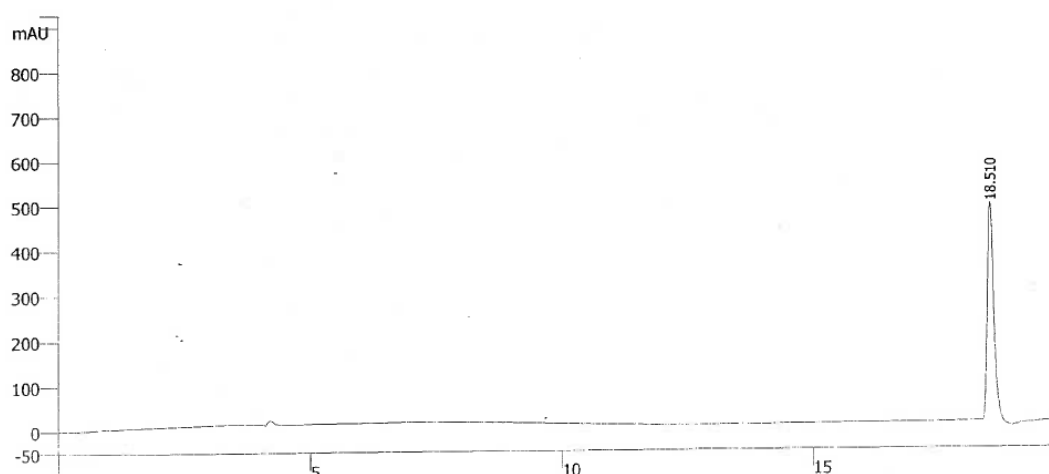
#### วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน caffeic acid และการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ละลาย ferulic acid 2 mg ใน methanol HPLC grade 10 mL (มีความเข้มข้นเท่ากับ 200 ppm)
2. ปิเปตสารละลาย ferulic acid ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 50 25 และ 12.5 ppm ตามลำดับ และกรองผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
3. ฉีดสารละลาย ferulic acid เข้าเครื่อง HPLC หลังจากนั้นเครื่อง HPLC จะทำการตรวจวัดวิเคราะห์และประมวลผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ ดังนี้
  - คอลัมน์ : uBondapakC18 300×4.9 mm

- อัตราเร็ว : 1ml/min
- การตรวจหา : UV Absorbance ที่ 254 nm
- ระยะเวลา : 20 นาที
- วัฏภาคเคลื่อนที่ : 100 % H<sub>2</sub>O (pH 3) -100 % methanol แบบ gradient ดังนี้

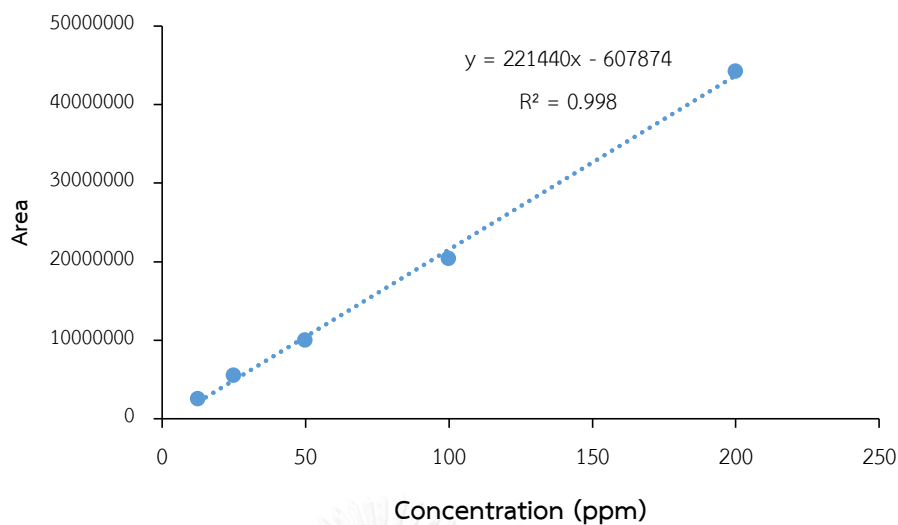
ระยะเวลา (นาที)	100 % H <sub>2</sub> O (pH3)	100 % methanol
0.00	100	-
20.00	-	100
25.00	100	-

จากการฉีดสารละลาย caffeic acid เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมที่มีค่าหน่วงเวลา (retention time, RT) แสดงดังรูปที่ ข. 11



รูปที่ ข.11 โครมาโทแกรม HPLC ของ ferulic acid

- สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ferulic acid (200, 100, 50, 25 และ 12.5 ppm) (แกน X) กับพื้นที่โครมาโทแกรมของ ferulic acid (แกน Y) ดังแสดงในรูปที่ ข.12



รูปที่ ข.12 กราฟมาตรฐานของ ferulic acid ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

#### วิธีวิเคราะห์

1. ละลายสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง 1 mg ใน methanol HPLC grade 1 mL (ความเข้มข้น 1 mg/mL)
2. นำสารละลายในข้อ ไปกรองผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
3. ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC หลังจากนั้นเครื่อง HPLC จะทำการตรวจวัดวิเคราะห์และประมวลผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม โดยใช้ภาวะของการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับการฉีดสารมาตรฐาน
4. นำโครมาโทแกรมที่ได้ไปเทียบค่าหน่วงเวลากับโครมาโทแกรมของ ferulic acid และคำนวณหา ferulic acid เทียบกับกราฟมาตรฐาน รายงานค่าเป็น mg /100 g dry wt.

## ภาคผนวก ค

### วิธีวิเคราะห์ทางชีวภาพ

#### ค.1 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum inhibitory concentration (MIC) ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- Sodium chloride (NaCl) (Loba Chemie, India)
- Mueller Hinton Broth (Himedia, India)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

- ละลาย sodium chloride 0.85 g ในน้ำกลั่น 100 mL และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
- ชั่ง Mueller Hinton Broth 21.00 g และละลายในน้ำกลั่น 1000 mL บรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 1mL ปิดฝา หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมตัวอย่าง

- ละลายผงของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง 200 mg ในน้ำกลั่น 1 mL (ผ่านการฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที)

การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

1. เชื้อโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบ (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Lactobacillus plantarum* , *Salmonella* Typhimurium ATCC13311, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Escherichia coli* ATCC25922) ประมาณ 4 - 5 โคโลนีใสในอาหารเหลว เขย่าเพื่อให้เชื้อกระจายตัวออกจากกัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. นำเชื้อในข้อ 1 มาปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $1 \times 10^8$  CFU/mL) และเจือจางเชื้อให้มีปริมาณ  $1 \times 10^6$  CFU/mL

### การวิเคราะห์

1. ปิเปตสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงความเข้มข้น 200 mg/mL ปริมาตร 1 mL ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอยู่ 1 mL แล้วเจือจางสารสกัดด้วยการทำ two fold dilution จนมีความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, และ 0.78125 mg/mL ตามลำดับ และปิเปตสารละลายในหลอดสุดท้ายทิ้ง 1 mL เพื่อให้มีปริมาตรเท่ากับหลอดอื่นๆ
2. ปิเปตเชื้อปริมาณ  $1 \times 10^6$  CFU/mL ลงในหลอดทดลองทุกหลอด (ใช้หลอดทดลองที่มีสารสกัด 200 mg ปริมาตร 1 mL และ เชื้อ 1 mL เป็น negative control และใช้หลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้ออย่างละ 1 mL เป็น positive control)
3. สำ ร ับ *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella* Typhimurium, และ *Escherichia coli* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในขณะที่ *Saccharomyces cerevisiae* บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
4. วิเคราะห์ค่าโดยสังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น (เปรียบเทียบกับ negative control และ positive control) อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC ของการทดลองค่า โดยค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้

### ค.2 ฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum bactericidal concentration (MBC) ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Tartaric acid (QReC, New Zealand)
- Baird–Parker Agar (Himedia, India)
- MacConkey Agar (Himedia, India)
- Potato Dextrose Agar (Himedia, India)
- Salmonella Shigella Agar (Himedia, India)
- Lactobacillus MRS Agar (MRS Agar) (Himedia, India)

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

- ละลาย tartaric acid 10 g ในน้ำกลั่น 100 mL และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
- ชั่ง Baird–Parker Agar (BPA) 63.00 g ละลายในน้ำกลั่น 950 mL บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลีหลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 °C เทลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 15-20 mL เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวและปล่อยให้อาหารแข็งตัว
- ชั่ง MacConkey Agar 51.53 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลีหลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 °C เทลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 15-20 mL เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวและปล่อยให้อาหารแข็งตัว
- ชั่ง Salmonella Shigella Agar (SS Agar) 63.02 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลีหลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นวุ้น และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 °C เทลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 15-20 mL เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวและปล่อยให้อาหารแข็งตัว
- ชั่ง Lactobacillus MRS Agar (MRS Agar) 67.15 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลีหลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 °C เทลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 15-20 mL เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวและปล่อยให้อาหารแข็งตัว
- ชั่ง Potato Dextrose Agar 39.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลีหลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 °C ผสมสารละลาย tartaric acid ความเข้มข้น 10 % (w/v) ในอัตราส่วน 1: 100 mL เขย่าให้เข้ากัน เทลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 15-20 mL เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวและปล่อยให้อาหารแข็งตัว

### การวิเคราะห์

1. นำหลอดทดลองที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิดดังนี้

Baird–Parker Agar	สำหรับ	<i>Staphylococcus aureus</i>
MacConkey Agar	สำหรับ	<i>Escherichia coli</i>
Potato Dextrose Agar	สำหรับ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Salmonella Shigella Agar	สำหรับ	<i>Salmonella Typhimurium</i>
Lactobacillus MRS Agar	สำหรับ	<i>Lactobacillus plantarum</i>

- บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-28 ชั่วโมง สำหรับ *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella Typhimurium*, และ *Escherichia coli* ในขณะที่ *Saccharomyces cerevisiae* บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถหาเชื้อได้จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นความเข้มข้นดังกล่าวจึงเป็นค่า MBC

### ค.3 การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามวิธีของ AOAC (2005)

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Sodium chloride (NaCl) (Loba Chemie, India)
- Plate Count Agar (Himedia, India)

#### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

- ละลาย sodium chloride 0.85 g ในน้ำกลั่น 100 mL และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
- ชั่ง Plate Count Agar 23.50 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลี หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C

#### การวิเคราะห์

การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี pour plate โดยใส่ตัวอย่างน้ำส้มที่เจือจางแล้วด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% w/v ในระดับที่เหมาะสม และปิเปตมา 1.0 mL ลงในจานเพาะเชื้อ แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate count agar: PCA) ที่เป็นวุ้นหลอมละลายที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 °C เทที่บกลงไปบนตัวอย่างในจานเพาะเชื้อ ปริมาตร 15-20 mL เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้ตัวอย่างน้ำส้มกระจายตัว ปล่อยให้อาหารแข็งตัว นำบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นภายในช่วง 25-250 โคโลนี และรายงานค่าเป็น colony-forming units/mL (CFU/mL)

#### ค.4 การตรวจนับปริมาณยีสต์และรา ตามวิธีของ AOAC (2005)

##### อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Sodium chloride (NaCl) (Loba Chemie, India)
- Potato Dextrose Agar (Himedia, India)
- Tartaric acid (QReC, New Zealand)

##### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

- ละลาย sodium chloride 0.85 g ในน้ำกลั่น 100 mL และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
- ละลาย tartaric acid 10 g ในน้ำกลั่น 100 mL และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
- ชั่ง potato dextrose agar 39.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลีหลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 °C ผสมสารละลาย tartaric acid ความเข้มข้น 10% w/v ในอัตราส่วน 1: 100 mL เขย่าให้เข้ากัน เทลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 15-20 mL เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวและปล่อยให้อาหารแข็งตัว

##### การวิเคราะห์

การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค spread plate โดยใส่ตัวอย่างน้ำส้มที่เจือจางแล้วด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% w/v ในระดับที่เหมาะสม และปิเปตมา 0.1 mL ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างน้ำส้มให้กระจายทั่วผิวหน้า บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และรายงานค่าเป็น colony-forming units/mL (CFU/mL)

#### ค.5 ปริมาณแลคติกแบคทีเรีย ตามวิธีของ AOAC (2005)

##### อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Sodium chloride (NaCl) (Loba Chemie, India)
- Lactobacillus MRS Agar (MRS Agar) (Himedia, India)



#### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

- ละลาย sodium chloride 0.85 g ในน้ำกลั่น 100 mL และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
- ชั่ง Lactobacillus MRS Agar (MRS Agar) 67.15 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลีหลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

#### การวิเคราะห์

การตรวจนับปริมาณแลกติกแบคทีเรียด้วยวิธี pour plate โดยใส่ตัวอย่างน้ำส้มที่เจือจางแล้วด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% w/v ในระดับที่เหมาะสม และปิเปตมา 1.0 mL ลงในจานเพาะเชื้อ แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS Agar ที่เป็นวุ้นหลอมละลายที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 °C เทที่ลงไปบนตัวอย่างในจานเพาะเชื้อ ปริมาตร 15-20 mL เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้ตัวอย่างน้ำส้มกระจายตัว ปล่อยให้อาหารแข็งตัว นำจานเพาะเชื้อไปบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นภายในช่วง 25-250 โคโลนี และรายงานค่าเป็น colony-forming units/mL (CFU/mL)

## ภาคผนวก ง

## การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab

## ง.1 การสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัด

ง. 1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.)

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองที่มีรูปแบบสมการแบบพูลควอดราทริก

(full quadratic)

Response Surface Regression: Total phenolic compounds				
Analysis of Variance				
Source	DF	Adj SS		
Model	9	16430.0		
Linear	3	1330.3		
Ethanol concentration (%)	1	5.2		
emperature (C)	1	1052.9		
Time (min)	1	272.2		
Square	3	13241.3		
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	1	5504.1		
emperature (C)*Temperature (C)	1	6864.7		
Time (min)*Time (min)	1	24.9		
2-Way Interaction	3	1858.4		
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	1	270.4		
Ethanol concentration (%)*Time (min)	1	1555.9		
Temperature (C)*Time (min)	1	32.1		
Source	DF	Adj MS	F-Value	
Model	9	1825.55	16.43	
Linear	3	443.44	3.99	
Ethanol concentration (%)	1	5.19	0.05	
Temperature (C)	1	1052.90	9.4	
Time (min)	1	272.22	2.45	
Square	3	4413.76	39.74	
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	1	5504.10	49.55	
Temperature (C)*Temperature (C)	1	6864.69	61.80	
Time (min)*Time (min)	1	24.93	0.22	
2-Way Interaction	3	619.47	5.58	
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	1	270.42	2.43	
Ethanol concentration (%)*Time (min)	1	1555.86	14.01	
Temperature (C)*Time (min)	1	32.11	0.29	
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value
Error	7	777.6	111.08	
Lack-of-Fit	3	273.4	91.13	0.72
Pure Error	4	504.2	126.04	
Total	16	17207.5		

Source	P-Value			
Model	0.001			
Linear	0.060			
Ethanol concentration (%)	0.835			
Temperature (C)	0.018			
Time (min)	0.161			
Square	0.000			
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	0.000			
Temperature (C)*Temperature (C)	0.000			
Time (min)*Time (min)	0.650			
2-Way Interaction	0.028			
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	0.163			
Ethanol concentration (%)*Time (min)	0.007			
Temperature (C)*Time (min)	0.607			
Error				
Lack-of-Fit	0.589			
Pure Error				
Total				
Model Summary				
	S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
	10.5394	95.48%	89.67%	70.00%
Coded Coefficients				
Term	Effect	Coef	SE	
Constant		455.20		
Ethanol concentration (%)	1.61	0.81		
Temperature (C)	-22.94	-11.47		
Time (min)	-11.67	-5.83		
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	-72.31	-36.16		
Temperature (C)*Temperature (C)	-80.76	-40.38		
Time (min)*Time (min)	-4.87	-2.43		
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	-16.44	-8.22		
Ethanol concentration (%)*Time (min)	-39.44	-19.72		
Temperature (C)*Time (min)	5.67	2.83		
Term	Coef	T-Value		
Constant		96.58		
Ethanol concentration (%)	3.73	0.22		
Temperature (C)	3.73	-3.08		
Time (min)	3.73	-1.57		
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	5.14	-7.04		
Temperature (C)*Temperature (C)	5.14	-7.86		
Time (min)*Time (min)	5.14	-0.47		
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	5.27	-1.56		
Ethanol concentration (%)*Time (min)	5.27	-3.74		
Temperature (C)*Time (min)	5.27	0.54		
Term	P-Value	VIF		
Constant	0.000			
Ethanol concentration (%)	0.835	1.00		
Temperature (C)	0.018	1.00		
Time (min)	0.161	1.00		
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	0.000	1.01		
Temperature (C)*Temperature (C)	0.000	1.01		
Time (min)*Time (min)	0.650	1.01		
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	0.163	1.00		
Ethanol concentration (%)*Time (min)	0.007	1.00		
Temperature (C)*Time (min)	0.607	1.00		

Regression Equation in Uncoded Units  

$$TP(\text{mg GAE}/100 \text{ g dry wt.}) = -512 + 17.17 \text{ Ethanol concentration } (\%)$$

$$+ 10.46 \text{ Temperature } (C)$$

$$+ 7.31 \text{ Time } (\text{min})$$

$$- 0.0904 \text{ Ethanol concentration } (\% * \text{Ethanol concentration } (\%))$$

$$- 0.1009 \text{ Temperature } (C) * \text{Temperature } (C)$$

$$- 0.0243 \text{ Time } (\text{min}) * \text{Time } (\text{min})$$

$$- 0.0206 \text{ Ethanol concentration } (\%) * \text{Temperature } (C)$$

$$- 0.0986 \text{ Ethanol concentration } (\%) * \text{Time } (\text{min})$$

$$+ 0.0142 \text{ Temperature } (C) * \text{Time } (\text{min})$$

ผลการทวนสอบสมการทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.1.1

ตารางที่ ง.1.1 การทวนสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.)		
			ค่าจากการทำนาย	ค่าจากการทดลอง	ความคลาดเคลื่อน (%)
50	30	35	381.03	379.33±4.16	0.45
90	30	35	398.83	362.67±6.43	9.97
70	30	25	432.33	425.33±1.15	1.65
70	70	45	397.67	433.33±9.02	8.23
50	50	25	401.81	376.00±8.72	6.87
90	50	25	442.57	319.33±6.43	38.59
70	50	35	454.95	441.33±5.03	3.08
70	50	35	454.95	460.00±18.33	1.09
70	50	35	454.95	419.33±3.06	8.49

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ง. 1.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.)

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองที่มีรูปแบบสมการแบบฟูลควอดราติก  
(full quadratic)

<b>Response Surface Regression: Flavonoid content</b>				
Analysis of Variance				
Source	DF	Adj SS		
Model	9	86.8067		
Linear	3	42.1687		
Ethanol concentration (%)	1	4.3019		
Temperature (C)	1	16.9506		
Time (min)	1	20.9162		
Square	3	39.7438		
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	1	2.2506		
Temperature (C)*Temperature (C)	1	27.3099		
Time (min)*Time (min)	1	9.5431		
2-Way Interaction	3	4.8941		
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	1	1.4463		
Ethanol concentration (%)*Time (min)	1	0.1936		
Temperature (C)*Time (min)	1	3.2542		
Source	DF	Adj MS	F-Value	
Model	9	9.6452	11.81	
Linear	3	14.0562	17.21	
Ethanol concentration (%)	1	4.3019	5.27	
Temperature (C)	1	16.9506	20.76	
Time (min)	1	20.9162	25.61	
Square	3	13.2479	16.22	
Ethanol concentration(*)*Ethanol concentration(*)	1	2.2506	2.76	
Temperature (C)*Temperature (C)	1	27.3099	33.44	
Time (min)*Time (min)	1	9.5431	11.69	
2-Way Interaction	3	1.6314	2.00	
Ethanol concentration (*)*Temperature (C)	1	1.4463	1.77	
Ethanol concentration (*)*Time (min)	1	0.1936	0.24	
Temperature (C)*Time (min)	1	3.2542	3.99	
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-
Value				
Error	7	5.7160	0.8166	
Lack-of-Fit	3	1.9292	0.6431	
0.68				
Pure Error	4	3.7867	0.9467	
Total	16	92.5226		
Source			P-Value	
Model			0.002	
Linear			0.001	
Ethanol concentration (%)			0.055	
Temperature (C)			0.003	
Time (min)			0.001	
Square			0.002	
Ethanol concentration (*)*Ethanol concentration (*)			0.141	
Temperature (C)*Temperature (C)			0.001	
Time (min)*Time (min)			0.011	
2-Way Interaction			0.203	
Ethanol concentration (*)*Temperature (C)			0.225	
Ethanol concentration (*)*Time (min)			0.641	
Temperature (C)*Time (min)			0.086	

Error				
Lack-of-Fit				0.609
Pure Error				
Total				
Model Summary				
	S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
	0.903640	93.82%	85.88%	60.24%
Coded Coefficients				
Term		Effect	Coef	SE
Constant			12.267	
Ethanol concentration (%)		1.467	0.733	
Temperature (C)		2.911	1.456	
Time (min)		-3.234	-1.617	
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)		1.462	0.731	
Temperature (C)*Temperature (C)		-5.094	-2.547	
Time (min)*Time (min)		-3.011	-1.505	
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)		1.203	0.601	
Ethanol concentration (%)*Time (min)		0.440	0.220	
Temperature (C)*Time (min)		-1.804	-0.902	
Term		Coef	T-Value	
Constant		0.404	30.35	
Ethanol concentration (%)		0.319	2.30	
Temperature (C)		0.319	4.56	
Time (min)		0.319	-5.06	
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)		0.440	1.66	
Temperature (C)*Temperature (C)		0.440	-5.78	
Time (min)*Time (min)		0.440	-3.42	
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)		0.452	1.33	
Ethanol concentration (%)*Time (min)		0.452	0.49	
Temperature (C)*Time (min)		0.452	-2.00	
Term		P-Value	VIF	
Constant		0.000		
Ethanol concentration (%)		0.055	1.00	
Temperature (C)		0.003	1.00	
Time (min)		0.001	1.00	
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)		0.141	1.01	
Temperature (C)*Temperature (C)		0.001	1.01	
Time (min)*Time (min)		0.011	1.01	
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)		0.225	1.00	
Ethanol concentration (%)*Time (min)		0.641	1.00	
Temperature (C)*Time (min)		0.086	1.00	
Regression Equation in Uncoded Units				
Flavonoid content(mg QCE/100 g dry wt.) = -13.6				
- 0.333 Ethanol concentration (%)				
+ 0.762 Temperature (C) + 1.041 Time (min)				
+ 0.00183 Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration(%)				
- 0.00637 Temperature (C)*Temperature (C)				
- 0.01505 Time (min)*Time (min)				
+ 0.00150 Ethanol concentration (%)*Temperature (C)				
+ 0.00110 Ethanol concentration (%)*Time (min)				
- 0.00451 Temperature (C)*Time (min)				

ผลการทวนสอบสมการทำนายปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.1.2

**ตารางที่ ง.1.2** การทวนสอบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ความ เข้มข้นของ เอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.)		
			ค่าจากการ ทำนาย	ค่าจากการ ทดลอง	ความคลาดเคลื่อน (%)
			50	30	35
90	30	35	9.47	8.50±0.53	11.39
70	30	25	12.84	12.64±0.61	1.62
70	70	45	10.58	10.26±1.52	3.14
50	50	25	7.76	8.50±0.69	8.63
90	50	25	12.28	12.37±0.85	0.71
70	50	35	12.25	10.79±0.99	13.59
70	50	35	13.11	12.64±0.81	3.71
70	50	35	13.25	12.98±0.46	2.03

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ง.1.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100g 100 g dry wt.)

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองที่มีรูปแบบสมการแบบพหุคูณควอดราติก

(full quadratic)

### Response Surface Regression: Antioxidant by DPPH assay

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS
Model	9	1153449
Linear	3	165141
Ethanol concentration (%)	1	103924
Temperature (C)	1	16113
Time (min)	1	45104
Square	3	901130
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	1	120136
Temperature (C)*Temperature (C)	1	649892
Time (min)*Time (min)	1	62711
2-Way Interaction	3	87179
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	1	11849
Ethanol concentration (%)*Time (min)	1	71947
Temperature (C)*Time (min)	1	3383

Source	DF	Adj MS	F-Value
Model	9	128161	164.65
Linear	3	55047	70.72
Ethanol concentration (%)	1	103924	133.51
Temperature (C)	1	16113	20.70
Time (min)	1	45104	57.95
Square	3	300377	385.90
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	1	120136	154.34
Temperature (C)*Temperature (C)	1	649892	834.94
Time (min)*Time (min)	1	62711	80.57
2-Way Interaction	3	29060	37.33
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	1	11849	15.22
Ethanol concentration (%)*Time (min)	1	71947	92.43
Temperature (C)*Time (min)	1	3383	4.35

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value
Error	7	5449	778	
Lack-of-Fit	3	3091	1030	1.75
Pure Error	4	2357	589	
Total	16	1158898		

Source	P-Value
Model	0.000
Linear	0.000
Ethanol concentration (%)	0.000
Temperature (C)	0.003
Time (min)	0.000
Square	0.000
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	0.000
Temperature (C)*Temperature (C)	0.000
Time (min)*Time (min)	0.000
2-Way Interaction	0.000
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	0.006
Ethanol concentration (%)*Time (min)	0.000
Temperature (C)*Time (min)	0.076



Error  
 Lack-of-Fit 0.295  
 Pure Error  
 Total

## Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
27.8993	99.53%	98.93%	95.41%

## Coded Coefficients

Term	Effect	Coef	SE
Constant		1560.3	
Ethanol concentration (%)	-227.95	-113.98	
Temperature (C)	89.76	44.88	
Time (min)	-150.17	-75.09	
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	-337.8	-168.9	
Temperature (C)*Temperature (C)	-785.7	-392.9	
Time (min)*Time (min)	-244.1	-122.0	
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	-108.9	-54.4	
Ethanol concentration (%)*Time (min)	-268.2	-134.1	
Temperature (C)*Time (min)	58.2	29.1	

Term	Coef	T-Value
Constant	12.5	125.06
Ethanol concentration (%)	9.86	-11.55
Temperature (C)	9.86	4.55
Time (min)	9.86	-7.61
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	13.6	-12.42
Temperature (C)*Temperature (C)	13.6	-28.90
Time (min)*Time (min)	13.6	-8.98
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	13.9	-3.90
Ethanol concentration (%)*Time (min)	13.9	-9.61
Temperature (C)*Time (min)	13.9	2.08

Term	P-Value	VIF
Constant	0.000	
Ethanol concentration (%)	0.000	1.00
Temperature (C)	0.003	1.00
Time (min)	0.000	1.00
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	0.000	1.01
Temperature (C)*Temperature (C)	0.000	1.01
Time (min)*Time (min)	0.000	1.01
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	0.006	1.00
Ethanol concentration (%)*Time (min)	0.000	1.00
Temperature (C)*Time (min)	0.076	1.00

## Regression Equation in Uncoded Units

DPPH(mM trolox/100 g dry wt.) = -5774 + 83.69 Ethanol concentration (%)  
 + 104.90 Temperature (C) + 117.6 Time (min)  
 - 0.4223 Ethanol concentration (%)\*Ethanol concentration (%)  
 - 0.9822 Temperature (C)\*Temperature (C)  
 - 1.220 Time (min)\*Time (min)  
 - 0.1361 Ethanol concentration (%)\*Temperature (C)  
 - 0.6706 Ethanol concentration (%)\*Time (min)  
 + 0.1454 Temperature (C)\*Time (min)

ผลการทวนสอบสมการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.1.3

**ตารางที่ ง.1.3** การทวนสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.)		
			ค่าจากการทำนาย	ค่าจากการทดลอง	ความคลาดเคลื่อน (%)
50	30	35	994.66	943.95±20.33	5.37
90	30	35	886.32	834.583±20.81	6.19
70	30	25	1343.26	1377.29±7.86	2.47
70	70	45	927.29	951.25±29.81	2.51
50	50	25	1104.38	1025.20±33.41	7.72
90	50	25	1109.58	1159.58±28.35	4.31
70	50	35	1581.11	1590.83±10.97	0.61
70	50	35	1591.53	1605.42±29.04	0.86
70	50	35	1543.26	1484.58±6.51	3.95

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ง. 1.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100g 100 g dry wt.)

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองที่มีรูปแบบสมการแบบพหุคูณควอดราติก

(full quadratic)

<b>Response Surface Regression: Antioxidant by FRAP assay</b>						
Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS			
Model	9	659168	73241			
Linear	3	113283	37761			
Ethanol concentration (%)	1	28121	28121			
Temperature (C)	1	55498	55498			
Time (min)	1	29665	29665			
Square	3	510485	170162			
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	1	120779	120779			
Temperature (C)*Temperature (C)	1	307283	307283			
Time (min)*Time (min)	1	38397	38397			
2-Way Interaction	3	35400	11800			
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	1	1304	1304			
Ethanol concentration (%)*Time (min)	1	30382	30382			
Temperature (C)*Time (min)	1	3713	3713			
Source		F-Value	P-Value			
Model		39.49	0.000			
Linear		20.36	0.001			
Ethanol concentration (%)		15.16	0.006			
Temperature (C)		29.92	0.001			
Time (min)		15.99	0.005			
Square		91.74	0.000			
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)		65.12	0.000			
Temperature (C)*Temperature (C)		165.67	0.000			
Time (min)*Time (min)		20.70	0.003			
2-Way Interaction		6.36	0.021			
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)		0.70	0.429			
Ethanol concentration (%)*Time (min)		16.38	0.005			
Temperature (C)*Time (min)		2.00	0.200			
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Error	7	12984	1855			
Lack-of-Fit	3	10732	3577	6.35	0.053	
Pure Error	4	2252	563			
Total	16	672152				
Model Summary						
	S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
	43.0679	98.07%	95.58%	73.93%		

Coded Coefficients			
Term	Effect	Coef	SE
Constant		1284.5	
Ethanol concentration (%)	-118.6		-59.3
Temperature (C)	-166.6		-83.3
Time (min)	-121.8		-60.9
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	-338.7		-169.4
Temperature (C)*Temperature (C)	-540.3		-270.1
Time (min)*Time (min)	-191.0		-95.5
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	36.1		18.1
Ethanol concentration (%)*Time (min)	-174.3		-87.2
Temperature (C)*Time (min)	-60.9		-30.5

Term	Coef	T-Value
Constant	19.3	66.69
Ethanol concentration (%)	15.2	-3.89
Temperature (C)	15.2	-5.47
Time (min)	15.2	-4.00
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	21.0	-8.07
Temperature (C)*Temperature (C)	21.0	-12.87
Time (min)*Time (min)	21.0	-4.55
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	21.5	0.84
Ethanol concentration (%)*Time (min)	21.5	-4.05
Temperature (C)*Time (min)	21.5	-1.41

Term	P-Value	VIF
Constant	0.000	
Ethanol concentration (%)	0.006	1.00
Temperature (C)	0.001	1.00
Time (min)	0.005	1.00
Ethanol concentration (%)*Ethanol concentration (%)	0.000	1.01
Temperature (C)*Temperature (C)	0.000	1.01
Time (min)*Time (min)	0.003	1.01
Ethanol concentration (%)*Temperature (C)	0.429	1.00
Ethanol concentration (%)*Time (min)	0.005	1.00
Temperature (C)*Time (min)	0.200	1.00

Regression Equation in Uncoded Units

$$\text{FRAP (mM trolox/100 g dry wt.)} = -4196 + 69.31 \text{ Ethanol concentration (\%)} + 65.54 \text{ Temperature (C)} + 98.9 \text{ Time (min)} - 0.4234 \text{ Ethanol concentration (\%)*Ethanol concentration (\%)} - 0.6754 \text{ Temperature (C)*Temperature (C)} - 0.955 \text{ Time (min)*Time (min)} + 0.0451 \text{ Ethanol concentration (\%)*Temperature (C)} - 0.436 \text{ Ethanol concentration (\%)*Time (min)} - 0.152 \text{ Temperature (C)*Time (min)}$$

ผลการทวนสอบสมการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.1.4

**ตารางที่ ง.1.4** การทวนสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่

ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt)		
			ค่าจากการทำนาย	ค่าจากการทดลอง	ความคลาดเคลื่อน (%)
50	30	35	1002.52	1001.25±82.86	0.13
90	30	35	847.59	746.04±20.81	13.61
70	30	25	1030.22	999.17±13.01	3.11
70	70	45	740.29	734.58±13.01	0.78
50	50	25	1050.38	984.58±29.54	6.68
90	50	25	1105.94	1000.21±10.57	10.57
70	50	35	1281.31	1309.58±10.04	2.16
70	50	35	1281.31	1259.58±32.82	1.73
70	50	35	1281.31	1303.33±17.76	0.92

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

## ง.2 การสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยสกัด

ง. 2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.)

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองที่มีรูปแบบสมการแบบพูลควอดตราทริก

(full quadratic)

Response Surface Regression: Total phenolic compounds					
Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS			
Model	13	204672			
Linear	4	101366			
Ethanol concentration (%)	1	42827			
Temperature (C)	1	26822			
Time (min)	1	72			
Amplitude (%)	1	31644			
Square	4	70645			
Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)	1	41013			
Temperature (C) * Temperature (C)	1	35084			
Time (min) * Time (min)	1	673			
Amplitude (%) * Amplitude (%)	1	15994			
2-Way Interaction	5	32661	4.63		
Ethanol concentration (%) * Time (min)	1	20513			
Ethanol concentration (%) * Amplitude (%)	1	3560			
Temperature (C) * Time (min)	1	413			
Temperature (C) * Amplitude (%)	1	7093			
Time (min) * Amplitude (%)	1	1082			
Source		Adj MS	F-Value		
Model		15744.0	11.15		
Linear		5341.4	17.95		
Ethanol concentration (%)		2827.5	30.34		
Temperature (C)		6822.3	19.00		
Time (min)		71.7	0.05		
Amplitude (%)		31644.2	22.42		
Square		17661.3	12.51		
Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)		41013.4	29.05		
Temperature (C) * Temperature (C)		35084.0	24.85		
Time (min) * Time (min)		672.7	0.48		
Amplitude (%) * Amplitude (%)		15993.6	11.33		
2-Way Interaction		6532.2	4.63		
Ethanol concentration (%) * Time (min)		20512.6	14.53		
Ethanol concentration (%) * Amplitude (%)		3560.1	2.52		
Temperature (C) * Time (min)		413.4	0.29		
Temperature (C) * Amplitude (%)		7093.4	5.02		
Time (min) * Amplitude (%)		1081.7	0.77		
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	
Error	15	21175	1411.7		
Lack-of-Fit	11	17507	1591.6	1.74	
Pure Error	4	3667	916.9		
Total	28	225847			
Source			P-Value		
Model			0.000		
Linear			0.000		
Ethanol concentration (%)			0.000		
Temperature (C)			0.001		
Time (min)			0.825		
Amplitude (%)			0.000		
Square			0.000		
Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)			0.000		

Temperature (C) *Temperature (C)	0.000		
Time (min) *Time (min)	0.501		
Amplitude (%) *Amplitude (%)	0.004		
2-Way Interaction	0.009		
Ethanol concentration (%) *Time (min)	0.002		
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	0.133		
Temperature (C) *Time (min)	0.596		
Temperature (C) *Amplitude (%)	0.041		
Time (min) *Amplitude (%)	0.395		
Error			
Lack-of-Fit	0.314		
Pure Error			
Total			
Model Summary			
S	R-sq R-sq (adj) R-sq (pred)		
37.5721	90.62% 82.50% 54.58%		
Coded Coefficients			
Term	Effect	Coef SE	Coef
Constant		547.6	16.8
Ethanol concentration (%)	-119.5	-59.7	10.8
Temperature (C)	94.6	47.3	10.8
Time (min)	4.9	2.4	10.8
Amplitude (%)	102.7	51.4	10.8
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	-159.0	-79.5	14.8
Temperature (C) *Temperature (C)	-147.1	-73.5	14.8
Time (min) *Time (min)	-20.4	-10.2	14.8
Amplitude (%) *Amplitude (%)	-99.3	-49.7	14.8
Ethanol concentration (%) *Time (min)	143.2	71.6	18.8
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	59.7	29.8	18.8
Temperature (C) *Time (min)	20.3	10.2	18.8
Temperature (C) *Amplitude (%)	84.2	42.1	18.8
Time (min) *Amplitude (%)	-32.9	-16.4	18.8
Term	T-Value	P-Value	
Constant	32.59	0.000	
Ethanol concentration (%)	-5.51	0.000	
Temperature (C)	4.36	0.001	
Time (min)	0.23	0.825	
Amplitude (%)	4.73	0.000	
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	-5.39	0.000	
Temperature (C) *Temperature (C)	-4.99	0.000	
Time (min) *Time (min)	-0.69	0.501	
Amplitude (%) *Amplitude (%)	-3.37	0.004	
Ethanol concentration (%) *Time (min)	3.81	0.002	
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	1.59	0.133	
Temperature (C) *Time (min)	0.54	0.596	
Temperature (C) *Amplitude (%)	2.24	0.041	
Time (min) *Amplitude (%)	-0.88	0.395	
Term	VIF		
Constant			
Ethanol concentration (%)	1.00		
Temperature (C)	1.00		
Time (min)	1.00		
Amplitude (%)	1.00		
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	1.08		
Temperature (C) *Temperature (C)	1.08		
Time (min) *Time (min)	1.08		
Amplitude (%) *Amplitude (%)	1.08		
Ethanol concentration (%) *Time (min)	1.00		

Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	1.00
Temperature (C) *Time (min)	1.00
Temperature (C) *Amplitude (%)	1.00
Time (min) *Amplitude (%)	1.00
Regression Equation in Uncoded Units	
TP(mg GAE/100 g dry wt.) = -354 + 6.35 Ethanol concentration (%)	
+ 10.55 Temperature (C) - 13.7 Time (min) + 29.6 Amplitude (%)	
- 0.1988 Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)	
- 0.1839 Temperature (C) * Temperature (C)	
- 0.102 Time (min) * Time (min) - 0.497 Amplitude (%) * Amplitude (%)	
+ 0.3581 Ethanol concentration (%) * Time (min)	
+ 0.1492 Ethanol concentration (%) * Amplitude (%)	
+ 0.0508 Temperature (C) * Time (min)	
+ 0.2106 Temperature (C) * Amplitude (%)	
- 0.164 Time (min) * Amplitude (%)	

ผลการทวนสอบสมการทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.2.1

**ตารางที่ ง.2.1** การทวนสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt)		
				ค่าจากการทำนาย	ค่าจากการทดลอง	ความคลาดเคลื่อน (%)
50	30	35	40	403.37	434.00±15.62	7.06
90	30	35	40	284.15	276.67±3.06	2.71
70	30	25	40	421.17	466.00±14.00	9.62
50	50	25	40	583.52	524.00±5.29	11.36
90	50	25	40	321.06	324.00±5.29	0.91
90	50	45	40	468.44	529.33±2.31	11.50
70	70	35	30	375.21	417.33±13.32	10.09
70	70	35	50	560.92	537.33±8.08	4.39
70	50	35	40	544.08	518.00±15.87	5.04
70	50	35	40	544.08	507.33±12.22	7.24

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ง.2.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.)

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองที่มีรูปแบบสมการแบบฟูลควอดราติก  
(full quadratic)

### Response Surface Regression: Flavonoid content

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value
Model	13	202.011		
Linear	4	55.048		
Ethanol concentration (%)	1	24.621		
Temperature (C)	1	9.869		
Time (min)	1	18.722		
Amplitude (%)	1	1.835		
Square	4	94.504		
Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)	1	9.290		
Temperature (C) * Temperature (C)	1	0.223		
Time (min) * Time (min)	1	76.953		
Amplitude (%) * Amplitude (%)	1	20.631		
2-Way Interaction	5	52.460		
Ethanol concentration (%) * Time (min)	1	23.709		
Ethanol concentration (%) * Amplitude (%)	1	21.889		
Temperature (C) * Time (min)	1	1.628		
Temperature (C) * Amplitude (%)	1	0.000		
Time (min) * Amplitude (%)	1	5.235		
Source			Adj MS	F-Value
Model			15.5393	29.28
Linear			13.7619	25.93
Ethanol concentration (%)			24.6212	46.39
Temperature (C)			9.8687	18.60
Time (min)			18.7221	35.28
Amplitude (%)			1.8355	3.46
Square			23.6259	44.52
Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)			9.2902	17.51
Temperature (C) * Temperature (C)			0.2233	0.42
Time (min) * Time (min)			76.9530	145.00
Amplitude (%) * Amplitude (%)			20.6306	38.87
2-Way Interaction			10.4921	19.77
Ethanol concentration (%) * Time (min)			23.7089	44.67
Ethanol concentration (%) * Amplitude (%)			21.8885	41.24
Temperature (C) * Time (min)			1.6281	3.07
Temperature (C) * Amplitude (%)			0.0002	0.00
Time (min) * Amplitude (%)			5.2346	9.86
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value
Error	15	7.961	0.5307	
Lack-of-Fit	11	7.085	0.6441	2.94
Pure Error	4	0.875	0.2188	
Total	28	209.972		
Source				P-Value
Model				0.000
Linear				0.000
Ethanol concentration (%)				0.000
Temperature (C)				0.001
Time (min)				0.000
Amplitude (%)				0.083
Square				0.000
Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)				0.001
Temperature (C) * Temperature (C)				0.526

Time (min)*Time (min)	0.000			
Amplitude (%)*Amplitude (%)	0.000			
2-Way Interaction	0.000			
Ethanol concentration (%) *Time (min)	0.000			
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	0.000			
Temperature (C) *Time (min)	0.100			
Temperature (C) *Amplitude (%)	0.984			
Time (min) *Amplitude (%)	0.007			
Error				
Lack-of-Fit	0.154			
Pure Error				
Total				
Model Summary				
	S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
	0.728498	96.21%	92.92%	82.78%
Coded Coefficients				
Term	Effect	Coef	SE	
Constant		17.992		
Ethanol concentration (%)	2.865	1.432		
Temperature (C)	-1.814	-0.907		
Time (min)	-2.498	-1.249		
Amplitude (%)	-0.782	-0.391		
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	-2.394	-1.197		
Temperature (C) *Temperature (C)	0.371	0.186		
Time (min) *Time (min)	-6.889	-3.444		
Amplitude (%) *Amplitude (%)	-3.567	-1.783		
Ethanol concentration (%) *Time (min)	-4.869	-2.435		
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	-4.679	-2.339		
Temperature (C) *Time (min)	-1.276	-0.638		
Temperature (C) *Amplitude (%)	0.015	0.007		
Time (min) *Amplitude (%)	2.288	1.144		
Term	Coef	T-Value		
Constant	0.326	55.23		
Ethanol concentration (%)	0.210	6.81		
Temperature (C)	0.210	-4.31		
Time (min)	0.210	-5.94		
Amplitude (%)	0.210	-1.86		
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	0.286	-4.18		
Temperature (C) *Temperature (C)	0.286	0.65		
Time (min) *Time (min)	0.286	-12.04		
Amplitude (%) *Amplitude (%)	0.286	-6.23		
Ethanol concentration (%) *Time (min)	0.364	-6.68		
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	0.364	-6.42		
Temperature (C) *Time (min)	0.364	-1.75		
Temperature (C) *Amplitude (%)	0.364	0.02		
Time (min) *Amplitude (%)	0.364	3.14		
Term	P-Value	VIF		
Constant	0.000			
Ethanol concentration (%)	0.000	1.00		
Temperature (C)	0.001	1.00		
Time (min)	0.000	1.00		
Amplitude (%)	0.083	1.00		
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	0.001	1.08		
Temperature (C) *Temperature (C)	0.526	1.08		
Time (min) *Time (min)	0.000	1.08		
Amplitude (%) *Amplitude (%)	0.000	1.08		
Ethanol concentration (%) *Time (min)	0.000	1.00		
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	0.000	1.00		
Temperature (C) *Time (min)	0.100	1.00		
Temperature (C) *Amplitude (%)	0.984	1.00		

Time (min) *Amplitude (%)	0.007	1.00
Regression Equation in Uncoded Units		
Flavonoid(mg QCE/100 g dry wt.) = -115.1 + 1.384 Ethanol concentratio(%)		
+ 0.018 Temperature(C)+ 2.840 Time(min) + 1.804 Amplitude(%)		
- 0.002992 Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)		
+ 0.000464 Temperature (C) *Temperature (C)		
- 0.03444 Time (min) *Time (min)		
- 0.01783 Amplitude (%) *Amplitude (%)		
- 0.01217 Ethanol concentration (%) *Time (min)		
- 0.01170 Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)		
- 0.00319 Temperature (C) *Time (min)		
+ 0.00004 Temperature (C) *Amplitude (%)		
+ 0.01144 Time (min) *Amplitude (%)		

ผลการทวนสอบสมการทำนายปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าปริมาณปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.2.2

**ตารางที่ ง.2.2** การทวนสอบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg QCE/100 g dry wt.)		
				ค่าจากการทำนาย	ค่าจากการทดลอง	ความคลาดเคลื่อน (%)
50	30	35	40	16.44	15.10±1.65	8.86
90	30	35	40	19.28	13.34±0.76	3.08
70	30	25	40	16.22	16.77±1.35	3.28
50	50	25	40	10.71	10.96±0.55	2.35
90	50	25	40	18.42	18.62±0.55	1.07
90	50	45	40	11.06	10.08±1.85	9.69
70	70	35	30	15.83	15.19±0.66	4.23
70	70	35	50	15.07	15.36±0.91	1.94
70	50	35	40	17.96	18.53±0.79	3.09
70	50	35	40	17.96	18.62±0.92	3.55

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ง. 2.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100g 100 g dry wt.)

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองที่มีรูปแบบสมการแบบพหุคูณกำลังสอง (full quadratic)

(full quadratic)

### Response Surface Regression: Antioxidant by DPPH assay

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	13	1310973	100844	126.64	0.000
Linear	4	217149	54287	68.17	0.000
Ethanol concentration (%)	1	39229	39229	49.26	0.000
Temperature (C)	1	889	889	1.12	0.307
Time (min)	1	101822	101822	127.87	0.000
Amplitude (%)	1	75208	75208	94.45	0.000
Square	4	773542	193386	242.85	0.000
Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)	1	445015	445015	558.85	0.000
Temperature (C) * Temperature (C)	1	229980	229980	288.81	0.000
Time (min) * Time (min)	1	113844	113844	142.96	0.000
Amplitude (%) * Amplitude (%)	1	364387	364387	457.59	0.000
2-Way Interaction	5	320282	64056	80.44	0.000
Ethanol concentration (%) * Time (min)	1	9385	9385	11.79	0.001
Ethanol concentration (%) * Amplitude (%)	1	12192	12192	15.31	0.000
Temperature (C) * Time (min)	1	16841	16841	21.15	0.000
Temperature (C) * Amplitude (%)	1	6	6	0.01	0.923
Time (min) * Amplitude (%)	1	281858	281858	353.96	0.000
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Error	15	11945	796		
Lack-of-Fit	11	11198	1018	5.45	0.000
Pure Error	4	747	187		
Total	28	1322918			
Source					P-Value
Model					0.000
Linear					0.000
Ethanol concentration (%)					0.000
Temperature (C)					0.307
Time (min)					0.000
Amplitude (%)					0.000
Square					0.000
Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)					0.000
Temperature (C) * Temperature (C)					0.000
Time (min) * Time (min)					0.000

Amplitude(%) *Amplitude(%)	0.000		
2-Way Interaction	0.000		
Ethanol concentration (%) *Time (min)	0.004		
Ethanol concentration (%) *Amplitude(%)	0.001		
Temperature (C) *Time (min)	0.000		
Temperature (C) *Amplitude(%)	0.933		
Time (min) *Amplitude(%)	0.000		
Error			
Lack-of-Fit	0.058		
Pure Error			
Total			
Model Summary			
S	R-sq		
28.2189	99.10%		
R-sq (adj)	R-sq (pred)		
98.31%	96.08%		
Coded Coefficients			
Term	Effect	Coef	SE
Constant		1754.4	
Ethanol concentration (%)	-114.35	-57.18	
Temperature (C)	17.22	8.61	
Time (min)	-184.23	-92.12	
Amplitude (%)	158.33	79.17	
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	-523.9	-261.9	
Temperature (C) *Temperature (C)	-376.6	-188.3	
Time (min) *Time (min)	-265.0	-132.5	
Amplitude (%) *Amplitude (%)	-474.0	-237.0	
Ethanol concentration (%) *Time (min)	96.9	48.4	
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	110.4	55.2	
Temperature (C) *Time (min)	129.8	64.9	
Temperature (C) *Amplitude (%)	2.4	1.2	
Time (min) *Amplitude (%)	530.9	265.5	
Term	Coef	T-Value	
Constant	12.6	139.02	
Ethanol concentration (%)	8.15	-7.02	
Temperature (C)	8.15	1.06	
Time (min)	8.15	-11.31	
Amplitude (%)	8.15	9.72	
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	11.1	-23.64	
Temperature (C) *Temperature (C)	11.1	-16.99	
Time (min) *Time (min)	11.1	-11.96	
Amplitude (%) *Amplitude (%)	11.1	-21.39	
Ethanol concentration (%) *Time (min)	14.1	3.43	
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	14.1	3.91	
Temperature (C) *Time (min)	14.1	4.60	
Temperature (C) *Amplitude (%)	14.1	0.09	
Time (min) *Amplitude (%)	14.1	18.81	
Term	P-Value	VIF	
Constant	0.000		
Ethanol concentration (%)	0.000	1.00	
Temperature (C)	0.307	1.00	
Time (min)	0.000	1.00	
Amplitude (%)	0.000	1.00	
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	0.000	1.08	
Temperature (C) *Temperature (C)	0.000	1.08	
Time (min) *Time (min)	0.000	1.08	
Amplitude (%) *Amplitude (%)	0.000	1.08	
Ethanol concentration (%) *Time (min)	0.004	1.00	
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	0.001	1.00	
Temperature (C) *Time (min)	0.000	1.00	
Temperature (C) *Amplitude (%)	0.933	1.00	
Time (min) *Amplitude (%)	0.000	1.00	

Regression Equation in Uncoded Units  
 DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) = -2199 + 69.30 Ethanol concentration (%)  
 + 35.91 Temperature (C)  
 - 55.8 Time (min) + 85.0 Amplitude (%)  
 - 0.6548 Ethanol concentration (%) \* Ethanol concentration (%)  
 - 0.4707 Temperature (C) \* Temperature (C)  
 - 1.325 Time (min) \* Time (min) - 2.370 Amplitude (%) \* Amplitude (%)  
 + 0.2422 Ethanol concentration (%) \* Time (min)  
 + 0.2760 Ethanol concentration (%) \* Amplitude (%)  
 + 0.3244 Temperature (C) \* Time (min)  
 + 0.0061 Temperature (C) \* Amplitude (%)  
 + 2.655 Time (min) \* Amplitude (%)

ผลการทวนสอบสมการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.2.3

ตารางที่ ง.2.3 การทวนสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (mM trolox/100 g dry wt.)		
				ค่าจากการทำนาย	ค่าจากการทดลอง	ความคลาดเคลื่อน (%)
50	30	35	40	1355.34	1421.04±47.01	4.62
90	30	35	40	1241.14	1364.79±46.39	9.06
70	30	25	40	1584.29	1470.00±16.54	7.78
50	50	25	40	1560.08	1699.17±16.04	8.19
90	50	25	40	1348.99	1489.79±1.80	9.45
90	50	45	40	1262.36	1200.21±61.34	5.18
70	70	35	30	1259.95	1468.96±26.58	14.23
70	70	35	50	1421.39	1384.58±86.39	2.66
70	50	35	40	1757.19	1750.21±16.04	0.40
70	50	35	40	1757.19	1731.46±14.77	1.49

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ง. 2.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100g 100 g dry wt.)

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองที่มีรูปแบบสมการแบบฟูลควอดราติก

(full quadratic)

<b>Response Surface Regression: Antioxidant by FRAP assay</b>				
Analysis of Variance				
Source	DF	Adj SS		
Model	14	979228		
Linear	4	386364		
Ethanol concentration (%)	1	1155		
Temperature (C)	1	30104		
Time (min)	1	353895		
Amplitude (%)	1	1210		
Square	4	148732		
Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)	1	14744		
Temperature (C) * Temperature (C)	1	22022		
Time (min) * Time (min)	1	25354		
Amplitude (%) * Amplitude (%)	1	135048		
2-Way Interaction	6	444132		
Ethanol concentration (%) * Temperature (C)	1	2431		
Ethanol concentration (%) * Time (min)	1	20515		
Ethanol concentration (%) * Amplitude (%)	1	86698		
Temperature (C) * Time (min)	1	365		
Temperature (C) * Amplitude (%)	1	1100		
Time (min) * Amplitude (%)	1	333025		
Source	DF	Adj MS	F-Value	
Model	14	69945	30.81	
Linear	4	96591	42.55	
Ethanol concentration (%)	1	1155	0.51	
Temperature (C)	1	30104	13.26	
Time (min)	1	353895	155.90	
Amplitude (%)	1	1210	0.53	
Square	4	37183	16.38	
Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)	1	14744	6.50	
Temperature (C) * Temperature (C)	1	22022	9.70	
Time (min) * Time (min)	1	25354	11.17	
Amplitude (%) * Amplitude (%)	1	135048	59.49	
2-Way Interaction	6	74022	32.61	
Ethanol concentration (%) * Temperature (C)	1	2431	1.07	
Ethanol concentration (%) * Time (min)	1	20515	9.04	
Ethanol concentration (%) * Amplitude (%)	1	86698	38.19	
Temperature (C) * Time (min)	1	365	0.16	
Temperature (C) * Amplitude (%)	1	1100	0.48	
Time (min) * Amplitude (%)	1	333025	146.71	
Source	DF	Adj SS	Adj MS	
Error	14	31780	2270	
Lack-of-Fit	10	28624	2862	3.63
Pure Error	4	3155	789	
Total	28	1011007		
Source			P-Value	
Model			0.000	
Linear			0.000	
Ethanol concentration (%)			0.487	
Temperature (C)			0.003	
Time (min)			0.000	
Amplitude (%)			0.477	
Square			0.000	
Ethanol concentration (%) * Ethanol concentration (%)			0.023	
Temperature (C) * Temperature (C)			0.008	

Time (min) *Time (min)				0.005
Amplitude (%) *Amplitude (%)				0.000
2-Way Interaction				0.000
Ethanol concentration (%) *Temperature (C)				0.318
Ethanol concentration (%) *Time (min)				0.009
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)				0.000
Temperature (C) *Time (min)				0.695
Temperature (C) *Amplitude (%)				0.498
Time (min) *Amplitude (%)				0.000
Error				
Lack-of-Fit				0.113
Pure Error				
Total				
Model Summary				
	S	R-sq	R-sq (adj)	R-sq (pred)
	47.6442	96.86%	93.71%	83.20%
Coded Coefficients				
Term	Effect	Coef	SE	
Constant			2111.4	
Ethanol concentration (%)	-19.6		-9.8	
Temperature (C)	100.2		50.1	
Time (min)	-343.5		-171.7	
Amplitude (%)	20.1		10.0	
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	-95.4		-47.7	
Temperature (C) *Temperature (C)	-116.5		-58.3	
Time (min) *Time (min)	-125.0		-62.5	
Amplitude (%) *Amplitude (%)	-288.6		-144.3	
Ethanol concentration (%) *Temperature (C)	-49.3		-24.7	
Ethanol concentration (%) *Time (min)	-143.2		-71.6	
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	294.4		147.2	
Temperature (C) *Time (min)	19.1		9.5	
Temperature (C) *Amplitude (%)	33.2		16.6	
Time (min) *Amplitude (%)	577.1		288.5	
Term	Coef	T-Value		
Constant	21.3	99.09		
Ethanol concentration (%)	13.8	-0.71		
Temperature (C)	13.8	3.64		
Time (min)	13.8	-12.49		
Amplitude (%)	13.8	0.73		
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	18.7	-2.55		
Temperature (C) *Temperature (C)	18.7	-3.11		
Time (min) *Time (min)	18.7	-3.34		
Amplitude (%) *Amplitude (%)	18.7	-7.71		
Ethanol concentration (%) *Temperature (C)	23.8	-1.03		
Ethanol concentration (%) *Time (min)	23.8	-3.01		
Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	23.8	6.18		
Temperature (C) *Time (min)	23.8	0.40		
Temperature (C) *Amplitude (%)	23.8	0.70		
Time (min) *Amplitude (%)	23.8	12.11		
Term	P-Value	VIF		
Constant	0.000			
Ethanol concentration (%)	0.487	1.00		
Temperature (C)	0.003	1.00		
Time (min)	0.000	1.00		
Amplitude (%)	0.477	1.00		
Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)	0.023	1.08		
Temperature (C) *Temperature (C)	0.008	1.08		
Time (min) *Time (min)	0.005	1.08		
Amplitude (%) *Amplitude (%)	0.000	1.08		
Ethanol concentration (%) *Temperature (C)	0.318	1.00		
Ethanol concentration (%) *Time (min)	0.009	1.00		



Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)	0.000	1.00
Temperature (C) *Time (min)	0.695	1.00
Temperature (C) *Amplitude (%)	0.498	1.00
Time (min) *Amplitude (%)	0.000	1.00
Regression Equation in Uncoded Units		
FRAP(mM trolox/100 g dry wt.) = 3816 + 2.37 Ethanol concentration (%)		
+ 16.40 Temperature (C) - 66.1 Time (min) - 40.2 Amplitude (%)		
- 0.1192 Ethanol concentration (%) *Ethanol concentration (%)		
- 0.1457 Temperature (C) *Temperature (C) - 0.625 Time (min) *Time (min)		
- 1.443 Amplitude (%) *Amplitude (%)		
- 0.0616 Ethanol concentration (%) *Temperature (C)		
- 0.358 Ethanol concentration (%) *Time (min)		
+ 0.736 Ethanol concentration (%) *Amplitude (%)		
+ 0.048 Temperature (C) *Time (min)		
+ 0.083 Temperature (C) *Amplitude (%) + 2.885 Time (min) *Amplitude (%)		

ผลการทวนสอบสมการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย โดยการสุ่มภาวะการสกัดมาตรวจสอบ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ที่ได้จากการทำนายและการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ ง.2.4

**ตารางที่ ง.2.4** การทวนสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีสกัดแบบใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย

ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (mM trolox/100 g dry wt.)		
				ค่าจากการทำนาย	ค่าจากการทดลอง	ความคลาดเคลื่อน (%)
50	30	35	40	1932.75	1924.17±10.05	0.45
90	30	35	40	1946.93	1709.58±7.22	13.88
70	30	25	40	2122.77	2153.33±15.73	1.42
50	50	25	40	2112.33	2182.50±9.38	3.22
90	50	25	40	2235.61	2418.96±7.86	7.58
90	50	45	40	1750.21	1693.96±15.73	3.32
70	70	35	30	1934.02	1912.71±31.30	1.11
70	70	35	50	1987.32	1885.63±25.58	5.39
70	50	35	40	2113.05	1943.96±6.51	8.70
70	50	35	40	2113.05	2122.08±12.63	0.43

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

## ภาคผนวก จ

## การประเมินทางประสาทสัมผัส

## แบบทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

ชื่อผู้ทดสอบ.....

อายุ..... เพศ..... วันที่ทดสอบ.....

**คำชี้แจง** โปรดทดสอบตัวอย่างต่อไปนี้ โดยการดมกลิ่น สังเกตสี และให้ระดับความชอบและไม่ชอบ ต่อผลิตภัณฑ์แต่ละตัวอย่าง **ไม่อนุญาตให้รับประทาน** โดยใส่ตัวเลขในช่องด้านซ้ายมือเพื่อแสดงรหัส ตัวอย่าง และใส่ตัวเลขในช่องที่เหลือ เพื่ออธิบายความรู้สึกชอบและไม่ชอบที่ระดับใด โดย

9: ชอบมากที่สุด      8: ชอบมาก      7: ชอบปานกลาง      6: ชอบเล็กน้อย

5: เฉยๆ      4: ไม่ชอบเล็กน้อย      3: ไม่ชอบปานกลาง      2: ไม่ชอบมาก

1: ไม่ชอบมากที่สุด

รหัสตัวอย่าง	กลิ่น	สี	ความชอบโดยรวม

ข้อเสนอแนะ.....

.....

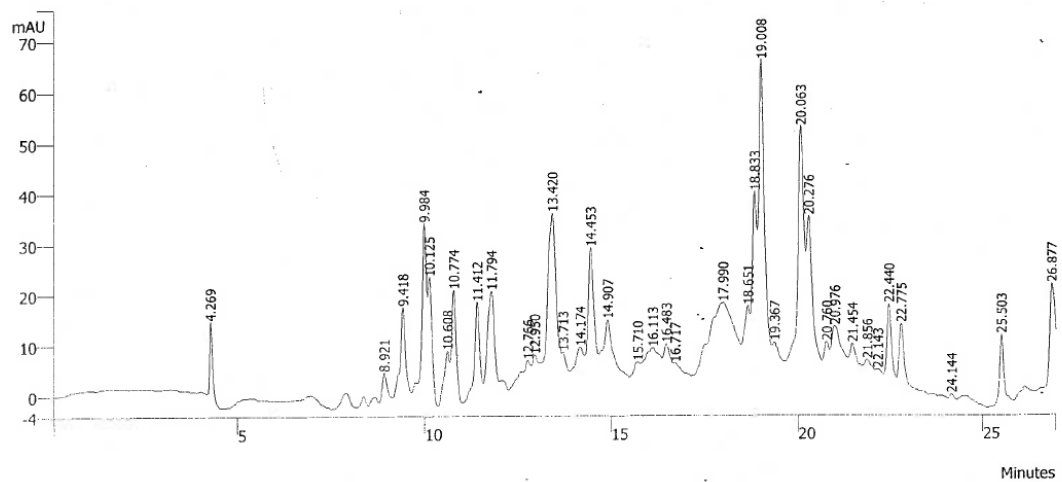
.....

.....

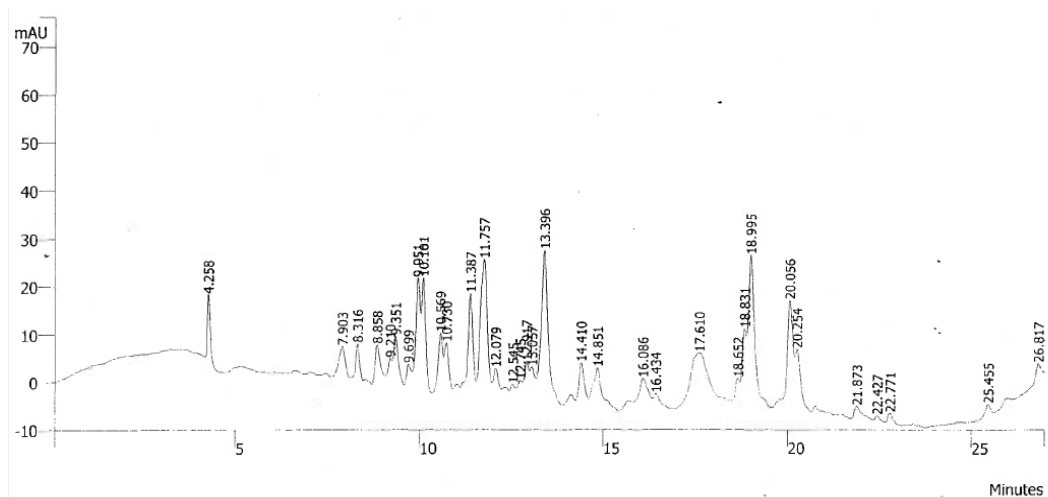
.....

ภาคผนวก ฉ  
โครมาโทแกรม

ฉ.1 โครมาโทแกรมของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วย



ฉ. 2 โครมาโทแกรมของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยวิธีการแช่



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฐิติรัตน์ ศิริจันทร์ เกิดวันที่ 1 ธันวาคม 2534 ที่จังหวัดสิงห์บุรี สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตจาก ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ (การกำหนดอาหารและโภชนาบำบัด) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อปีการศึกษา 2556 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2557

นางสาวฐิติรัตน์ ศิริจันทร์ ได้นำเสนอผลงานวิจัยด้วยวาจาในหัวข้อ ผลของแอมพลิฟูด และเวลาต่อการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดมะเกี๋ยง ในการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2560 (RSU National Research Conference 2017) ในวันที่ 28 เมษายน 2560 ณ มหาวิทยาลัยรังสิต

