

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเจียวกุหลาบ *Gynostemma pentaphyllum* Makino ด้วย
คลื่นอัลตราซาวด์และการประยุกต์ในเครื่องดื่ม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXTRACTION OF ANTIOXIDANT FROM JIAOGULAN *Gynostemma pentaphyllum* Makino
BY ULTRASOUND AND APPLICATION IN BEVERAGE



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

Department of Food Technology

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเหี่ยวงู หลาน <i>Gynostemma pentaphyllum</i> Makino ด้วย คลื่นอัลตราซาวด์และการประยุกต์ในเครื่องดื่ม
โดย	น.ส.พิชานันท์ ขำขยัน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิติพงศ์ อัศตรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวนิช)

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภา คงเป็นสุข)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิติพงศ์ อัศตรกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชาลีตา บรมพิชัยชาติกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

พิกานันท์ ข้าพชยัน : การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใญ่หวู่หลาน *Gynostemma pentaphyllum* Makino ด้วยคลื่นอัลตราซาวด์และการประยุกต์ในเครื่องดื่ม. (EXTRACTION OF ANTIOXIDANT FROM JIAOGULAN *Gynostemma pentaphyllum* Makino BY ULTRASOUND AND APPLICATION IN BEVERAGE) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.กิตติพงศ์ อัครตรกุล

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใญ่หวู่หลาน โดยศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใญ่หวู่หลานโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ช่วย (ultrasound-assisted extraction, UAE) ซึ่งพิจารณาจากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) โดยปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย ความเข้มข้นของเอทานอล (60, 70 และ 80% v/v) เวลา (10, 20 และ 30 นาที) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (30, 40 และ 50%) และอัตราส่วนของใญ่หวู่หลานต่อตัวทำละลายเอทานอลเท่ากับ 2:100 g/mL และวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) จากผลการทดลองพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากใญ่หวู่หลานที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP สูงสุดคือ ความเข้มข้นเอทานอล 68% v/v เวลา 19 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 42% โดยสารสกัดจากใญ่หวู่หลานที่ภาวะนี้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 1834.94 และ 3217.08 μM trolox/100 g dry weight ตามลำดับ จากนั้นศึกษาการพัฒนาเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใญ่หวู่หลาน โดยผสมสารสกัดจากใญ่หวู่หลาน 0-3% v/v ในชาใบหม่อน (กำหนดสารให้ความหวานซูคราโลส 0.01% w/v และกรดซิตริก 0.08% w/v) และศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพ จุลินทรีย์ และคุณภาพทางประสาทสัมผัส ผลการทดลองพบว่า การเติมสารสกัดจากใญ่หวู่หลานส่งผลให้ตัวอย่างมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เพิ่มขึ้น โดยตัวอย่างที่เติมสารสกัดจากใญ่หวู่หลาน 3% v/v มีค่าดังกล่าวสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รวมถึงค่า ΔE^* จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณสารสกัดใญ่หวู่หลานเพิ่มขึ้นเช่นกัน ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำได้ทั้งหมดของทุกตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) จากผลการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการทดสอบทางประสาทสัมผัสจึงเลือกตัวอย่างที่เติมสารสกัดจากใญ่หวู่หลาน 1.5% v/v เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการแปรรูปด้วยความร้อนและผลของบรรจุภัณฑ์ต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใญ่หวู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์และตัวอย่างควบคุม (ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใญ่หวู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำได้ทั้งหมดของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มลดลง ในขณะที่ค่า ΔE^* ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา ของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อพิจารณาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์และราพบว่าตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (LTLT และ HTST) ในบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดมีอายุการเก็บรักษา 5 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ โดยเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใญ่หวู่หลานที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิสูงเวลาสั้นที่บรรจุในขวดแก้วสีชาที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและคุณภาพทางจุลินทรีย์ดีที่สุด

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6172019623 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD: JIAOGULAN, ANTIOXIDANT PROPERTY, ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION

Pichanan Kamkayan : EXTRACTION OF ANTIOXIDANT FROM JIAOGULAN *Gynostemma pentaphyllum* Makino BY ULTRASOUND AND APPLICATION IN BEVERAGE. Advisor: Asst. Prof. KITIPONG ASSATARAKUL

This study aimed to develop ready-to-drink herbal drink containing jiaogulan leaf extract. The optimum conditions for the extraction of jiaogulan leaves by using ultrasound assisted extraction on antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays were carried out. Three independent variables, including ethanol concentrations (60, 70 and 80% v/v), time (10, 20 and 30 min) and amplitude (30, 40 and 50%) with the ratio of jiaogulan leaf powder to ethanol solvent of 2:100 g/mL analyzed by response surface methodology (RSM) were investigated. Results showed that the optimum extraction conditions for antioxidant activity from jiaogulan leaves were the ethanol concentration of 68% v/v at 19 min and the amplitude of 42% and under these conditions, antioxidant activity by DPPH and FRAP assays of jiaogulan leaf extract was 1834.94 and 3217.08 μM trolox./100 g dry weight, respectively. Then, the development of ready-to-drink herbal drink containing jiaogulan leaf extract was studied by mixing 0-3% v/v jiaogulan leaf extract in mulberry leaf tea (sucralose 0.01% w/v and citric acid 0.08% w/v). Chemical, physical, microbiological and sensory properties of developed drink were determined. It was found that the addition of jiaogulan leaf extract resulted in an increase in total phenolic content, total flavonoid content and the antioxidant activity by DPPH and FRAP assays of samples. In addition, the sample with 3% v/v of jiaogulan leaf extract had the highest amount of above-mentioned properties with statistical significance ($p \leq 0.05$) and ΔE^* value also increased as the amount of jiaogulan leaf extract increased. While the pH, total acid content and total soluble solids content of all samples were not significant differences ($p > 0.05$). Based on the antioxidant property analysis and sensory test, the sample with 1.5% v/v jiaogulan leaf extract was selected to study the optimum conditions for thermal processing and the effect of packaging on the change in properties of ready-to-drink herbal drinks containing jiaogulan leaf extract during storage at 4 °C for 9 weeks. It was observed that there was no significant difference between of pasteurized sample and control sample in term of total phenolic content, total flavonoid content and the antioxidant activity by DPPH assay ($p > 0.05$) while control sample had the highest antioxidant activity by FRAP assay ($p \leq 0.05$). During the storage at 4 °C for 9 weeks, the total phenolic content, flavonoid content and antioxidant activity by DPPH and FRAP assays, total acid content and total soluble solids of all samples tended to decrease whereas the ΔE^* value, total plate count and yeast and mold count had an increasing tendency with an increasing storage time at 4 °C. When considering number of total plate count and yeast and mold count, shelf life of pasteurized sample and control sample in both types of packaging were 5 and 8 weeks, respectively. The ready-to-drink herbal drink containing jiaogulan leaf extract pasteurized at high temperature short time and packed in amber bottle glass had the better quality according to antioxidant activity and microbial properties.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Food Technology

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วย การสนับสนุนจากทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อหน่วยงานเป็น สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) รหัสโครงการ MSD6210088 และได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก บริษัท เดอะ กิฟวิ่ง ที จำกัด ซึ่งเป็นผู้ร่วมให้ทุนผู้ช่วยวิจัยระดับปริญญาโทเพื่ออุตสาหกรรม รวมถึงวัตถุประสงค์ในการทำวิจัย และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิติพงษ์ อัครกุล อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ผู้ให้คำแนะนำ แนวคิด สั่งสอนและดูแลด้วยความเอาใจใส่ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ มาโดยตลอด จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ไฉ วัฒน โอภาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรภา คงเป็นสุข รองศาสตราจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังให้คำแนะนำ ทั้งด้านวิชาการและด้านอื่น ๆ รวมทั้งตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวก และการให้คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ขอขอบคุณเพื่อน พี่ และน้อง ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ ให้การช่วยเหลือ และคำปรึกษาตลอดการทำงานวิจัย ขอกราบขอบพระคุณพ่อแม่ และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจที่สำคัญ และให้การสนับสนุนเสมอมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

พิชานันท์ ขำขยัน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 เจียวกู่หลาน (jiaogulan).....	3
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นเจียวกู่หลาน.....	3
2.1.2 ถิ่นกำเนิดและการกระจายพันธุ์.....	4
2.1.3 สภาพแวดล้อมการปลูก.....	4
2.1.4 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเจียวกู่หลาน.....	4
2.1.5 องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของเจียวกู่หลาน.....	5
2.2 ชาใบหม่อน.....	7
2.2.1 สายพันธุ์หม่อน.....	8
2.2 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds).....	9
2.2.1 ฟลาโวนอยด์ (flavonoid).....	11
2.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.....	15
2.3.1 อนุมูลอิสระ.....	15
2.3.2 อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค.....	18

2.3.4 สารต้านอนุมูลอิสระ	19
2.3.4.1 สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic antioxidants).....	20
2.3.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymatic antioxidants)..	21
2.3.5 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ.....	21
2.3.5.1 free radical scavenging.....	22
2.3.5.2 singlet oxygen quenching (1O_2).....	22
2.3.5.3 metal chelation	23
2.3.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	23
2.3.6.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (หรือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay)	23
2.3.6.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (หรือ ferric ion reducing antioxidant power assay).....	24
2.4 การสกัด (extraction)	24
2.4.1 การชง (infusion).....	25
2.4.2 การต้ม (decoction).....	25
2.4.3 การหมัก (maceration).....	25
2.4.4 เพอร์โคเลชัน (percolation)	26
2.4.5 การสกัดแบบต่อเนื่อง (soxhlet extractor).....	27
2.5 การสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย (ultrasound assisted extraction, UAE).....	28
2.5.1 อ่างอัลตราโซนิก (ultrasonic baths).....	29
2.5.2 ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ (ultrasonic probe systems).....	30
2.5.3 ปรากฏการณ์คาวิเทชัน (cavitation)	30
2.5.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัด	33
2.5.4.1 ชนิดของตัวทำละลาย	33

2.5.4.2 เวลาในการสกัด	34
2.5.4.3 แอมพลิจูด (amplitude).....	35
2.6 การพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization).....	36
2.6.1 การพาสเจอร์ไรส์อาหารที่มีค่า pH มากกว่า 4.5 (low-acid food).....	38
2.6.2 การพาสเจอร์ไรส์อาหารที่มีค่า pH น้อยกว่า 4.5 (acid food).....	38
2.7 การหาภาวะที่เหมาะสม	38
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	42
3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน.....	44
3.2 การพัฒนาสูตรเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	47
3.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการแปรรูปด้วยความร้อนและผลของบรรจุภัณฑ์ต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษา.....	48
3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	49
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	50
4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน.....	50
4.1.1 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	50
4.1.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	56
4.1.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน.....	62
4.1.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	66
4.1.5 ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใบเจียวกู่หลาน.....	71
4.1.6 การเปรียบเทียบผลของการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยกับวิธีการชง (infusion) ต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ	75
4.2 การพัฒนาสูตรเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	77

4.2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของ เครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	77
4.2.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของเครื่องต้มสมุนไพร ผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน.....	78
4.2.3 ค่าสี (L^* , a^* , b^* และ ΔE^*) ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบ เจียวกู่หลาน	80
4.2.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำได้ ทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน.....	81
4.2.5 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และ <i>E. coli</i> และ coliform ของ เครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	83
4.2.6 การประเมินผลทางประสาทสัมผัสของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจาก ใบเจียวกู่หลาน	85
4.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการแปรรูปด้วยความร้อนและผลของบรรจุภัณฑ์ต่อการ เปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่ หลานระหว่างการเก็บรักษา.....	88
4.3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัด จากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษา.....	88
4.3.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบ เจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษา.....	93
4.3.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภค ผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษา	97
4.3.4 ค่าสี (L^* , a^* , b^* และ ΔE^*) ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบ เจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษา.....	102
4.3.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บ รักษา.....	106

4.3.6 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา ปริมาณ <i>E. coli</i> และ coliform ของ เครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียววู่หลานระหว่างการเก็บรักษา	109
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	115
บรรณานุกรม.....	117
ภาคผนวก.....	135
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ.....	136
ก.1 ค่าสีและค่าความแตกต่างของสี (ΔE^*).....	136
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์สมบัติทางเคมี.....	137
ข.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด.....	137
ข.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตามวิธีของ AOAC (2000).....	137
ข.3 ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) ในรูปกรดซิตริก ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (2000)	137
ข.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดย Folin-Ciocalteu ตามวิธีของ Waterhouse (2002).....	139
ข.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดตามวิธีของ Rattana และคณะ (2010).....	141
ข.6 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ดัดแปลงจากวิธี ของ Brand-Williams และคณะ (1995).....	143
ข.7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงจาก วิธีของ Benzie และ Strain (1996).....	146
ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพ.....	150
ค.1 การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามวิธีของ AOAC (2000).....	150
ค.2 การตรวจนับปริมาณยีสต์และรา ตามวิธีของ AOAC (2000).....	151
ค.3 การตรวจนับปริมาณ <i>Escherichia coli</i> และ coliforms ตามวิธีของ BAM (2001).....	152
ภาคผนวก ง การประเมินทางประสาทสัมผัส.....	156
ภาคผนวก จ ภาพแสดงเครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง.....	157

ประวัติผู้เขียน 159



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของสารอาหารที่พบในใบของเจียวกู่หลาน	6
ตารางที่ 2.2 แร่ธาตุที่พบในใบของเจียวกู่หลาน	6
ตารางที่ 2.3 กรดอะมิโนที่พบในเจียวกู่หลาน.....	7
ตารางที่ 2.4 อนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์และแหล่งที่พบในอาหาร	12
ตารางที่ 2.5 Reactive oxygen species (ROS) และ Reactive nitrogen species (RNS) ที่เกิด ภายในเซลล์	18
ตารางที่ 2.6 ค่าดัชนีความมีขั้ว (polarity index) ของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	34
ตารางที่ 2.7 วัตถุประสงค์ของการพาสเจอไรซ์อาหารต่าง ๆ.....	37
ตารางที่ 3.1 ระดับของปัจจัยต่าง ๆ ในการสกัดสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ ช่วย.....	44
ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองแบบ Box–Behnken design (BBD).....	45
ตารางที่ 3.3 การแปรระดับปัจจัยของสูตรเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่ หลาน	47
ตารางที่ 3.4 ภาวะในการพาสเจอไรซ์และชนิดของบรรจุภัณฑ์ ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภค ผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	49
ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	51
ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัยต่าง ๆ ที่ ส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	52
ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน.....	57
ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัยต่าง ๆ ที่ ส่งผลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	58
ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน.....	62
ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัยต่าง ๆ ที่ ส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	63
ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน.....	67

ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP	68
ตารางที่ 4.9 ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใบเจียวกู่หลานต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ	71
ตารางที่ 4.10 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานจากการสกัดด้วยคลื่น อัลตราซาวด์ช่วยและการชง.....	76
ตารางที่ 4.11 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	78
ตารางที่ 4.12 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	79
ตารางที่ 4.13 ค่า L^* , a^* , b^* และ ΔE^* ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน.....	81
ตารางที่ 4.14 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	82
ตารางที่ 4.15 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และ ปริมาณ <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) และ coliforms ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน	84
ตารางที่ 4.16 คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน.....	87
ตารางที่ 4.17 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	92
ตารางที่ 4.18 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	94
ตารางที่ 4.19 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	98
ตารางที่ 4.20 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	99
ตารางที่ 4.21 ปริมาณ <i>E. coli</i> และ coliform ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	114

ตารางที่ ข.1	วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	142
ตารางที่ ข.2	วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	145
ตารางที่ ข.3	วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	148
ตารางที่ ค.1	การวิเคราะห์ด้วยวิธี 3-tube MPN ที่ตัวอย่างความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและแสดงผลเป็น MPN/mL ที่ค่าความเชื่อมั่น 95%.....	155



สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	ลักษณะเจียวกู่หลาน.....	3
รูปที่ 2.2	การจำแนกกลุ่มของสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ.....	9
รูปที่ 2.3	โครงสร้างทางเคมีของฟีนอล	10
รูปที่ 2.4	สารประกอบฟีนอลิกจำแนกตามองค์ประกอบทางเคมี	10
รูปที่ 2.5	สารโพลีฟีนอลจำแนกตามองค์ประกอบทางเคมี.....	11
รูปที่ 2.6	โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์และโครงสร้างอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์.....	13
รูปที่ 2.7	การแบ่งชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ	20
รูปที่ 2.8	วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม	25
รูปที่ 2.9	การสกัดด้วยวิธีการหมัก	26
รูปที่ 2.10	การสกัดด้วยวิธีซอกซ์เลต	27
รูปที่ 2.11	วิธีการสกัดด้วยเทคนิคขั้นสูง.....	28
รูปที่ 2.12	ช่วงของคลื่นอัลตราซาวด์.....	29
รูปที่ 2.13	อ่างอัลตราโซนิก.....	29
รูปที่ 2.14	อัลตราโซนิกชนิดโพรบ	30
รูปที่ 2.15	ลักษณะฮอว์นชนิดต่าง ๆ	30
รูปที่ 2.16	ปรากฏการณ์ควาเวชัน.....	31
รูปที่ 2.17	การเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์	32
รูปที่ 2.18	ปรากฏการณ์ควาเวชันในเซลล์พืช	32
รูปที่ 2.19	ลักษณะกราฟโครงร่างและกราฟพื้นผิวตอบสนอง.....	40
รูปที่ 2.20	การออกแบบการทดลอง Box-Behnken design สำหรับ 3 ปัจจัย.....	41
รูปที่ 4.1	กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot) ที่แสดงอิทธิพลร่วมของ (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาที), (B) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%), (C) เวลา (นาที) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ภาวะต่าง ๆ	55
รูปที่ 4.2	ระดับปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) จากใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย.....	56
รูปที่ 4.3	กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot) ที่แสดงอิทธิพลร่วมของ (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาที), (B) ความเข้มข้นของเอ	

ทานอล (% v/v) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%), (C) เวลา (นาที่) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ภาวะต่าง ๆ	60
รูปที่ 4.4 ระดับปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) จากใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย.....	61
รูปที่ 4.5 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot) ที่แสดงอิทธิพลร่วมของ (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาที่), (B) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%), (C) เวลา (นาที่) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ($\mu\text{M trolox}/100 \text{ g dry wt.}$) ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ภาวะต่าง ๆ	64
รูปที่ 4.6 ระดับปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) จากใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย.....	66
รูปที่ 4.7 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot) ที่แสดงอิทธิพลร่วมของ (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาที่), (B) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%), (C) เวลา (นาที่) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ($\mu\text{M trolox}/100 \text{ g dry wt.}$) ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ภาวะต่าง ๆ	69
รูปที่ 4.8 ระดับปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) จากใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย.....	70
รูปที่ 4.9 ภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่าง ๆ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย.....	72
รูปที่ 4.10 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	91
รูปที่ 4.11 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	96
รูปที่ 4.12 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	101
รูปที่ 4.13 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	102
รูปที่ 4.14 ค่า L* ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	104

รูปที่ 4.15 ค่า a^* ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	105
รูปที่ 4.16 ค่า b^* ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	105
รูปที่ 4.17 ค่า ΔE^* ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	106
รูปที่ 4.18 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	108
รูปที่ 4.19 ปริมาณกรดทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	108
รูปที่ 4.20 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	109
รูปที่ 4.21 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/mL) ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	112
รูปที่ 4.22 ปริมาณยีสต์และรา (log CFU/mL) ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	113
รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	141
รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	143
รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.....	146
รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	149
รูปที่ จ.1 การสกัดใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย	157
รูปที่ จ.2 การระเหยเอทานอลออกจากสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานด้วยเครื่อง rotary evaporater	157
รูปที่ จ.3 เครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วใส	158
รูปที่ จ.4 เครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วสีชา	158

บทที่ 1

บทนำ

เครื่องต้มสมุนไพรได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน อันเป็นผลมาจากที่ผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้ความสำคัญต่อสุขภาพมากขึ้น เห็นได้จากจำนวนผู้บริโภคที่เลือกซื้อผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เครื่องต้มที่มีประโยชน์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งประโยชน์ทางด้านโภชนาการ ดังนั้นจึงมีการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์เครื่องต้มสมุนไพรที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมากขึ้น ส่งผลให้ตลาดผลิตภัณฑ์เครื่องต้มสมุนไพรเพื่อสุขภาพมีการแข่งขันที่สูงขึ้น การแปรรูปเครื่องต้มสมุนไพรสามารถทำได้หลายรูปแบบ เช่น การเตรียมเครื่องต้มสมุนไพรสดด้วยการชง และการต้มหรือแช่ เป็นต้น ซึ่งการแปรรูปดังกล่าว นั้นผลิตภัณฑ์จะมีอายุการเก็บรักษาที่สั้น และอาจไม่สะดวกต่อการบริโภคของผู้บริโภคที่มีความเร่งรีบ ดังนั้นในปัจจุบันการแปรรูปผลิตภัณฑ์เครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคที่มีอายุการเก็บรักษานานขึ้น จึงช่วยเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันทางการตลาดของกลุ่มสินค้าเครื่องต้มสมุนไพรได้

เครื่องต้มสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ผลิตจากธรรมชาติและให้คุณค่าทางโภชนาการแก่ผู้บริโภค พืชสมุนไพรที่เป็นที่น่าสนใจและกำลังได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน คือ เจียวกู่หลาน (*Gynostemma pentaphyllum* Makino.) ซึ่งถูกจัดอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae และเป็นพืชล้มลุกชนิดเถาเลื้อยขนานกับพื้นดิน มีใบรูปรี ส่วนของปลายใบแหลมและมีขอบใบหยัก เจียวกู่หลานมีการปลูกมากทางตอนเหนือของประเทศไทย โดยมีการนำเข้าจากประเทศจีน ซึ่งในประเทศจีน เจียวกู่หลานเป็นสมุนไพรจีนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรค เนื่องจากพืชสมุนไพรชนิดนี้สามารถชะลอความแก่ ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดระดับไขมันเลือด ลดระดับคอเรสเตอรอล และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น ซึ่งเป็นผลมาจากพืชเหล่านี้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) มีงานวิจัยรายงานว่าเจียวกู่หลานมีสารฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ (เคออสทิน และรูทีน) โพลีแซ็กคาไรด์ กรดอะมิโน คลอโรฟิลล์ เกลลีแอส และแร่ธาตุต่าง ๆ

การแปรรูปเครื่องต้มสมุนไพรโดยการประยุกต์ใช้สารสกัดจากใบเจียวกู่หลานในผลิตภัณฑ์เครื่องต้ม เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากในปัจจุบันพบว่าการใช้พืชสมุนไพรเจียวกู่หลานในผลิตภัณฑ์อาหารยังมีน้อยมาก ซึ่งการสกัดเป็นกระบวนการพื้นฐานที่สำคัญสำหรับแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการออกจากวัตถุดิบ อย่างไรก็ตามกรรมวิธีในการสกัดมีด้วยกันหลากหลายวิธี ดังนั้นการเลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสมจึงเป็นขั้นตอนเบื้องต้นที่สำคัญในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการเลือกวิธีการสกัดมักขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการสกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันมีการ

นำคลื่นอัลตราซาวด์เข้ามาใช้ในการสกัดอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีเพื่อสิ่งแวดล้อม (green technology) ขณะที่การสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจส่งผลต่อการสกัด เช่น ชนิดของตัวทำละลาย ความเข้มข้นของตัวทำละลาย อัตราส่วนของของแข็งต่อของเหลว ความเข้มข้นของแอมพลิฟิแคชัน อุณหภูมิ และเวลาในการสกัด เป็นต้น นอกจากนี้อีกขั้นตอนที่สำคัญคือการแปรรูปเครื่องต้มด้วยความร้อน ซึ่งการแปรรูปเครื่องต้มพร้อมบริโภคร่วมด้วยความร้อนแบบพาสเจอร์ไรซ์เป็นหนึ่งวิธีที่ช่วยฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ได้ โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อยับยั้งเอนไซม์และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค รวมถึงเพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์และเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อยืดอายุของผลิตภัณฑ์ แม้ว่าการแปรรูปด้วยความร้อนแบบพาสเจอร์ไรซ์จะเป็นวิธีที่ช่วยรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เครื่องต้มให้คงอยู่มากที่สุด เช่น คุณภาพด้านประสาทสัมผัส และคุณค่าทางด้านโภชนาการ แต่กระบวนการแปรรูปที่ใช้ความร้อนอาจส่งผลกระทบต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์เครื่องต้ม อีกทั้งการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการแปรรูปเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการแปรรูปผลิตภัณฑ์เครื่องต้มที่ปลอดภัย รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ระหว่างการเก็บรักษาสามารถใช้ในการประเมินอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เครื่องต้มได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยและการแปรรูปผลิตภัณฑ์เครื่องต้มสมุนไพรด้วยความร้อน ติดตามการเปลี่ยนแปลงของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาเพื่อประเมินอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากเจียวกุหลาบ

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 เจียวกู่หลาน (jiaogulan)

เจียวกู่หลาน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino เป็นพืชในวงศ์ Cucurbitaceae ในประเทศไทยมีชื่อเรียกเจียวกู่หลานตามท้องถิ่นที่หลากหลาย โดยแรกเริ่มที่มีการนำพืชสมุนไพรชนิดนี้เข้ามาเรียกว่า “ปัญญาจันทร์” หลังจากนั้นจึงมีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ เช่น ชาสตุล และเบญจจันทร์ เป็นต้น สำหรับชื่อภาษาอังกฤษอื่น ๆ คือ miracle grass, southern ginseng, 5-leaf ginseng, gynostemma และ penta tea (สรกนก วิมลมังคั่ง และ วริษา พงศ์เรชนานนท์, 2560)



รูปที่ 2.1 ลักษณะเจียวกู่หลาน

ที่มา: ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ (2556)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นเจียวกู่หลาน

เจียวกู่หลานเป็นพืชล้มลุกชนิดเถาเลื้อยขนานกับพื้นดินและมีลำต้นเรียวเล็ก บริเวณข้อจะมีขนและรากงอกออกมา ใบประกอบไปด้วยใบย่อย 5 ใบ มีลักษณะใบรูปรีหรือรูปไข่ และปลายโคนใบแหลม ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อยเล็กน้อยหรือเป็นคลื่น ก้านใบยาว 3-7 เซนติเมตร ดอกแยกเพศ ขนาดเล็ก สีเขียวอมเหลือง ผลกลม ผิวขรุขระ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-7 มิลลิเมตร เมื่อแก่จัดจะมีสีดำ ภายในมี 1-3 เมล็ด (สรกนก วิมลมังคั่ง และ วริษา พงศ์เรชนานนท์, 2560; อรสา ดิสถาพร, 2551)

2.1.2 ถิ่นกำเนิดและการกระจายพันธุ์

เจียวกู่หลานพบมากในเขตมณฑลทางใต้ของแม่น้ำแยงซีเกียงในประเทศจีน โดยเฉพาะทางด้านตะวันตกเฉียงใต้ ได้แก่ มณฑลเสฉวน กวางสี กวางตุ้ง เป็นต้น นอกจากนี้ ยังพบได้ในประเทศเกาหลี ญี่ปุ่น ศรีลังกา อินเดีย และมาเลเซีย ส่วนในประเทศไทยพบได้ตามธรรมชาติที่ดอยอินทนนท์ ซึ่งปัจจุบันได้มีเกษตรกรเพาะปลูกพืชชนิดนี้หลายจังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ชัยภูมิ จันทบุรี และนครราชสีมา (เย็นจิตร เตชะดำรงสิน, 2547)

2.1.3 สภาพแวดล้อมการปลูก

เจียวกู่หลานสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศที่แตกต่างกันมาก ซึ่งสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุด คือ ที่ร่มอากาศชื้น อากาศไม่ร้อนจัด และไม่แห้งแล้ง ส่วนระดับความสูงจากน้ำทะเลที่เหมาะสมแก่การปลูก คือ ความสูงต่ำกว่าระดับน้ำทะเล 3,200 เมตร มักขึ้นตามภูเขา หุบเขา สองฟากดิ่ง และบริเวณสองข้างของถนนที่มีความชันสูง ปลูกได้ดีในดินที่มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนหรือด่างอ่อน (อรสา ดิสถาพร, 2551)

2.1.4 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเจียวกู่หลาน

ในประเทศจีนเจียวกู่หลานเป็นสมุนไพรจีนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรค โดยส่วนต้นของเจียวกู่หลานช่วยรักษาโรคตับอักเสบ เบาหวาน และโรคหลอดเลือดหัวใจ (Li และคณะ, 2016) ส่วนใบของเจียวกู่หลานสามารถแก้การอักเสบ แก้ไอ ขับเสมหะ ลดความดัน บำบัดโรคตับอักเสบ และโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดหัวใจ (Tang และคณะ, 2011) และมีการใช้ทั้งต้นและรากที่เป็นยาเย็น ในการขับพิษ ขับพิษร้อน ถอนพิษไข้ รวมถึงมีการใช้เป็นยาแก้ปวดต่าง ๆ เช่น รักษาโรคตับอักเสบ กรวยไตอักเสบ กระเพาะและลำไส้อักเสบ (วิทยา บุญวรพัฒน์, 2554) นอกจากนี้ประเทศจีนตอนใต้แถบยูนนานไปจนถึงไต้หวันมีการใช้เจียวกู่หลานมาเป็นเวลานาน โดยถือว่าเป็นยาอายุวัฒนะ เนื่องจากมีคุณสมบัติช่วยบำรุงสุขภาพ และชะลอความชรา งานวิจัยในประเทศจีนระบุวาพิซซิน มีฤทธิ์ในการลดคอเลสเตอรอลในร่างกาย โดยเสริมประสิทธิภาพของตับในการส่งน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรตไปยังกล้ามเนื้อเพื่อสร้างพลังงานแทนที่จะให้น้ำตาลเปลี่ยนเป็น triglycerides ซึ่งร่างกายจะเก็บเป็นไขมัน นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการลดไขมันไม่ดีในร่างกายหรือ low density lipoprotein (LDL) และเพิ่ม high density lipoprotein (HDL) ซึ่งเป็นไขมันที่ดีต่อร่างกาย ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยไขมัน ลดระดับไขมันในเลือด และการตกตะกอนของไขมันในเส้นเลือด (อรสา ดิสถาพร, 2551) สำหรับประเทศญี่ปุ่น มีการใช้ในผลิตภัณฑ์ที่มี

ส่วนผสมของเจียวกู่หลานแกมผงหอก ดับกลิ่นกาย เครื่องดื่มสมุนไพร อาหารเสริมสุขภาพ และใช้เป็นสารปรุงแต่งในอาหารเสริมสุขภาพ (กรมพัฒนาแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2548) และในประเทศไทยมีการใช้ต้นของพืชสมุนไพรชนิดนี้มาทำเป็นยาพอกเพื่อรักษาแผล และอาการปวดของกระดูก ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเจียวกู่หลาน โดยนำส่วนของใบมาผลิตเป็นชาชง รวมถึงใช้ผลิตเป็นอาหารเสริม (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548)

เจียวกู่หลานมีสรรพคุณทางยาหลายประการ จากงานวิจัยของ Yeo และคณะ (2008) ที่ศึกษาฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานในหนูทดลอง โดยใช้สารสกัดสองความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นสูง (0.01% w/w) และความเข้มข้นต่ำ (0.0025% w/w) เปรียบเทียบกับผลของยา rosiglitazone (0.005% w/w) พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงและกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง และมีระดับอินซูลินในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยาอย่างมีนัยสำคัญ และจากการตรวจเซลล์ของตับอ่อนพบว่ามีความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการสร้างอินซูลินเพิ่มขึ้น ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการได้รับสารสกัดในปริมาณสูงสามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้

2.1.5 องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของเจียวกู่หลาน

จากการรวบรวมรายงานการวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้องกับสารอาหารและโภชนาการของเจียวกู่หลาน (องค์ประกอบของสารอาหารที่พบในเจียวกู่หลาน แสดงดังตารางที่ 2.1) พบว่าพืชชนิดนี้อุดมไปด้วยธาตุอาหาร กรดอะมิโน วิตามิน และโปรตีนหลากหลายชนิด โดยมีการรายงานว่ามีส่วนประกอบของเจียวกู่หลานมีแร่ธาตุ เช่น ซีลีเนียม เจอมาเนียม เหล็ก แมกนีเซียม แคลเซียม แมงกานีส และทองแดง ในส่วนของลำต้นพบ โซเดียม โปแตสเซียม และเหล็ก นอกจากนี้ยังพบการรายงานในเชิงปริมาณของแร่ธาตุและกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในพืชชนิดนี้อีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.2 และ 2.3 (Liang และ Sun, 2002; Park และคณะ, 1987) และมีการรายงานเกี่ยวกับสารเคมีที่พบในเจียวกู่หลานว่า พืชชนิดนี้มีสารเคมีมากกว่า 230 ชนิดด้วยกัน ซึ่งสามารถแบ่งตามกลุ่มโครงสร้างทางเคมี ได้แก่ ซาโปนิน (saponins) สเตอรอล (sterols) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) (สรกนก วิมลมังคั่ง และ วริษา พงศ์เรขานานนท์, 2560) ซึ่งกลุ่มสารเคมีที่นักวิจัยนิยมศึกษาและพบมากในเจียวกู่หลานคือสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของสารอาหารที่พบในใบของเจียวกู่หลาน

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
ความชื้น	41
คาร์โบไฮเดรต	55.4
โปรตีน	19.4
ไขมัน	7.5
เถ้า	13.5

ที่มา: Park และคณะ (1987)

ตารางที่ 2.2 แร่ธาตุที่พบในใบของเจียวกู่หลาน

สาร	ปริมาณ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)
โพแทสเซียม (K)	3219
โซเดียม (Na)	29
แมกนีเซียม (Mg)	1404
แมงกานีส (Mn)	8
เหล็ก (Fe)	21
แคลเซียม (Ca)	1746
ทองแดง (Cu)	1.2

ที่มา: Park และคณะ (1987)

ตารางที่ 2.3 กรดอะมิโนที่พบในเจียวกู่หลาน

สาร	ปริมาณ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)
อาร์จินิน (arginine)	0.0559
กรดแอสพาทิก (aspartic acid)	0.0929
ซีสทีอีน (cystine)	1.1325
กรดกลูตามิก (glutamic acid)	0.6872
ไกลซีน (glycine)	0.8600
ฮิสทีดีน (histidine)	0.4730
ไอโซลิวซีน (isoleucine)	0.2127
ลิวซีน (leucine)	0.0549
ไลซีน (lysine)	1.5563
เมไธโอนีน (methionin)	0.3289
ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine)	0.9758
ซีรีน (serine)	0.629
ทรีโอนีน (threonine)	1.1425

ที่มา: จารีย์ บันสิทธิ์ และ สุทธิดา ไชยราช (2547)

2.2 ชาใบหม่อน

ใบหม่อน (*Morus Alba* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรที่ทราบกันโดยทั่วไปว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพ เนื่องจากมีสรรพคุณที่มากมาย ได้แก่ ช่วยลดไขมันในเลือด ลดน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิต ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Sánchez-Salcedo และคณะ, 2015; Wen และคณะ, 2019) โดยใบหม่อนเป็นพืชที่นิยมรับประทานกันมาแต่ช้านาน สามารถใช้ประกอบอาหารหรือใช้เป็นยาสมุนไพร โดยเฉพาะในประเทศทางตะวันออก ตัวอย่างเช่น ในประเทศจีน นิยมใช้ใบหม่อนมาปรุงเป็นยาจีน ช่วยในการรักษาไข้และป้องกันตับ (Zhishen และคณะ, 1999) ในประเทศเกาหลีและญี่ปุ่น มีการบริโภคใบหม่อนเป็นอาหารเสริมเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Kim และคณะ, 2003) สำหรับในประเทศไทย มีการใช้ใบหม่อนมาบริโภคหลากหลายวิธี เช่น นำใบหม่อนใส่ในน้ำแกงส้ม หรือใช้เป็นผักในแกงเผ็ด นอกจากนี้เปลือกต้นหม่อนสามารถใช้เป็นยาแผนโบราณเพื่อบรรเทาอาการไข้ เป็นต้น (Wanyo และคณะ, 2011)

ชาสมุนไพรที่ทำจากใบหม่อนเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่คนแถบเอเชียนิยมบริโภค เนื่องจากประโยชน์ทางด้านสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ (Thaipitakwong และคณะ, 2018) และจากการศึกษางานวิจัยพบว่าใบหม่อนมีโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต รวมถึงแร่ธาตุ และวิตามินต่าง ๆ เช่น แคลเซียม เหล็ก กรดโฟลิก วิตามินเอ วิตามินบี และวิตามินซี เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบการรายงานเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดในกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ มีสาร flavonol glycosides คือ rutin, isoquercitrin, quercetin 3-(6-acetylglucoside), astragalin and kaempferol 3-(6-acetylglucoside) และสารฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นอีกเป็นจำนวนมาก (Arabshahi-Delouee และคณะ, 2007; Onogi และคณะ, 1993)

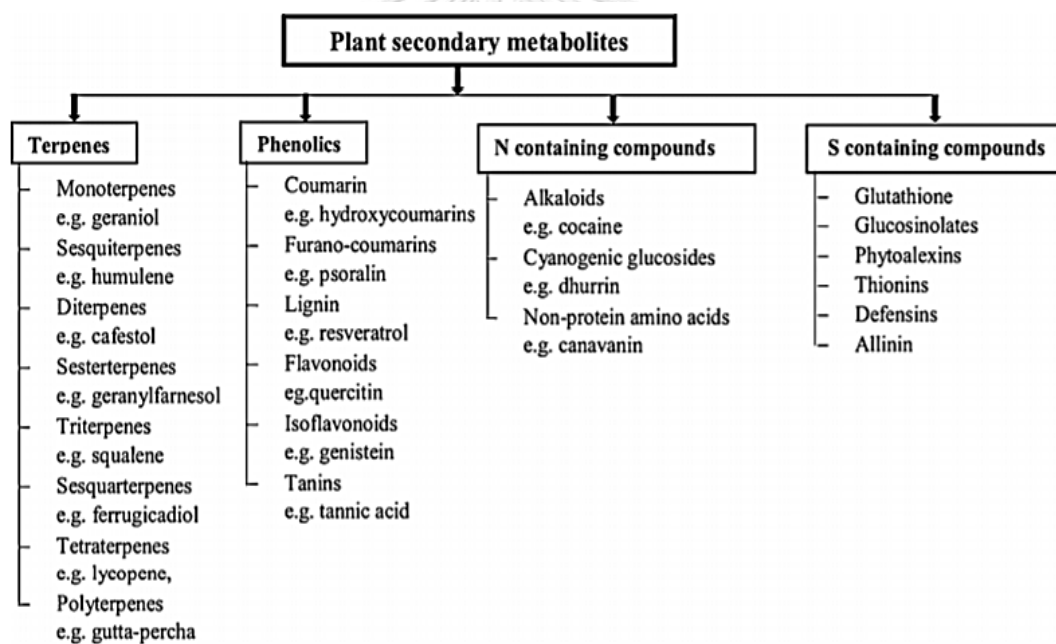
2.2.1 สายพันธุ์หม่อน

หม่อนที่นิยมปลูกในประเทศไทยมีหลากหลายสายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกันตามลักษณะของลำต้น ใบ และดอก โดยพันธุ์หม่อนตามพื้นเมืองของไทยมักมีชื่อเรียกตามสภาพท้องถิ่น ตามแหล่งที่มาหรือตามชื่อบุคคล เช่น หม่อนน้อย หม่อนสร้อย หม่อนแดง หม่อนแก้ว เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำพันธุ์หม่อนจากต่างประเทศเข้ามาเพาะปลูกหลายพันธุ์ เช่น Hluin Jio No. 44 (ประเทศจีน) Kear yan Soeban (ประเทศเกาหลี) และ Kokuso (ประเทศญี่ปุ่น) เป็นต้น นักวิชาการของประเทศไทยได้ผสมสายพันธุ์หม่อนเหล่านี้เพื่อรวบรวมลักษณะเด่นของแต่ละสายพันธุ์ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เพื่อให้ได้พันธุ์หม่อนที่มีผลผลิตสูงและมีคุณภาพที่ดีขึ้น ซึ่งพันธุ์ที่ได้ผ่านการรับรองจากกรมวิชาการและที่ได้รับการแนะนำจากกรมวิชาการเกษตรมีด้วยกันหลายพันธุ์ เช่น หม่อนน้อย หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นต้น (วิชุดา จันทรข้างแรม, 2561)

หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นพันธุ์ส่งเสริมของทางราชการ เนื่องจากใบมีลักษณะใหญ่หนา ไม่เหนียวง่าย เหมาะกับการนำไปผลิตเป็นชา เนื่องจากให้ผลผลิตสูง ซึ่งหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นการผสมพันธุ์กันระหว่างหม่อนพันธุ์ในประเทศไทยและต่างประเทศ คือพันธุ์น้อยและพันธุ์ Luin Jio 44 จากประเทศจีน มีลักษณะเด่นคือ เป็นหม่อนเทศเมีย ปลูกได้ทุกพื้นที่ทนทานต่อโรคราแป้งและโรคใบด่างได้ดี ลำต้นเป็นทรงพุ่มมีลักษณะตั้งตรงหลังการเก็บเกี่ยวหรือตัดแต่งกิ่ง มีการแตกกิ่งเร็วไม่พักตัวในทุกฤดูกาล จึงทำให้มีใบตลอดปีมีผลผลิตต่อไร่สูง 4,327.96 กิโลกรัม/ไร่/ปี ใบไม่มีแฉก ขนาดใบใหญ่ หนา อ่อนนุ่ม และไม่เหนียวง่าย (กรมหม่อนไหม, ม.ป.ป.)

2.2 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารประกอบทางเคมีที่พืชสร้างขึ้นด้วยกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยสารประกอบเคมีที่พืชสร้างขึ้นสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ เมแทบอลิต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งสารเมแทบอลิต์ปฐมภูมิเป็นสารที่พบในพืชชั้นสูงทั่วไป และมีความจำเป็นต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ประกอบไปด้วยสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดอะมิโน ในขณะที่สารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิเป็นกลุ่มของสารพิษเคมี (phytochemicals) พบในสิ่งมีชีวิตบางชนิดเท่านั้นและไม่จำเป็นต่อการดำรงชีพ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มสำคัญ คือ สารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoids) ฟีนอลิก (phenolics) สารประกอบไนโตรเจน (N-containing compounds) และสารประกอบซัลเฟอร์ (S-containing compounds) เป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 2.2) (จิตรลดา เหมรา, 2558; Jamwal และคณะ, 2018)



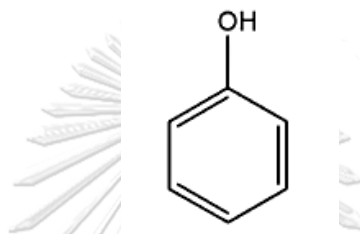
รูปที่ 2.2 การจำแนกกลุ่มของสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ

ที่มา: Jamwal และคณะ (2018)

สารประกอบฟีนอลิกพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ สมุนไพร และซีเรียล เป็นต้น โครงสร้างหลักของสารประกอบฟีนอลิก คือ ฟีนอล ซึ่งประกอบไปด้วยวงแหวนเบนซีน 1 วง (รูปที่ 2.3) โดยสารประกอบฟีนอลที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) หรือ อะไกลโคโคน (aglycone) ซึ่งฟีนอลที่ละลายได้นั้นมักพบในแวคิวโอลเซลล์ (cell vacuoles) ในขณะที่ฟีนอลที่ไม่ละลายน้ำนั้นจะเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell walls)

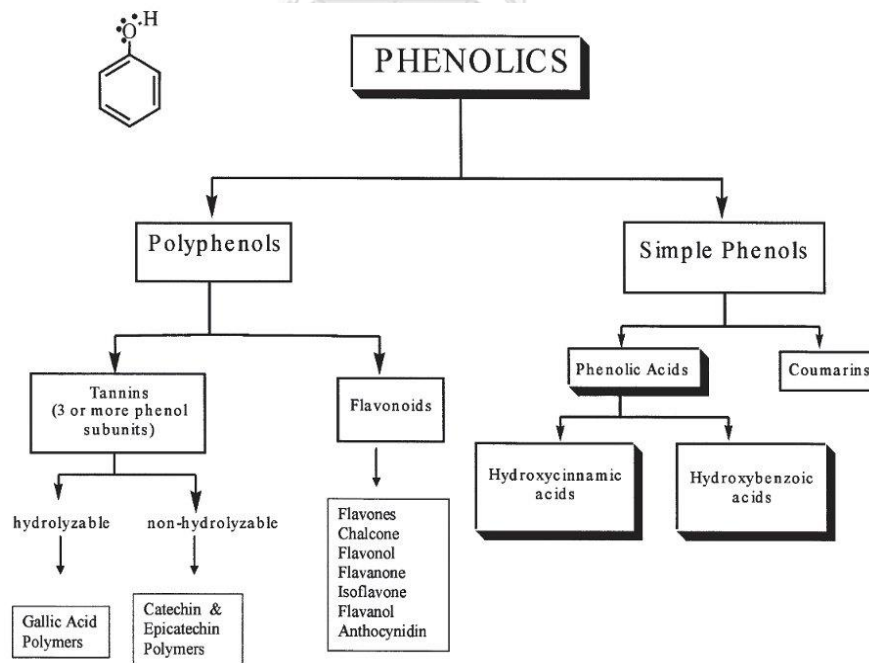
นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกสามารถจำแนกตามองค์ประกอบทางเคมีได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ polyphenols และ simple phenols ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (Piccolella และคณะ, 2015)

อย่างไรก็ตามมีหลากหลายงานวิจัยที่ให้ความสนใจกับสารกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenol) เนื่องจากเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่สุดในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งพบได้ในธรรมชาติมากถึง 8,000 ชนิด โดยโครงสร้างของโพลีฟีนอลประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกจับกับหมู่ไฮดรอกซิลตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป (Manach และคณะ, 2004) ซึ่งจำแนกตามโครงสร้าง ขึ้นอยู่กับจำนวนของวงแหวนฟีนอลและธาตุที่มาจับกับวงแหวนนั้น ๆ โดยจำแนกเป็น 4 ประเภท ดังแสดงในรูปที่ 2.5



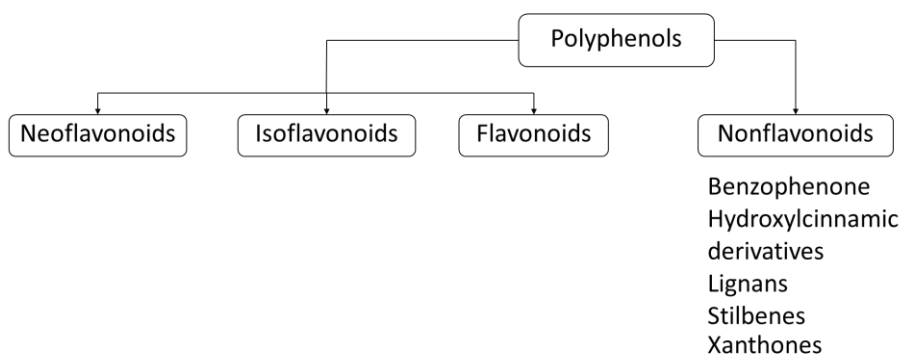
รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของฟีนอล

ที่มา: Samira และคณะ (2018)



รูปที่ 2.4 สารประกอบฟีนอลิกจำแนกตามองค์ประกอบทางเคมี

ที่มา: Devanand และ Mukhopadhyay (2006)



รูปที่ 2.5 สารโพลีฟีนอลจำแนกตามองค์ประกอบทางเคมี
ที่มา: Piccolella และ Pacifico (2015)

2.2.1 ฟลาโวนอยด์ (flavonoid)

ฟลาโวนอยด์จัดเป็นพอลิฟีนอลที่มีความสำคัญมากที่สุด เป็นสารที่ละลายน้ำ (water-soluble) ถูกเก็บในเซลล์แวคิวโอล (vacuoles cell) (Tanaka และคณะ, 2008) โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์มีสูตรโมเลกุล คือ C₁₅ (C₆-C₃-C₆) โดยวงแหวนเบนซีน 2 วง คือ วงแหวน A และ B เชื่อมต่อกันด้วยออกซิเจน 1 อะตอม และคาร์บอน 3 อะตอม (heterocyclic pyran) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวงแหวน C การจัดกลุ่มสารฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งตามฟังก์ชันและพันธะที่เกิดขึ้นที่วงแหวน C และหมู่ฟังก์ชันที่เกิดพันธะกับวงแหวน B ได้อนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ 6 ชนิด คือ ไอโซฟลาโวน (isoflavones) ฟลาวาโนน (flavanones) ฟลาวานอล (flavanols) ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาโวน (flavones) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 (Teixeira และคณะ, 2013; Pietta, 2000) ซึ่งในแหล่งอาหารชนิดต่าง ๆ จะมีอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ที่ต่างกันด้วย โดยตารางที่ 2.4 แสดงอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ที่พบในแหล่งอาหารชนิดต่าง ๆ

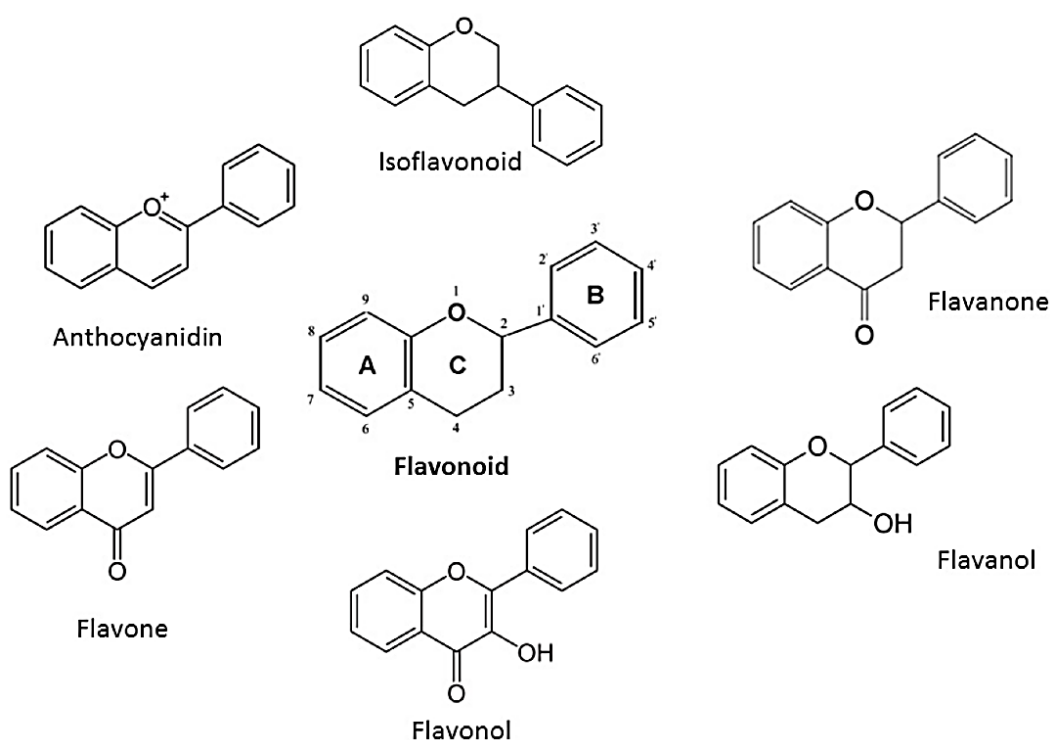
ตารางที่ 2.4 อนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์และแหล่งที่พบในอาหาร

อนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์	ตัวอย่างสารประกอบ	แหล่งที่พบ
ฟลาโวนอล (flavonols)	kaempferol quercetin myricetin tamarixetin	หอมใหญ่, ไวน์แดง, น้ำมันมะกอก, บลูเบอร์รี่, แอปเปิ้ล, เชอร์รี่ และ ชา
ฟลาโวน (flavones)	chrysin apigenin rutin luteolin	เปลือกผลไม้, ไวน์แดง, พริกแดง, เปลือกมะเขือเทศ, พาร์สลีย์ และ ไทม์
ฟลาวานอล (flavanols)	catechin epicatechin epigallocatechin glausan-3-epicatechin proanthocyanidin	แอปเปิ้ล และ ชา
ฟลาวานอน (flavanones)	naringin naringenin taxifolin hesperidin	ผลไม้ตระกูลส้ม, เกรปฟรุ้ต และ เลมอน
ไอโซฟลาโวน (isoflavones)	genistein daidzein	ถั่วเหลือง และพืชตระกูลถั่ว
แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins)	apigenidin cyanidin delphinidin pelargonidin malvidin	เชอร์รี่ สตรอว์เบอร์รี่ และองุ่น

ที่มา: Prithviraj (2019)

อนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ในพืชสมุนไพร เป็นสารประกอบที่ช่วยปกป้องความ
เฉพาะตัวของพืชสมุนไพร กล่าวได้ว่าชนิดหรือสายพันธุ์ของพืชสมุนไพรจะมีอนุพันธ์ของฟลา
โวนอยด์ที่แตกต่างกันรวมถึงมีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ที่ต่างกัน นอกจากนี้หากพบสาร

ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ในรูปอิสระเรียกว่า อะไกลโคน (aglycone) แต่โดยส่วนมากจะพบในรูปไกลโคไซด์ (glycoside) โดยเกิดพันธะระหว่างโมเลกุลของน้ำตาล ทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ กับโมเลกุลของออกซิเจนที่ตำแหน่ง 3 บนวงแหวน B (รูปที่ 2.6) โดยการแทนที่อะตอมไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิล (Kopustinskiene และคณะ, 2020) ซึ่งจากการศึกษาของ Jang และคณะ (2016) พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเจียวกู่หลานส่วนใหญ่อาจมาจากผลของสารฟลาโวนอยด์ในรูปไกลโคไซด์ ซึ่งสามารถพบได้มากในส่วนเนื้อดินของพืชชนิดนี้



รูปที่ 2.6 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์และโครงสร้างอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์

ที่มา: Kopustinskiene และคณะ (2020)

Wang และคณะ (2018) ได้วิเคราะห์อนุพันธ์ของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานด้วยวิธี MPLC (medium-pressure liquid chromatography) และวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และพบว่า สามารถแยกสารฟลาโวนอยด์จากสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน ได้ 9 ชนิด ประกอบด้วย rutin, isorhamnetin-3-O- β -D-rutinoside, quercetin-3-O- β -D-glucoside, ombuoside, isorhamnetin, kaempferol-3- β -D-O-rutinoside, kaempferol, quercetin และ 4'-O-methylkaempferol-3-O-rutinoside จากผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี H_2O_2 -induced A549 cell cytotoxicity พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย H_2O_2 เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เซลล์มีชีวิตลดลง

ประมาณ $58.6 \pm 3.4\%$ ของกลุ่มที่ไม่ได้รับการบ่ม แต่สำหรับเซลล์ที่ได้รับสารฟลาโวนอยด์ เซลล์มีปริมาณการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะฟลาโวนอยด์ชนิดที่ความเข้มข้นมากกว่า $50 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งได้แก่ฟลาโวนอยด์ชนิด 4'-O-methyl-kaempferol-3-O-rutinoside, rutin, quercetin-3-O- β -D-glucoside และ isorhamnetin-3-O- β -D-rutinoside เช่นเดียวกับ Xie และคณะ (2010) ที่รายงานว่าอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ที่สำคัญ 2 ชนิด ที่พบมากในเจียวกู่หลานคือ quercetin และ rutin นอกจากนี้ Ou-yang และคณะ (2013) ได้ศึกษาสารฟลาโวนอยด์ในใบหม่อน และพบว่าฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลักของใบหม่อนที่มีฤทธิ์ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ โดยอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์เหล่านั้นส่วนใหญ่ประกอบด้วย rutin, quercetin, kaempferol-3-O-rutinoside และ kaempferol ซึ่งจากการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์จำนวนมากของ quercetin และ rutin มุ่งเน้นไปที่ประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ในทุกระบบของร่างกาย (Kristina และคณะ, 2020) นอกจากนี้จากการรายงานของ Flora (2009) พบว่าฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือการป้องกันภาวะเครียดที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress) โดยการเป็น free radical scavenger และยังมีกลไกที่สำคัญอีกอย่างคือการจับกับโลหะหนัก โดยเฉพาะ Fe และ Cu ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิด Fenton reaction ซึ่งจะก่อให้เกิด hydroxyl radical อีกด้วย โดยเฉพาะเคอควิซิทิน ที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและลดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมถึงลดความเป็นพิษต่อเซลล์ของไลโปโปรตีน (lipoproteins) ที่มีความหนาแน่นต่ำ แม้ว่าจะมีการรายงานเกี่ยวกับประโยชน์ทางด้านเภสัชวิทยาของเคอควิซิทินเป็นจำนวนมาก แต่ก็ยังพบการรายงานที่เกี่ยวกับอันตรายของสารชนิดนี้ด้วยเช่นกัน

เคอควิซิทิน (quercetin) จัดอยู่ในสารฟลาโวนอยด์ประเภทสารฟลาโวนอล พบได้ในผัก ผลไม้หลายชนิด โดยส่วนมากจะพบเคอควิซิทินในรูปไกลโคไซด์ซึ่งเกิดพันธะกับน้ำตาล เช่นกลูโคส (glucose) แรมโนส (rhamnose) หรือรูติโนส (rutinoside) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านความสามารถในการละลาย และการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งตามกฎหมายทั่วไป เคอควิซิทินในรูปไกลโคไซด์จะมีความสามารถในการละลายน้ำมากกว่าเคอควิซิทินในรูปอะไกลโคโคน เนื่องจากเคอควิซิทินในรูปอะไกลโคโคนจะไม่มีน้ำตาลมาเกาะ จึงไม่สามารถละลายในน้ำเย็นได้ทั้งหมดรวมถึงละลายได้ไม่ดีในน้ำร้อน แต่จะละลายได้ค่อนข้างดีในแอลกอฮอล์และไขมัน (Gregory, 2011) โดยเคอควิซิทินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบจึงมีผลต่อโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ เช่น ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular protection) ฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง (anti-cancer activity) ฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว (anti-leukemic) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ฤทธิ์ต้านอาการแพ้ (anti-

allergic) ลดความดัน (anti-hypertension) ฤทธิ์ต้านการเจริญของไวรัสและแบคทีเรีย (anti-viral and bacterial activity) และฤทธิ์ป้องกันระบบประสาท (neuroprotection) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยลดความเป็นพิษของการออกซิไดซ์ไขมันชนิด LDL ที่มีต่อเซลล์ (oxidized LDL-cholesterol cytotoxicity reduction) (Ahn และคณะ, 2008; Boots และคณะ, 2008)

รูทีน (rutin) เรียกอีกอย่างว่า rutoside, quercetin-3-rutinoside และ sophorin เป็นฟลาโวนอยด์ในรูปของไกลโคไซด์ ซึ่งเกิดจาก flavonols quercetin และ disaccharide rutinose (Atanassova และ Bagdassarian, 2009) มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปในผักและผลไม้ พบมากในดอกเสาวรส บักวีทชา และแอปเปิ้ล มีการนำรูทีนมาใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างโดยเฉพาะกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีส่วนช่วยในการต่อต้านอาการแพ้ และต้านการอักเสบในกระเพาะอาหาร (cytoprotective) ป้องกันหลอดเลือด (vasoprotective) ต่อด้านสารก่อมะเร็ง (anticarcinogenic) ป้องกันระบบประสาท (neuroprotective) และป้องกันหัวใจ (cardioprotective) เป็นต้น รวมถึงมีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรีย ไวรัส และโปรโตซัว (antibacterial, antiviral และ antiprotozoal) นอกจากนี้ยังพบว่ารูทีนสามารถป้องกันการเกิดแผลเยื่อเมือกในกระเพาะอาหารในสัตว์ทดลองที่ถูกกระตุ้นให้อยู่ในสภาวะ oxidative stress ได้ (Yang และคณะ, 2008; Ganeshpurkar และคณะ, 2017)

2.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2.3.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) อย่างน้อย 1 คู่ โคจรรอบวงนอกสุด ซึ่งทำให้ไม่เสถียร (unstable) และว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ภายในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ โดยอนุมูลอิสระจะเป็นตัวรับหรือให้อิเล็กตรอนแกโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวมันเสถียร ส่งผลให้โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือได้รับอิเล็กตรอนกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ซึ่งเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา ดังสมการที่ 1.1 และ 1.2





อนุมูลอิสระมีหลายชนิด ซึ่งชนิดที่สำคัญ ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และไฮดรอกซิลแรดดิคัล (hydroxyl radical) โดยอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนหายใจผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) เช่น การหายใจระดับเซลล์เพื่อสร้างพลังงาน ซึ่งจะเกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) นอกจากนี้สามารถเกิดขึ้นกับเซลล์ที่ได้รับการบาดเจ็บและการอักเสบจากผลการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม เป็นต้น อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วยังสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อมได้ด้วย ซึ่งเป็นสิ่งที่มักเกิดขึ้นได้ในชีวิตประจำวัน เช่น การได้รับเชื้อโรค รังสี แสงแดด คิวบ์หรือ เขม่าจากเครื่องยนต์ การย่างเนื้อสัตว์ที่มีไขมันสูงไหม้ และยา เป็นต้น (Cornelli, 2009; Gutteridge และคณะ, 1992; Halliwell, 1999; Lockwood, 2007; Shalaby, 2013)

อย่างไรก็ตามการสร้างอนุมูลอิสระหรือการกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระทั้งจากอนุมูลอิสระและสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radicals) ดังแสดงในตารางที่ 2.5 สิ่งที่เป็นตัวบ่งบอกระดับความเป็นพิษคือความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกาย ซึ่งสารที่มีความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายเรียกว่า reactive species (RS) ส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ โดยเฉพาะการฉายรังสีต่าง ๆ เช่น รังสี UV รังสี X-ray และรังสีแกมมา (gamma-ray) นอกจากนี้ยังเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาจากโลหะ มลพิษในอากาศ เป็นต้น อนุมูลอิสระในรูปของ ROS เช่น

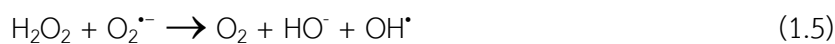
- superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ซึ่งเกิดจากการรับอิเล็กตรอน (e^-) เข้ามาในปฏิกิริยา reduction ของออกซิเจน (O_2) ดังสมการที่ 1.3



- hydrogen peroxide (H_2O_2) เกิดขึ้นได้ดังสมการที่ 1.4



- hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) เกิดได้จาก 2 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยา Haber-Weiss ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และ $\text{O}_2^{\cdot-}$ และปฏิกิริยา Fenton reaction ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการ oxidation ระหว่าง H_2O_2 และเหล็ก (Fe) ดังสมการที่ 1.5 และ 1.6



ส่วนที่พบได้น้อยจะอยู่ในรูปของ reactive nitrogen species (RNS) เช่น nitric oxide radical (NO^{\cdot}) และ nitrogen dioxide radical (NO_2^{\cdot}) เป็นต้น โดยสารเหล่านี้สามารถกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตลอดเวลาและเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ในสิ่งมีชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากซึ่งไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) จึงนำไปสู่ภาวะ oxidative stress (Halliwell, 2001; Flora, 2009) หากไม่มีการยับยั้งปรากฏการณ์นี้โดยสารต้านอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนจะเกิดขึ้นต่อเนื่องและทำให้คุณสมบัติและการทำงานของสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตถูกทำลายและเกิดความเสียหายตามลำดับ การสร้างออกซิเจนจากปฏิกิริยาบางชนิดแสดงในสมการที่ 1.7-1.11



ตารางที่ 2.5 Reactive oxygen species (ROS) และ Reactive nitrogen species (RNS) ที่เกิดภายในเซลล์

Free radical	Non-radicals
ROS	
$O_2^{\cdot -}$ superoxide	H_2O_2 hydrogen peroxide
OH^{\cdot} hydroxyl	$HOCl^{\cdot}$ hypochlorus
RO_2^{\cdot} peroxy	O_3 ozone
RO^{\cdot} alkoxy	1O_2 singlet oxygen peroxynitrite
HO_2^{\cdot} hydroperoxyl	
RNS	
NO^{\cdot} nitric oxide	$ONOO^{\cdot}$ peroxynitrite
NO_2^{\cdot} nitrogen dioxide	$ROONO$ alkyl
	N_2O_3 peroxynitrites
	N_2O_4 dinitrogen
	HNO_2 trioxide
	NO_2^+ dinitrogen
	NO tetraoxide
	NO^- nitrous acid
	NO^+ nitronium anion
	NO_2Cl nitroxyl anion
	nitrosyl cation
	nitryl chloride

ที่มา : Dhawan (2014)

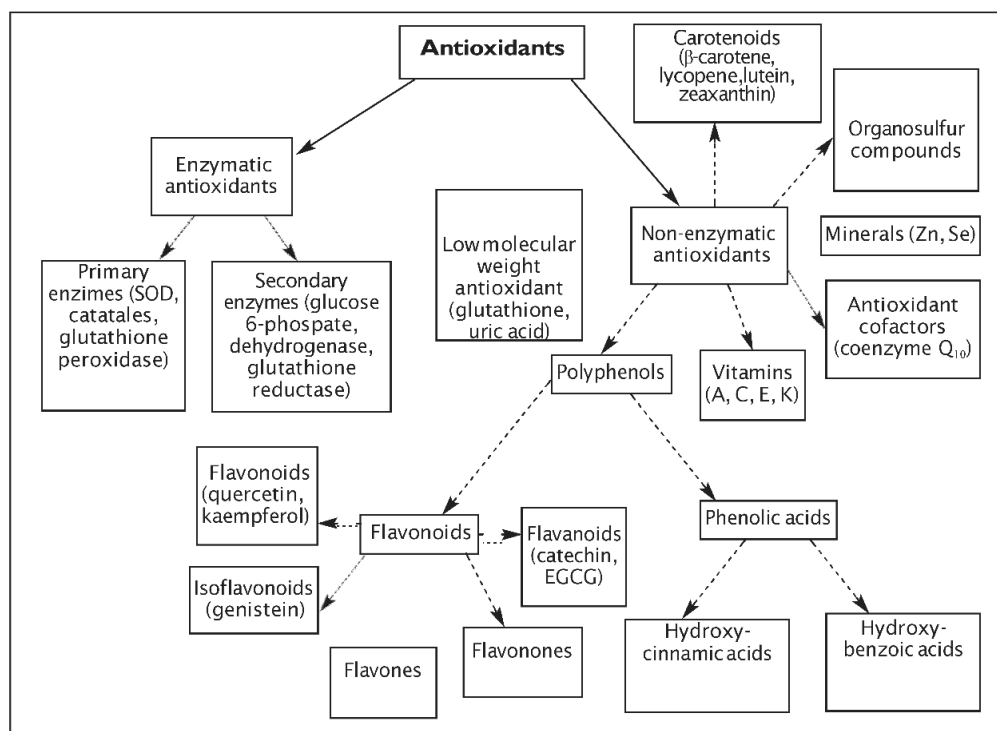
2.3.2 อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค

เนื่องจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีจำนวนมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจึงกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น กรดนิวคลีอิก (nucleic acids) โปรตีน (proteins) กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) และ คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) (Shalaby, 2013) และทำลายสมดุลของระบบต่าง ๆ ในร่างกายโดยทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ เช่น ทำลายหน้าที่ของเซลล์เมมเบรนทำให้เซลล์ตาย ทำลายดีเอ็นเอโดยไปจับกับหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลดีออกซีไร

โบส (deoxyribose sugar) นอกจากนี้ยังสามารถแตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีนทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และการเกิดมะเร็ง (Surveswaran และคณะ, 2007) และเป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด ได้แก่ โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาท โรคมะเร็ง โรคความผิดปกติเกี่ยวกับสายตา รวมถึงการแก่ชรา เป็นต้น (Dhawan, 2014; Sarms และคณะ, 2010) นอกจากนี้ในปัจจุบันมีรายงานว่า ROS มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวาน ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ ภายในร่างกาย ในสภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูง อนุมูลอิสระจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมากขึ้นซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน (Hwang และ Kim, 2007; Ak และ Gülçin, 2008)

2.3.4 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่ช่วยป้องกัน ยับยั้ง หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่มีโมเลกุลเสถียรพอที่จะให้อิเล็กตรอน เพื่อทำลายและลดปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้ไปทำลายหรือสร้างความเสียหายต่อสารประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต โดยสารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้แม้ว่าจะมีความเข้มข้นต่ำ จะคงมีความสามารถในการยับยั้งหรือชะลอกระบวนการออกซิเดชัน โดยการขัดขวาง ทำลาย หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ก่อนที่โมเลกุลที่สำคัญจะเสียหาย นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังทำหน้าที่ตรวจจับไอออนของโลหะที่เป็นตัวการในการสร้าง ROS อีกด้วย (Kebede และคณะ, 2019; Kumar, 2014; Flora, 2009) โดยสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การแบ่งชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: Iannitti และ Palmier (2009)

2.3.4.1 สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่เป็นเอนไซม์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (Muluken และ Shimelis, 2019; Nimse และ Pal, 2015; Flora, 2009) คือ

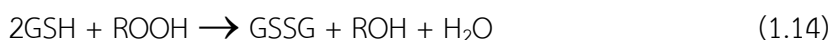
(1) primary enzymatic antioxidants ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์สำคัญ 3 ชนิด ที่ทำหน้าที่ป้องกันหรือยับยั้งอนุมูลอิสระ ได้แก่

- superoxide dismutase (SOD) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ $O_2^{\cdot-}$ ไปเป็น H_2O_2 และ O_2 ดังสมการที่ 1.12



- glutathione peroxidase (GPx) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่เป็นเอนไซม์ ที่มี tripeptide glutathione (GSH) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนสองตัวเพื่อลดปริมาณ H_2O_2 โดย GPx จะเร่งปฏิกิริยา reduction ของ H_2O_2 ให้เป็นน้ำ (H_2O) (ดังสมการที่ 1.13) หรือเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา organic peroxides (ROOH) ให้

กลายเป็นแอลกอฮอล์ (ROH) (สมการที่ 1.14) ในขณะที่ออกซิไดซ์ GSH ไปพร้อม ๆ กัน และเอนไซม์ชนิดนี้ยังช่วยกำจัดเปอร์ออกไซด์ที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยา Fenton reaction ได้ดีอีกด้วย



- catalase (CAT) เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์ของพืช สัตว์ และแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน (aerobic bacteria) โดยจะพบ CAT ในออร์แกเนลล์ของเซลล์ที่เรียกว่าเพอรอกซิโซม (peroxisome) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้กลายเป็น H_2O และ O_2 ดังสมการ 1.15



(2) secondary enzymatic antioxidants ประกอบด้วย glutathione reductase และ glucose-6-phosphate dehydrogenase โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ไม่ได้ทำหน้าที่ป้องกันหรือยับยั้งอนุมูลอิสระโดยตรง แต่อาจมีส่วนช่วยในการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ

2.3.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymatic antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ทำหน้าที่ซ่อมแซมระบบต่าง ๆ ของร่างกายและช่วยป้องกันสภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยการกำจัด ROS และ RNS สารในกลุ่มนี้มีหลากหลายชนิด เช่น vitamins (A, C, E และ K), enzyme cofactors (Q10), minerals (zinc และ selenium), organosulfur compounds (allium และ allium sulfur), nitrogen compounds (uric acid), peptides (glutathione) และ polyphenol (flavonoids และ phenolic acid) เป็นต้น (รูปที่ 2.7)

2.3.5 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน

(singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelation) และยับยั้งการทำงานของ lipoxygenase เป็นต้น (Choe และ Min, 2009)

2.3.5.1 free radical scavenging

เป็นกลไกที่จะยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ จะเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ซึ่งมีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิม จึงทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกแบบนี้ ได้แก่ vitamins (เช่น vitamin E) กลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระแบบสังเคราะห์ (เช่น butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary-butyl hydroquinone (TBHQ)) และ polyphenol (เช่น catechin, ellagic acid, gallic acid, malvidin และ quercetin) ตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยาแสดงในสมการที่ 1.15-1.18



(เมื่อ A คือ สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน H คือ ไฮโดรเจน O คือ ออกซิเจนและ R คือ อนุมูลอิสระ) (Flora, 2009)

2.3.5.2 singlet oxygen quenching (1O_2)

ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยเปลี่ยน singlet oxygen (1O_2) ให้อยู่ในรูป triplet oxygen (3O_2) เพื่อกำจัดหรือป้องกันการเกิดออกซิเจน (O_2) ที่เป็นปัจจัยหนึ่งของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้ ได้แก่ tocopherols, carotenoids, curcumin, phenolics, urate และ ascorbate เป็นต้น (Choe และ Min, 2009) ตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังสมการที่ 1.19



2.3.5.3 metal chelation

โลหะหนัก เช่น Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^{2+} เป็นสาเหตุที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายประเภท ดังนั้นการที่มีสารที่มีกลไกไปยับยั้งอนุมูลอิสระโดยไปจับกับไอออนของโลหะเหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น (Flora, 2009)

2.3.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ (เช่น thin layer chromatography (TLC) และ high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น) และการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ (เช่น วิธี oxygen radical absorbance capacity (ORAC), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), ferric reducing ability of plasma (FRAP) และ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นต้น) ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะที่แตกต่างกันออกไป จึงนิยมใช้วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าหนึ่งเทคนิคในการตรวจสอบและสรุปผล (Muluken และ Shimelis, 2019)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยหลักด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี (spectrometric techniques) ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาของโมเลกุลของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ (Pisoschi และ Negulescu, 2012) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้เป็น การวัดการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer) ซึ่งเป็นเครื่องมือพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางเคมีทั่วไป จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2.3.6.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (หรือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay)

DPPH คืออนุมูลอิสระที่มีความเสถียร (stable free radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่นิยมนำไปใช้เป็นตัววัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจ โดยใช้หลักการของ $DPPH\cdot$ ในรูปของอนุมูลอิสระ สารละลายของ DPPH จะมีสีม่วงและดูดกลืนคลื่นแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดย $DPPH\cdot$

จะทำปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R•) ดังสมการที่ 1.20 และ 1.21



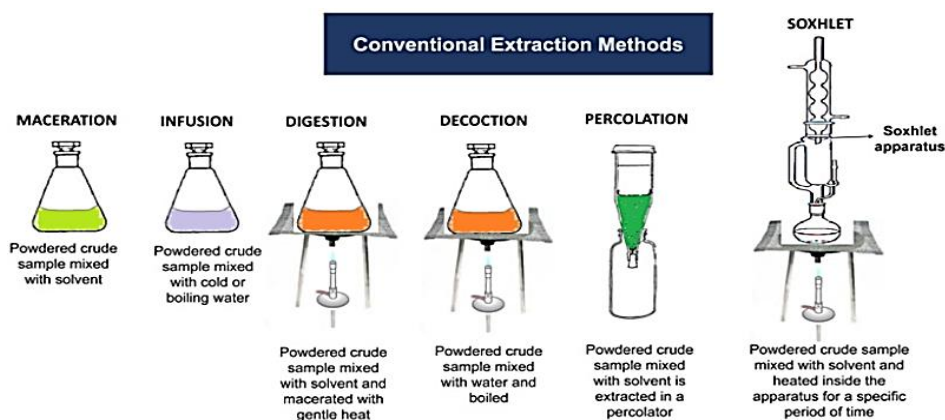
เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปออกซิไดซ์ (DPPH) ซึ่งการลดลงของอนุมูลอิสระดังกล่าวส่งผลให้สีม่วงของสารละลายจางลงและเป็นตัวชี้วัดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หรือหมายถึงการลดลงของ DPPH เป็นผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระ (Brand-Williams และคณะ, 1995; Pisoschi และ Negulescu, 2012)

2.3.6.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (หรือ ferric ion reducing antioxidant power assay)

วิธีการวิเคราะห์นี้จะมีหลักการที่แตกต่างไปจากวิธี DPPH ที่ได้กล่าวไปข้างต้น โดยวิธี FRAP จะอาศัยหลักการวัดความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระให้กับสารประกอบเชิงซ้อน ferric ion และ 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine หรือ $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ ในสภาวะที่เป็นกรด (low pH) โดย Fe^{3+} ใน FRAP reagent จะรับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระแล้วเปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ สารประกอบเชิงซ้อนนี้จะมีสีน้ำเงิน และสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้เป็นการวัดการเพิ่มขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Fe^{2+} และ TPTZ โดยค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จะเป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (Benzie และ Strain, 1996; Pisoschi และ Negulescu, 2012)

2.4 การสกัด (extraction)

การสกัดเป็นกระบวนการพื้นฐานสำหรับการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการออกจากวัตถุดิบ ซึ่งการสกัดมีด้วยกันหลากหลายวิธี วิธีแบบดั้งเดิม (conventional extraction method) ที่นิยมใช้กัน ได้แก่ การชง (infusion) การต้ม (decoction) การหมัก (maceration) เพอร์โคเลชัน (percolation) และการตุ๋นหรือการย่อย (digestion) เป็นต้น (รูปที่ 2.8) (Belwal และคณะ, 2018)



รูปที่ 2.8 วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

ที่มา: Belwal และคณะ (2018)

2.4.1 การชง (infusion)

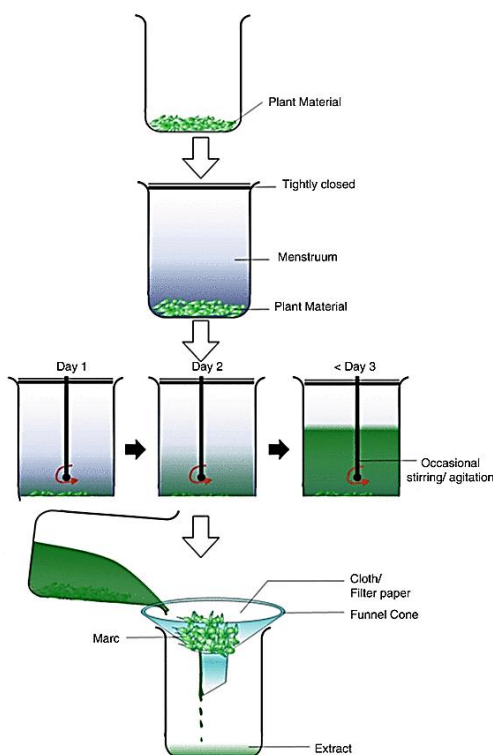
เป็นการสกัดวัตถุดิบโดยนำสมุนไพรหรือพืชที่ต้องการสกัดมาแช่เป็นระยะเวลาสั้น ๆ ร่วมกับการใช้น้ำร้อนหรือน้ำเย็น ดังนั้นสารสกัดที่ได้จะเป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิไม่สูงมาก (Handa และคณะ, 2008)

2.4.2 การต้ม (decoction)

ในกระบวนการนี้วัตถุดิบจะถูกแช่และต้มในน้ำตามปริมาณและเวลาที่กำหนด วิธีการสกัดนี้เหมาะสำหรับการแยกองค์ประกอบที่ละลายในน้ำได้ดีและทนความร้อนได้ดี เนื่องจากต้องต้มหลังจากที่น้ำเดือดต่อไปอีกประมาณ 15 นาที (Handa และคณะ, 2008)

2.4.3 การหมัก (maceration)

หลักการสกัดสารสำคัญจากพืชด้วยวิธีนี้ (รูปที่ 2.9) คือ หมักตัวอย่างด้วยตัวทำละลายในภาชนะที่ปิดสนิท ดำเนินการโดยบดตัวอย่างและแช่ด้วยน้ำหรือตัวทำละลายในภาชนะปิดสนิท ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน ระหว่างการสกัดควรมีการกวนหรือคนเป็นบางช่วงเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจึงกรองเพื่อแยกสารสกัดออก ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือ ไม่ใช้ความร้อน จึงเหมาะสำหรับตัวอย่างที่ไวต่อความร้อน แต่มีข้อเสียคือ ใช้เวลาในการสกัดนาน เนื่องจากในระหว่างการสกัดมีการเคลื่อนที่ของสารสกัดค่อนข้างน้อย (Handa และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.9 การสกัดด้วยวิธีการหมัก

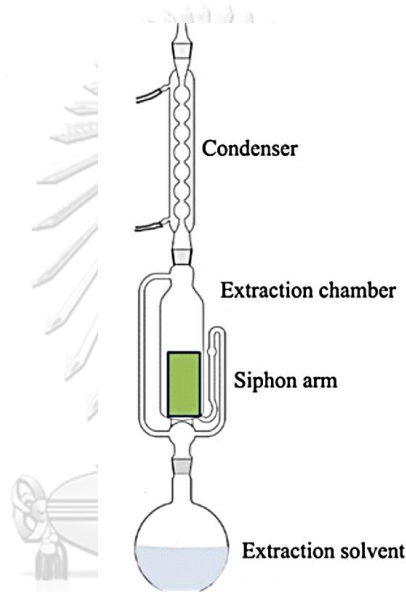
ที่มา: Sasidharan และคณะ (2018)

2.4.4 เพอร์โคเลชัน (percolation)

เพอร์โคเลชันเป็นการสกัดสารสำคัญโดยใช้ระยะเวลาช่วงสั้น ๆ ด้วยเครื่องชง (percolator) ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดต้องอยู่ในรูปแบบผงและใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว (polarity) แตกต่างกันร่วมในการสกัด ซึ่งหลักการของการชงจะคล้ายกับการแช่แต่จะแตกต่างกันตรงที่ ในการนำวัตถุดิบมาหมักกับตัวทำละลายให้พองตัวเต็มที่ พอขึ้นประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วค่อย ๆ ใส่ผงวัตถุดิบเพิ่มไปที่ละชั้นลงในเครื่องชงทีละน้อย ๆ จากนั้นจึงเติมตัวทำละลายลงไปให้สูงเหนือระดับสมุนไพรมาก แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงวัตถุดิบช้า ๆ พร้อมกับละลายสารสำคัญจากผงตัวอย่างออกมา เครื่องชงมีลักษณะเป็นคอลัมน์ทรงกระบอกปลายเปิดทั้งสองด้าน โดยที่ปลายด้านบนจะกว้างกว่าด้านล่าง เพื่อความสะดวกในการบรรจุผงตัวอย่าง ส่วนปลายด้านล่างมักจะต่อเข้ากับท่อสายยางเปิด-ปิดสำหรับไซเออสารสกัดออก การสกัดควรเติมตัวทำละลายใหม่เหนือผงวัตถุดิบเรื่อย ๆ เพื่อทำการสกัดซ้ำ ระวังอย่าปล่อยให้แห้ง จนกว่าองค์ประกอบในผงตัวอย่างจะละลายออกมาหมด สามารถทดสอบได้โดยการตรวจสอบสารสกัดสุดท้าย (Handa และคณะ, 2008)

2.4.5 การสกัดแบบต่อเนื่อง (soxhlet extractor)

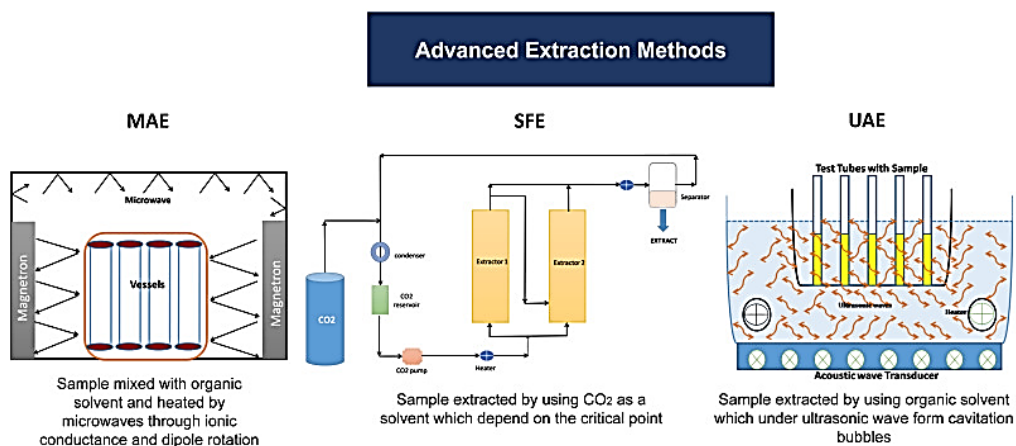
การสกัดจะเกิดขึ้นในระบบปิดและใช้ความร้อนช่วยในการสกัด โดยการสกัดเป็นการสกัดแบบต่อเนื่อง ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้จำเป็นต้องมีจุดเดือดต่ำ เมื่อตัวทำละลายใน flask ระเหยและกลั่นตัวลงไปที่ thimble ซึ่งบรรจุตัวอย่างอยู่ จากนั้นเมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในภาชนะด้วยวิธีการกลั่นน้ำ ทั้งสารสกัดไว้ในภาชนะ ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ (รูปที่ 2.10) ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะกับสารที่ไวต่อความร้อน (Sasidharan และคณะ, 2018)



รูปที่ 2.10 การสกัดด้วยวิธีซอกซ์เลต

ที่มา: Sasidharan และคณะ (2018)

วิธีการสกัดเหล่านี้เป็นการสกัดที่มีมาตั้งแต่ช่วงศตวรรษที่ 11 ซึ่งในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงวิธีการสกัด โดยนำวิธีการสกัดที่ได้กล่าวข้างต้นนั้นมาเป็นขั้นตอนพื้นฐานของเทคนิคการสกัดขั้นสูง วิธีการสกัดด้วยเทคนิคขั้นสูง (advanced extraction methods) ได้แก่ การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave assisted extraction; MAE) การสกัดสารด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid extraction; SFE) การสกัดด้วยของเหลวความดันสูง (pressurized liquid extraction; PLE) การสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic assisted extraction; UAE) การสกัดโดยใช้เอนไซม์ (enzyme assisted extraction; EAE) เป็นต้น (รูปที่ 2.11) (Belwal และคณะ, 2018)



รูปที่ 2.11 วิธีการสกัดด้วยเทคนิคขั้นสูง

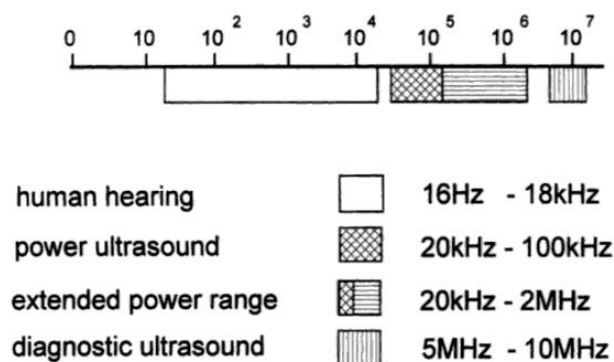
ที่มา: Belwal และคณะ (2018)

การสกัดที่กล่าวมาข้างต้นนี้มีข้อจำกัดในการสกัดสารสำคัญในพืช ดังนั้นการเลือกวิธีสกัดจึงเป็นสิ่งสำคัญเบื้องต้นในการสกัด การเลือกวิธีการสกัดมักขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ (Belwal และคณะ, 2018) ซึ่งในปัจจุบันมีการนำคลื่นอัลตราซาวด์เข้ามาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีเพื่อสิ่งแวดล้อม (green technology) เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการสกัดแบบอื่นแล้วสามารถลดเวลาและอุณหภูมิในการสกัด รวมถึงช่วยลดตัวทำละลายหรือใช้ตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มผลผลิตและส่งผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ดังนั้นจึงนิยมนำเทคนิคนี้ไปใช้เพื่อแยกส่วนประกอบของอาหาร เช่น กลิ่น สารต้านอนุมูลอิสระ เม็ดสี ส่วนประกอบอินทรีย์ และแร่ธาตุอื่น ๆ เป็นต้น (Pingret และคณะ, 2012)

2.5 การสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย (ultrasound assisted extraction, UAE)

คลื่นอัลตราซาวด์ หรือคลื่นอัลตราโซนิค (ultrasonic waves) หมายถึงพลังงานที่เกิดจากคลื่นเสียง ที่มีการสั่นของคลื่นประมาณ 20,000 ครั้งต่อวินาทีหรือสูงกว่า หรือหมายถึงคลื่นความดัน (pressure waves) ที่มีความถี่ (frequency) สูงกว่าคลื่นเสียงปกติที่มนุษย์ไม่สามารถได้ยิน (ตั้งแต่ 16 Hz ถึง 20 kHz) แต่ความถี่ต่ำกว่าไมโครเวฟ (ตั้งแต่ 20 kHz ถึง 10 MHz) คลื่นอัลตราซาวด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ช่วงหลัก ตามความถี่ (รูปที่ 2.12) โดยจำแนกเป็น diagnostic ultrasounds ซึ่งคือคลื่นอัลตราซาวด์ในช่วงนี้จะมีพลังงานต่ำและความถี่สูง มีความถี่ตั้งแต่ 5 ถึง 10 MHz สามารถใช้ในหลายสาขา เช่น การถ่ายภาพทางการแพทย์ และด้านการวิเคราะห์ เป็นต้น และ power ultrasound ซึ่งคือคลื่นอัลตราซาวด์ในช่วงนี้จะมีพลังงานสูงและความถี่ต่ำ (high power and low

frequencies) มีความถี่ตั้งแต่ 20 ถึง 100 kHz ทำให้เกิดผลต่อคุณสมบัติทางกลและทางเคมีของอาหาร เนื่องจากคลื่นดังกล่าวทำให้เกิดปรากฏการณ์คาวิเทชัน (cavitation) จึงนิยมประยุกต์ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร (Mason, 1998; Pingret, Fabiano-Tixier และ Chemat, 2012)



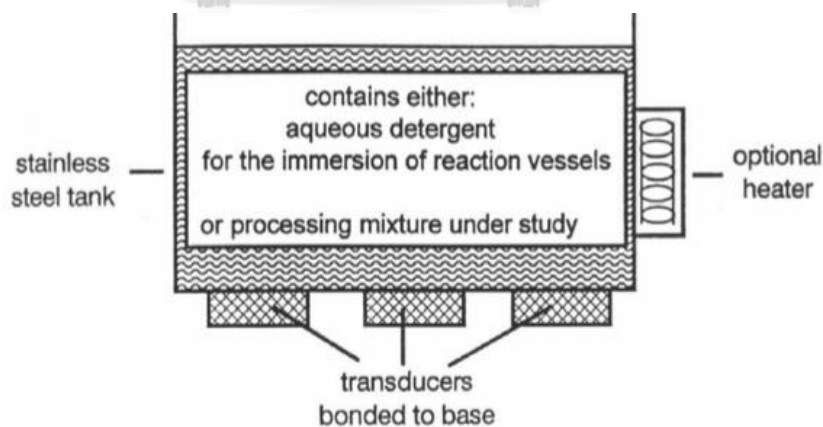
รูปที่ 2.12 ช่วงของคลื่นอัลตราซาวด์

ที่มา: Mason (1998)

ทั้งนี้เครื่องอัลตราซาวด์มีหลากหลายประเภท ตัวอย่างเช่น

2.5.1 อ่างอัลตราโซนิก (ultrasonic baths)

อัลตราซาวด์ชนิดอ่างประกอบด้วยทรานส์ดีวเซอร์อยู่บริเวณด้านล่างของอ่าง แสดงดังรูปที่ 2.13 ซึ่งความถี่ที่ใช้งานโดยส่วนใหญ่มีค่าประมาณ 40 kHz ซึ่งอ่างอัลตราโซนิกนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีราคาที่ถูกกว่าอัลตราโซนิกชนิดโพรบ

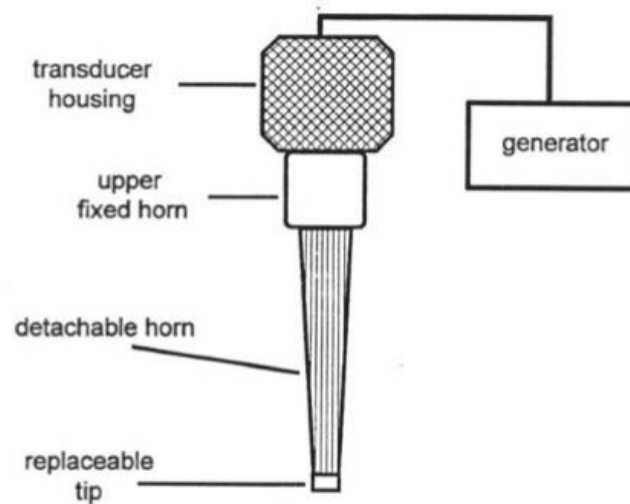


รูปที่ 2.13 อ่างอัลตราโซนิก

ที่มา: Mason (1998)

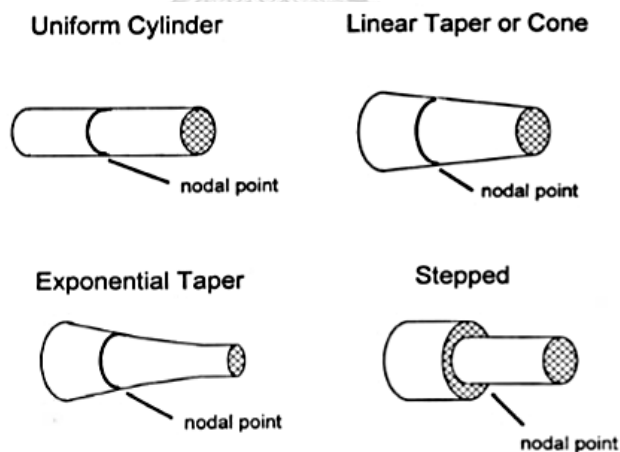
2.5.2 ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ (ultrasonic probe systems)

อัลตราโซนิกแบบโพรบ (รูปที่ 2.14) ประกอบด้วยทรานสดิวเซอร์ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานหรือคลื่นเสียงต่อเข้ากับอุปกรณ์ที่เรียกว่า ฮอร์น (horn) โดยฮอร์นแต่ละชนิดจะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.14 อัลตราโซนิกชนิดโพรบ

ที่มา: Mason (1998)



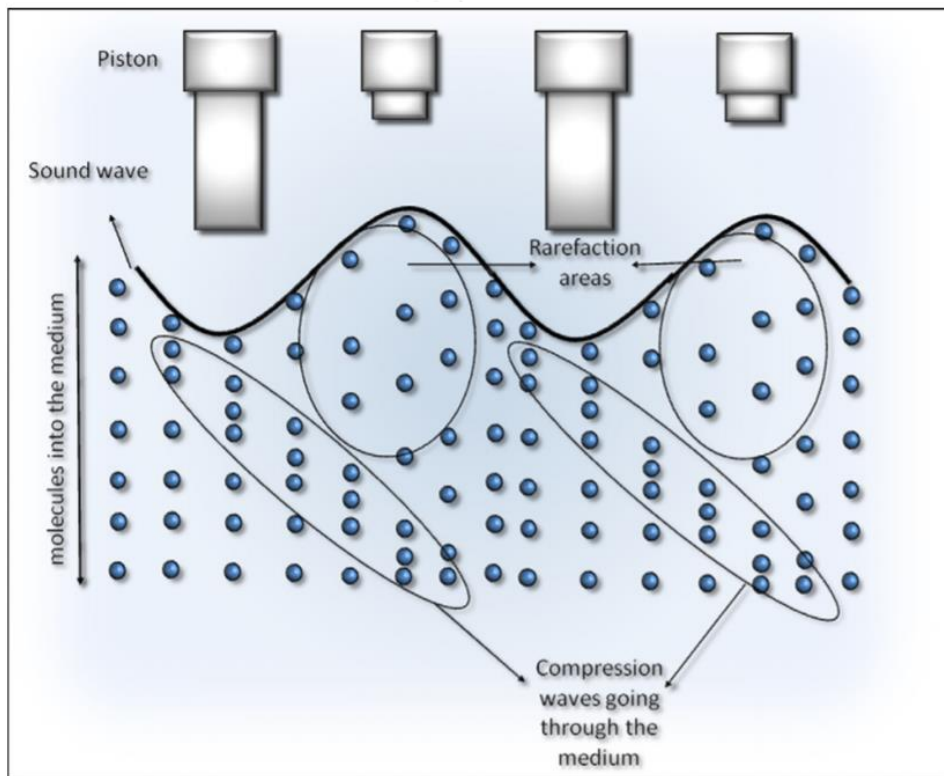
รูปที่ 2.15 ลักษณะฮอร์นชนิดต่าง ๆ

ที่มา: Mason (1998)

2.5.3 ปรากฏการณ์ควาวิเตชัน (cavitation)

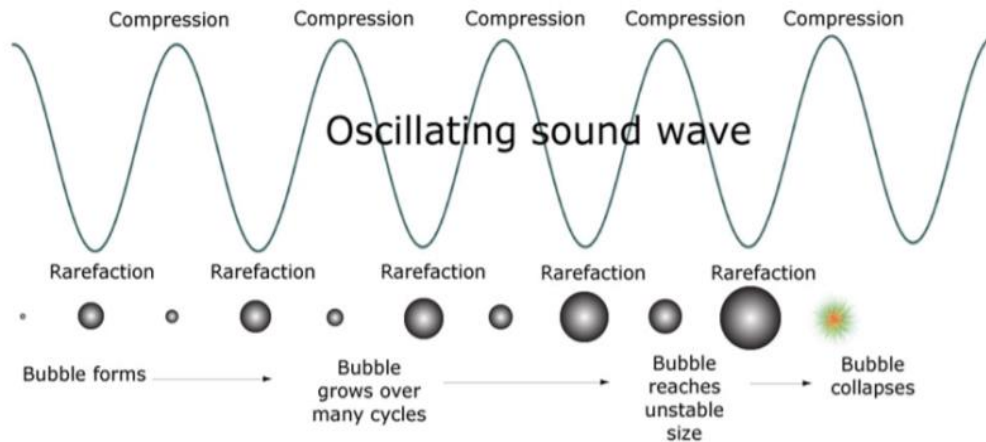
การใช้ช่วงความถี่ power ultrasound ในการสกัด ส่งผลต่อคุณสมบัติทางกลและทางเคมีของสารสกัด เนื่องจากคลื่นดังกล่าวทำให้เกิดปรากฏการณ์ควาวิเตชัน ดังแสดงในรูปที่

2.16 ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวจะทำให้การเกิดโพรงอากาศในของเหลว โดยจะเกิดขึ้นเมื่อแรงดันในของเหลวที่อุณหภูมิกงที่ลดลงต่ำกว่าจุดเดือด ซึ่งการเกิดควิเตชันสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ควิเตชันแบบถาวร (stable cavitation) เกิดขึ้นเมื่อฟองอากาศได้รับคลื่นอัลตราโซนิกเป็นจำนวนหลายรอบของการสั่นแต่ไม่เกิดการแตกของฟองอากาศ และฟองอากาศอาจจะเพิ่มขนาดขึ้นจนมีความถี่ธรรมชาติเท่ากับกับความถี่ในการสั่นแบบบังคับ และควิเตชันแบบชั่วคราว (transient cavitation) เกิดจากฟองแก๊สเกิดการสั่นและขยายขนาดเพิ่มขึ้นในลักษณะคงที่ในระยะเวลาหนึ่ง ก่อนที่จะแตกออกอย่างรวดเร็วเมื่อถึงขนาดหนึ่ง (รูปที่ 2.17)



รูปที่ 2.16 ปรากฏการณ์ควิเตชัน

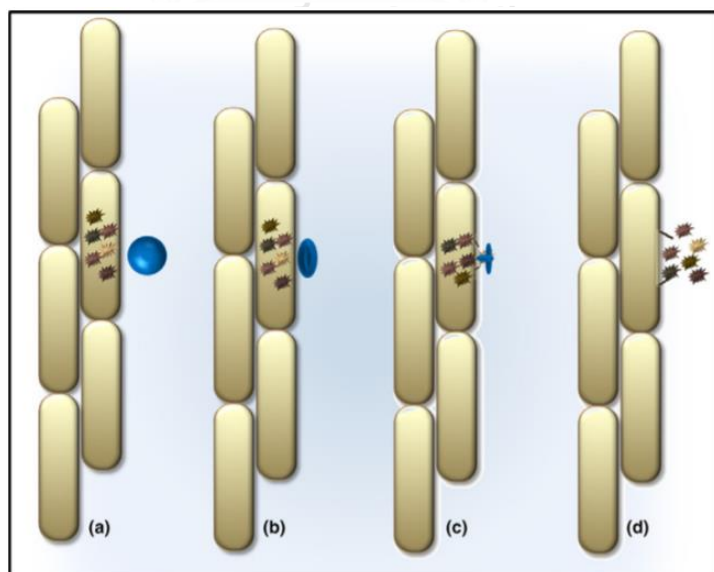
ที่มา: Pingret และคณะ (2012)



รูปที่ 2.17 การเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์

ที่มา: Leong และคณะ (2017)

ปรากฏการณ์คาวิตีชันสามารถช่วยปลดปล่อยสารที่อยู่ภายในเซลล์พืชให้ถูกสกัดออกมาได้ง่ายและปริมาณมากขึ้น จากรูปที่ 2.18 แสดงปรากฏการณ์คาวิตีชันในเซลล์พืช โดยเมื่อคลื่นอัลตราซาวด์เคลื่อนที่ผ่านตัวกลาง เช่น น้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ (a) จะทำให้เกิดฟองอากาศที่บริเวณใกล้กับพื้นผิวเซลล์พืช (b) ซึ่งฟองอากาศจะเกิดการหดตัวและขยายตัวเป็นวัฏจักรซ้ำไปมา (c) และเกิดคลื่นกระแทกขนาดเล็ก (microjet) จากการที่ฟองอากาศเกิดการแตกและมีทิศทางพุ่งเข้าสู่พื้นผิวด้วยความเร็วสูง (d) ทำให้เกิดความดันและความร้อนปริมาณมากที่บริเวณดังกล่าว ส่งผลให้ผนังเซลล์ของพืชถูกทำลายและช่วยให้สารภายในเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมาสู่ตัวทำละลาย (Pingret และคณะ, 2012)



รูปที่ 2.18 ปรากฏการณ์คาวิตีชันในเซลล์พืช

ที่มา: Pingret และคณะ (2012)

2.5.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัด

จากการรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยพบว่า มีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการสกัด โดยปัจจัยที่น่าสนใจในการศึกษา คือ

2.5.4.1 ชนิดของตัวทำละลาย

การสกัดนิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่าง ๆ กัน โดยประสิทธิภาพของสารสกัดจะขึ้นอยู่กับทางเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งควรมีคุณสมบัติในการละลายสารที่ต้องการสกัดได้ ไม่ระเหยง่ายหรือยากจนเกินไป ไม่ติดไฟง่าย ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย โดยตัวทำละลายแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการสกัดสารแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสมบัติความมีขั้วของตัวทำละลายและองค์ประกอบของตัวถูกละลายที่ต้องการสกัด โดยจะเป็นไปตามกฎ “like dissolves like” คือตัวถูกละลายสามารถละลายในตัวทำละลายได้เมื่อความเป็นขั้วของตัวทำละลายกับตัวถูกละลายมีค่าใกล้เคียงกัน เช่นตัวถูกละลายที่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว และตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำละลายจึงเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการสกัด เพื่อให้การสกัดมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยการคัดเลือกตัวทำละลายในการสกัดจากความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.6 (ประเสริฐ ศรีไพโรจน์, 2528; Ramamoorthy และ Bono, 2007)

Markham (1975) กล่าวว่าทางเลือกตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต้องคำนึงถึงสภาพขั้วของตัวถูกละลายที่ต้องการ จากการศึกษาการสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยสามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ในรูปอะไกลโคไซด์ได้ ในขณะที่เมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้นสามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ในรูปของไกลโคไซด์หรือสารฟลาโวนอยด์กลุ่มแอนโธไซยานินได้ สำหรับฟลาโวนอยด์ในรูปของอะไกลโคไซด์ที่มีขั้วต่ำเช่น ไอโซฟลาโวน ฟลาวาโนน ฟลาโวน และฟลาโวนอล ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดหมู่เมทิลมากมักสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น เบนซีน (benzene) คลอโรฟอร์ม (chloroform) อีเทอร์ (ether) หรือเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) เป็นต้น สำหรับสารฟลาโวนอยด์ในรูปไกลโคไซด์และอะไกลโคไซด์ที่มีขั้วสูงขึ้น เช่น ชาลโคน (chalcones) ฟลาโวนอล ไบฟลาโวนิล (biflavonyls) และออโรน (aurones) สามารถสกัดจากวัสดุของพืชโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น อะซิโตน (acetone) แอลกอฮอล์ และน้ำ หรือตัวทำละลายผสมของสารเหล่านี้

ตารางที่ 2.6 ค่าดัชนีความมีขั้ว (polarity index) ของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	ค่าดัชนีความมีขั้ว
pentane	0
toluene	2.4
benzene	2.7
chlorobenzene	2.7
dichloromethane	3.1
ethyl acetate	4.4
dioxane	4.8
acetone	5.1
methanol	5.1
ethanol	5.2
acetonitrile	5.8
dimethylformamide	6.4
n-methyl-2-pyrrolidone	6.7
dimethyl sulfoxide	7.2
water	10.2

ที่มา: Kleiman และคณะ (2015)

2.5.4.2 เวลาในการสกัด

เวลาเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสกัด เนื่องจากช่วยเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสระหว่างสารละลายและเซลล์พืช และเอื้อต่อการเกิดปรากฏการณ์ควิเตชัน (Santos และคณะ, 2014) ซึ่งมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับผลของเวลาต่อการสกัดมากมาย โดย Yang และคณะ (2010) ศึกษาการสกัดสารฟลาโวนอยด์จากดอก *Citrus aurantium* L. ด้วยวิธีคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย โดยใช้เวลาที่แตกต่างกัน (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 นาที) และกำหนดสภาวะการสกัดอื่น ดังนี้ พลังงาน 200 วัตต์ ความเข้มข้นเอทานอล 50% (v/v) อัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง 40:1 มิลลิลิตรต่อกรัม และอุณหภูมิ 40 °C และพบว่าเมื่อใช้เวลาในการสกัด 10-50 นาที ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและสูงสุดที่ 50 นาที หลังจากนั้นปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Al-Dhabi และคณะ (2017) ที่ศึกษาการสกัดสารพฤษเคมี (ปริมาณสารประกอบ

พีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด กรดคลอโรจีนิก และกรดโปรโตคาทีคูอิก) จากกากกาแฟด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย โดยวิเคราะห์ผลด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) และพบว่าปริมาณสารฟลักซ์เคมีเพิ่มขึ้นตามเวลาการสกัดที่เพิ่มขึ้น (สูงสุด 36 นาที) ซึ่งเวลาที่เพิ่มขึ้นจะนำไปสู่การเพิ่มอัตราการถ่ายโอนมวลสารระหว่างสารละลายและเซลล์ โดยผลจากการเกิดคาวิตีชันส่งผลให้เซลล์เนื้อเยื่อฉีกขาดและปลดปล่อยสารต่าง ๆ ออกมา แต่เมื่อเวลาใดการสกัดเพิ่มขึ้นจนถึงระยะหนึ่ง การสกัดจะเข้าสู่สมดุลและเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มสูงขึ้นจนเกินจุดสมดุลจะเกิดการสลายตัวของสารฟลักซ์เคมี ส่งผลให้ปริมาณสารลดลง เนื่องจากผลของปริมาณความร้อนที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อความเสถียรต่อโครงสร้างของสารประกอบทำให้โครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงจากปฏิกิริยาทางลบ เช่น การเกิดออกซิเดชัน (Yang และคณะ, 2010; Anaya-Esparza และคณะ, 2018) โดยผลของอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น จากการใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น ส่งผลให้ค่าความหนืด (viscosity) ลดลง แต่เพิ่มความสามารถในการละลาย (solubility) อัตราการแพร่ (diffusion rate) และความดันไอ (vapor pressure) ทำให้เกิดปรากฏการณ์คาวิตีชันมากขึ้น ทั้งนี้เมื่อถึงอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง ปริมาณผลผลิตที่ได้อาจลดลง เนื่องจากการทนต่อความร้อนของสารลดลง ประกอบกับสารที่ต้องการสกัดเริ่มหมดหรือเปลี่ยนสภาพไป (denature) (Corbin และคณะ, 2014)

2.5.4.3 แอมพลิจูด (amplitude)

แอมพลิจูดเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย โดยแอมพลิจูดคือ ระยะการกระจัดที่มีค่ามากที่สุดจากแนวสมดุลไปยังสันคลื่นหรือท้องคลื่น ซึ่งแอมพลิจูดเป็นตัวแสดงถึงพลังงานของคลื่น หากความเข้มของแอมพลิจูดสูง แสดงว่าพลังงานของคลื่นมีค่ามาก และความเข้มของแอมพลิจูดต่ำ แสดงว่าพลังงานของคลื่นมีค่าน้อย ดังนั้นการเพิ่มหรือลดความเข้มของแอมพลิจูดจึงส่งผลต่อปรากฏการณ์คาวิตีชันโดยตรง (Li และคณะ, 2004)

โดย Goula (2013) ศึกษาปริมาณผลผลิต (yield) ของน้ำมันจากการสกัดเมล็ดทับทิม (pomegranate seeds) โดยศึกษาความเข้มของแอมพลิจูดระดับ 20-60% และวิเคราะห์ผลด้วย RSM พบว่าปริมาณผลผลิตของการสกัดสูงขึ้นตามระดับความเข้มของแอมพลิจูดที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Muangrat, Pongsirikul และ Blanco (2017) ที่ศึกษาการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในการสกัด

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากซังแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยแปรระดับความเข้มข้นของแอมพลิจูดที่ใช้ในการสกัดเป็น 25, 50, 100% (กำลังไฟฟ้า 250 วัตต์ ความถี่ 24 กิโลเฮิร์ตซ์) กำหนดอัตราส่วนตัวทำละลายต่อตัวอย่าง เท่ากับ 1:20 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที และพบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของแอมพลิจูดเพิ่มขึ้นจาก 25% เป็น 46.21% สารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น และจะมีปริมาณลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของแอมพลิจูดมากกว่า 46.21% ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการย่อยสลายของสารประกอบฟีนอลิก

โดย Mason (1997) และ Li และคณะ (2004) ได้ให้คำอธิบายไว้ว่าการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของแอมพลิจูดจะช่วยเพิ่มโอกาสการเกิดปรากฏการณ์ควิวเตชันได้มากขึ้น โดยปรากฏการณ์ดังกล่าวส่งผลให้เกิดโพรงอากาศและผลเชิงกลของอัลตราซาวด์ที่ดีขึ้น ซึ่งจะเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างพื้นผิวของแข็งและของเหลว และทำให้เนื้อเยื่อเมล็ดฉีกขาดมากขึ้น ตัวทำละลายจึงสามารถซึมเข้าไปในเซลล์พืชได้มากขึ้น ทำให้สารภายในเมล็ดละลายออกมาในตัวทำละลายสูงกว่าที่แอมพลิจูดต่ำ เพราะที่ความเข้มข้นของแอมพลิจูดต่ำคลื่นเสียงจะเกิดการสั่นน้อยกว่า ทั้งนี้เมื่อความเข้มข้นของแอมพลิจูดเพิ่มจนถึงระดับหนึ่งปริมาณผลผลิตที่สกัดได้จะลดลง

2.6 การพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization)

การพาสเจอร์ไรซ์เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่ออายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเป้าหมายหลักของการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชนิดนี้คือการยับยั้งเอนไซม์และเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยการพาสเจอร์ไรซ์เป็นการใช้ความร้อนต่ำกว่า 100 °C ซึ่งจะช่วยรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์อาหารให้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด เช่น คุณสมบัติทางด้านประสาทสัมผัส และโภชนาการ รวมถึงเพื่อหลีกเลี่ยงการเน่าเสียของจุลินทรีย์และเอนไซม์ โดยยึดอายุการเก็บของอาหารที่อุณหภูมิ 4 °C

Silvestre และคณะ (2008) กล่าวว่า การพาสเจอร์ไรซ์สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การใช้อุณหภูมิต่ำเวลานาน (low temperature-long time, LTLT) เช่น การพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 63 °C เวลา 30 นาที และการใช้อุณหภูมิสูงเวลาสั้น (high temperature-short time, HTST) เช่น การพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 15 วินาที นอกจากนี้ Rahman, (2007) ยังได้กล่าวถึงการเลือกใช้ อุณหภูมิและเวลาในการพาสเจอร์ไรซ์ผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ โดยการฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้จะใช้ความร้อนที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 100 °C และระยะเวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ซึ่งส่วนใหญ่จะพิจารณาจากค่า pH

ของผลิตภัณฑ์อาหาร สามารถแบ่งอาหารได้ 2 ประเภท คือ อาหารที่มีค่า pH มากกว่า 4.5 (low-acid food) และอาหารที่มีค่า pH น้อยกว่า 4.5 (acid food) ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 วัตถุประสงค์ของการพาสเจอร์ไรซ์อาหารต่าง ๆ

ชนิดอาหาร	วัตถุประสงค์หลัก	วัตถุประสงค์รอง	อุณหภูมิและเวลา
pH > 4.5			
น้ำผลไม้	ยับยั้งเอนไซม์ (pectinesterase และ polygalacturonase) ยีสต์ และรา	ทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสีย	65 °C, 30 นาที; 77 °C, 1 นาที; 88 °C, 15 วินาที
เบียร์	ทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสีย (<i>Lactobacillus</i> species และ <i>Saccharomyces</i> species)		65-68 °C, 20 นาที (ในภาชนะขวด); 72-75 °C, 1-4 นาที ที่ 900-1000 kPa
pH < 4.5			
นม	ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค (<i>Brucella abortis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Coxiella burnetti</i>)	ทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสีย และเอนไซม์	63 °C, 30 นาที; 71.5 °C, 15 วินาที
ไข่	ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค (<i>Salmonella seftenburg</i>)	ทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสีย	64.4 °C, 2.5 นาที; 60 °C, 3.5 นาที
ไอศกรีม	ทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสีย	ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค	65 °C, 30 นาที; 71 °C, 10 นาที; 80 °C, 15 วินาที

ที่มา: Rahman (2007)

2.6.1 การพาสเจอร์ไรซ์อาหารที่มีค่า pH มากกว่า 4.5 (low-acid food)

มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทั้งหมดและทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียบางส่วน ส่งผลให้มีจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียบางส่วนหลงเหลืออยู่ในอาหาร ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีการบางอย่างร่วมด้วยเพื่อช่วยชะลอการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์เหล่านี้ เช่น การเก็บที่อุณหภูมิเย็น (refrigeration) การลดค่าน้ำอิสระ (water activity, aw) และการปรดกรด (acidification) เป็นต้น

2.6.2 การพาสเจอร์ไรซ์อาหารที่มีค่า pH น้อยกว่า 4.5 (acid food)

มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อทำลาย vegetative cell ของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียและยับยั้งเอนไซม์ เนื่องจากที่ภาวะนี้จุลินทรีย์มีสปอร์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะที่เป็นกรด ดังนั้นการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและการงอกของสปอร์จึงไม่เกิดขึ้น เช่น ผลไม้สด น้ำผลไม้ และน้ำอัดลม เป็นต้น การพาสเจอร์ไรซ์อาหารกลุ่มนี้มักจะมุ่งเน้นไปที่การทำลายยีสต์และรา โดยจะถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 °C และ 80 °C ตามลำดับ เป็นเวลา 20 นาที

2.7 การหาภาวะที่เหมาะสม

การประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดไบโอเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย เป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ปัญหา ซึ่งผลตอบสนองที่สนใจจะขึ้นอยู่กับหลายตัวแปร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาจุดหรือความเหมาะสมต่อผลนั้น นอกจากนี้วิธีพื้นผิวตอบสนองยังเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพกับกระบวนการที่มีความซับซ้อน ทำให้ง่ายในการจัดการข้อมูลและอธิบายผล เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ รวมถึงช่วยลดจำนวนชุดทดลองในการประเมินตัวแปรหลายตัว ดังนั้นจึงมีประโยชน์อย่างมากต่อการลดต้นทุน และการลดเวลาในเชิงปฏิบัติการ (Stroescu และคณะ, 2013)

Sarabia และ Ortiz (2009) กล่าวว่า การใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองในการวิเคราะห์ข้อมูลสามารถศึกษาอิทธิพลร่วม (interaction effect) ของหลายปัจจัยต่อตัวแปรตาม ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) เพื่อประเมินความพอเพียงของแบบจำลอง และทดสอบนัยสำคัญของเทอมของแบบจำลอง และทำนายภาวะที่เหมาะสม (optimum conditions) เพื่อแสดงค่าการตอบสนองสูงสุด (maximum response) ด้วยการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ (multiple regression analysis) เพื่อนำไปสร้างแบบจำลองทำนายผลการทดลองจริง

โดยความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรและการตอบสนองสามารถอธิบายได้ดังสมการที่ 1.22 เมื่อกำหนดให้ y คือผลตอบสนอง (ตัวแปรตาม) ที่เกิดจากตัวแปรอิสระ (X_1, X_2, \dots, X_k) และ ϵ คือ ค่าความคลาดเคลื่อนของผลตอบสนอง y

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \epsilon \quad (1.22)$$

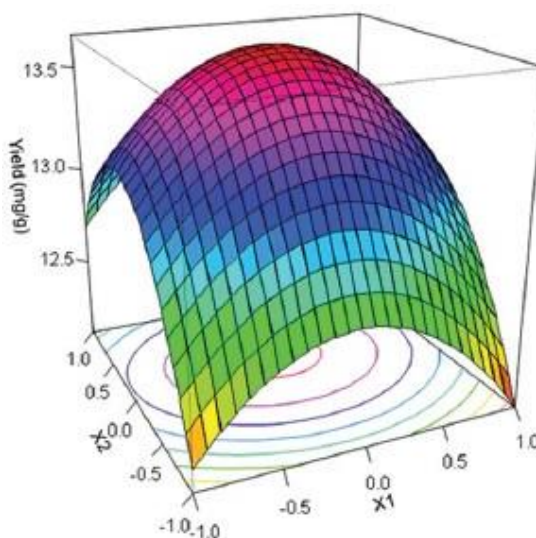
ซึ่งปัญหาเกี่ยวกับวิธีพื้นผิวตอบสนองคือมักจะไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนองและตัวแปรอิสระ ดังนั้นในขั้นตอนแรกจะต้องหาค่าประมาณที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวแทนสำหรับแสดงความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่าง y และเซตของตัวแปรอิสระ ซึ่งโดยทั่วไปมักใช้ฟังก์ชันพหุนามกำลังต่ำ อาจเป็นแบบจำลองของผลตอบสนองที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับตัวแปรอิสระ ฟังก์ชันที่จะใช้ในการประมาณความสัมพันธ์คือแบบจำลองกำลังหนึ่ง (first-order response) (สมการที่ 1.23) แต่ถ้ามีส่วนโค้งเกี่ยวข้องในระบบจะใช้ฟังก์ชันพหุนามที่มีกำลัง เช่น แบบจำลองกำลังสอง (second-order model) ดังสมการที่ 1.24 ซึ่งจากการประมวลผลทางสถิติจะแสดงผลการตอบสนองในลักษณะกราฟโครงร่าง (contour plot) และภาพ 3 มิติของกราฟพื้นผิวตอบสนอง (surface plot) ดังแสดงในรูปที่ 2.19

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \epsilon \quad (1.23)$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad (1.24)$$

เมื่อ	y	คือ ผลตอบสนอง (ตัวแปรตาม)
	X_i, X_j	คือ ตัวแปรอิสระ
	β_0	คือ จุดตัดหรือค่าคงที่
	β_i	คือ สัมประสิทธิ์ของสมการเชิงเส้น
	β_{ii}	คือ สัมประสิทธิ์ของสมการกำลังสอง
	β_{ij}	คือ สัมประสิทธิ์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระทั้งสอง
	ϵ	คือ ความคลาดเคลื่อนสุ่ม

สมการตัวแบบที่สร้างได้สามารถตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (validation) โดยทำการทดลองซ้ำกับตัวแปรอิสระที่อยู่ในจุดที่ภาวะเหมาะสม แล้ววัดค่าตัวแปรผลตอบสนอง เพื่อเปรียบเทียบกับตัวแปรผลตอบสนองที่ทำนายได้จากสมการ และตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง หากแบบจำลองไม่เหมาะสมให้เริ่มต้นทดลองเพื่อนำข้อมูลมาสร้างสมการตัวแบบใหม่ (Sánchez และคณะ, 2016)



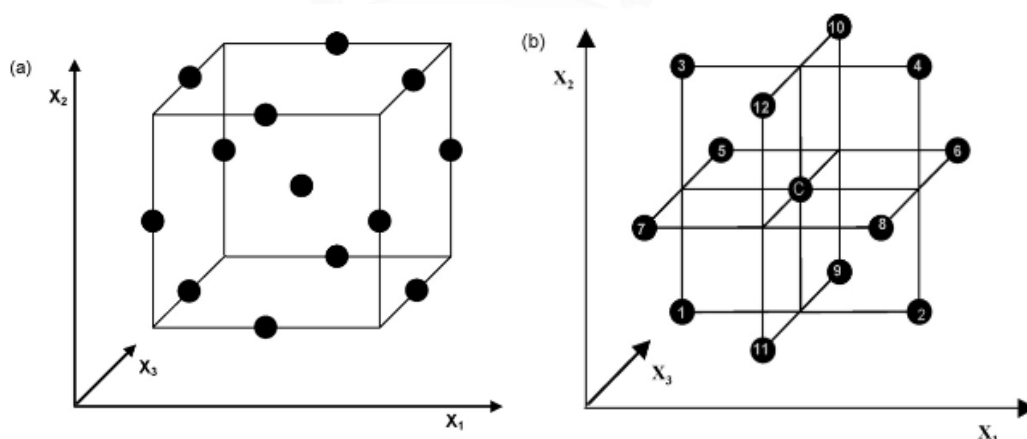
รูปที่ 2.19 ลักษณะกราฟโครงร่างและกราฟพื้นผิวตอบสนอง

ที่มา: Kim, Shin และ Seo (2014)

การออกแบบการทดลอง (design of experiment, DOE) มีด้วยกันหลายรูปแบบ แต่ในเชิงปฏิบัติมักไม่ทราบรูปแบบความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่างผลตอบสนองและตัวแปรอิสระ ซึ่งโดยทั่วไปมักนิยมใช้ตัวแบบกำลังสอง (second-order model) เนื่องจากมีความยุ่งยากและซับซ้อนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับตัวแบบอื่น ๆ (Stroescu และคณะ, 2013) ตัวแบบกำลังสองหรือบางครั้งอาจเรียกว่าสมการกำลังสอง (quadratic model) เป็นตัวแบบที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง (quadratic relationship) กล่าวคือ เมื่อตัวแปรอิสระตัวใดตัวหนึ่งเพิ่มหรือลดลง ผลการตอบสนองอาจเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะที่ไม่เป็นเส้นตรง แต่มีลักษณะเป็นเส้นโค้งแทน ซึ่งการออกแบบการทดลองแบบ full factorial design (FFD) เป็นเทคนิคการออกแบบที่ครอบคลุมทุกตัวแปร โดยมีปัจจัยที่ศึกษาหรือตัวแปรอิสระอย่างน้อย 2 ตัวแปร และตัวแปรตามอย่างน้อย 1 ตัวแปร การออกแบบการทดลองที่มีระดับของตัวแปรอิสระ 3 ระดับ นิยมกำหนดแบบ 3^k factorial เมื่อ k คือจำนวนของตัวแปรอิสระ ยกตัวอย่างเช่น หากมีตัวแปรอิสระ 3 ตัวแปร หรือ 4 ตัวแปร นั้นหมายความว่า จะมีจำนวนการทดลองเท่ากับ 3^3 และ 3^4 หรือเท่ากับ 27 และ 81 การทดลอง ตามลำดับ เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปการทดลองจำนวนมากนี้ไม่เหมาะสมในงานอุตสาหกรรม หรืองานที่มีขอบเขตของเวลาทรัพยากรและต้นทุนในการทดลอง จึงมีการพัฒนาการออกแบบแผนการทดลองที่ลดจำนวนการทดลองและสามารถนำข้อมูลไปวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองได้ เช่น Box-Behnken design (BBD), central composite design (CCD) และ Doehlertmatrix (DM) เป็นต้น (จรัล ทรัพย์เสรี, 2009; Bezerra และคณะ, 2008)

การออกแบบการทดลองแบบ BBD เป็นการทดลองที่นิยมใช้มากในกรณีศึกษาปัจจัยที่มี 3 ระดับ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ช่วยประมาณค่าสัมประสิทธิ์ลำดับที่หนึ่งและลำดับที่สองของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการออกแบบด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพและประหยัดต้นทุนในการทดลองมากกว่าแบบอื่น โดยเฉพาะการออกแบบการทดลองแบบ FFD ที่มีจำนวนการทดลองจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับ Ferreira และคณะ (2007) และ Bezerra และคณะ (2008) ที่รายงานว่า การออกแบบการทดลองแบบ BBD เป็นการออกแบบจำลองกำลังสองที่ดีกว่าแบบอื่น ๆ (เช่น 3^k full factorial design, CCD และ DM) เนื่องจากใช้ต้นทุนในการทดลองน้อยกว่า และเป็น การออกแบบการทดลองที่มีประสิทธิภาพอีกด้วย

การออกแบบนี้ใช้หลักการของ 2^k full factorial ผสมกับจุดกึ่งกลาง (central point) รวมเข้าไป โดยที่ k คือ จำนวนของตัวแปรอิสระ และการออกแบบนี้ยังมีความสามารถในการหมุนหรือเกือบหมุนได้อีกด้วย (Ferreira และคณะ, 2007) ซึ่ง Box และ Behnken (1960) ได้ออกแบบตารางสำหรับแผนการทดลองที่มีปัจจัยตั้งแต่ 3 ถึง 16 ปัจจัย โดยหลักการออกแบบการทดลองจะกำหนดให้พารามิเตอร์ 2 ตัว อยู่ในรูปออร์โทกอนัล (orthogonal) คือ +1 หรือ -1 ส่วนพารามิเตอร์ที่เหลือจะกำหนดให้เป็น 0 โดยจุดทดลองจะอยู่บนไฮเปอร์สเฟียร์ (hypersphere) ที่ห่างจากจุดศูนย์กลางเท่า ๆ กัน ตัวอย่างการออกแบบการทดลองสำหรับ 3 ปัจจัย ดังแสดงในรูปที่ 2.20 การออกแบบการทดลองแบบ BBD จะแบ่งแผนการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบไปด้วยจำนวนการทดลอง $N = 2k(k-1) + cp$ โดยที่ k คือ จำนวนของตัวแปรอิสระ และ cp คือ จำนวนจุดศูนย์กลาง ซึ่งระดับของปัจจัยทั้งหมด 3 ระดับ ต้องมีระยะห่างเท่า ๆ กัน (Bezerra และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.20 การออกแบบการทดลอง Box-Behnken design สำหรับ 3 ปัจจัย

ที่มา: Ferreira และคณะ (2007)

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ

ใบเจียวกุหลาบ จากมณฑลฝูเจี้ยน ประเทศจีน ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เดอะ กิฟวิ่ง ที่ จำกัด, ประเทศไทย

ใบหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เดอะ กิฟวิ่ง ที่ จำกัด, ประเทศไทย

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 (AlCl_3) (Ajax Finechem, New Zealand)

citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) (food grade, Union chemical 1986, thailand)

ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (A.R. grade, VWR Prolabo, France)

Folin-ciocalteu reagent (Loba Chemie, India)

ferric chloride (POCH S.A., Poland)

gallic acid (Sigma Aldrich, USA)

glacial acetic acid (A.R. grade, QRëC, New Zealand)

hydrochloric acid (HCl) (Kemaus, Australia)

methanol (CH_3OH) (Giant Leo Intertrade, Thailand)

phenolphthalein ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$) (A.R. grade, Ajax Finechem, New Zealand)

potassium acetate ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) (A.R. grade, Ajax Finechem, New Zealand)

potassium hydrogen phthalate ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) (Kemaus, Australia)

quercetin (Sigma Aldrich, Germany)

sodium acetate (CH_3COONa) (A.R. grade, Ajax Finechem, New Zealand)

sodium acetate trihydrate ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (A.R. grade, Ajax Finechem, Australia)

sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) (Kemaus, Australia)

sodium chloride (NaCl) (A.R. grade, Loba Chemie, India)

sodium hydroxide (NaOH) (A.R. grade, QReC, New Zealand)
 sodium nitrite (NaNO₂) (KemAus, Australia)
 sucralose (C₁₂H₁₉Cl₃O₈) (food grade, Krungthepchemi, Thailand)
 tartaric acid (QReC, New Zealand)
 tripyridyltriazine (TPTZ) (Sigma Aldrich, USA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

EC broth (Himedia, India)
 eosin methylene blue (EMB) Agar (Himedia, India)
 lauryl tryptose broth (Himedia, India)
 potato dextrose agar (Himedia, India)
 plate count agar (Himedia, India)

เครื่องมือ และอุปกรณ์

เครื่อง autoclave (Tomy รุ่น SX700, Japan)
 เครื่อง centrifuge (Hettich รุ่น zentrifugen 19, Germany)
 เครื่อง chroma meter (Minolta รุ่น CR-400, Japan)
 เครื่อง digital refractometer (Hanna รุ่น HI96801, Thailand)
 เครื่อง hotplate stirrer (SCIOLOGEX รุ่น SCI550-S, USA)
 เครื่อง pH meter (Mettler Toledo รุ่น S220, Switzerland)
 เครื่อง rotary evaporator (Buchi Rotavapor รุ่น R-200, USA)
 เครื่อง ultrasound probe (Hielscher รุ่น UP400S, Germany)
 เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Fisher scientific รุ่น GENESYS 20, USA)
 เครื่อง vacuum sealer (Multivac รุ่น A300/16, Germany)
 เครื่อง water bath (Mettmert รุ่น WNB 22, Germany)
 เครื่อง shaking water bath (Julabo รุ่น SW23, Germany)
 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น Newclassic, Switzerland)
 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S, Switzerland)
 ตู้ป่น (Heraeus รุ่น B5042, Germany)

โพรบวัดอุณหภูมิ (Testo รุ่น type k thermocouple, UK)

การเตรียมตัวอย่างใบเจียวกุหลาน

บดใบเจียวกุหลานแห้งและกรองผ่านตะแกรงร่อนขนาด 50 mesh (ได้ผงเจียวกุหลานแห้ง) เก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนตภายใต้ภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ก่อนใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเจียวกุหลาน

ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ในการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยที่ส่งผลต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเจียวกุหลาน ประกอบด้วย 3 ปัจจัย แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล (ethanol concentration) เวลา (extraction time) และความเข้มของแอมพลิจูด (amplitude) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 กำหนดอัตราส่วนของผงเจียวกุหลานต่อตัวทำละลายเอทานอลเท่ากับ 2:100 (กรัมต่อมิลลิลิตร) และควบคุมอุณหภูมิสุดท้ายของตัวอย่างให้อยู่ในช่วง $83.00 \pm 3.00\text{ }^{\circ}\text{C}$ ออกแบบการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Box-Behnken design (BBD) ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้พื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM)

ตารางที่ 3.1 ระดับของปัจจัยต่าง ๆ ในการสกัดสารสกัดจากใบเจียวกุหลานโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ช่วย

ปัจจัย	หน่วย	ระดับ		
		-1	0	1
ความเข้มข้นของเอทานอล (ethanol concentration)	% v/v	60	70	80
เวลาที่ใช้ในการสกัด (extraction time)	นาที	10	20	30
ความเข้มของแอมพลิจูด (amplitude)	%	30	40	50

หลังจากการสกัดตามภาวะต่าง ๆ ข้างต้นแล้ว ทำให้ภาชนะที่ใส่สารละลายเย็น จากนั้นปั่นเหวี่ยง (centrifuge) สารละลายที่ได้ ที่ 4500 rpm เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนใส (supernatant) ไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นระเหยเอทานอลภายใต้ภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 °C ใน rotary evaporator เป็นเวลา 35±2 นาที และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 mL และเก็บส่วนใสในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 °C (Tabaraki และ Nateghi, 2011) โดยกำหนดตัวอย่างควบคุม (control) ในการสกัด คือ ผงเจียวกู่หลาน 2 กรัมต่อน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 95±5.00 °C ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (ดัดแปลงตามวิธีของ Toyoda และคณะ, 1997) และเก็บส่วนใสในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 °C

ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken design (BBD)

ลำดับ	ลำดับการทดลอง	ความเข้มข้นของเอทานอล (%v/v)	เวลา (นาที)	ความเข้มของแอมพลิจูด (%)
1	13	60	10	40
2	14	80	10	40
3	9	60	30	40
4	5	80	30	40
5	12	60	20	30
6	7	80	20	30
7	1	60	20	50
8	6	80	20	50
9	15	70	10	30
10	8	70	30	30
11	3	70	10	50
12	2	70	30	50
13	4	70	20	40
14	16	70	20	40
15	11	70	20	40
16	10	70	20	40
17	17	70	20	40

วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ได้จากข้อ 3.1 ต่าง ๆ ดังนี้

3.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetry (ตามวิธีของ Slinkard และคณะ, 1997)

3.1.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี aluminium chloride colorimetry (ดัดแปลงตามวิธีของ Rattana และคณะ, 2010)

3.1.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (ดัดแปลงตามวิธีของ Brand-Williams และคณะ, 1995)

3.1.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) (ดัดแปลงตามวิธีของ Benzie และ Strain, 1996)

สร้างสมการถดถอยเชิงเส้นโค้งจากผลการทดลอง (สมการที่ 3.1) (Bezerra และคณะ, 2008) โดยมีตัวแปรต้นคือ ความเข้มข้นของเอทานอล เวลา และความเข้มข้นของแอมพลิจูด และตัวแปรตามคือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ดังนี้

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (3.1)$$

เมื่อ y คือ ผลตอบสนอง (ตัวแปรตาม)

X_i, X_j คือ ตัวแปรอิสระ

β_0 คือ จุดตัดหรือค่าคงที่

β_i คือ สัมประสิทธิ์ของสมการเชิงเส้น

β_{ii} คือ สัมประสิทธิ์ของสมการกำลังสอง

β_{ij} คือ สัมประสิทธิ์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระทั้งสอง

ε คือ ความคลาดเคลื่อนสุ่ม

เลือกภาวะการสกัดที่เหมาะสมจำนวน 1 วิธี โดยพิจารณาจากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (validation) ด้วยการเตรียมสารสกัดที่ภาวะเหมาะสม แล้ววิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของตัวอย่าง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการวิเคราะห์กับค่าที่ทำนายจากสมการ เพื่อหาร้อยละความแตกต่าง ดังสมการที่ 3.2 (Sánchez และคณะ, 2016)

$$\text{ร้อยละความแตกต่าง} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยที่วิเคราะห์ได้จริง} - \text{ค่าเฉลี่ยจากการทำนาย}}{\text{ค่าเฉลี่ยจากการทำนาย}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2 การพัฒนาสูตรเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ

เตรียมน้ำชาใบหม่อน โดยแช่ใบหม่อนแห้งน้ำหนัก 2 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 5.00 °C เป็นเวลา 5 นาที และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 (ดัดแปลงตามวิธีของ Toyoda และคณะ, 1997)

เตรียมสารสกัดเจียวกุหลาบ โดยสกัดสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบตามภาวะที่เหมาะสม (จากข้อที่ 3.1) จากนั้นปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ได้ ที่ 4500 rpm เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนใสไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นระเหยเอทานอลภายใต้ภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 °C ใน rotary evaporator เป็นเวลา 35 ± 2 นาที และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 mL

พัฒนาสูตรเครื่องดื่ม โดยผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบในน้ำชาใบหม่อน โดยแปรสัดส่วนของสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบเท่ากับ 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3% v/v และกำหนดปริมาณส่วนผสม 2 ชนิด ให้คงที่ ได้แก่ สารให้ความหวาน (sucralose) 0.01% w/v และกรดซิตริก (citric acid) 0.08% w/v เป็นจำนวน 5 สูตร ร่วมกับตัวอย่างควบคุม 1 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 การแปรระดับปัจจัยของสูตรเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ

สูตร	สารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ (%v/v)	กรดซิตริก (%w/v)	สารให้ความหวาน (%w/v)
ตัวอย่างควบคุม	0	0.08	0.01
1	1	0.08	0.01
2	1.5	0.08	0.01
3	2	0.08	0.01
4	2.5	0.08	0.01
5	3	0.08	0.01

วิเคราะห์สมบัติทางเคมี กายภาพ จุลินทรีย์ และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบที่ได้จากการพัฒนาสูตรดังนี้

3.2.1. สมบัติตามข้อ 3.1.1-3.1.4

3.2.2. เปอร์เซ็นต์กรดที่ไตเตรตได้ด้วยการไตเตรตกับสารละลาย NaOH (AOAC, 2000)

- 3.2.3. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง digital refractometer (AOAC, 2000)
- 3.2.4. ค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter (AOAC, 2000)
- 3.2.5. ค่าสี ระบบ CIE LAB ด้วยเครื่อง chroma meter
- 3.2.6. ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (AOAC, 2000)
- 3.2.7. ปริมาณของยีสต์และรา (AOAC, 2000)
- 3.2.8. ปริมาณ *Escherichia coli* และ coliforms (BAM, 2001)
- 3.2.9. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้แบบทดสอบชนิด 9 point-hedonic scale และใช้สเกลแบบ scoring (ภาคผนวก จ) ทดสอบผู้บริโภคจำนวน 30 คน ในการยอมรับด้าน กลิ่น สี และความชอบโดยรวม โดยกำหนดระดับคะแนน ดังนี้

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

เลือกสูตรที่เหมาะสมที่สุดจำนวน 1 สูตร โดยพิจารณาจากคะแนนความชอบโดยรวม และ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ร่วมกับสมบัติด้านอื่น ๆ สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการแปรรูปด้วยความร้อนและผลของบรรจุภัณฑ์ต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน ระหว่างการเก็บรักษา

ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการพาสเจอร์ไรซ์ โดยแปรปัจจัยที่ศึกษาเป็น 2 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิสูงเวลาสั้น (อุณหภูมิ 75 °C เวลา 20 วินาที) และอุณหภูมิต่ำเวลานาน (อุณหภูมิ 65 °C เวลา 30 นาที) (ดัดแปลงจาก Davidov-Pardo และคณะ, 2010) จากนั้นบรรจุผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานในบรรจุภัณฑ์ โดยแปรบรรจุภัณฑ์ 2 ชนิด คือ

ขวดแก้วใส และขวดแก้วสีชาที่ผ่านการลวกด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 °C เวลา 2 นาที (ดังแสดงในตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 ภาวะในการพาสเจอร์ไรซ์และชนิดของบรรจุภัณฑ์ ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภค ผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ

ภาวะในการพาสเจอร์ไรซ์	ชนิดของบรรจุภัณฑ์	
อุณหภูมิสูงเวลาสั้น (high temperature short time; HTST)	ขวดแก้วใส	ขวดแก้วสีชา
อุณหภูมิต่ำเวลานาน (low temperature long time; LTLT)	ขวดแก้วใส	ขวดแก้วสีชา

เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 °C และติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ตามข้อ 3.2.1-3.2.7 ทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์

3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ออกแบบการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Box-Behnken design (BBD) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย response surface methodology (RSM) ซึ่งประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป minitab statistical software version 18 (minitab Inc., State College, PA, USA) สำหรับการทดลองข้อ 3.1 และออกแบบการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) สำหรับการประเมินผลด้านสมบัติทางเคมี กายภาพ จุลินทรีย์ และออกแบบการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) สำหรับการประเมินผลทางประสาทสัมผัส วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS statistics version 22 (IBM Corp., NY, USA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการทดลองข้อ 3.2 และ 3.3

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย ออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken design (BBD) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) โดยปัจจัยในการศึกษา ได้แก่ ผลของความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) (x_1) เวลา (นาที) (x_2) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) (x_3) จากผลการทดลองพบว่าปัจจัยที่ใช้ในการสกัดใบเจียวกู่หลานทั้ง 3 ปัจจัย มีอิทธิพลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) โดยผลการศึกษาของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ที่ได้ แสดงดังต่อไปนี้

4.1.1 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

จากการศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยที่ภาวะต่าง ๆ ผลการทดลองของแต่ละภาวะการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานมีค่าอยู่ในช่วง 162.86-203.69 mg gallic acid equivalent/100 g dry weight basis (mg GAE/100 g dry wt.)

จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง สามารถทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ภาวะต่าง ๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ แสดงดังสมการที่ 4.1

$$\begin{aligned} \text{TPC} = & -7007 + 154.9x_1 + 104.0x_2 + 68.0x_3 - 1.133x_1^2 - 2.444x_2^2 - 0.902x_3^2 \\ & - 0.100x_1x_2 + 0.080x_1x_3 + 0.072x_2x_3 \end{aligned} \quad (4.1)$$

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

ลำดับ ที่	ความเข้มข้นของ เอทานอล (% v/v)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของ แอมพลิจูด (%)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.)
1	60	10	40	168.42±3.70
2	60	30	40	188.69±5.60
3	80	10	40	178.56±4.17
4	80	30	40	191.06±4.57
5	60	20	30	177.86±6.64
6	60	20	50	178.28±7.69
7	80	20	30	170.08±4.39
8	80	20	50	185.36±4.49
9	70	10	30	163.69±4.19
10	70	10	50	162.86±4.97
11	70	30	30	167.31±3.18
12	70	30	50	198.83±4.39
13	70	20	40	198.06±6.25

* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าสัมประสิทธิ์ในการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) มีค่าระหว่าง 0 ถึง 1 เมื่อค่าที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการถดถอย (regression) มีค่าเท่ากับค่าที่ได้จากการทดลองทุกจุด R^2 จะมีค่าเท่ากับ 1 และค่า R^2 -adj (adjusted coefficient of determination) เป็นค่าที่แสดงถึงความถูกต้องของค่า R^2 ในกรณีที่มีจำนวนปัจจัยในการพิจารณาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งหากค่า R^2 และ R^2 -adj มีค่าใกล้เคียงกันหมายความว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นมีความเหมาะสมนั่นเอง นอกจากนี้การพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) เป็นอีกสิ่งหนึ่งที่มีความสำคัญ ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสามปัจจัยมีความเหมาะสมกับข้อมูลหรือไม่ โดยหากค่าการขาดความเหมาะสมของสมการไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) จะหมายความว่า สมการความสัมพันธ์ที่ได้มีความเหมาะสมกับข้อมูล (อาภาภรณ์ จันทรปรีกษ์ และคณะ, 2561; Sánchez และคณะ, 2016; Puntipa และคณะ, 2020) จากตารางที่ 4.2 พบว่า R^2 และ R^2 -adj มีค่าเท่ากับ 96.63% และ 92.30% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการ

ขาดความเหมาะสมของสมการ พบว่า p-value มีค่าเท่ากับ 0.315 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้นจึงสามารถนำสมการที่ได้มาใช้ในการทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานสูงสุดได้

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Variable	P-value	Remark
model	0.000	
linear	0.001	
X ₁	0.308	
X ₂	0.000	significant
X ₃	0.003	significant
quadratic	0.000	
X ₁ ²	0.016	significant
X ₂ ²	0.001	significant
X ₃ ²	0.000	significant
2-way interaction	0.013	
X ₁ X ₂	0.340	
X ₁ X ₃	0.091	
X ₂ X ₃	0.004	significant
Lack of fit	0.315	
R ² = 96.63%	R ² -adj. = 92.30%	

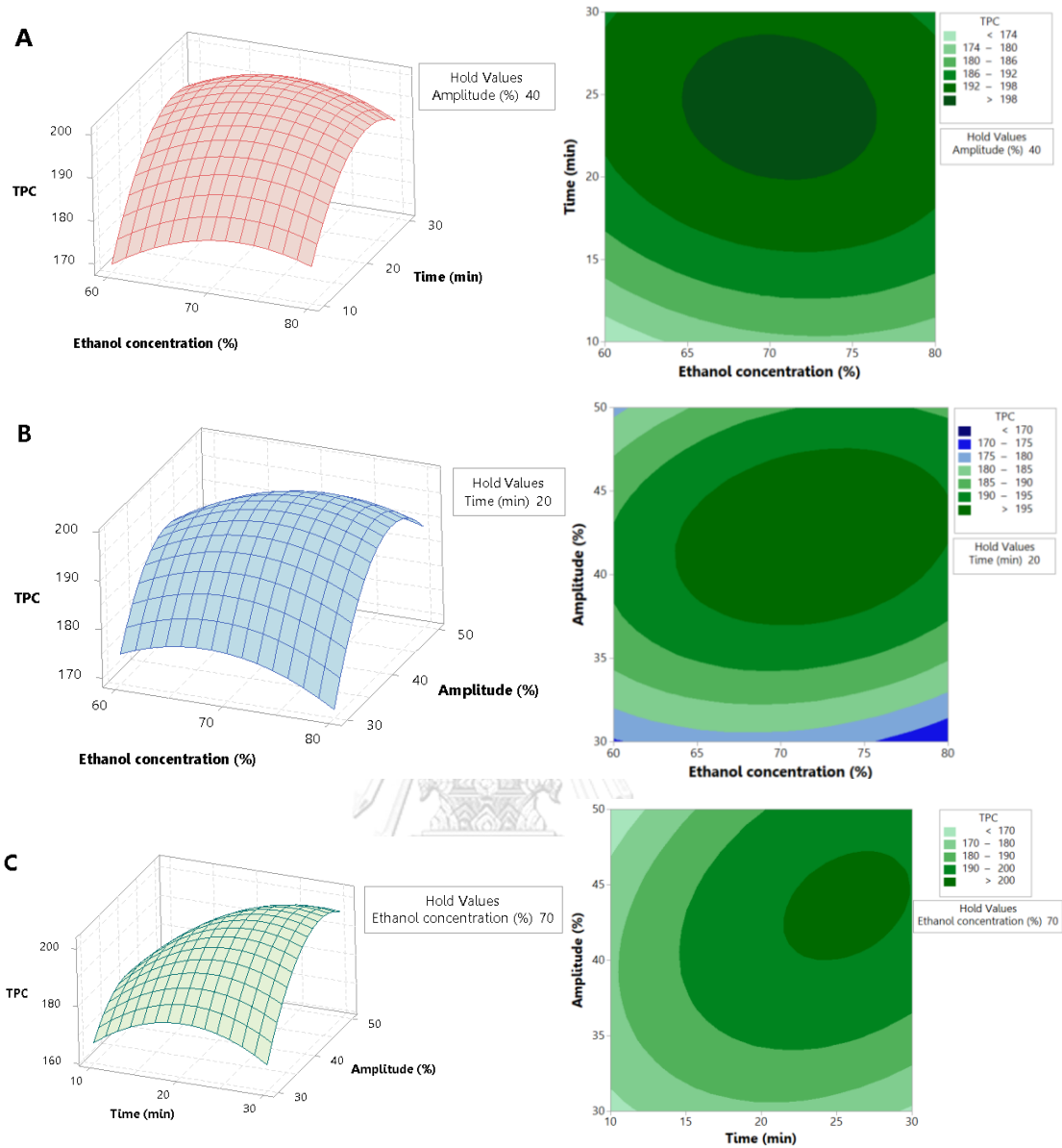
X₁ = ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v), X₂ = เวลา (นาที), X₃ = ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)

การวิเคราะห์สัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละปัจจัยเป็นการทดสอบว่าปัจจัยแต่ละปัจจัยในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มีอิทธิพลหรือไม่ต่อค่าผลตอบสนอง ด้วยการเปรียบเทียบค่า p-value ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยพบว่าปัจจัยทั้งสามปัจจัยมีอิทธิพลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน โดยเมื่อพิจารณาในส่วนของพจน์เชิงเส้น (linear terms) พบว่าเวลาในการสกัดและความเข้มข้นของแอมพลิจูดเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่เมื่อพิจารณาพจน์ของกำลังสอง (quadratic terms) พบว่าทั้งสามปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล เวลาในการสกัด และความเข้มข้นของ

แอมพลิฟิแคชัน มีอิทธิพลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาพจน์ของอิทธิพลร่วม (interaction terms) พบว่าพจน์อิทธิพลร่วมระหว่างเวลาในการสกัดและความเข้มข้นของแอมพลิฟิแคชันมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

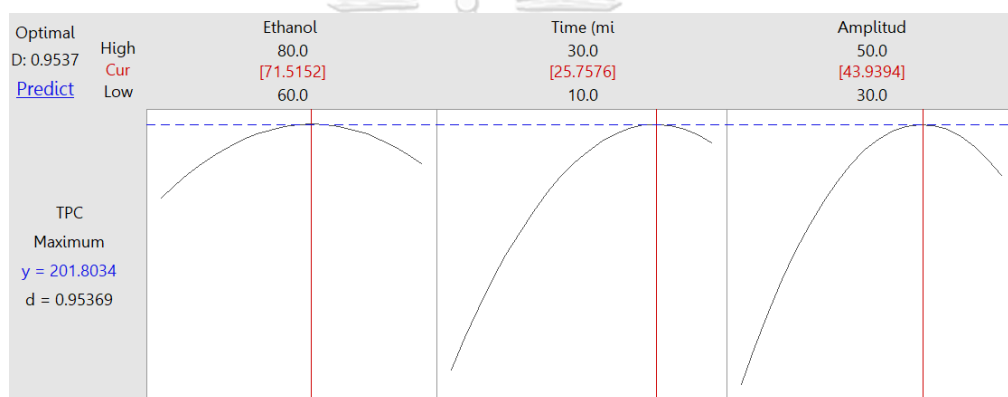
จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้น สามารถนำไปวิเคราะห์หาภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลร่วมของแต่ละปัจจัยในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอย่างละเอียด แสดงในรูปแบบกราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot) ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ผลการศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาท) ในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน เมื่อใช้ความเข้มข้นของแอมพลิฟิแคชันที่ (40%) (รูปที่ 4.1 (A)) พบว่า ปัจจัยทั้งสองส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดตามระดับของความเข้มข้นของเอทานอลและเวลาที่ใช้ในการสกัดที่มากขึ้น จนเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 75% ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่าในกระบวนการสกัดเป็นการอาศัยตัวทำละลายเป็นตัวพาตัวถูกละลายออกจากเซลล์ ซึ่งการใช้ตัวทำละลายในการสกัด ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะมีความเป็นขั้วไม่เท่ากัน ส่งผลให้มีความสามารถในการละลายสารชนิดเดียวกันได้ไม่เท่ากัน ซึ่งในการศึกษานี้ได้ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำและเอทานอล โดยน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงสุดและเมื่อมาผสมกับตัวทำละลายเอทานอล จะส่งผลให้ขั้วของตัวทำละลายลดลง เมื่อตัวทำละลายและตัวถูกละลายมีขั้วที่ใกล้เคียงกัน ตัวถูกละลายจะสามารถละลายในตัวทำละลายได้ดีและสามารถสกัดสารออกจากเซลล์ได้ง่ายขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า 75% v/v ส่งผลให้ขั้วของตัวทำละลายลดลงมากกว่าเดิม ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้จากใบเจียวกู่หลานจึงมีปริมาณลดลง (Tabaraki และ Nateghi, 2011) ขณะที่งานวิจัยของ Neuang และคณะ (2017) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของ *Phyllanthus niruri* (ลูกใต้ใบ) โดยการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย (53 กิโลเฮิร์ตซ์, 270 วัตต์) เมื่อกำหนดเวลาในการสกัดเป็น 60 นาที ที่อุณหภูมิ 50 °C พบว่าสภาพขั้วของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพของการสกัดสารประกอบฟีนอลิก โดยดัชนีความมีขั้วของน้ำและเอทานอลมีค่าเท่ากับ 9.0 และ 4.3 ตามลำดับ การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากลูกใต้ใบด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 40% v/v ส่งผลให้สารสกัดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด และจากงานวิจัยของ Chan และคณะ

(2009) ที่ศึกษาระดับของความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัด limau purut (*Citrus hystrix*) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยแปรระดับความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 20 40 60 80 และ 100% v/v ร่วมกับอุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นเอทานอล 60% v/v สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้มากที่สุด ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่าตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดที่ต่างกันส่งผลให้องค์ประกอบ ซึ่งในที่นี้หมายถึงชนิดของสารประกอบฟีนอลิกมีความแตกต่างกัน จึงมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างกันได้ (Dzah และคณะ, 2020) และเมื่อพิจารณาร่วมกับเวลาในการสกัด พบว่าเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกัน โดยช่วงเวลาในการสกัดที่ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบเสี้ยวกู่หลานมีค่าสูงคือช่วง 20-30 นาที ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการสกัดที่ใช้เวลาเพิ่มขึ้นสามารถเอื้อต่อการเกิดปรากฏการณ์ควิเตชันได้ดีกว่าที่ระยะเวลาสั้น รวมถึงช่วยเพิ่มเวลาให้สารละลายสัมผัสกับเซลล์พืชได้นานกว่า ทำให้สารภายในเซลล์สามารถละลายและแพร่ออกมาได้มากกว่าการใช้เวลาสั้น (Santos และคณะ, 2014) และรูปที่ 4.1 (B) แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) เมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดคงที่ (20 นาที) โดยพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนตามระดับความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นถึง 80% v/v สำหรับการสกัดด้วยความเข้มข้นของแอมพลิจูดช่วง 40-45% จะส่งผลให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง โดยการเพิ่มความเข้มข้นของแอมพลิจูดส่งผลให้เกิดฟองอากาศที่มีพลังงานสูงมาสัมผัสที่บริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เนื้อเยื่อเกิดความเสียหายหรือเกิดการฉีกขาด จึงเพิ่มการซึมผ่านของเนื้อเยื่อพืช ทำให้สารภายในเนื้อเยื่อสามารถละลายออกมายังตัวทำละลายได้มากขึ้น (Santos และคณะ, 2014; Al-dhabi และคณะ, 2017) เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างเวลา (นาที) ในการสกัดและความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัดคงที่ (70% v/v) (รูปที่ 4.1 (C)) แสดงให้เห็นว่าในช่วงเริ่มต้นของการสกัด ปัจจัยของเวลาและความเข้มข้นของแอมพลิจูดที่ใช้ในการสกัดมีอิทธิพลต่อการสกัดสารฟีนอลิกเพียงเล็กน้อย ในขณะที่เมื่อใช้เวลาในการสกัด 20-30 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูดช่วง 40-45% สารสกัดจากใบเสี้ยวกู่หลานจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง



รูปที่ 4.1 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot) ที่แสดงอิทธิพลร่วมของ (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาที), (B) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และความเข้มของแอมพลิจูด (%), (C) เวลา (นาที) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) (mg GAE/100 g dry wt.) ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ภาวะต่าง ๆ

การทำนายภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการสกัดใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย เพื่อให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้สูงที่สุด (ค่าการตอบสนองสูงที่สุด: maximum) ด้วยฟังก์ชัน response optimizer โดยวัดความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบสนอง (composite desirability, D) ซึ่งค่าความพึงพอใจของผลตอบสนองมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 หากมีค่าเท่ากับ 1 หมายถึง ผลตอบสนองนั้นได้รับความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์ (อาภาภรณ์ จันทร์ปรีกษ์ และคณะ, 2561) ดังแสดงในรูปที่ 4.2 โดยภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากใบเจียวกู่หลานคือ ความเข้มข้นของเอทานอล 71.51% v/v เวลา 25.76 นาที และความเข้มของแอมพลิจูด 43.94% ซึ่งจะได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 201.80 mg GAE/100 g dry wt.



รูปที่ 4.2 ระดับปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) จากใบเจียวกู่หลาน ด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.1.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

การสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยที่ภาวะต่าง ๆ ส่งผลให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานมีค่าแตกต่างกัน โดยพบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีค่าอยู่ในช่วง 17.32-44.69 mg quercetin equivalents/100 g dry weight basis (mg QCE/100 g dry wt.) ดังแสดงในตารางที่ 4.3

การวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองสามารถทำนายปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ภาวะต่าง ๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ดังแสดงในสมการที่ 4.2

$$\begin{aligned} \text{TFC} = & -576.7 + 9.58x_1 + 6.651x_2 + 9.359x_3 - 0.05035x_1^2 - 0.01800x_2^2 \\ & - 0.07701x_3^2 - 0.05202x_1x_2 - 0.02470x_1x_3 - 0.04890x_2x_3 \end{aligned}$$

(4.2)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียววู่หลาน

ลำดับ ที่	ความเข้มข้นของ เอทานอล (% v/v)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของ แอมพลิจูด (%)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด (mg QCE/100 g dry wt.)
1	60	10	40	21.07±1.74
2	60	30	40	40.39±2.41
3	80	10	40	42.20±0.55
4	80	30	40	40.71±3.93
5	60	20	30	17.32±0.46
6	60	20	50	33.72±1.56
7	80	20	30	31.60±0.69
8	80	20	50	38.12±1.55
9	70	10	30	22.24±1.64
10	70	10	50	40.19±2.60
11	70	30	30	36.44±1.84
12	70	30	50	34.83±0.60
13	70	20	40	42.93±1.22

* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.4 พบว่า R^2 และ R^2 -adj มีค่าเท่ากับ 98.11% และ 95.67% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ พบว่า p-value มีค่าเท่ากับ 0.095 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าสมการความสัมพันธ์ที่ได้มีความเหมาะสมกับข้อมูล ดังนั้นจึงสามารถนำสมการมาใช้ในการทำนายปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียววู่หลานสูงสุดได้

เมื่อเปรียบเทียบค่า p-value ของสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละปัจจัยในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (ตารางที่ 4.4) พบว่าในส่วนของพจน์เชิงเส้น ของปัจจัยหลักทั้งหมด (ความเข้มข้นของเอทานอล เวลาในการสกัด และความเข้มข้นของแอมพลิจูด) มีอิทธิพลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลและความเข้มข้นของแอมพลิจูด (พจน์ของกำลังสอง) มีอิทธิพลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้พจน์ของความเข้มข้นของ

เอทานอลและเวลาในการสกัด กับพจน์ของเวลาในการสกัดและความเข้มข้นของแอมพลิจูด (พจน์ของอิทธิพลร่วม) มีผลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

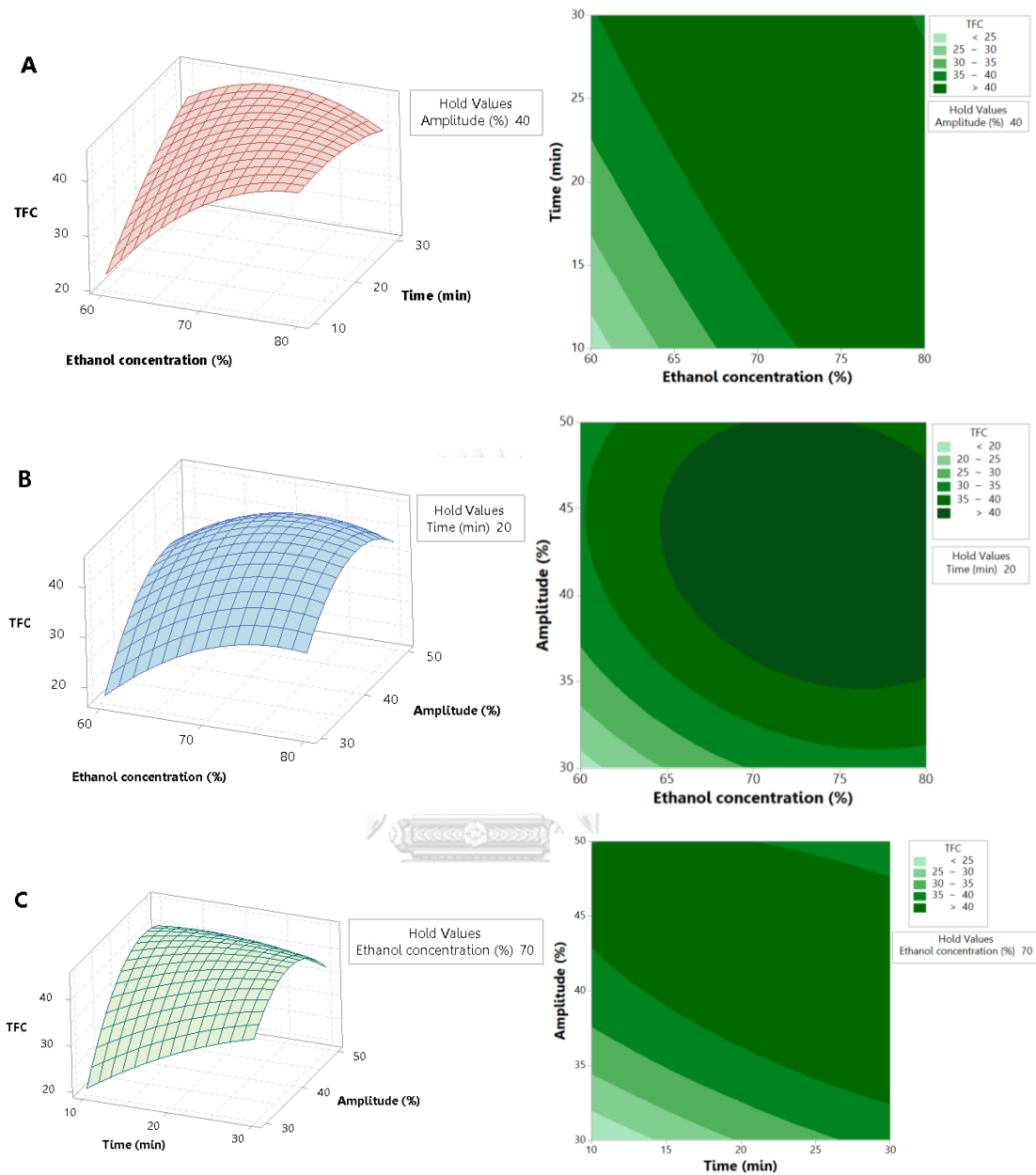
Variable	P-value	Remark
model	0.000	
linear	0.000	
X_1	0.000	significant
X_2	0.001	significant
X_3	0.000	significant
quadratic	0.000	
X_1^2	0.001	significant
X_2^2	0.073	
X_3^2	0.000	significant
2-way interaction	0.000	
$X_1 X_2$	0.001	significant
$X_1 X_3$	0.026	
$X_2 X_3$	0.001	significant
Lack of fit	0.095	
$R^2 = 98.11\%$		$R^2\text{-adj.} = 95.67\%$

X_1 = ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v), X_2 = เวลา (นาที), X_3 = ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นสามารถนำไปวิเคราะห์หาภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลร่วมของแต่ละปัจจัยในการสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอย่างละเอียด แสดงในรูปแบบกราฟพื้นผิวตอบสนอง และกราฟโครงร่าง ดังแสดงในรูปที่ 4.3

รูปที่ 4.3 (A) แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาที) ในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เมื่อใช้ความเข้มข้นของแอมพลิจูดคงที่ (40%) โดยผลการทดลองพบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานมีค่าสูง เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลและเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น โดย

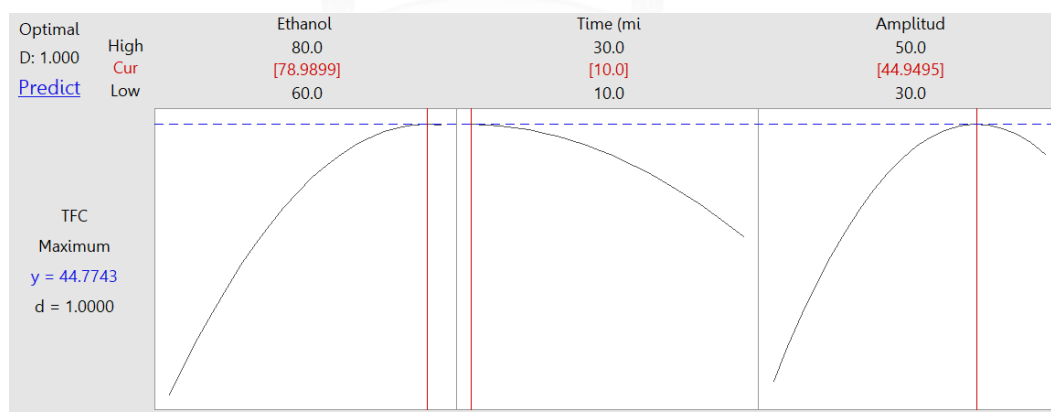
การใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยสามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ในรูปอะไกลโคไซด์ได้ ในขณะที่เมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้นสามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ในรูปของไกลโคไซด์หรือสารฟลาโวนอยด์กลุ่มแอนโธไซยานินได้ (Awotedu และคณะ, 2020; Zhuang และคณะ, 2017) ทั้งนี้จากการรายงานของ Jang และคณะ (2016) พบว่าสารสกัดจากเงี้ยวกุหลานในส่วนเหนือดินประกอบไปด้วยสารฟลาโวนอยด์ในรูปไกลโคไซด์ ได้แก่ เควอซิทิน และรูทีน เป็นต้น ดังนั้นความสามารถในการสกัดสารฟลาโวนอยด์ของความเข้มข้นของเอทานอลแต่ละระดับจะขึ้นอยู่กับชนิดของฟลาโวนอยด์ในพืชชนิดนั้น ๆ ด้วย นอกจากนี้เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ในการสกัด เมื่อใช้เวลาในการสกัดคงที่ (20 นาที) (รูปที่ 4.3 (B)) ผลการศึกษาพบว่าปัจจัยทั้งสองมีผลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในช่วงกว้าง โดยเมื่อระดับของความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า 65% v/v และความเข้มข้นของแอมพลิจูดมากกว่า 35% ในการสกัด ส่งผลให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจากการศึกษาของ Yang และคณะ (2010) ที่ศึกษาการสกัดดอก *Citrus aurantium* ด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่าเมื่อกำหนดปัจจัยในการสกัดอื่น ๆ ให้คงที่ และแปรระดับของความเข้มข้นของเอทานอลในช่วง 40-80% v/v สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 50% v/v มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด อาจกล่าวได้ว่าองค์ประกอบของสารฟลาโวนอยด์ในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันจึงทำให้ความเข้มข้นของสารต่างกัน โดยสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารสำคัญของสารสกัดจากใบเงี้ยวกุหลาน เช่น เควอซิทิน และรูทีน สามารถละลายได้ดีในสภาพที่มีขั้วสูง ในขณะที่ Ivana และคณะ (2008) ที่ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเควอซิทินจากหอมแดงด้วยวิธีการแช่ (maceration) โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของเอทานอล (5-100% v/v) เวลาในการสกัด (5-60 นาที) และอัตราส่วนของของเหลวต่อของแข็ง (10-80 mL/g) พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเควอซิทินจากหอมแดงคือความเข้มข้นของเอทานอล 80% v/v เวลาในการสกัด 47.3 นาที และอัตราส่วนของของเหลวต่อของแข็ง 63.9 mL/g เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของเอทานอลต่อปริมาณเควอซิทินพบว่าปริมาณเควอซิทินของสารสกัดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้น จนเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 60% v/v การเพิ่มขึ้นของปริมาณเควอซิทินจะค่อนข้างคงที่ และจะมีปริมาณสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของเอทานอลช่วง 80% v/v



รูปที่ 4.3 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot) ที่แสดงอิทธิพลร่วมของ (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาที), (B) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และความเข้มของแอมพลิจูด (%), (C) เวลา (นาที) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) (mg QCE/100 g dry wt.) ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ภาวะต่าง ๆ

ในขณะที่เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างเวลา (นาที) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัดคงที่ (70% v/v) (รูปที่ 4.3 (C)) พบว่าสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูง เมื่อเวลาและความเข้มข้นของแอมพลิจูดในการสกัดเพิ่มขึ้น และการใช้เวลาในการสกัดนานสุด (30 นาที) และความเข้มข้นของแอมพลิจูดสูงสุด (50%) มีผลให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีแนวโน้มลดลง อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์เกิดความเสียหายจากการเพิ่มความเข้มข้นของแอมพลิจูด (Al-dhabi และคณะ, 2017) และการใช้เวลาในการสกัดนานส่งผลให้สารพฤษเคมีที่สำคัญสลายไปได้ อันเป็นผลมาจากเมื่อเวลาในการสกัดนานขึ้น พลังงานของคลื่นเสียงความถี่สูงที่ถูกสะสมไว้สามารถสร้างความร้อนในกระบวนการสกัด ซึ่งปริมาณความร้อนที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อความเสถียรต่อโครงสร้างของสารประกอบทำให้โครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงจากปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น การเกิดออกซิเดชันของพอลิฟีนอล (Yang และคณะ, 2010; Anaya-Esparza และคณะ, 2018)

การทำนายภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการสกัดใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยให้ได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดได้สูงที่สุด สามารถพิจารณาจากรูปที่ 4.4 โดยพบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากใบเจียวกู่หลานคือ ความเข้มข้นของเอทานอล 78.99% v/v เวลา 10.00 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 44.95% ในการสกัด ซึ่งมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 44.77 mg GAE/100 g dry wt.



รูปที่ 4.4 ระดับปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) จากใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย

4.1.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยที่ภาวะต่าง ๆ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานมีค่าอยู่ในช่วง 361.93-610.27 μM trolox//100 g dry weight basis (μM trolox/100 g dry wt.) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

ลำดับ ที่	ความเข้มข้นของ เอทานอล (% v/v)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของ แอมพลิจูด (%)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (μM trolox/100 g dry wt.)
1	60	10	40	373.80±6.14
2	60	30	40	420.30±7.37
3	80	10	40	401.30±5.77
4	80	30	40	386.47±10.50
5	60	20	30	441.93±8.14
6	60	20	50	430.27±8.02
7	80	20	30	380.93±8.74
8	80	20	50	406.60±9.85
9	70	10	30	361.93±12.10
10	70	10	50	452.93±11.02
11	70	30	30	426.93±5.13
12	70	30	50	457.93±6.11
13	70	20	40	589.27±6.46

* ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองสามารถทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ภาวะต่าง ๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ แสดงดังสมการที่ 4.3

$$\begin{aligned} \text{DPPH} = & -6017 + 140 \cdot x_1 + 54.76x_2 + 56.1x_3 - 1.019x_1^2 - 0.919x_2^2 - 0.724x_3^2 \\ & - 0.153 x_1x_2 + 0.093x_1x_3 - 0.150 x_2x_3 \end{aligned}$$

(4.3)

ค่า R^2 และ R^2 -adj ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงในตารางที่ 4.6 โดยมีค่าเท่ากับ 97.43% และ 94.13% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ พบว่า p-value มีค่าเท่ากับ 0.096 ซึ่งมีความมากกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าสมการความสัมพันธ์ที่ได้มีความเหมาะสมกับข้อมูล ดังนั้นจึงสามารถนำสมการมาใช้ในการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานสูงสุดได้

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

Variable	P-value	Remark
model	0.000	
linear	0.081	
X_1	0.173	
X_2	0.134	
X_3	0.058	
quadratic	0.000	
X_1^2	0.000	significant
X_2^2	0.000	significant
X_3^2	0.000	significant
2-way interaction	0.270	
$X_1 X_2$	0.192	
$X_1 X_3$	0.408	
$X_2 X_3$	0.201	
Lack of fit	0.096	
$R^2 = 97.43\%$	R^2 -adj. =94.13%	

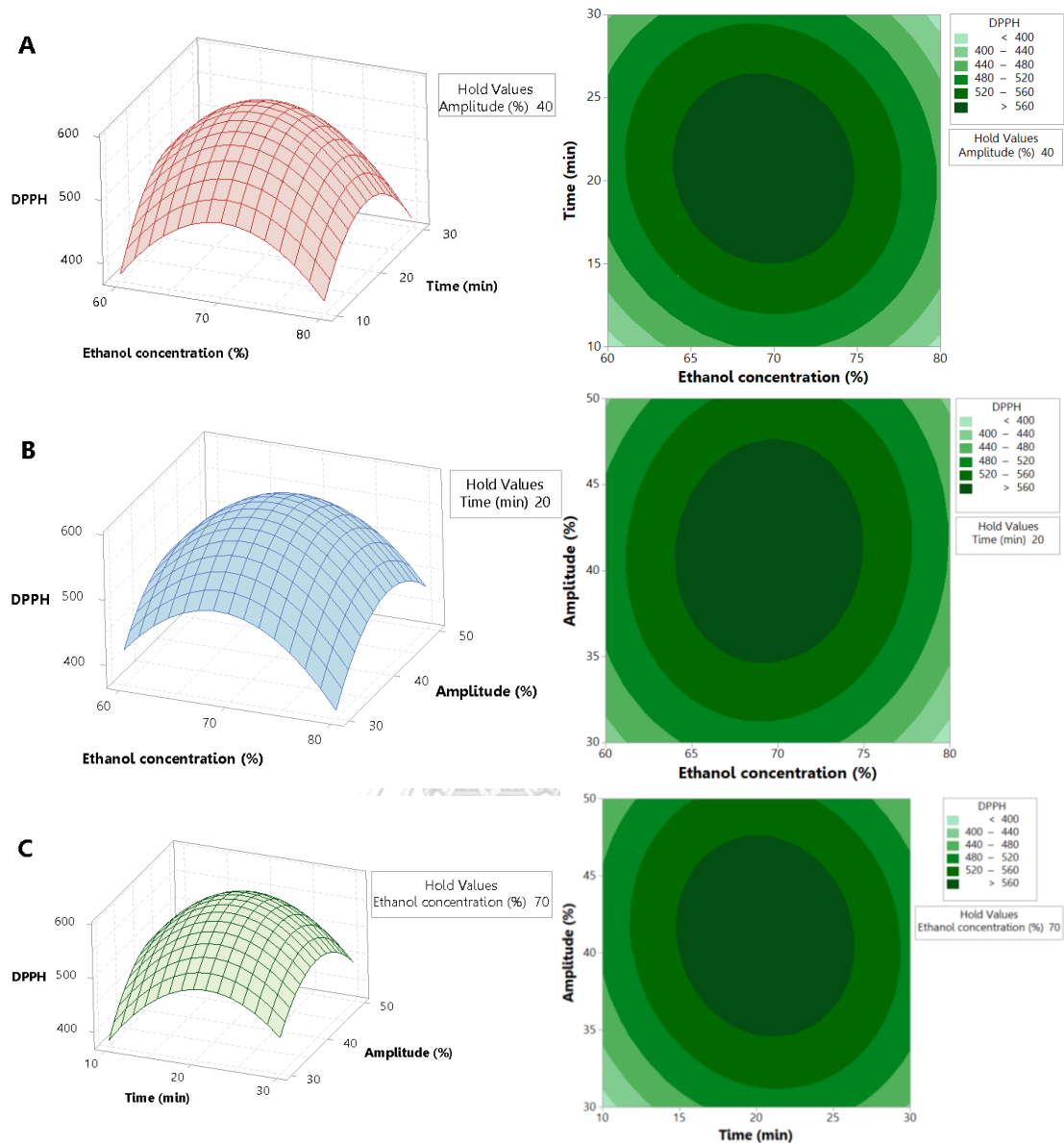
X_1 = ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v), X_2 = เวลา (นาที), X_3 = ความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%)

เมื่อเปรียบเทียบค่า p-value ของสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละปัจจัยในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (ตารางที่ 4.6) พบว่าปัจจัยหลักทั้งหมด (ความเข้มข้นของเอทานอล เวลาในการสกัด และความเข้มข้นของแอมพลิจูด) ไม่มีอิทธิพลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในขณะที่เมื่อพิจารณาพจน์กำลังสอง พบว่า

ปัจจัยหลักทั้งสามปัจจัยมีอิทธิพลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

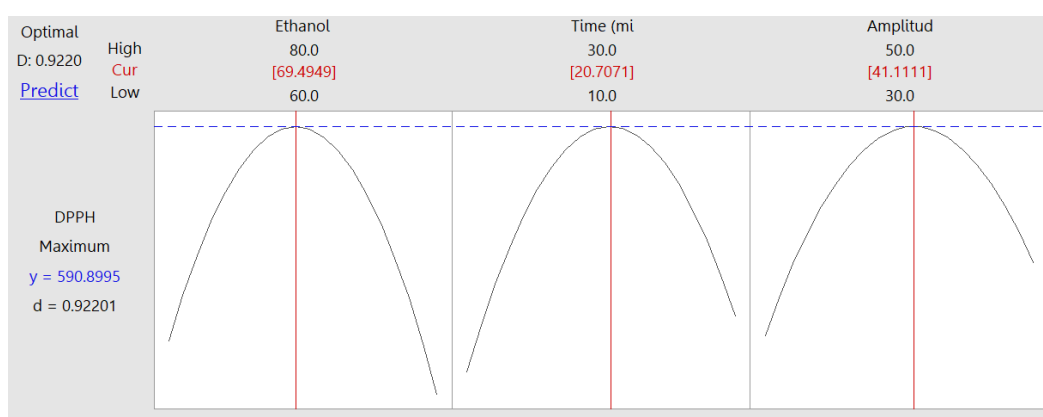
แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นสามารถนำไปวิเคราะห์หาภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลร่วมของแต่ละปัจจัยในการสกัดต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH อย่างละเอียด โดยแสดงในรูปแบบกราฟพื้นผิวตอบสนองและกราฟโครงร่าง ดังแสดงในรูปที่ 4.5

รูปที่ 4.5 (A) แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาท) ในการสกัดที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) เมื่อใช้ความเข้มข้นของแอมพลิจูดในการสกัดคงที่ (40%) โดยผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากใบเจียวกู่หลานมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) สูงขึ้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอทานอลช่วง 65-75% และเวลา 15-25 นาท ในการสกัด และรูปที่ 4.5 (B) แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ในการสกัด เมื่อใช้เวลาในการสกัดคงที่ (20 นาท) โดยพบว่าระดับที่เพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของเอทานอลและความเข้มข้นของแอมพลิจูดในการสกัด ส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งช่วงความเข้มข้นของเอทานอลและความเข้มข้นของแอมพลิจูดในการสกัดที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) สูง คือช่วง 65-75% v/v และ 35-45% ตามลำดับ ซึ่งระดับที่เพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของแอมพลิจูดให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับอิทธิพลร่วมระหว่างเวลา (นาท) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ในการสกัด เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัดคงที่ (70% v/v) (รูปที่ 4.5 (C)) พบว่าความเข้มข้นของแอมพลิจูดช่วง 35-45% ร่วมกับการใช้เวลาช่วง 15-25 นาทในการสกัด สารสกัดจากใบเจียวกู่หลานจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) สูง



รูปที่ 4.5 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot) ที่แสดงอิทธิพลร่วมของ (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาที), (B) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และความเข้มของแอมพลิจูด (%), (C) เวลา (นาที) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ($\mu\text{M trolox}/100 \text{ g dry wt.}$) ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ภาวะต่าง ๆ

ซึ่งจากการทำนายภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการสกัดใบเจียวกุหลาบด้วยคลีนอัลตราซาวด์ช่วย เพื่อให้ได้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ที่สกัดได้สูงที่สุด (รูปที่ 4.6) พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) จากใบเจียวกุหลาบคือ ความเข้มข้นของเอทานอล 69.49% v/v เวลา 20.70 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 41.11% ซึ่งที่ภาวะนี้ สารสกัดจากใบเจียวกุหลาบมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) เท่ากับ 590.90 μM trolox/100 g dry wt.



รูปที่ 4.6 ระดับปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) จากใบเจียวกุหลาบด้วยคลีนอัลตราซาวด์ช่วย

4.1.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบด้วยคลีนอัลตราซาวด์ช่วยที่ภาวะต่าง ๆ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบมีค่าอยู่ในช่วง 3332.59-1586.30 μM trolox/100 g dry wt. ดังแสดงในตารางที่ 4.7

การวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง สามารถทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ที่ภาวะต่าง ๆ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ แสดงดังสมการที่ 4.4

$$\text{FRAP} = -7007 + 154.9x_1 + 104.0x_2 + 68.0x_3 - 1.133x_1^2 - 2.444x_2^2 - 0.902x_3^2 - 0.100x_1x_2 + 0.080x_1x_3 + 0.072x_2x_3$$

(4.4)

ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

ลำดับ ที่	ความเข้มข้นของ เอทานอล (% v/v)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของ แอมพลิจูด (%)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (μM trolox/100 g dry wt.)
1	60	10	40	451.67±20.83
2	60	30	40	472.04±6.85
3	80	10	40	441.48±19.76
4	80	30	40	422.04±13.70
5	60	20	30	624.35±16.28
6	60	20	50	649.81±14.59
7	80	20	30	536.39±12.34
8	80	20	50	593.80±13.91
9	70	10	30	396.57±23.91
10	70	10	50	458.61±10.85
11	70	30	30	466.94±22.95
12	70	30	50	557.69±18.91
13	70	20	40	804.54±14.69

* ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ข้อมูลค่า R^2 และ R^2 -adj ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP แสดงในตารางที่ 4.8 โดยพบว่า R^2 และ R^2 -adj มีค่าเท่ากับ 98.03% และ 95.49% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ พบว่า p-value มีค่าเท่ากับ 0.204 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าสมการความสัมพันธ์ที่ได้มีความเหมาะสมกับข้อมูล ดังนั้นจึงสามารถนำสมการมาใช้ในการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานสูงสุดได้

เมื่อเปรียบเทียบค่า p-value ของสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละปัจจัยในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (ตารางที่ 4.8) พบว่าความเข้มข้นของแอมพลิจูด (ปัจจัยหลัก) มีอิทธิพลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และในส่วน of พจน์ของกำลังสองพบว่าทั้งสามปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล เวลาในการสกัด และความเข้มข้นของแอมพลิจูด มีอิทธิพลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP อย่างมี

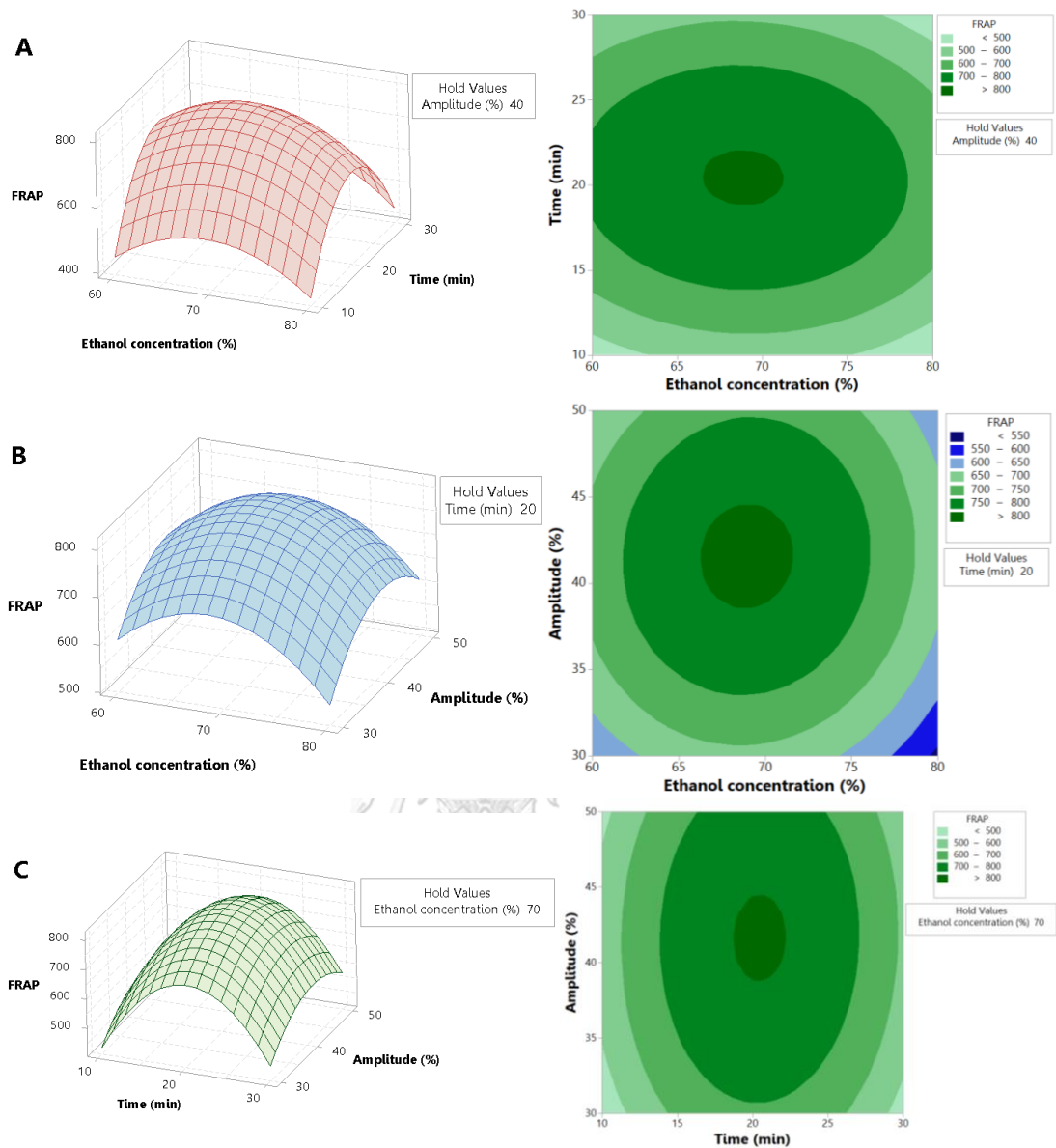
นัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ขณะที่พจน์ของอิทธิพลร่วม พบว่าพจน์ของอิทธิพลทุกพจน์ไม่มีผลต่อต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

Variable	P-value	Remark
model	0.000	
linear	0.042	
X_1	0.067	
X_2	0.114	
X_3	0.041	significant
quadratic	0.000	
X_1^2	0.000	significant
X_2^2	0.000	significant
X_3^2	0.001	significant
2-way interaction	0.854	
$X_1 X_2$	0.569	
$X_1 X_3$	0.647	
$X_2 X_3$	0.680	
Lack of fit	0.204	
$R^2 = 98.03\%$		$R^2\text{-adj.} = 95.49\%$

X_1 = ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v), X_2 = เวลา (นาที), X_3 = ความเข้มข้นของแอมพลิฟิแคชัน (%)

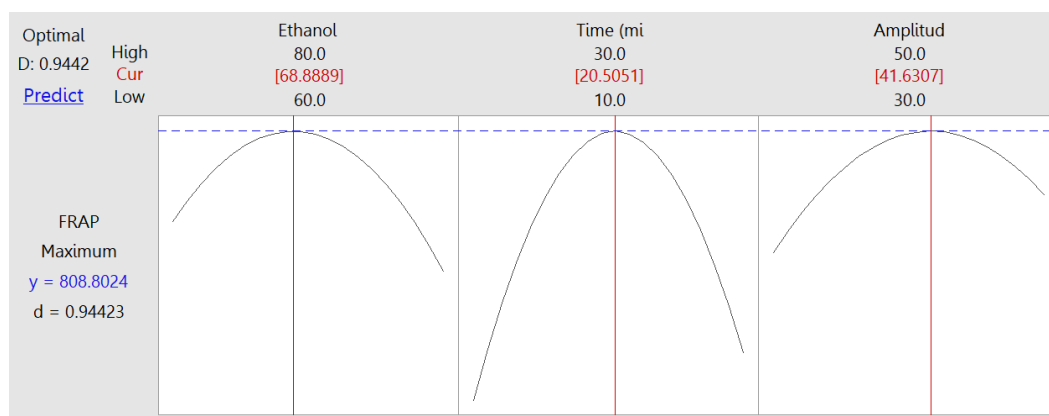
แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นสามารถนำไปวิเคราะห์หาภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลร่วมของแต่ละปัจจัยในการสกัดต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP อย่างละเอียด โดยแสดงในรูปแบบกราฟพื้นผิวตอบสนอง และกราฟโครงร่าง ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot) ที่แสดงอิทธิพลร่วมของ (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาที), (B) ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และความเข้มของแอมพลิจูด (%), (C) เวลา (นาที) และความเข้มของแอมพลิจูด (%) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (μM trolox/100 g dry wt.) ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ภาวะต่าง ๆ

เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และเวลา (นาที) ในการสกัดที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เมื่อใช้ความเข้มข้นของแอมพลิจูดคงที่ (40%) (รูปที่ 4.7 (A)) พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน มีค่าสูงเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอทานอลและเวลาในการสกัดที่ระดับกลาง คือความเข้มข้นของเอทานอล 70% v/v และเวลา 20 นาที ในการสกัด และรูปที่ 4.7 (B) แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ในการสกัด เมื่อใช้เวลาในการสกัดคงที่ (20 นาที) ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์การสกัดใบเจียวกู่หลานด้วยระดับของความเข้มข้นของเอทานอลและความเข้มข้นของแอมพลิจูดที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปริมาณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เพิ่มขึ้นด้วย โดยช่วงความเข้มข้นของเอทานอลและความเข้มข้นของแอมพลิจูดในระดับกลางส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มากที่สุด ซึ่งมีค่าในช่วง 65-70% v/v และ 40-45% v/v ตามลำดับ และสำหรับอิทธิพลร่วมระหว่างเวลา (นาที) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (%) ในการสกัดที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัดคงที่ (70% v/v) จากรูปที่ 4.7 (C) พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีปริมาณสูงในช่วงเวลาในการสกัด 20 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูดช่วง 40-45% ในการสกัด

การทำนายภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการสกัดใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย เพื่อให้ได้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) ที่สกัดได้สูงที่สุด (รูปที่ 4.8) พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) จากใบเจียวกู่หลานคือความเข้มข้นของเอทานอล 68.89% v/v เวลา 20.51 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 41.63% ในการสกัด ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) เท่ากับ 808.80 μM trolox/100 g dry wt.



รูปที่ 4.8 ระดับปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) จากใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย

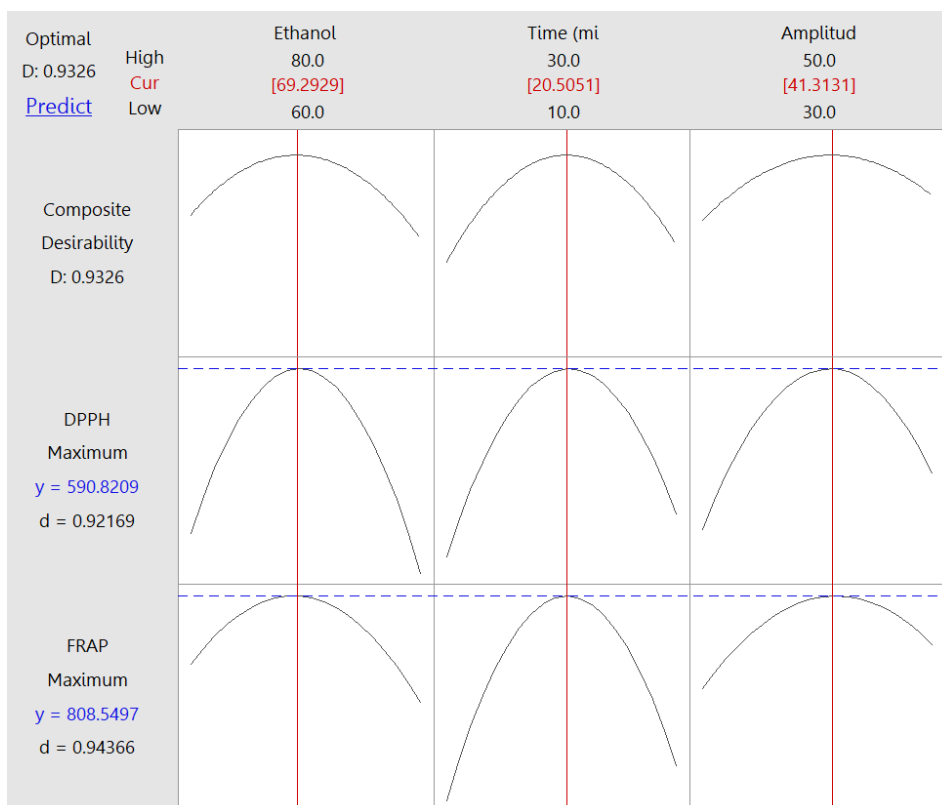
4.1.5 ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใบเจียวกู่หลาน

ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใบเจียวกู่หลานของแต่ละปัจจัยในการสกัดใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย เพื่อให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ที่สกัดได้สูงที่สุด แสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใบเจียวกู่หลานต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

	ความเข้มข้นของ เอทานอล (% v/v)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของ แอมพลิจูด (%)
สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	71.52	25.76	43.94
ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด	78.99	10.00	44.95
ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย วิธี DPPH	69.49	20.71	41.11
ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย วิธี FRAP	68.89	20.51	41.63

การเลือกภาวะที่เหมาะสมโดยการพิจารณาค่าการตอบสนองสูงที่สุดด้วยฟังก์ชัน response optimizer ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP คือ ความเข้มข้นเอทานอล 69.30% v/v เวลา 20.51 นาที และความเข้มแอมพลิจูด 41.31% โดยสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ภาวะนี้ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 590.82 และ 808.54 μM trolox/100 g dry wt. ตามลำดับ



รูปที่ 4.9 ภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่าง ๆ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีหลักการในการทดสอบคือ การสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นแน่ชัดและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงจากค่าการดูดกลืนแสง โดยการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการทดสอบที่ใช้ DPPH• ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ มีสีม่วงและสามารถดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จะสูญเสียอิเล็กตรอนอิสระให้กับตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งในที่นี้ก็คือสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานนั่นเอง ซึ่งการลดลงของอนุมูลอิสระดังกล่าวสามารถสังเกตได้จากการจางลงของสีม่วงในสารละลาย ขณะที่การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นการทดสอบสมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานแก่อนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบ โดยอาศัยการวัดปฏิกิริยา reduction ของ Fe^{3+} -TPTZ ไปเป็น Fe^{2+} -TPTZ ที่สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ซึ่งค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เพิ่มขึ้นจะเป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ, 2560) จากผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่าง ๆ ต่อ

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่า การสกัดใบเจียวกู่หลานด้วยความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน โดยมีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นของเอทานอล 69.30% v/v แต่เมื่อสกัดด้วยความเข้มข้นของเอทานอลที่มีระดับที่สูงกว่าค่าดังกล่าว จะส่งผลให้สารสกัดจากใบเจียวกู่หลานมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อพิจารณาภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยด้านความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากตารางที่ 4.9 พบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากใบเจียวกู่หลาน คือ 71.51 และ 79.00% v/v ตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกมีบทบาทสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารประกอบฟีนอลิกในใบเจียวกู่หลานที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากสารกลุ่มฟลาโวนอยด์แล้วยังมีสารกลุ่มอื่น ๆ อีกด้วย เช่น กลุ่มกรดฟีนอลิก (phenolic acid) หรือ สารประกอบฟีนอลิกอื่นที่อยู่ในรูปไกลโคไซด์ จากการศึกษาของ Samec และคณะ (2016) ที่ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกรดฟีนอลิกจากสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน พบว่าสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานอุดมประกอบไปด้วยกรดฟีนอลิกหลากหลายชนิด ได้แก่ protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, salicylic acid, caffeic acid, 4-coumaric acid, chlorogenic acid และ ferulic acid เป็นต้น ซึ่งจากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพบว่า chlorogenic acid เป็นกรดฟีนอลิกที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้จากการศึกษาผลของเวลาในการสกัด พบว่าเมื่อทำการสกัดใบเจียวกู่หลานที่เวลาประมาณ 20 นาที สารสกัดที่ได้จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP สูงที่สุด โดยการใช้เวลานที่น้อยกว่าหรือมากกว่า 20 นาที จะส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานมีแนวโน้มลดลง กล่าวได้ว่า การเพิ่มเวลาในการสกัดจะช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายโอนมวลสารระหว่างตัวทำละลายและเซลล์พืช และเอื้อต่อการเกิดคาวิตีชัน ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวส่งผลให้เซลล์เนื้อเยื่อของพืชเกิดการฉีกขาดและปลดปล่อยสารต่าง ๆ ออกมา แต่เมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นจนถึงระยะหนึ่งการสกัดจะเข้าสู่สมดุลและเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มสูงขึ้นจนถึงจุดสมดุลจะเกิดการสลายตัวของสารพฤษเคมี เนื่องจากผลของความร้อนที่เกิดขึ้นจะส่งผลต่อความเสถียรต่อโครงสร้างของสารประกอบทำให้โครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงจากปฏิกิริยาทางลบ เช่น การเกิดออกซิเดชัน ส่งผลให้ปริมาณสารลดลง (Yang และคณะ, 2010; Anaya-Esparza และคณะ, 2018) สำหรับผลของความเข้มข้นของแอมพลิฟิคาที่ใช้ในการสกัดใบเจียวกู่หลาน พบว่าการใช้

ความเข้มข้นของแอมพลิจูดที่ระดับต่ำกว่า 40% มีแนวโน้มให้สารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ได้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจาก การใช้ความเข้มข้นของแอมพลิจูดต่ำจะส่งผลให้การสั่นของคลื่นเสียงที่ส่งผ่านตัวทำละลายมีความรุนแรงน้อย ขณะที่การใช้ความเข้มข้นของแอมพลิจูดที่สูงขึ้นจะเพิ่มความรุนแรงของคลื่นเสียง ซึ่งจะเพิ่มโอกาสให้ฟองอากาศมาสัมผัสกับเซลล์พืชและเพิ่มการเกิดคาวิตีชันนั่นเอง (Hemwimol และคณะ, 2006) แต่เมื่อความเข้มข้นของแอมพลิจูดในการสกัดเพิ่มมากกว่า 40% จะเกิดการสั่นของคลื่นสูง ซึ่งสามารถสร้างความร้อนขึ้นและส่งผลให้ปริมาณสารพฤษเคมีที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสลายตัวเนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานจึงมีปริมาณลดลง (Santos และคณะ, 2008)

การตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (validation) ด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ที่ได้จากการทดลองที่ภาวะที่เหมาะสม และจากการทำนายด้วยสมการที่ 4.3 และ 4.4 โดยทำการประมาณค่าภาวะในการสกัดเพื่อให้ง่ายต่อการทดลองเป็นความเข้มข้นของเอทานอล 69.30% v/v เวลาในการสกัด 20.50 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 40% แสดงผลในรูปแบบของร้อยละความแตกต่างพบว่าสมการทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีความแตกต่างเท่ากับ 1.37 และ 1.44% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำ แสดงว่าสมการมีความถูกต้องเหมาะสมและสามารถอธิบายพฤติกรรมของตัวแปรต้นได้ดี จากการศึกษาของ Rabab และคณะ (2021) พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ด *Aframomum melegueta* ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย คือ เวลาในการสกัด 59.3 นาที ความเข้มข้นของเอทานอล 99.8% v/v และอัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง 9.8 mL/g ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ มีค่าเท่ากับ 11.31 mg GAE/g dry wt. เมื่อทำการทดลองตามภาวะที่เหมาะสมข้างต้นจำนวน 3 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสมการ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเมล็ด *Aframomum melegueta* มีค่าเท่ากับ 10.71 ± 0.19 mg GAE/g dry wt. โดยมีความคลาดเคลื่อนเท่ากับ 5.30% ซึ่งความคลาดเคลื่อนจากการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กับค่าที่ได้จากการทดลองจริงไม่ควรเกิน 10% ดังนั้นจึงถือได้ว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มีความน่าเชื่อถือและเหมาะสมในการทำนายได้ดี

4.1.6 การเปรียบเทียบผลของการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยกับวิธีการชง (infusion) ต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

ผลการเปรียบเทียบตัวอย่างสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ผ่านการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย (ภาวะที่เหมาะสมจากข้อที่ 4.1.5) กับวิธีการชง (ตัวอย่างควบคุม) ต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ข้อมูลแสดงดังตารางที่ 4.10 พบว่าตัวอย่างสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ผ่านการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตัวอย่างควบคุม โดยสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่สกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย (ความเข้มข้นของเอทานอล 69.30% v/v เวลาในการสกัด 20.50 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 40%) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 190.08 ± 4.91 mg GAE/100 g dry wt., 43.73 ± 0.49 mg QCE/100 g dry wt., 590.82 ± 6.51 μ M trolox/100 g dry wt. และ 808.54 ± 17.59 μ M trolox/100 g dry wt. ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่สกัดด้วยวิธีการชง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เฉลี่ยเท่ากับ 95.78 ± 4.34 mg GAE/100 g dry wt., 10.28 ± 0.42 mg QCE/100 g dry wt., 167.46 ± 11.73 μ M trolox/100 g dry wt. และ 287.31 ± 12.60 μ M trolox/100 g dry wt. ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นความแตกต่างเท่ากับ 50.39, 23.52, 27.93 และ 35.03% ตามลำดับ

จากงานวิจัยของ Roidaki และคณะ (2015) ที่ศึกษาผลของวิธีการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบ sea buckthorn ด้วยวิธีการชง และคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย พบว่า การสกัดด้วยอัลตราซาวด์ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดมีปริมาณสูงกว่าการสกัดด้วยวิธีการชง โดยการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ ทำให้เกิดผลต่อคุณสมบัติทางกลและทางเคมีของอาหาร เนื่องจากคลื่นดังกล่าวทำให้เกิดปรากฏการณ์คาวิตชันในตัวทำละลายส่งผลให้ตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปตัวถูกละลายได้ดีขึ้น รวมถึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสารได้ดีอีกด้วย นอกจากนี้ปรากฏการณ์คาวิตชันยังไปทำลายเนื้อเยื่อบริเวณผนังเซลล์ทำให้สารสกัดสามารถออกมายังตัวทำละลายได้มากขึ้น (Pingret และคณะ, 2012) ซึ่งต่างกับการสกัดด้วยวิธีการชง การสกัดด้วยวิธีนี้เป็น การสกัดตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างที่ต้องการสกัดสกัดมาแช่เป็นระยะเวลาสั้น ๆ ในน้ำร้อนเท่านั้น ซึ่งการสัมผัสกันของตัวทำละลายและตัวอย่างจะเกิดขึ้นเพียงระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น ตัวทำละลายจึงแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในของตัวอย่างออกมาได้น้อย

ตารางที่ 4.10 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานจากการสกัดด้วยคลีนอัลตราซาวด์ช่วยและการชง

วิธีการสกัด	UAE	การชง
สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 g dry wt.)	190.08±4.91	95.78±4.34
ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QCE/100 g dry wt.)	43.73±0.49	10.28±0.42
ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (μ M trolox/100 g dry wt.)	590.82±6.51	167.46±11.73
ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (μ M trolox/100 g dry wt.)	808.54±17.59	287.31±12.60

UAE = คลีนอัลตราซาวด์ช่วย

วรรณญา วงศ์วานิช และ กิตติชัย บรรจง (2559) ที่ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดต่อปริมาณผลผลิตและคุณภาพของน้ำมันเมล็ดองุ่นด้วยวิธีการแช่ (maceration) และการใช้คลีนอัลตราซาวด์ช่วย พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยวิธีการแช่ (maceration) คือ อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อผงเมล็ดองุ่น 6:1 v/w เวลาในการสกัด 30 นาที โดยที่ภาวะนี้ให้ปริมาณผลผลิต 11.13% โดยน้ำหนักแห้ง และภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยคลีนอัลตราซาวด์ช่วย (ความถี่ 20 กิโลเฮิรตซ์ กำลังไฟฟ้า 750 วัตต์ ความเข้มข้นของแอมพลิฟิเคชัน 80%) คือ อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อผงเมล็ดองุ่น 2:1 v/w เป็นเวลา 15 นาที โดยให้ปริมาณผลผลิต 11.42% โดยน้ำหนักแห้ง แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยคลีนอัลตราซาวด์ช่วยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายได้ถึง 3 เท่า และลดระยะเวลาในการสกัดเป็น 2 เท่าของวิธีการแช่

Mohammadpour และคณะ (2019) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันจากเมล็ดมะรุม (*Moringa peregrina*) ด้วยคลีนอัลตราซาวด์ช่วยและการสกัดแบบต่อเนื่อง (soxhlet extractor) พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันจากเมล็ดมะรุมด้วยคลีนอัลตราซาวด์ช่วยคือ อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อของแข็งเท่ากับ 5:20 mL/g เวลาในการสกัด 5-30 นาที พลังงานของเครื่องอัลตราซาวด์ 348 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 30 °C ซึ่งให้ปริมาณผลผลิตสูงสุดคือ 53.10% ขณะที่การสกัดแบบต่อเนื่องได้ปริมาณผลผลิตสูงสุดคือ 43.00% ที่เวลา

การสกัด 11 ชั่วโมง ดังนั้นการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์เป็นวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพ โดยช่วยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลาย ลดระยะเวลาในการสกัด และช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตให้สูงขึ้นได้

4.2 การพัฒนาสูตรเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

การทดลองนี้เป็นการพัฒนาสูตรเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานและออกแบบการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานในน้ำชาใบหม่อน แปรสัดส่วนของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานเท่ากับ 0 (ตัวอย่างควบคุม), 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3% v/v และกำหนดปริมาณส่วนผสม 2 ชนิด ให้คงที่ ได้แก่ สารให้ความหวาน (sucralose) 0.01% w/v และกรดซิตริก (citric acid) 0.08% w/v และวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP) จากผลการศึกษา พบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 210.44-401.00 mg GAE/100 mL ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 21.13-46.00 mg QE/100 mL และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP อยู่ในช่วง 297.63-392.47 และ 1047.41-1658.52 μ M trolox/100 mL ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10-4.11)

4.2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในแต่ละสูตรเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม พบว่าเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานทั้ง 6 สูตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน โดยการเติมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 3% v/v มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดที่สุด คือ 401.00 ± 9.61 mg GAE/100 mL และตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำที่สุด คือ 210.44 ± 10.55 mg GAE/100 mL (ตารางที่ 4.11)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสูตรเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานมีผลไปในทิศทางเดียวกันกับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยสูตรที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 3% v/v มี

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดคือ 46.00 ± 1.58 mg QCE/100 mL และเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพียง 21.13 ± 0.48 mg QCE/100 mL ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเติมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบในน้ำชาใบหม่อนส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น โดยปริมาณสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบที่เพิ่มขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ตารางที่ 4.11 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ

สารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ (% v/v)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 mL)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QCE/100 mL)
0	210.44 ± 10.55^f	21.13 ± 0.48^e
1	246.00 ± 10.64^e	28.62 ± 0.64^d
1.5	300.45 ± 8.55^d	31.84 ± 0.61^c
2	338.22 ± 6.73^c	37.79 ± 0.48^c
2.5	372.67 ± 13.34^b	41.98 ± 0.61^b
3	401.00 ± 9.61^a	46.00 ± 1.58^a

ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง (a,b,c,...) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ทั้งนี้จากงานวิจัยของ Xie และคณะ (2011) ที่รายงานว่าเจียวกุหลาบอุดมไปด้วยสารประกอบฟลาโวนอยด์หลากหลายชนิด โดยเฉพาะสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ที่พบมากในพืชชนิดนี้คือ quercetin และ rutin ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันกับที่พบได้มากในใบหม่อนอีกด้วย นอกจากนี้ใบหม่อนยังพบอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ชนิดอื่น ๆ อีก เช่น kaempferol-3-O-rutinoside และ kaempferol เป็นต้น ดังนั้นจึงพบสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดปริมาณสูง ในตัวอย่างที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ 1-3% v/v และตัวอย่างควบคุม (ไม่มีการเติมสารสกัด)

4.2.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ

สารต้านอนุมูลอิสระมีหน้าที่ช่วยลดหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถลดความเสียหายของเซลล์ที่เป็นผลมาจากอนุมูลอิสระได้ สารพฤกษเคมีต่าง ๆ ในพืช

ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ (Kebede และคณะ, 2019) ผลการการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานแสดงในตารางที่ 4.12 โดยพบว่าการเสริมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานในปริมาณที่ต่างกันส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยสูตรที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 3% v/v มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 392.47 ± 20.74 และ 1658.52 ± 50.41 $\mu\text{M trolox}/100$ mL ตามลำดับ ในขณะที่สูตรตัวอย่างควบคุมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ต่ำที่สุด (297.63 ± 6.75 $\mu\text{M trolox}/100$ mL) แต่ไม่มีความแตกต่างกับสูตรที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 1 และ 1.5% v/v อย่างมีนัยสำคัญ (310.47 ± 1.15 และ 315.47 ± 6.51 $\mu\text{M trolox}/100$ mL ตามลำดับ) ($p > 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 1% v/v มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ต่ำที่สุดและมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อาจกล่าวได้ว่าปริมาณสารสำคัญของน้ำชาใบหม่อน ซึ่งประกอบไปด้วยสารพฤกษเคมีที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารประกอบฟลาโวนอยด์ในรูปไกลโคไซด์ เช่น rutin, isoquercitrin, quercetin, astragaloside และ kaempferol เป็นต้น ส่งผลให้ตัวอย่างควบคุมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกับตัวอย่างที่มีการเสริมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 1% v/v (Katsube และคณะ, 2016)

ตารางที่ 4.12 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

สารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน (% v/v)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ($\mu\text{M trolox}/100$ mL)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ($\mu\text{M trolox}/100$ mL)
0	297.63 ± 6.75^d	1047.41 ± 43.15^d
1	310.47 ± 1.15^{cd}	1117.78 ± 48.43^d
1.5	315.47 ± 6.51^{cd}	1247.41 ± 19.51^c
2	340.30 ± 19.49^{cb}	1384.44 ± 45.47^b
2.5	352.13 ± 3.33^b	1458.52 ± 27.96^b
3	392.47 ± 20.74^a	1658.52 ± 50.41^a

ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง (a,b,c,..) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2.3 ค่าสี (L^* , a^* , b^* และ ΔE^*) ของเครื่องตีผสมนัไพรพร้อมบริโศคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

สีจัดเป็นคุณสมบัติทางกายภาพอีกอย่างหนึ่งที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญ เนื่องจากเป็นคุณสมบัติแรกที่ผู้บริโภคสามารถสังเกตเห็น (Bulotta และคณะ, 2014) การวิเคราะห์สีของตัวอย่างอาหารประกอบไปด้วยค่า L^* คือค่าความสว่าง (แสดงค่าอยู่ในช่วง 0-100 โดยที่ L^* 100 แสดงว่าตัวอย่างมีความสว่างมากที่สุด) ค่า a^* คือค่าของสีเขียวและสีแดง ($-a^*$ แสดงค่าสีเขียว และ $+a^*$ แสดงค่าสีแดง) ค่า b^* คือค่าของสีเหลืองและน้ำเงิน ($-b^*$ แสดงค่าสีน้ำเงิน และ $+b^*$ แสดงค่าสีเหลือง) และค่า ΔE^* คือค่าความแตกต่างของสีระหว่างตัวอย่างควบคุม (สารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 0% v/v) กับตัวอย่างสูตรเครื่องตีที่ผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 1-3% v/v โดยค่า ΔE^* มาก หมายถึง ตัวอย่างมีสีแตกต่างจากตัวอย่างควบคุมมาก ซึ่งจากการวิเคราะห์ค่าสีของเครื่องตีผสมนัไพรพร้อมบริโศคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน ทั้ง 6 สูตร พบว่าตัวอย่างควบคุมมีค่า L^* , a^* และ b^* มากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 78.23 ± 0.02 , 8.21 ± 0.03 และ 51.44 ± 0.03 ตามลำดับ ($p < 0.05$) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานในน้ำชาใบหม่อนและการเพิ่มปริมาณสารสกัดส่งผลให้ค่า L^* มีค่าความสว่างลดลง รวมถึงค่า a^* และ b^* มีค่าลดลงเช่นเดียวกัน ซึ่งหมายความว่าเมื่อปริมาณสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานเพิ่มมากขึ้นตัวอย่างจะมีความเป็นสีแดงมากกว่าสีเขียว และมีความเป็นสีน้ำเงินมากกว่าสีเหลือง จากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้ค่า ΔE^* (ค่าความแตกต่างของสีระหว่างตัวอย่างที่ผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 0% v/v กับตัวอย่างที่ผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 1-3% v/v) มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยถ้าค่า ΔE^* มาก แสดงว่าตัวอย่างมีสีแตกต่างจากค่าเริ่มต้นมาก ดังแสดงในตารางที่ 4.13 และพบว่า สูตรที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานปริมาณสูงสุด (3% v/v) มีค่า ΔE^* สูงที่สุด (47.77 ± 0.02)

ตารางที่ 4.13 ค่า L^* , a^* , b^* และ ΔE^* ของเครื่องตีผสมปูนไฟรพร้อมบริโคมผสมสารสกัดจากใบเจียว
กู่หลาน

สารสกัดจากใบ เจียวกู่หลาน (% v/v)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0	78.23±0.02 ^a	8.21±0.03 ^a	51.44±0.03 ^a	0.00±0.00 ^f
1	67.25±0.05 ^b	7.83±0.02 ^b	48.23±0.03 ^b	11.44±0.05 ^e
1.5	59.88±0.02 ^c	7.64±0.02 ^c	47.83±0.03 ^c	18.71±0.03 ^d
2	49.63±0.02 ^d	7.60±0.05 ^c	47.14±0.02 ^d	28.93±0.02 ^c
2.5	39.94±0.02 ^e	7.50±0.02 ^{cd}	46.96±0.02 ^e	38.56±0.02 ^b
3	30.75±0.02 ^f	7.56±0.03 ^d	46.33±0.03 ^f	47.77±0.02 ^a

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง (a,b,c,...) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำได้ ทั้งหมดของเครื่องตีผสมปูนไฟรพร้อมบริโคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำได้ทั้งหมด เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในด้านคุณภาพ ความปลอดภัย และความสม่ำเสมอของการผลิต ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการผลิตเครื่องตีอาจส่งผลกระทบต่อรสชาติ และอาจทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับ ในการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดทั้งหมดของเครื่องตีผสมปูนไฟรพร้อมบริโคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน พบว่าสูตรเครื่องตีทั้ง 6 สูตร มีค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4.23-4.29 และปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.08-0.09% กรดซิตริก ดังแสดงในตารางที่ 4.14 โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างที่เสริมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 3% v/v มีค่าต่ำที่สุด (4.23 ± 0.02)

ตารางที่ 4.14 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของเครื่องดื่มสมุนไพรร่วมบริโภคนผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

สารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน (% v/v)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ^{ns}	ปริมาณกรดทั้งหมด (%กรดซิตริก) ^{ns}	ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ^{ns}
0	4.29±0.02	0.08±0.01	0.77±0.06
1	4.27±0.03	0.08±0.01	0.77±0.06
1.5	4.26±0.04	0.09±0.01	0.77±0.06
2	4.25±0.03	0.09±0.01	0.77±0.12
2.5	4.24±0.04	0.09±0.01	0.80±0.10
3	4.23±0.02	0.09±0.01	0.80±0.10

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{ns} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของแต่ละแถวในแนวดิ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เนื่องจากสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดซึ่งมีส่วนประกอบของกรดฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิก กรดคาเฟอิก เป็นต้น จึงส่งผลให้ตัวอย่างที่ใส่สารสกัดจากใบเจียวกู่หลานมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่าตัวอย่างที่ไม่ใส่สารสกัด (Tasnim และคณะ, 2010) โดยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในเครื่องดื่มมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เครื่องดื่มเป็นผลิตภัณฑ์ในภาชนะบรรจุปิดสนิทที่มีความเป็นกรดต่ำ ซึ่งจะนำไปตามข้อกำหนดประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 349) พ.ศ. 2556 นอกจากนี้การปรับลดค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4 ด้วยกรดต่าง ๆ เช่น กรดแอสคอร์บิก กรดซิตริก และกรดอะซีติก สามารถใช้ในการควบคุมการเกิดสีน้ำตาลของน้ำผลไม้และขึ้นผลไม่ได้ เนื่องจากกรดซิตริกเป็นสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลในกลุ่ม acidulant โดยเมื่อลดค่าความเป็นกรด-ด่างให้ต่ำกว่าค่า optimum pH ของ PPO จะส่งผลให้เอนไซม์ PPO มีกิจกรรมลดลง นอกจากนี้กรดซิตริกยังเป็นสารคีเลท (chelating agent) ที่สามารถจับกับทองแดงที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ PPO เมื่อทองแดงถูกดึงออกไปทำให้เอนไซม์ PPO ไม่สามารถทำงานได้หรือทำงานได้ช้าลง โดยทองแดงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เอนไซม์ทำงานได้เป็นปกติ (Martinez และ Whitaker, 1995; Sapers, 1993) โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ PPO อยู่ที่ 6.5 และกิจกรรมของเอนไซม์จะคงที่ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 5-11 ที่อุณหภูมิ 5 °C (Yang และคณะ, 2000)

ตารางที่ 4.14 แสดงปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำได้ทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ โดยพบว่าทุกตัวอย่างมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำได้ทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยมีปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำได้ทั้งหมดในช่วง 0.77-0.80 °Brix ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำมาก เนื่องจากในเครื่องต้มมีการใช้สารทดแทนความหวาน ได้แก่ ซูคราโลส เพียงเล็กน้อย (0.01% w/v) ซึ่งซูคราโลสเป็นสารทดแทนความหวานที่มีความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโคสถึง 600 เท่า และมีปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำได้ทั้งหมดน้อยมากเมื่อเทียบกับสารทดแทนความหวานอื่น ๆ ซูคราโลสเป็นสารสังเคราะห์ที่ได้จากการใช้น้ำตาลซูโคสเป็นสารตั้งต้น แล้วแทนที่กลุ่มไฮดรอกซิลด้วยอะตอมสารคลอไรด์ 3 ตำแหน่ง ทำให้มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับน้ำตาลซูโคส และให้รสชาติหวาน ไม่มีรสขมติดลิ้น และมีความใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโคส รวมถึงเป็นสารทดแทนความหวานที่สามารถทนความร้อนได้ (Aurora, 2005)

4.2.5 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และ *E. coli* และ coliform ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ

จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญมากในวงการอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นสาเหตุสำคัญที่สุดที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพและเน่าเสีย หรืออาจทำให้อาหารเป็นพิษได้ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์มีด้วยกันหลายปัจจัย เช่น แหล่งอาหาร ค่า water activity (a_w) อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณของออกซิเจน เป็นต้น ทั้งนี้เกณฑ์การเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร กำหนดให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และราต้องไม่เกินมาตรฐาน คือ 1.00×10^5 และ 5.00×10^3 CFU/mL ตามลำดับ (Yeoboah และคณะ, 2010; กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560) รวมถึง *Escherichia coli* (*E. coli*) และ coliforms ในตัวอย่างต้องไม่เกิน 2.2 MPN/100 mL (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2562) ตารางที่ 4.15 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และ ปริมาณ *E. coli* และ coliforms ในเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ ทั้ง 6 สูตร โดยไม่พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์และราในตัวอย่างทั้ง 6 สูตร รวมถึงพบ *E. coli* และ coliforms ไม่เกิน 3 MPN/100 mL ในทุกสูตร ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในขั้นตอนการเตรียมน้ำใบหม่อน ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีปริมาณมากที่สุดในเครื่องต้มดำเนินการโดยแช่ใบหม่อนในน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที อาจส่งผลให้โปรตีนในเซลล์ของจุลินทรีย์เสียสภาพธรรมชาติและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ในเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ถูกทำลายได้ รวมถึงสุขลักษณะในขั้นตอนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ดีสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ทั้งน้ำชาใบหม่อนและสาร

สกัดจากใบเจียวกู่หลานที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีความสามารถในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) โดยทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่บริเวณผนังเซลล์ ทำให้กรดอะมิโนรั่วไหลออกจากเซลล์ และซึมผ่านผนังเซลล์ไปทำลายกลไกการทำงานภายในเซลล์ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติภายในเซลล์และสูญเสียการสมดุล ส่งผลให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Moreno และคณะ, 2006; Shahidi และ Naczki, 2004)

ตารางที่ 4.15 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และ ปริมาณ *Escherichia coli* (*E. coli*) และ coliforms ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

สารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน (% v/v)	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/mL)	ปริมาณยีสต์และรา (log CFU/mL)	<i>E. coli</i> และ coliforms (MPN/mL)
0	ND	ND	<3
1	ND	ND	<3
1.5	ND	ND	<3
2	ND	ND	<3
2.5	ND	ND	<3
3	ND	ND	<3

*ND = ตรวจไม่พบ

จากงานวิจัยของ Onogi และคณะ (1993) รายงานว่า พบสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดในใบหม่อน โดยสารประกอบที่มีความสำคัญซึ่งเป็นสารในกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ ได้แก่ รูทีน เคอร์ซีทิน และแคมป์เฟอร์อล รวมถึงมีการรายงานที่พบรูทีน และเคอร์ซีทิน ซึ่งเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานด้วยเช่นกัน (Xie และคณะ, 2011) ในขณะที่ กิติพงษ์ อัครตรกุล และ นฤมล หิมะสุทธิเดช (2560) รายงานว่าสารสกัดจากหัวหอมมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ อันเป็นผลจากสารสกัดจากหัวหอมมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีสารประกอบหลัก ได้แก่ เคอร์ซีทิน และแคมป์เฟอร์อล ประกอบด้วยส่วนของไกลโคไซด์และอะไกลโคไซด์ ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอน 3 ซึ่งเป็นหมู่สำคัญที่ทำให้เกิดการยับยั้งจุลินทรีย์ได้

4.2.6 การประเมินผลทางประสาทสัมผัสของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ

การทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ เป็นการทดลองโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบสูงสุดที่ผู้บริโภคยอมรับได้ โดยเฉพาะรสขมที่เกิดจากสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบที่อาจส่งผลกระทบต่อกรยอมรับในเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสูตรเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ โดยแปรปริมาณสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ 6 ระดับ คือ 0% (ตัวอย่างควบคุม), 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3% v/v แสดงในตารางที่ 4.16 และพบว่าสูตรที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ 1% v/v ได้รับคะแนนความชอบด้านสี กลิ่นโดยรวม รสหวาน รสเปรี้ยว รสขม กลิ่นรส และความชอบโดยรวมมากที่สุด (7.63 ± 0.72 , 6.70 ± 0.95 , 6.53 ± 1.17 , 6.63 ± 1.10 , 7.10 ± 1.09 , 6.63 ± 1.07 และ 6.80 ± 1.13 คะแนน ตามลำดับ) สีของเครื่องต้มเป็นสิ่งแรกที่มีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค โดยคะแนนความชอบด้านสีของเครื่องต้มทั้ง 6 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วง 6.20-7.63 คะแนน ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง เนื่องจากสีของเครื่องต้มทั้ง 6 ตัวอย่าง มีสีที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะตัวอย่างที่เติมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ 1 และ 1.5% v/v มีปริมาตรของสารสกัดไม่แตกต่างกันมากนัก ส่งผลให้ได้รับคะแนนความชอบด้านสีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในขณะที่คะแนนความชอบด้านกลิ่นโดยรวมของเครื่องต้มทั้ง 6 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วง 5.67-6.70 คะแนน (อยู่ในเกณฑ์เฉยๆ ถึงชอบเล็กน้อย) โดยตัวอย่างควบคุมได้รับคะแนนน้อยที่สุด (5.67 ± 1.37 คะแนน) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการเสริมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบในน้ำชาใบหม่อนจะช่วยเพิ่มกลิ่นรสชาให้กับเครื่องต้ม ดังนั้นเครื่องต้มที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบจึงได้รับคะแนนความชอบด้านกลิ่นโดยรวมมากกว่าตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้คะแนนความชอบด้านรสหวาน รสเปรี้ยว และรสขม ของตัวอย่างที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบที่ระดับสูงสุด (3% v/v) มีคะแนนน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 4.93 ± 1.64 , 5.40 ± 1.10 และ 4.40 ± 1.83 คะแนน ตามลำดับ เนื่องจากการเติมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบที่มีความเข้มข้นสูง (ปริมาณมากขึ้น) ส่งผลให้เครื่องต้มมีรสขมมากขึ้น และสามารถกลบรสชาติอื่น ๆ ของผลิตภัณฑ์ได้

เมื่อพิจารณาคะแนนความชอบโดยรวมของเครื่องต้มทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างได้รับคะแนนอยู่ในช่วง 4.87-6.80 คะแนน ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ไม่ชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง โดยตัวอย่างที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ 3% v/v ได้รับคะแนนน้อย

ที่สุด (4.87 ± 1.78 คะแนน) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจผลมาจากรสชาติขมของปริมาณสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่เพิ่มมากขึ้น โดยตัวอย่างที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 1% และ 1.5% v/v ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เมื่อวิเคราะห์คะแนนความชอบโดยรวมของตัวอย่างที่มีการเติมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 1% และ 1.5% v/v ซึ่งมีคะแนนเท่ากับ 6.80 ± 1.13 และ 6.57 ± 1.61 คะแนน ตามลำดับ และเป็นคะแนนที่อยู่ในเกณฑ์ชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง โดย Resurreccion (1998) ระบุว่าคะแนนการยอมรับของผลิตภัณฑ์ควรมีคะแนนมากกว่า 6 คะแนน จึงจะถือว่าผู้บริโภคให้การยอมรับผลิตภัณฑ์

ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากคะแนนความชอบโดยรวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ร่วมกับสมบัติด้านอื่น ๆ จึงเลือกสูตรเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 1.5% v/v ซึ่งเป็นสูตรที่ได้รับคะแนนความชอบโดยรวม 6.57 คะแนน และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 300.45 ± 8.55 mg GAE/100 mL 31.84 ± 0.61 mg QCE/100 mL 315.47 ± 6.51 μ M trolox/100 mL และ 1247.41 ± 19.51 μ M trolox/100 mL ตามลำดับ สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.16 คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มสมุนไพรร่วมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ

สารสกัดจากใบ เจียวกุหลาบ (% v/v)	สี	กลิ่นโดยรวม	รสหวาน	รสเปรี้ยว	รสขม	กลิ่นรส	ความชอบโดยรวม
0	6.83±0.99 ^{bc}	5.67±1.37 ^b	5.57±1.63 ^{ab}	5.53±0.94 ^b	6.53±1.33 ^{ab}	5.77±1.50 ^{abc}	5.87±1.53 ^{abc}
1	7.63±0.72 ^a	6.70±0.95 ^a	6.53±1.17 ^a	6.63±1.10 ^a	7.10±1.09 ^a	6.63±1.07 ^a	6.80±1.13 ^a
1.5	7.37±0.72 ^{ab}	6.47±1.14 ^{ab}	6.10±1.65 ^a	6.23±1.31 ^{ab}	6.70±1.64 ^{ab}	6.33±1.30 ^{ab}	6.57±1.61 ^{ab}
2	6.53±1.01 ^c	6.20±1.46 ^{ab}	5.77±1.70 ^{ab}	5.77±1.14 ^b	6.10±1.69 ^{ab}	5.67±1.61 ^{abc}	5.93±1.76 ^{abc}
2.5	6.63±1.07 ^c	6.00±1.17 ^{ab}	5.43±1.46 ^{ab}	5.87±1.25 ^{ab}	5.67±1.69 ^b	5.50±1.48 ^{bc}	5.47±1.66 ^{bc}
3	6.20±1.27 ^c	5.90±1.24 ^{ab}	4.93±1.64 ^b	5.40±1.10 ^b	4.40±1.83 ^c	5.27±1.48 ^c	4.87±1.78 ^c

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง (a,b,c,...) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.5$)

4.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการแปรรูปด้วยความร้อนและผลของบรรจุภัณฑ์ต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบระหว่างการรักษา

การพาสเจอร์ไรซ์เป็นกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน โดยนิยมใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 100 °C เพื่อยืดอายุของผลิตภัณฑ์อาหารให้นานขึ้นเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C โดยเป้าหมายหลักของการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชนิดนี้คือการยับยั้งเอนไซม์และเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งการพาสเจอร์ไรซ์สามารถทำได้สองวิธี คือ การใช้อุณหภูมิต่ำเวลานาน (low temperature-long time, LTLT) และ การใช้อุณหภูมิสูงเวลาสั้น (high temperature-short time, HTST) นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารหรือเครื่องดื่มมีด้วยกันหลายปัจจัย เช่น แสง อากาศ และอุณหภูมิในการเก็บรักษา ดังนั้นการเลือกใช้บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมจึงมีส่วนช่วยในการชะลอการเสื่อมเสียคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมี และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ หรือการเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัส เช่น สี กลิ่น รส และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ซึ่งการเสื่อมเสียเหล่านี้อาจส่งผลกระทบต่อารยอมรับของผู้บริโภค โดยบรรจุภัณฑ์ทำหน้าที่ปกป้องผลิตภัณฑ์ที่บรรจุอยู่ภายใน อีกทั้งยังช่วยเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ และเป็นสื่อแนะนำข้อมูลที่สร้างความดึงดูดใจต่อผู้บริโภคได้อีกด้วย

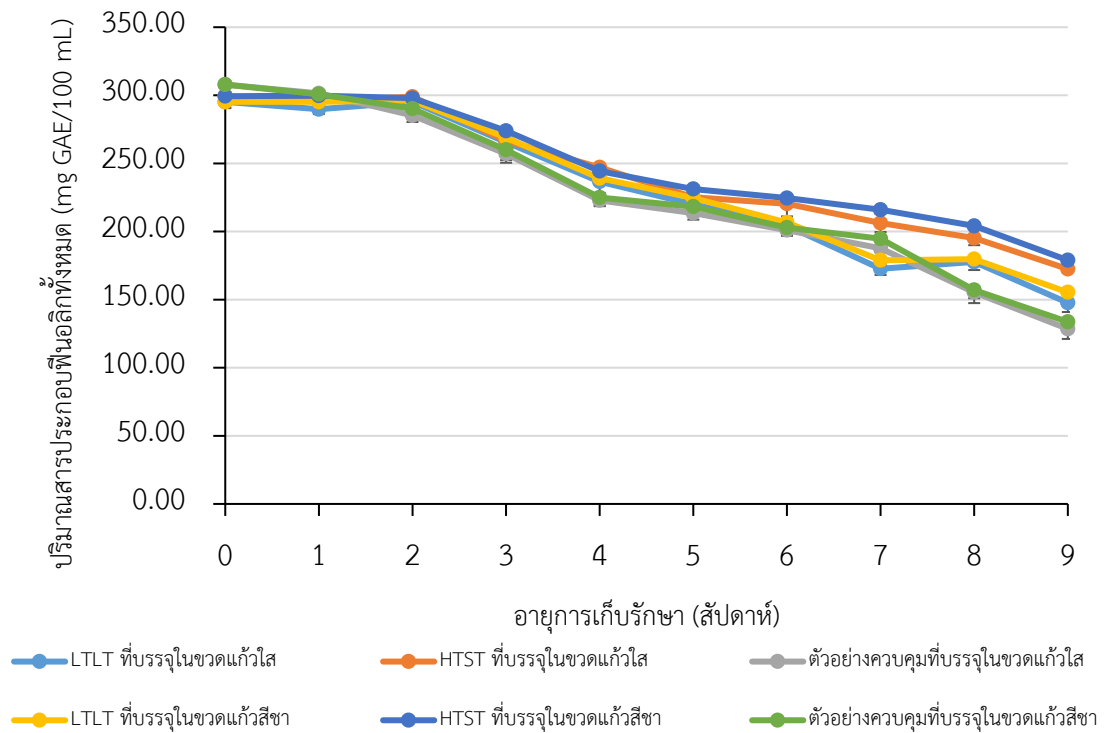
4.3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบระหว่างการรักษา

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ด้วยอุณหภูมิต่ำเวลานาน (LTLT) และอุณหภูมิสูงเวลาสั้น (HTST) ในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT, HTST และตัวอย่างควบคุม ในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วใส และขวดแก้วสีชา มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเริ่มต้น (สัปดาห์ที่ 0) เท่ากับ 295.16 ± 5.40 , 299.33 ± 8.74 และ 307.87 ± 6.21 mg GAE/100 mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.17 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาในเชิงปริมาณของแต่ละตัวอย่างจะพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์นั้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมเล็กน้อย ซึ่ง Noci และคณะ (2008) รายงานว่าการพาสเจอร์ไรซ์เป็นกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ซึ่งความร้อนอาจส่งผลให้สารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้เกิดการสลายตัว โดยส่วนใหญ่เป็นผลมาจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Martin-Cabrejas และคณะ (2009) ที่รายงานว่ากระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนส่งผลให้เกิดการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะเมื่ออุณหภูมิเพิ่ม

สูงขึ้น เนื่องจากความร้อนทำให้เกิดการสลายของพันธะที่สารประกอบฟีนอลิกจับกับองค์ประกอบอื่น เช่น โพรตีน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก ส่งผลให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกได้ ในขณะที่ Brecht และคณะ (2008) และ Choi และคณะ (2006) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น หลังจากที่ได้รับความร้อน อาจเป็นผลเนื่องมาจากผนังเซลล์ของพืชถูกทำลายหรือทำให้อ่อนตัวลงจากความร้อนส่งผลให้สารประกอบฟีนอลิกถูกปลดปล่อยจากส่วน insoluble ของพืช และส่งผลให้มีปริมาณสารต้านออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้น

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคมรสสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในทุกตัวอย่างมีแนวโน้มลดลงเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.17) โดยในช่วงสัปดาห์ที่ 0-3 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของทุกตัวอย่างมีปริมาณค่อนข้างคงที่ จากนั้นเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นส่งผลให้เครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคมรสสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rabie และคณะ (2014) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำเคปกุสเบอร์รี่พาสเจอร์ไรซ์ (cape gooseberry) (*Physalis peruviana* L.) ที่เก็บรักษา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 5 °C โดยเมื่อสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา พบว่าสารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้ทั้งที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์และไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ ยังคงมีปริมาณเกือบคงที่ในช่วงวันที่ 0-7 จากนั้นจะลดลงเล็กน้อยในช่วงวันที่ 7-14 และลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 14-21 และจากการรายงานของ Sharma และคณะ (2018) พบว่า คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ลดลงระหว่างอายุการเก็บรักษาส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค โดยหากคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในเชิงปริมาณลดลงถึง 25% ผู้บริโภคบางส่วนจะปฏิเสธการซื้อหรือบริโภคผลิตภัณฑ์ชนิดนั้น ขณะที่บางกลุ่มเลือกที่จะไม่ยอมรับผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพลดลงถึง 50% ดังนั้นงานวิจัยที่ศึกษาแบบจำลองทำนายอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์จึงมักเลือกใช้เกณฑ์การตัดสินใจที่ 25% และ 50% เป็นจุดสุดท้ายในการประเมินอายุการเก็บรักษา จากตารางที่ 4.17 พบว่า ในสัปดาห์ที่ 4 ตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใส และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วสีชา มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 222.87 ± 8.26 และ 224.95 ± 7.86 mg GAE/100 mL ตามลำดับ หรือมีปริมาณลดลงไป 27.61 และ 26.93% ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเริ่มต้น ทั้งนี้การลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างการเก็บรักษามีสาเหตุหลักมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน อันได้แก่กิจกรรมของเอนไซม์

โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases, PPO) และเปอร์ออกซิเดส (peroxidases, POD) (Barberan และคณะ, 2001) นอกจากนี้ Brecht และคณะ (2008) รายงานว่าการให้ความร้อนสามารถยับยั้งหรือลดกิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POD ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นหรือลดน้อยลงในระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากสารประกอบฟีนอลเป็นสับสเตรตให้กับเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ใช้เอนไซม์ ดังนั้นจึงอธิบายได้ว่า ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา และตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงไม่เกิน 25% ของปริมาณเริ่มต้น แม้มีอายุการเก็บรักษาที่ 5 สัปดาห์ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงมากกว่า 25% ของปริมาณเริ่มต้น เมื่อมีอายุการเก็บรักษาที่ 6 สัปดาห์ โดยมีการลดลงไป 30.77, 29.80, 26.38 และ 24.99% ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเริ่มต้นตามลำดับ หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 9 สัปดาห์ ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 147.66 ± 7.36 , 155.37 ± 8.12 , 172.45 ± 4.43 , 178.91 ± 2.60 , 128.49 ± 6.77 และ 133.70 ± 4.63 mg GAE/100 mL ตามลำดับ โดยการลดลงคิดเป็น 49.97, 47.36, 40.23, 58.26 และ 56.57% ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเริ่มต้น จากตารางที่ 4.17 แสดงให้เห็นว่า ในสัปดาห์ที่ 9 ตัวอย่างที่ผ่านพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุขวดแก้วสีชามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุขวดแก้วใส ซึ่งหมายความว่าชนิดของบรรจุภัณฑ์ไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 4.10 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคน้ำมันสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

ตารางที่ 4.17 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรอบแห้งบริเวณพื้นที่อุทยานระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

ระยะเวลาการเก็บ (สัปดาห์ที่)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100 mL)					
	ขวดแก้วใส			ขวดแก้วสีชา		
	LTLT	HTST	ตัวอย่างควบคุม	LTLT	HTST	ตัวอย่างควบคุม
0 ^{ns}	295.16±5.40	299.33±8.74	307.87±6.21	295.16±5.40	299.33±8.74	307.87±6.21
1 ^{ns}	289.75±5.71	296.00±6.16	301.41±4.33	295.16±5.40	299.75±8.18	300.79±4.16
2	295.16±4.76 ^{ab}	298.91±4.74 ^a	285.16±3.54 ^b	296.20±5.95 ^{ab}	297.87±6.50 ^a	290.16±7.10 ^{ab}
3	265.58±6.54 ^{ab}	266.62±7.50 ^{ab}	257.04±4.27 ^b	268.91±5.20 ^{ab}	273.91±5.55 ^a	259.95±4.16 ^b
4	236.62±4.27 ^{abc}	247.04±5.79 ^a	222.87±8.26 ^c	239.12±5.55 ^{ab}	244.33±6.70 ^a	224.95±7.86 ^{bc}
5	219.95±4.78 ^{ab}	225.16±6.35 ^{ab}	213.50±8.19 ^b	224.54±7.28 ^{ab}	231.20±6.64 ^a	218.29±5.50 ^{ab}
6	204.33±2.97 ^c	220.37±4.88 ^{ab}	201.00±7.51 ^c	206.62±6.71 ^{bc}	224.54±9.29 ^a	202.87±5.46 ^c
7	172.66±2.81 ^e	206.20±9.94 ^{ab}	187.66±4.56 ^{cd}	178.91±4.17 ^{de}	215.99±6.56 ^a	194.75±4.54 ^{bc}
8	177.66±7.94 ^b	195.16±6.05 ^a	155.37±5.95 ^c	179.75±9.06 ^b	204.12±5.20 ^a	157.04±6.06 ^c
9	147.66±7.36 ^b	172.45±4.43 ^a	128.49±6.77 ^c	155.37±8.12 ^b	178.91±2.60 ^a	133.70±4.63 ^c

LTLT = เครื่องต้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อุณหภูมิต่ำกว่าเวลาอบ, HTST = เครื่องต้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อุณหภูมิสูงเวลาสั้น, ตัวอย่างควบคุม = เครื่องต้มที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในจำนวน (a,b,c,...) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

^{ns} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของแต่ละแถวในแถวเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

4.3.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษา

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ผ่านการแปรรูปด้วยความร้อนแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 4.18 โดยพบว่าตัวอย่างแบบ LTLT แบบ HTST และตัวอย่างควบคุม มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเริ่มต้น (สัปดาห์ที่ 0) เท่ากับ 31.93 ± 1.20 , 32.78 ± 0.74 และ 33.32 ± 1.22 mg QCE/100 mL ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดระหว่างตัวอย่าง LTLT, HTST และตัวอย่างควบคุม พบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยตัวอย่างควบคุมมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST และที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แบบ LTLT ตามลำดับ เนื่องจากกระบวนการให้ความร้อนส่งผลให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสลายตัวหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ส่งผลให้เกิดการสูญเสียความสมบูรณ์ของเซลล์หรือเกิดการสลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งมีออกซิเจน เอนไซม์ และแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Davey และคณะ, 2000) นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Sanche และคณะ (2020) ที่ศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของน้ำเสาวรสที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน พบว่าตัวอย่างน้ำเสาวรสที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แบบอุณหภูมิสูงเวลาสั้น (อุณหภูมิ 82 °C, 20 วินาที) (HTST) เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการรักษาสารฟลาโวนอยด์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการพาสเจอร์ไรส์แบบอุณหภูมิต่ำเวลานาน (อุณหภูมิ 63 °C, 30 นาที) (LTST) โดยหลังผ่านการพาสเจอร์ไรส์น้ำเสาวรสอุณหภูมิสูงเวลาสั้น ตัวอย่างมีปริมาณ epicatechin, isoorientin, isovitexin และ hesperitin คงเหลือเท่ากับ 83.7, 50.5, 38.0 และ 69.4% ของตัวอย่างที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ ตามลำดับ ทั้งนี้สารประกอบฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดมีการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับจำนวนและการจัดเรียงตัวของหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ชนิดนั้น ๆ โดยสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดที่ทนความร้อนได้ดีคือ catechins, epicatechin, gallate และ epigallocatechin (Hallamn, 2001; Bravo, 1998)

ตารางที่ 4.18 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเสี้ยวกุหลาบระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

ระยะเวลาการเก็บ (สัปดาห์ที่)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QCE/100 mL)					
	ขวดแก้วใส			ขวดแก้วสีชา		
	LTLT	HTST	ตัวอย่างควบคุม	LTLT	HTST	ตัวอย่างควบคุม
0 ^{ns}	31.93±1.20	32.78±0.74	33.32±1.22	31.93±1.21	32.78±0.75	33.32±1.22
1 ^{ns}	30.97±0.75	31.93±0.53	31.09±1.39	31.45±1.10	32.41±0.41	31.57±0.50
2 ^{ns}	29.03±0.93	29.15±1.10	28.43±0.60	29.34±1.23	29.22±1.19	28.37±0.44
3 ^{ns}	26.14±0.77	27.10±1.80	26.74±0.63	26.62±1.72	27.83±2.28	27.34±1.44
4 ^{ns}	25.47±0.65	24.99±0.52	24.39±0.502	25.71±1.46	26.62±1.61	25.17±1.52
5 ^{ns}	24.57±1.76	24.75±1.61	24.39±0.82	24.81±1.79	24.81±2.63	24.75±1.71
6 ^{ns}	23.12±1.05	23.66±1.28	22.45±0.94	23.18±1.70	24.08±1.21	23.60±1.28
7 ^{ns}	21.97±4.24	22.94±0.64	21.37±1.87	22.76±0.99	23.66±1.31	22.45±0.46
8 ^{ns}	21.55±2.36	22.03±1.07	19.13±1.73	22.82±3.48	22.39±2.18	21.61±3.38
9	20.34±1.54 ^{ab}	20.94±2.09 ^a	16.78±2.13 ^b	21.13±1.13 ^a	21.19±1.41 ^a	17.56±1.39 ^{ab}

LTLT = เครื่องต้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อุณหภูมิต่ำกว่าเวลานาน, HTST = เครื่องต้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อุณหภูมิสูงเวลานาน, ตัวอย่างควบคุม = เครื่องต้มที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์

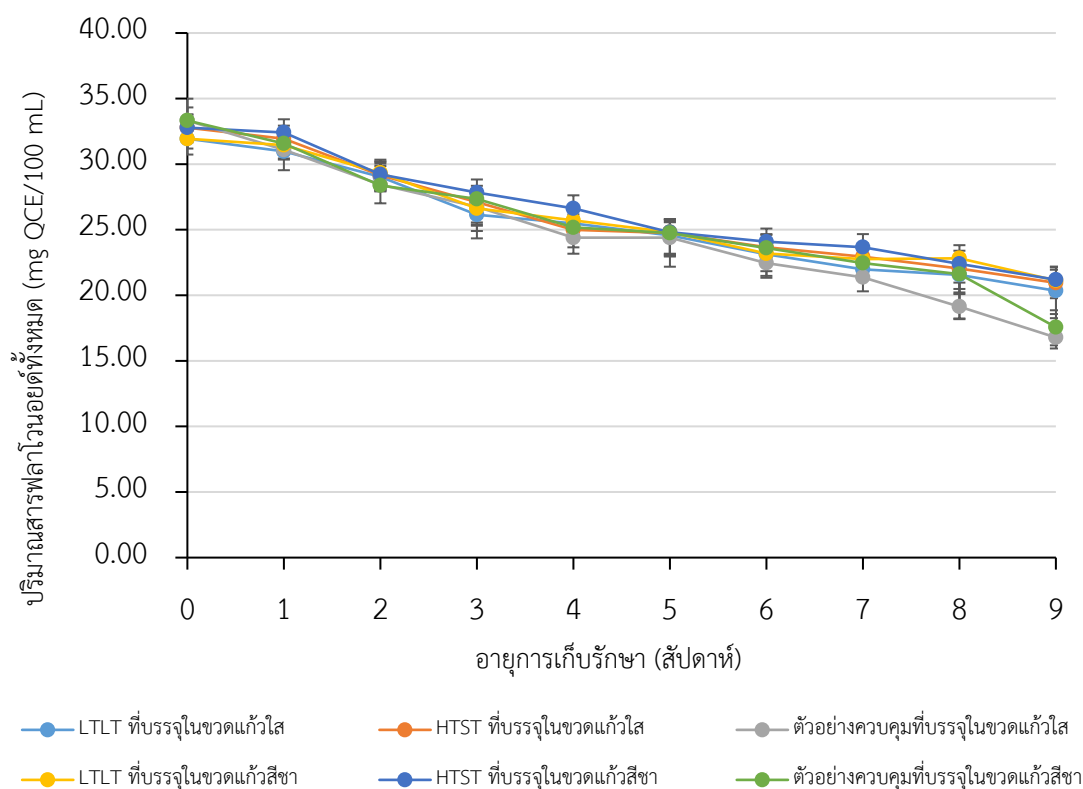
ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในจำนวน (a,b,c,...) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

^{ns} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของแต่ละแถวในแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

จากการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของเครื่องตีผสมนมไพรพร้อมบริโคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลานต่อ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของตัวอย่างมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คือ มีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ดังแสดงในรูปที่ 4.11 และจากตารางที่ 4.18 พบว่าผลของการพาสเจอร์และการบรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่แตกต่างกัน ไม่มีผลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 0-8 อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยในสัปดาห์ที่ 4 ของการเก็บรักษา ตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใส และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วสีชา มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 24.39 ± 0.50 และ 25.17 ± 1.52 mg QCE/100 mL ตามลำดับ หรือมีค่าลดลง 26.81 และ 24.46% ของปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเริ่มต้น ขณะที่การลดลงไป 25% ของปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT และแบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา คือในสัปดาห์ที่ 6 (การลดลงของตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT ที่บรรจุในขวดแก้วใสมีค่า เท่ากับ 27.60% ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT ที่บรรจุในขวดแก้วสีชามีค่าเท่ากับ 27.41% ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสมีค่าเท่ากับ 27.81% และตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วสีชามีค่าเท่ากับ 26.52%) เมื่อสิ้นสุดอายุการเก็บรักษาเครื่องตีผสมนมไพรพร้อมบริโคมผสมสารสกัดเจียวกุหลาน (สัปดาห์ที่ 9) พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 20.34 ± 1.54 , 21.13 ± 1.13 , 20.94 ± 2.09 , 21.19 ± 1.41 , 16.78 ± 2.13 และ 17.56 ± 1.39 mg QCE/100 mL ตามลำดับ หรือลดลงไป เท่ากับ 36.29, 33.84, 36.10, 35.36, 49.64 และ 47.28% ของปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเริ่มต้น โดยตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วสีชามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด ($p\leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใส ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT ที่บรรจุในขวดแก้วสีชา ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT ที่บรรจุในขวดแก้วใส และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วสีชา ($p>0.05$) อาจกล่าวได้ว่าชนิดของบรรจุภัณฑ์ (ขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา) ไม่มีผลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Del-Toro-Sánchez และคณะ (2015) ที่รายงานว่าการพาสเจอร์เป็นสารสำคัญในกลุ่มฟีนอล โดยจาก

การศึกษาการเก็บรักษาสารสกัดจากต้น *Anemopsis californica* ในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วใส และขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ -20, 4, 25 และ 50 °C พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดลดลง โดยปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดที่เก็บในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C จะมีความคงตัวสูงส่งผลให้ปริมาณสารสุดท้ายแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยสารสกัดที่เก็บในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วสีชามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากกว่าสารสกัดที่เก็บในขวดแก้วใส ขณะที่การเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิสูง (50 °C) สารสกัดที่เก็บในบรรจุภัณฑ์ที่ต่างชนิดกันมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด กล่าวได้ว่าความคงตัวของสารฟลาโวนอยด์ รวมถึงสารในกลุ่มพอลิฟีนอลอื่น ๆ ขึ้นอยู่กับแสงและอุณหภูมิในการเก็บรักษา โดยแสงและอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นสามารถเหนี่ยวนำการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารกลุ่มพอลิฟีนอลได้



รูปที่ 4.11 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

4.3.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษา

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) และไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (ตัวอย่างควบคุม) แสดงดังตารางที่ 4.19 และ 4.19 โดยพบว่า ตัวอย่างแบบ LTLT แบบ HTST และตัวอย่างควบคุม มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เริ่มต้น (สัปดาห์ที่ 0) เท่ากับ 430.35 ± 7.37 , 442.85 ± 9.29 และ 443.60 ± 18.92 $\mu\text{M trolox}/100$ mL ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ขณะที่ตัวอย่างแบบ LTLT แบบ HTST และตัวอย่างควบคุม มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เริ่มต้น (สัปดาห์ที่ 0) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 1780.28 ± 32.51 , 1834.44 ± 31.1 และ 1917.78 ± 36 $\mu\text{M trolox}/100$ mL ตามลำดับ และตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีกลไกในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระและกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ทำให้มีผลการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงแนะนำให้มีการทดสอบหลายวิธีเพื่อเปรียบเทียบกัน โดยวิธี DPPH เป็นการทดสอบความสามารถในการให้อิโอดรเจนอะตอมของสารต้านอนุมูลอิสระแก่อนุมูลอิสระของ DPPH* สำหรับวิธี FRAP เป็นการทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่เป็นตัวแทนของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ (เอนก หาลี และ บุญยกฤต รัตนพันธุ์, 2560)

ตารางที่ 4.19 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของเครื่องต้มสมุนไพรอบบิริโคคผสมสารสกัดจากใบเจียวคู่หลานระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

ระยะเวลาการเก็บ (สัปดาห์ที่)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ($\mu\text{M trolox}/100 \text{ mL}$)					
	ขวดแก้วใส			ขวดแก้วสีชา		
	LTLT	HTST	ตัวอย่างควบคุม	LTLT	HTST	ตัวอย่างควบคุม
0 ^{ns}	430.35±7.37	442.85±9.29	443.60±18.92	430.35±7.37	442.85±9.29	443.60±18.92
1	425.60±12.62 ^{bc}	441.35±4.43 ^{ab}	421.85±8.81 ^c	430.60±8.29 ^{bc}	457.35±5.68 ^a	433.60±6.22 ^{bc}
2	412.60±8.21 ^{ab}	419.85±8.66 ^a	399.60±7.62 ^{bc}	423.60±7.87 ^a	425.85±9.91 ^a	390.10±1.29 ^c
3	352.10±11.62 ^{cd}	356.10±8.96 ^{bc}	335.85±8.06 ^d	363.10±5.26 ^{abc}	376.10±9.98 ^a	372.35±4.43 ^{ab}
4 ^{ns}	338.85±8.62	353.35±6.13	350.60±11.52	368.60±1.83	340.35±19.72	357.60±19.10
5	312.60±13.93 ^b	324.85±9.50 ^{ab}	326.60±5.48 ^{ab}	323.10±4.04 ^{ab}	329.35±12.89 ^{ab}	345.10±9.71 ^a
6	295.10±8.70 ^d	313.85±10.53 ^{bc}	299.35±9.22 ^{cd}	318.85±5.38 ^b	337.60±4.97 ^a	313.35±8.42 ^{bcd}
7	268.60±13.29 ^{cd}	294.85±8.54 ^{ab}	260.35±7.14 ^d	287.60±9.97 ^{bc}	311.10±9.81 ^a	269.10±9.11 ^{cd}
8	258.60±6.68 ^{bc}	278.10±8.43 ^{ab}	246.10±14.39 ^c	262.10±15.8 ^{bc}	290.10±5.80 ^a	247.35±10.08 ^c
9	232.10±7.05 ^b	252.60±7.53 ^{ab}	234.10±7.42 ^b	248.10±12.37 ^{ab}	259.60±9.87 ^a	235.60±9.56 ^b

LTLT = เครื่องต้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อุณหภูมิต่ำกว่าเวลานาน, HTST = เครื่องต้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อุณหภูมิสูงเวลานสั้น, ตัวอย่างควบคุม = เครื่องต้มที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a,b,c,...) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

^{ns} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของแต่ละแถวในแนวนอนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4.20 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภครวมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

ระยะเวลาการเก็บ (สัปดาห์ที่)	ขวดแก้วใส			ขวดแก้วสีชา		
	LTLT	HTST	ตัวอย่างควบคุม	LTLT	HTST	ตัวอย่างควบคุม
0	1780.28±32.51 ^b	1834.44±31.10 ^b	1917.78±36 ^a	1780.28±32.51 ^b	1834.44±31.10 ^b	1917.78±36.00 ^a
1	1606.67±27.59 ^d	1685.83±26.60 ^{bc}	1695.56±31.75 ^{bc}	1635.83±29.87 ^{cd}	1744.17±27.73 ^{ab}	1788.61±28.46 ^a
2 ^{ns}	1569.17±35.82	1587.22±30.26	1587.22±34.69	1633.06±64.37	1630.28±34.36	1652.50±41.67
3	1480.28±32.83 ^{cd}	1553.89±26.64 ^{ab}	1520.56±36.71 ^{bcd}	1473.33±37.95 ^d	1603.89±29.57 ^a	1587.22±38.62 ^{ab}
4	1383.06±29.53 ^{ab}	1396.94±31.87 ^a	1321.94±33.45 ^b	1426.11±25.86 ^a	1445.56±37.68 ^a	1442.78±32.87 ^a
5	1353.80±27.78 ^{ab}	1302.50±32.20 ^b	1090.00±36.57 ^d	1384.40±36.57 ^a	1380.20±34.06 ^a	1198.30±36.43 ^c
6	1194.10±48.09 ^b	1202.50±31.22 ^{ab}	1088.60±25.41 ^c	1226.10±34.69 ^{ab}	1271.90±34.66 ^a	1162.20±23.57 ^{bc}
7	1138.60±31.22 ^c	1219.10±30.56 ^b	898.33±32.24 ^d	1181.60±44.10 ^{bc}	1324.70±34.06 ^a	971.94±36.96 ^d
8	1170.50±37.54 ^a	1234.40±38.76 ^a	873.33±31.75 ^b	1255.28±38.86 ^a	1208.00±27.73 ^a	928.89±23.57 ^b
9	953.89±41.20 ^{bc}	1095.50±31.10 ^a	849.72±34.36 ^c	1037.22±36.99 ^{ab}	1137.20±22.45 ^a	896.94±25.41 ^c

LTLT = เครื่องต้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อุณหภูมิต่ำกว่าเวลานาน, HTST = เครื่องต้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อุณหภูมิสูงเวลานาน, ตัวอย่างควบคุม = เครื่องต้มที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในจำนวน (a,b,c,...) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

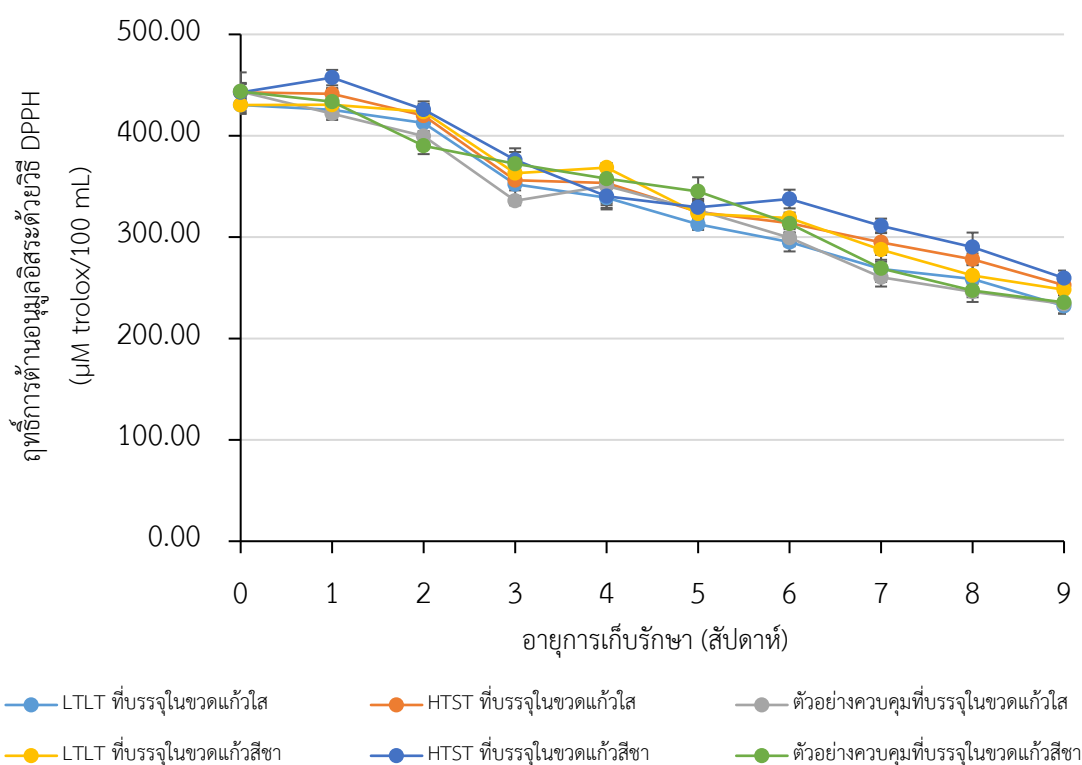
^{ns} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของแต่ละแถวในแถวเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคนผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานต่อ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 9 สัปดาห์ (รูปที่ 4.12 และ 4.13) พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ซึ่งมีแนวโน้มเชิงปริมาณไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือเมื่ออายุการเก็บเพิ่มขึ้นส่งผลให้ทุกตัวอย่างมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดลดลง อันเป็นผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลงด้วยเช่นกัน จากตารางที่ 4.19 พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วันสุดท้าย (สัปดาห์ที่ 9) ของตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชามีค่าเท่ากับ 232.10 ± 7.05 , 248.10 ± 12.37 , 252.60 ± 7.53 , 259.60 ± 9.87 , 234.10 ± 7.42 และ 235.60 ± 9.56 $\mu\text{M trolox}/100 \text{ mL}$ ตามลำดับ หรือลดลง 46.07, 42.35, 42.96, 41.38, 47.23 และ 46.89% ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เริ่มต้น ตามลำดับ โดยตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดสีชามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใส และตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTST ที่บรรจุในขวดแก้วสีชา ($p \leq 0.05$)

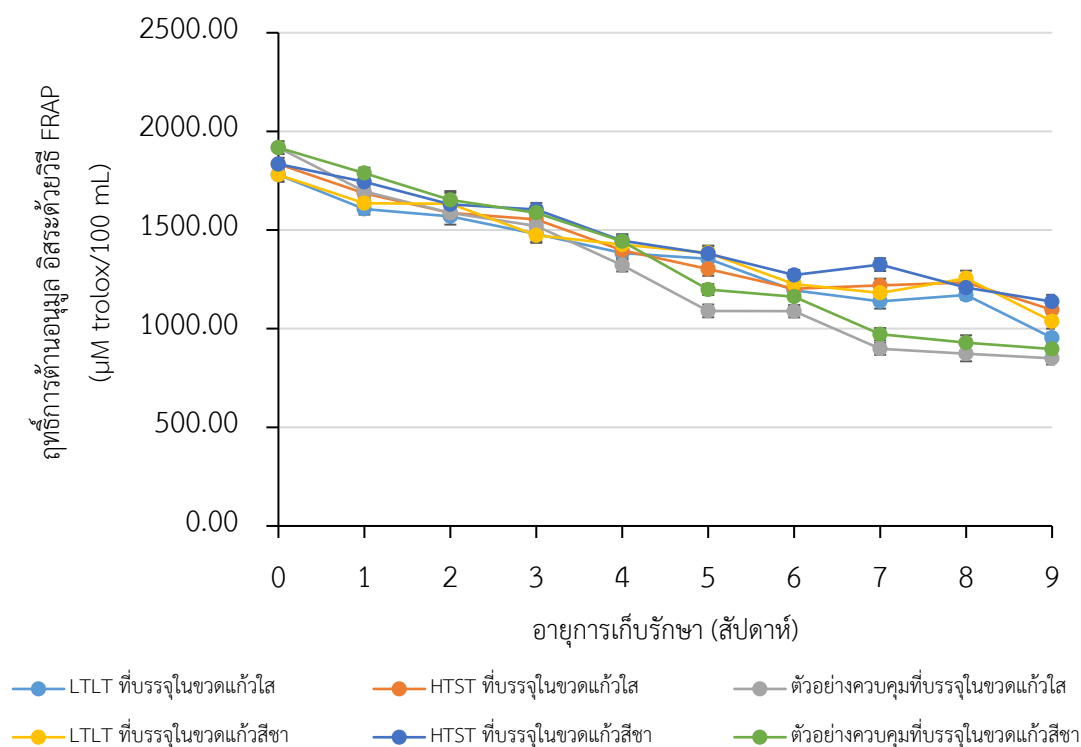
จากตารางที่ 4.19 แสดงข้อมูลฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ซึ่งวันสุดท้าย (สัปดาห์ที่ 9) ของการเก็บรักษา ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชามีค่าเท่ากับ 953.89 ± 41.20 , 1095.50 ± 31.10 , 1037.20 ± 9.62 , 849.72 ± 34.36 , 1137.20 ± 22.45 และ 896.94 ± 113.98 $\mu\text{M trolox}/100 \text{ mL}$ ตามลำดับ หรือลดลง 46.42, 41.74, 40.28, 38.01, 55.69 และ 53.23% ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เริ่มต้น ตามลำดับ โดยตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และไม่มีความแตกต่างกันกับตัวอย่างแบบ LTST ที่บรรจุในขวดแก้วสีชา ($p \leq 0.05$) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าชนิดของบรรจุภัณฑ์ไม่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Del-Toro-Sánchez และคณะ (2015) ที่พบว่าแสงและอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการเก็บ

รักษาสารสกัดจาก *Anemopsis californica* ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีขาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 60 วัน สามารถรักษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไว้ได้ถึง 90%

การลดลงของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระซึ่งทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP ระหว่างการเก็บรักษาเป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ PPO แต่ในตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) จึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ PPO ลดลง ซึ่งมีผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดน้อยลงด้วยเช่นกัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ ขวัญจิตต์ อนุกุล วัฒนา และ ขนิษฐา ศรีนวล (2561) ที่พบความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับสูงระหว่างฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP กับสารประกอบฟีนอลิก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.77 และ 0.79 ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารสำคัญที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในข้าวไรซ์เบอร์รี่



รูปที่ 4.12 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของเครื่องตีผสมนึ่งพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 4.13 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

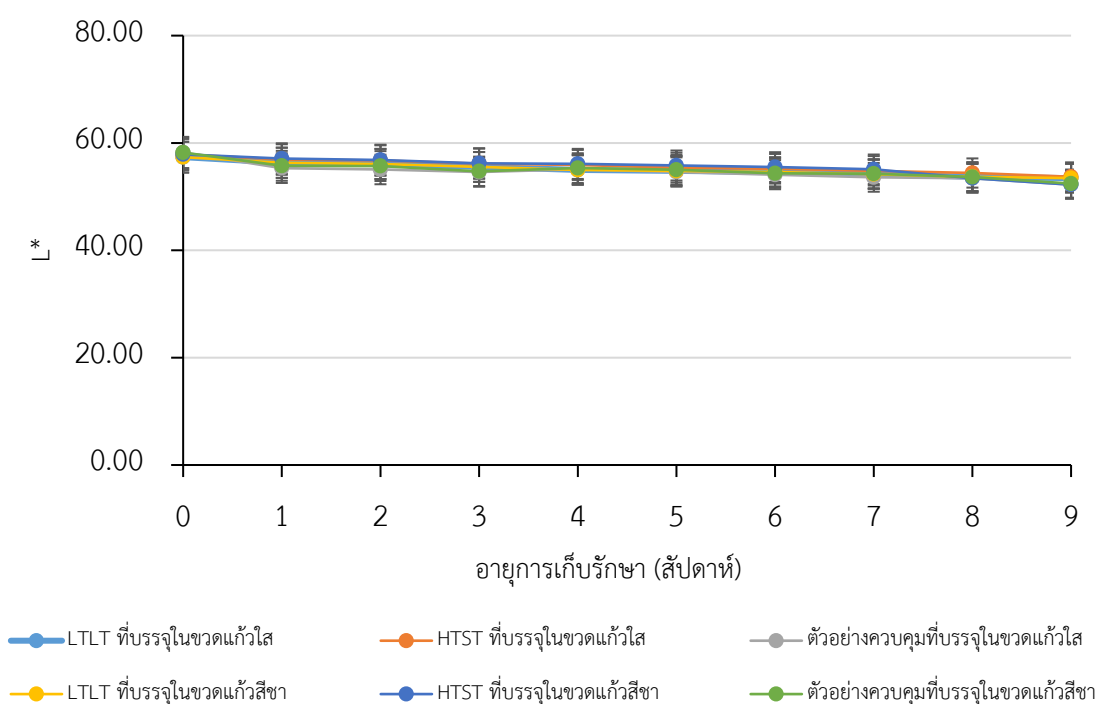
4.3.4 ค่าสี (L^* , a^* , b^* และ ΔE^*) ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษา

จากการศึกษาค่าคุณภาพทางด้านสีของของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) และไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งได้แก่ ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT และตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST มีค่า L^* (แสดงถึงค่าความสว่าง) เท่ากับ 57.36 ± 0.11 และ 57.89 ± 0.05 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม (58.22 ± 0.05) สำหรับค่า a^* ($-a^*$ แสดงค่าสีเขียว และ $+a^*$ แสดงค่าสีแดง) ของตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT และแบบ HTST มีค่าเท่ากับ 4.63 ± 0.09 และ 4.28 ± 0.10 ตามลำดับ และมีค่า b^* ($-b^*$ แสดงค่าสีน้ำเงิน และ $+b^*$ แสดงค่าสีเหลือง) เท่ากับ 61.97 ± 0.07 และ 60.85 ± 0.33 ตามลำดับ โดยค่า a^* และ b^* ของตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) มีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุม (4.03 ± 0.09 และ 60.3 ± 0.08 ตามลำดับ) ซึ่งหมายความว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์จะมีค่าสีแดงและสีเหลืองเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดจากคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีเขียวถูกทำ

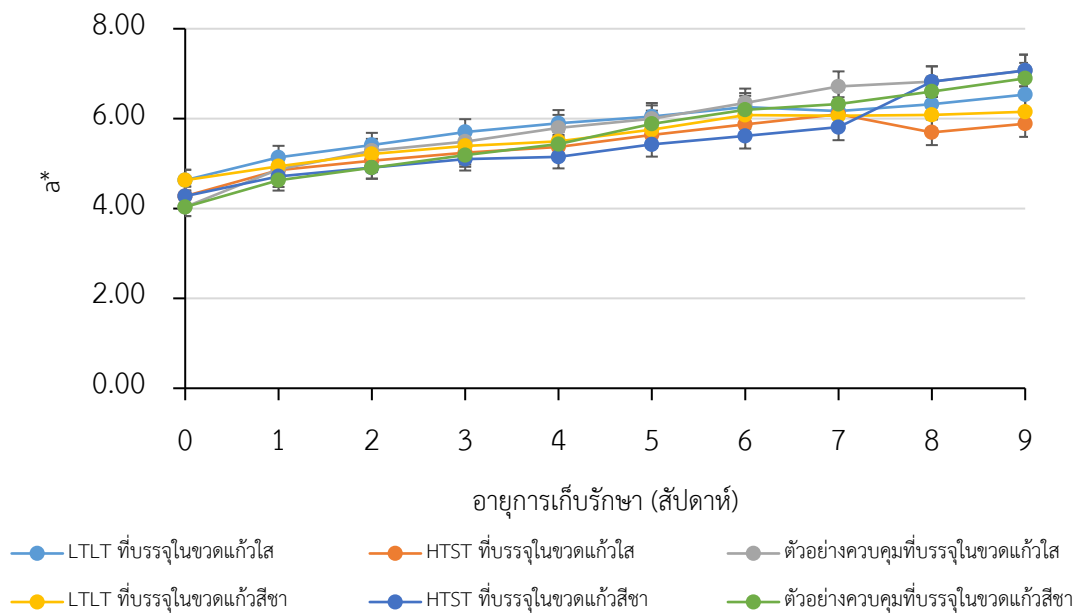
ให้เปลี่ยนเป็นฟิโอฟิติน (pheophytin) ซึ่งมีสีเขียวแก่หรือเป็นสีเขียวมะกอก เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของคลอโรฟิลล์ถูกเปลี่ยนไป โดยคลอโรฟิลล์เกิดการสูญเสียอะตอมของแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ซึ่งตรงกลางของโมเลกุลในโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไฮโดรเจน 2 อะตอม โดยปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นเมื่อคลอโรฟิลล์ทำปฏิกิริยากับกรด เช่น กรดอินทรีย์ที่เดิมในอาหารและ/หรือ เกิดจากการได้รับความร้อนเป็นเวลานาน (Simpson, 1985) ดังนั้นจึงพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT มีค่า L^* ต่ำกว่า และมีค่า a^* และ b^* สูงกว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าสีระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า ค่า L^* และ b^* ของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.14 และ 4.16 ตามลำดับ) โดยในสัปดาห์ที่ 9 ของการเก็บรักษาตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา มีค่า L^* เท่ากับ 57.36 ± 0.11 , 57.89 ± 0.05 , 58.22 ± 0.05 , 57.36 ± 0.11 , 57.89 ± 0.05 และ 58.22 ± 0.05 ตามลำดับ ในขณะที่ค่า a^* ของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.15) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้ค่า ΔE^* ของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยค่าสีที่เปลี่ยนแปลงไปจะสามารถเห็นความแตกต่างที่ชัดเจนได้เมื่อมีค่า $\Delta E^* > 3.00$ (Krapfenbauer และคณะ, 2006) จากรูปที่ 4.17 แสดงให้เห็นว่าในสัปดาห์ที่ 1-2 ตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใส และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุขวดแก้วสีชา มีค่า ΔE^* เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยในสัปดาห์ที่ 2 ตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใส และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วสีชา มีค่า ΔE^* เท่ากับ 3.91 ± 0.06 และ 3.13 ± 0.08 ตามลำดับ ขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา มีค่า ΔE^* อยู่ในช่วง 1.62-2.16 และเมื่อสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา (สัปดาห์ที่ 9) พบว่า ทุกตัวอย่างมีค่า ΔE^* อยู่ในช่วง 4.78-7.77 โดยตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใส มีค่า ΔE^* สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ลองลงมาก็คือตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วสีชา ทั้งนี้เป็นผลมาจากตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ จะมีแนวโน้มในการเกิดสีน้ำตาลได้มากกว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic browning reaction) โดยปัจจัยสำคัญที่เป็นตัวกำหนดอัตราการเกิดสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ คือ สมบัติเชิงปริมาณ และเชิงคุณภาพ ของสารประกอบฟีนอลและ PPO (polyphenol

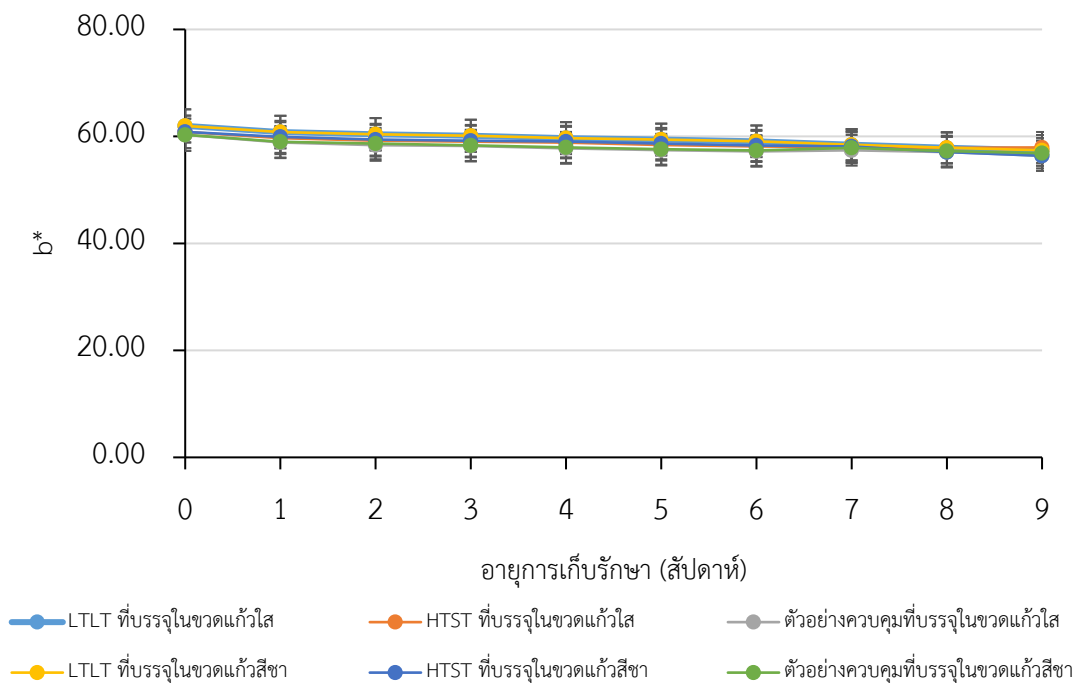
oxidase) ที่มีอยู่ในผักและผลไม้ รวมถึงค่าความเป็นกรด-ด่าง ออกซิเจน แสง และอุณหภูมิ (Martinez และ Whitaker, 1995) การเกิดสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์นี้ เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) สารประกอบฟีนอลไปเป็น o-quinone และเกิดพอลิเมอร์ไรซ์ (polymerized) ต่อจนได้สารเชิงซ้อนสีน้ำตาลโดยมี PPO เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Sapers, 1993) ขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์จะสามารถยับยั้งการทำงานของ PPO ได้ เนื่องจากความร้อนทำให้ PPO ซึ่งเป็นโปรตีนเกิดการเสียสภาพ (protein denaturation) และไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ Chutintrasri และ Noomhorm (2006) รายงานว่ากิจกรรมของ PPO ที่อยู่ภายในเซลล์สูญเสียไปมากกว่า 60% หลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 40-60 °C เป็นเวลา 30 นาที และสูญเสียไป 93% ที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 5 นาที และ 98.8% เมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 5 นาที



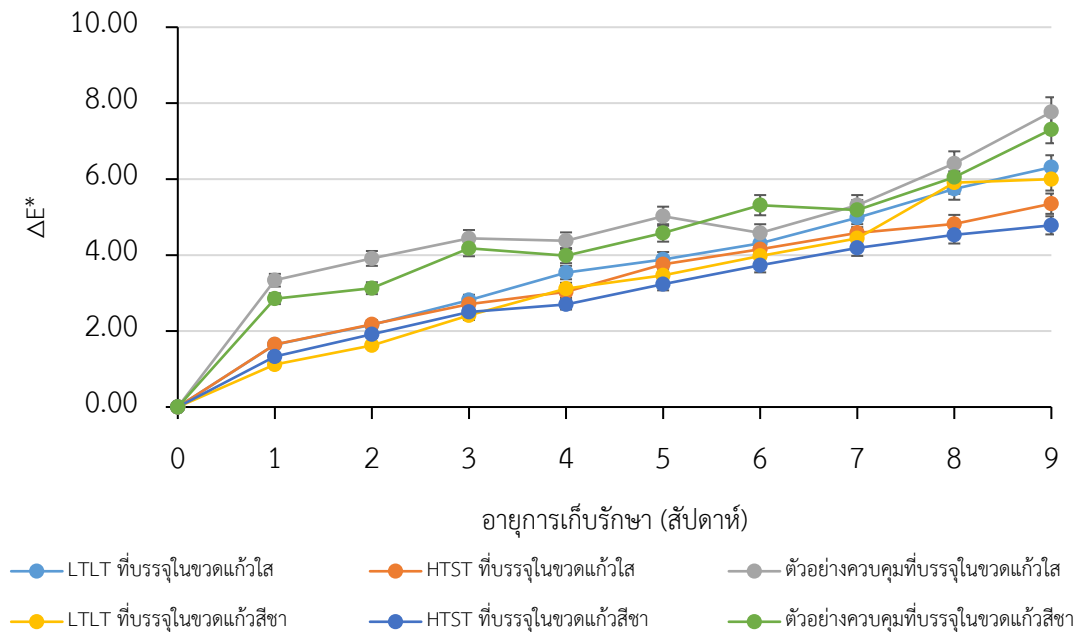
รูปที่ 4.14 ค่า L* ของเครื่องดื่มสมุนไพรร่วมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 4.15 ค่า a^* ของเครื่องตีผสมนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 4.16 ค่า b^* ของเครื่องตีผสมนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 4.17 ค่า ΔE^* ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

4.3.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษา

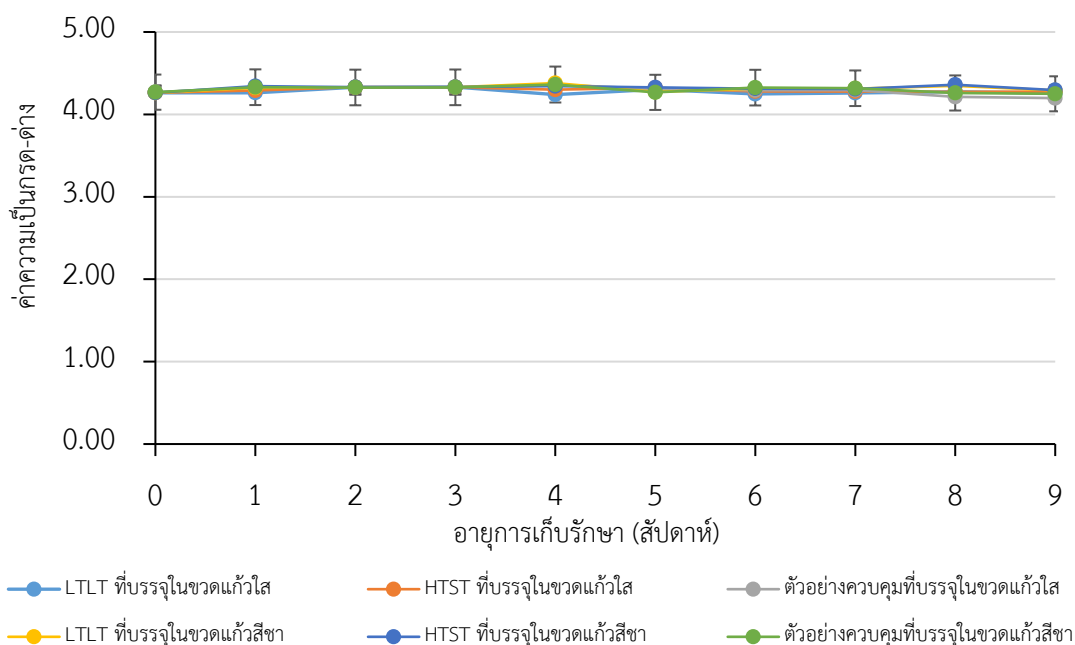
ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) และไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ ของทุกตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Saeeduddin และคณะ (2015) ที่ศึกษาอุณหภูมิและเวลาในการพาสเจอร์ไรซ์น้ำลูกแพร์ต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด โดยแปรอุณหภูมิและเวลาในการพาสเจอร์ไรซ์เป็น 2 ปัจจัย คือที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที และอุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที หลังผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ และพบว่าความร้อนในการแปรรูปไม่มีผลต่อพารามิเตอร์ทางกายภาพ โดยค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดทุกตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างที่เก็บรักษาที่ 4°C เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (สัปดาห์ที่ 0) ของตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีขา ตัวอย่างที่ผ่านการ

พาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา มีค่าอยู่ในช่วง 4.26-4.27 และมีค่าความเป็นกรด-ต่างลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น และพบว่าค่าความเป็นกรด-ต่างสุดท้าย (สัปดาห์ที่ 9) อยู่ในช่วง 4.25-4.30 แสดงให้เห็นว่าตลอดอายุการเก็บรักษา ค่าความเป็นกรด-ต่าง มีแนวโน้มคงที่ในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 4.18 ขณะที่ Zhao และคณะ (2013) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ต่างในระหว่างการเก็บรักษาของน้ำแตงกวา ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 50 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ต่างของน้ำแตงกวามีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการเติบโตของจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น อันเป็นผลมาจากการผลิตกรดของจุลินทรีย์จึงส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ต่างลดลง นอกจากนี้จากการศึกษาของ Davidov-Pardo และคณะ (2010) ได้อธิบายความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรด-ต่างกับสารประกอบฟีนอลิก ว่า ค่าความเป็นกรด-ต่างมีผลต่อความเสถียรของสารประกอบฟีนอลิก โดยไอโซเมอร์และโพลีเมอร์มีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรด-ต่างระหว่าง 4-5 ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ต่างของทุกตัวอย่างในช่วง 4.25-4.30 จึงช่วยป้องกันการสูญเสียสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างได้ถึง 50% ของปริมาณเริ่มต้น เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 9 สัปดาห์

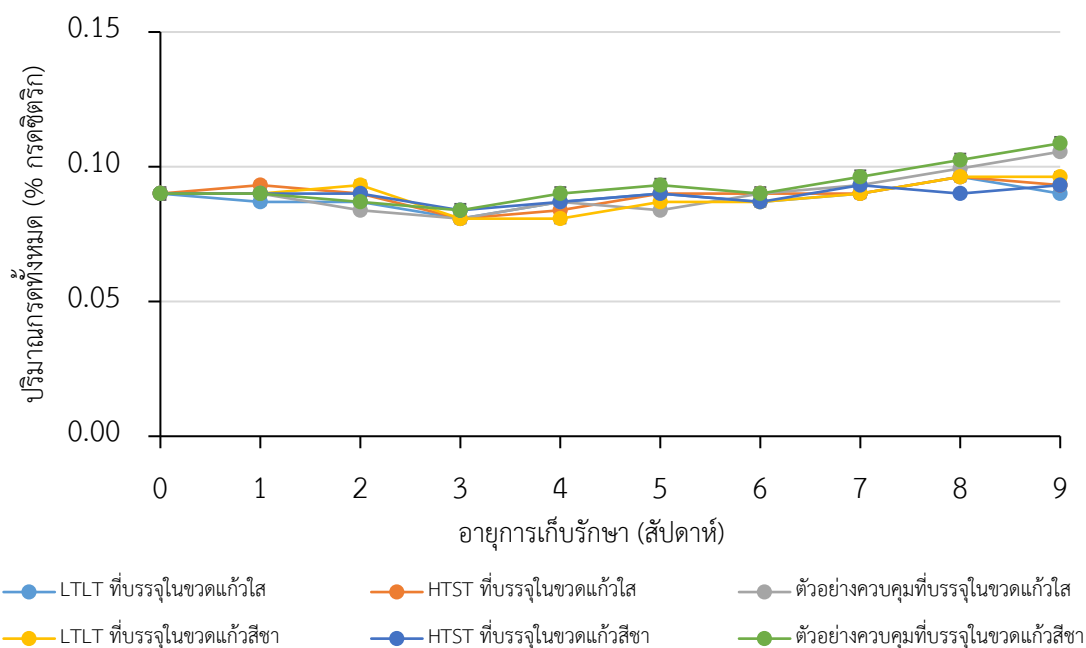
สำหรับปริมาณกรดทั้งหมดของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) และไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ ในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชาเริ่มต้น (สัปดาห์ที่ 0) มีค่าเท่ากับ 0.09% กรดซิตริก จากรูปที่ 4.19 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมดของทุกตัวอย่างระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 9 สัปดาห์ โดยพบว่าปริมาณกรดทั้งหมดในทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษาในช่วง 6-9 สัปดาห์ ซึ่งเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่มีอายุการเก็บรักษา 9 สัปดาห์มีปริมาณกรดทั้งหมด อยู่ในช่วง 0.09-0.11% กรดซิตริก โดยตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วสีชามีปริมาณกรดทั้งหมดสูงที่สุด

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของตัวอย่างที่เก็บรักษาที่ 4 °C เป็นเวลา 9 สัปดาห์ แสดงในรูปที่ 4.20 โดยพบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใส และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วสีชา มีแนวโน้มลดลงระหว่างการเก็บรักษาในช่วง 5-9 สัปดาห์ โดยมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดสุดท้าย (สัปดาห์ที่ 9) เท่ากันคือ 0.63 °Brix ขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ LTLT และ

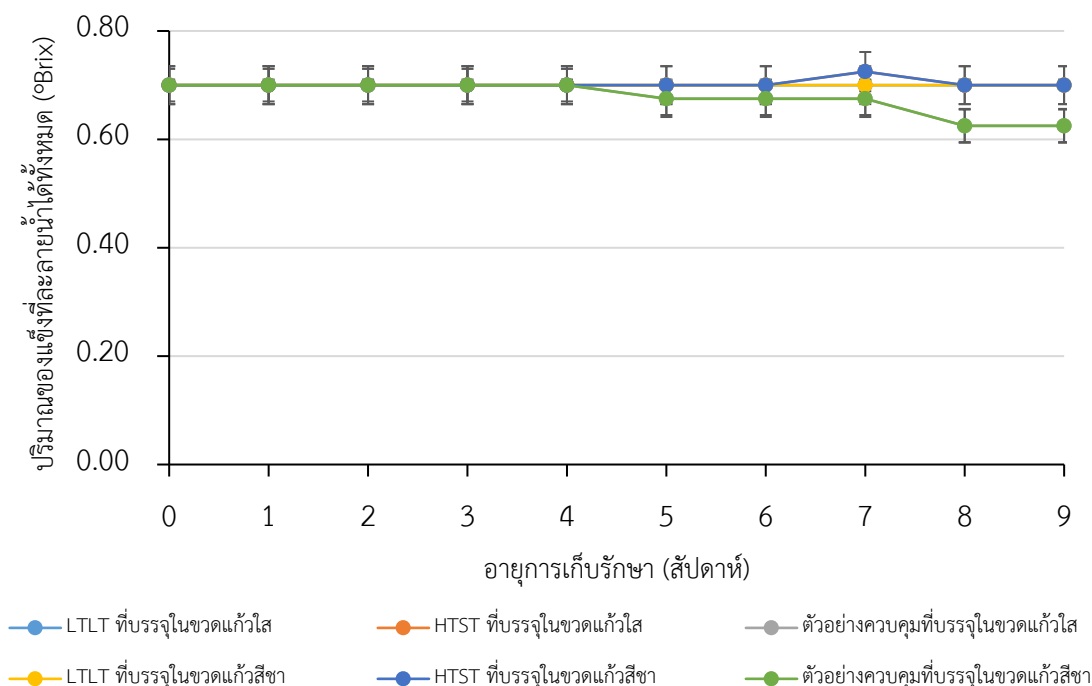
ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แบบ HTST ในบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.70 °Brix



รูปที่ 4.18 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเครื่องดื่มสมุนไพรร่วมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 4.19 ปริมาณกรดทั้งหมดของเครื่องดื่มสมุนไพรร่วมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 4.20 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของเครื่องตีผสมนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

4.3.6 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา ปริมาณ *E. coli* และ coliform ของเครื่องตีผสมนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษา

การเสื่อมเสียของอาหารทำให้เกิดรสเปรี้ยวที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับในผลิตภัณฑ์อาหารรสเปรี้ยวที่เกิดขึ้นนั้นส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย (bacteria) รา (mold) และ ยีสต์ (yeast) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถสลายคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันในอาหาร ทำให้เกิดโมเลกุลที่มีขนาดเล็กหลายชนิด เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids) ซึ่งได้แก่ กรดแลคติก (lactic acid) และกรดอะซิติก (acetic acid) (Donald, 2002) ทั้งนี้เกณฑ์การเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร กำหนดให้อาหารมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์และราไม่เกิน 1.00×10^5 และ 5.00×10^3 CFU/mL ตามลำดับ (Yeoboah และคณะ, 2010; กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560) รวมถึง *E. coli* และ coliforms ในตัวอย่างต้องไม่เกิน 2.2 MPN/100 mL (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2562)

การแปรรูปเครื่องตีผสมนไพรพร้อมบริโภคมผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานด้วยการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) ส่งผลให้ไม่พบจุลินทรีย์ รวมถึงยีสต์และรา ในตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ เนื่องจากการแปรรูปด้วยความร้อนแบบการพาสเจอร์ไรซ์

สามารถการยับยั้งเอนไซม์และเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและการเสื่อมเสียคุณภาพอาหารได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Noci และคณะ (2008) ที่ศึกษาผลของการพาสเจอร์ไรซ์น้ำแอปเปิ้ล และพบว่า การพาสเจอร์ไรซ์น้ำแอปเปิ้ลช่วยลดจำนวนของจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะการพาสเจอร์ไรซ์อุณหภูมิสูงเวลาสั้นที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 15 วินาที สามารถลดจุลินทรีย์ได้ถึง 6 log นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบจุลินทรีย์ ยีสต์ และรา ในตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสารพฤกษเคมี (สารประกอบฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์) ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาจมีส่วนช่วยในการลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในตัวอย่าง รวมถึงสภาวะที่ตีในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยเฉพาะการเตรียมน้ำชาใบหม่อนซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีมากกว่า 95% ของตัวอย่าง ถูกเตรียมด้วยความร้อนสูงถึง 95 °C ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mena และคณะ (2012) รายงานว่า การพาสเจอร์ไรซ์น้ำทับทิมด้วยความร้อน 65-90 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 5 วินาที สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ของน้ำผลไม้ได้

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) และตัวอย่างควบคุม ในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าชนิดของบรรจุภัณฑ์ไม่ส่งต่อปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษา จากรูปที่ 4.21 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) เริ่มตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเมื่อมีอายุการเก็บรักษามากกว่า 3 สัปดาห์ ขณะที่ตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ มีการเจริญของจุลินทรีย์ตั้งแต่ในสัปดาห์แรกของการเก็บรักษา เมื่อสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา (สัปดาห์ที่ 9) พบว่า ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) ในบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิด มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 3.55-3.70 log CFU/mL ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ขณะที่ตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใส และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วสีชา มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.03 และ 4.05 log CFU/mL ตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษามีค่าไม่เกินมาตรฐาน (5 log CFU/mL)

จากการศึกษาผลของการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมต่อปริมาณยีสต์และราของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 9 สัปดาห์ ในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา พบว่าชนิดของบรรจุภัณฑ์ไม่มีผลต่อปริมาณยีสต์และราอย่างมี

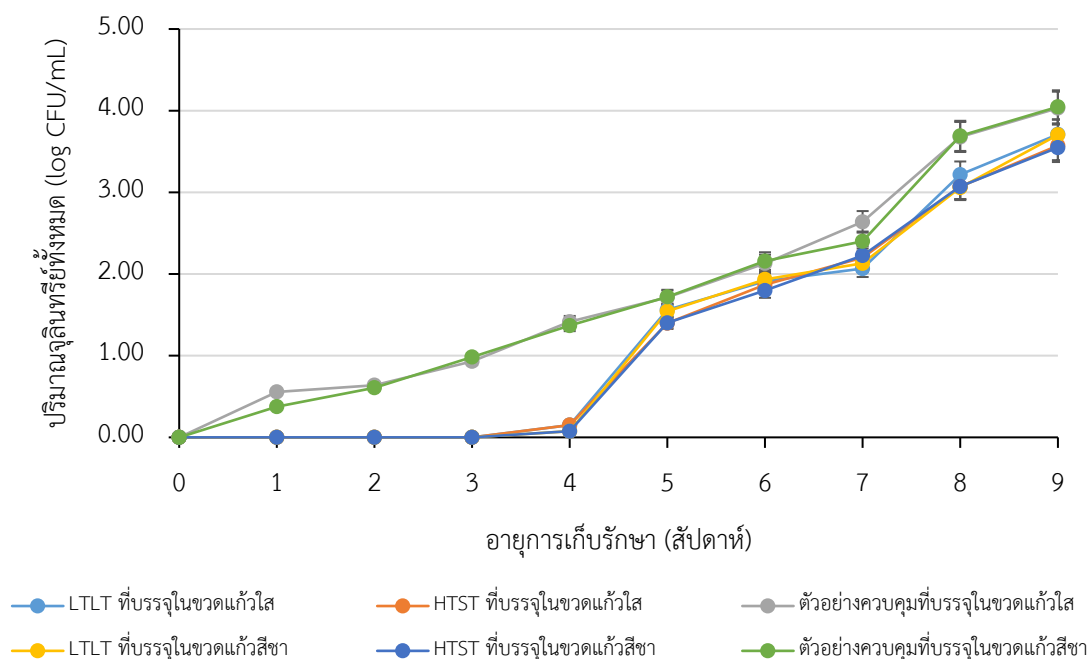
นัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยพบว่าปริมาณยีสต์และราของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้น จากรูปที่ 4.22 พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์เริ่มมีการเจริญของยีสต์และราในสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป ขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีการเจริญของยีสต์และราตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ของการเก็บรักษา โดยตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใส และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วสีขามีปริมาณยีสต์และราในสัปดาห์ที่ 6 เท่ากับ 4.29 และ 4.33 log CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณการปนเปื้อนสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน (3.70 log CFU/mL) ขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) ในบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดมีปริมาณยีสต์และราไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานในระหว่างการเก็บรักษา 1-8 สัปดาห์ โดยเมื่อสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา (สัปดาห์ที่ 9) ทุกตัวอย่างมีปริมาณยีสต์และราอยู่ในช่วง 3.90-5.69 log CFU/mL โดยตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วใส และตัวอย่างควบคุมที่บรรจุในขวดแก้วสีขามีปริมาณยีสต์และราสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ *E. coli* และ coliforms ในตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรร่วมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 9 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.21) พบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณ *E. coli* และ coliforms < 3 MPN/mL ตลอดอายุการเก็บรักษา (สัปดาห์ที่ 0-9) โดย *E. coli* และ coliform เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง (Gram negative rod) จัดอยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ซึ่งสามารถพบเชื้อได้ทั่วไปในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น รวมถึงในดิน และน้ำ ด้วยเหตุนี้ *E. coli* จึงมีความสำคัญในการเป็นตัวชี้วัดสุขลักษณะของอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Rompré และคณะ, 2002)

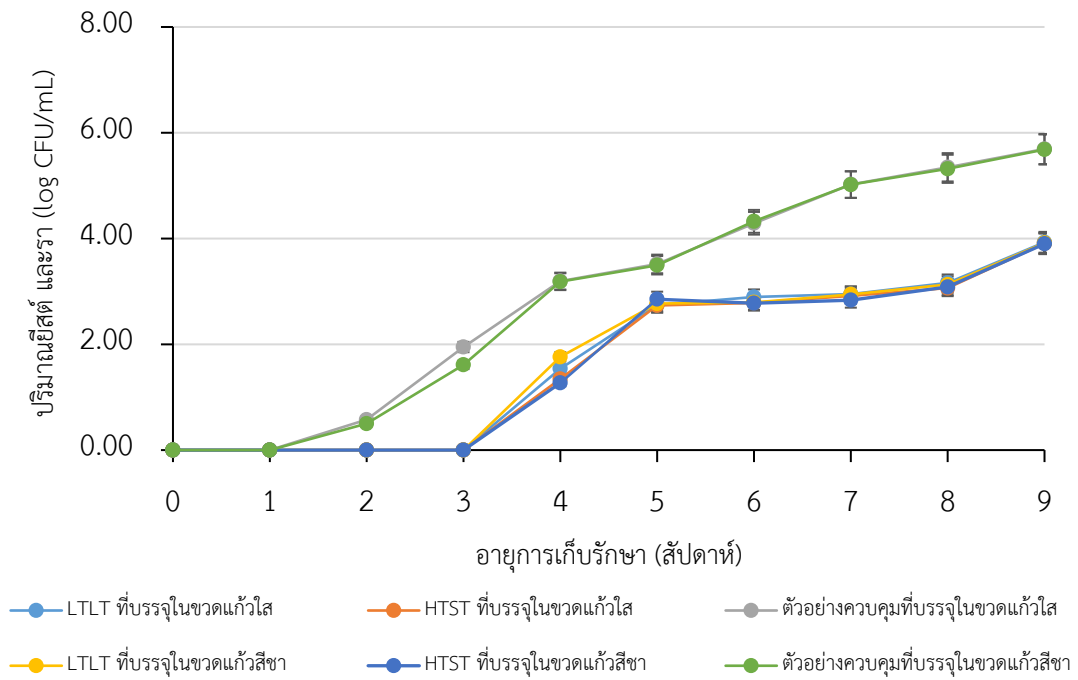
เมื่อพิจารณาจากปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดร่วมกับปริมาณยีสต์และรา พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) ในบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิด มีอายุการเก็บรักษาได้นานถึง 8 สัปดาห์ ในขณะที่ตัวอย่างควบคุม ในบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดจะมีอายุการเก็บรักษาได้เพียง 5 สัปดาห์เท่านั้น ที่อุณหภูมิ 4 °C

การแปรรูปด้วยความร้อนมีผลต่ออัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา โดยจะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์จะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ช้ากว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ทั้งนี้อาจเป็นผลจากปริมาณสารประกอบฟีนอลและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในตัวอย่าง ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีสมบัติในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่เนื่องจากความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลในตัวอย่างอาจไม่เพียงพอที่จะฆ่าจุลินทรีย์ จึงทำได้เพียงยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

บางส่วนเท่านั้น ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น (Tajkarimi และคณะ, 2010) อีกทั้งค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง 4.26-4.30 และ 0.63-0.70 °Brix ตามลำดับ จึงเป็นข้อจำกัดของชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถรอดชีวิตหรือเจริญได้ ซึ่งหากผลิตภัณฑ์อาหารมีค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.0 จะมีส่วนช่วยในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ เช่น *Enterobacteriaceae*, *Salmonella typhimurium* รวมถึงแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ เช่น *Enterotoxigenic Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* และ *Shigella flexneria* เป็นต้น (Taylor, 2004) จากปัจจัยต่างๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้นส่งผลให้สามารถยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบได้ยาวนานมากยิ่งขึ้น โดยตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) ในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา มีอายุการเก็บรักษาสูงสุด (8 สัปดาห์) โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และปริมาณ *E. coli* และ coliforms ไม่เกินกำหนดมาตรฐาน



รูปที่ 4.21 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 4.22 ปริมาณยีสต์และราของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

ตารางที่ 4.21 ปริมาณ *E. coli* และ coliform ของเครื่องดื่มสมุนไพรอบมบริโกผสมสารสกัดจากใบเจียวฤๅษะระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

ระยะเวลาการเก็บ (สัปดาห์ที่)	ปริมาณ <i>E. coli</i> และ coliform (MPN/mL)					
	ขวดแก้วใส			ขวดแก้วสีชา		
	LTLT	HTST	ตัวอย่างควบคุม	LTLT	HTST	ตัวอย่างควบคุม
0	<3	<3	<3	<3	<3	<3
1	<3	<3	<3	<3	<3	<3
2	<3	<3	<3	<3	<3	<3
3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
4	<3	<3	<3	<3	<3	<3
5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
6	<3	<3	<3	<3	<3	<3
7	<3	<3	<3	<3	<3	<3
8	<3	<3	<3	<3	<3	<3
9	<3	<3	<3	<3	<3	<3

LTLT = เครื่องดื่มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อุณหภูมิต่ำกว่าเวลานาน, HTST = เครื่องดื่มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อุณหภูมิสูงเวลานสั้น, ตัวอย่างควบคุม = เครื่องดื่มที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย และวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ซึ่งพิจารณาจากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP โดยปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยความเข้มข้นของเอทานอล (60, 70 และ 80% v/v) เวลา (10, 20 และ 30 นาที) และความเข้มข้นของแอมพลิจูด (30, 40 และ 50%) พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใบเจียวกู่หลานต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย คือ ความเข้มข้นเอทานอล 69.30% v/v เวลา 20.51 นาที และความเข้มข้นแอมพลิจูด 41.31% ซึ่งสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานที่ภาวะนี้ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 590.82 และ 808.54 μM trolox/100 g dry wt. ตามลำดับ และเพื่อให้ง่ายต่อการทดลองจึงทำการประมาณค่าภาวะในการสกัดเป็น ความเข้มข้นเอทานอล 69.30% v/v เวลาในการสกัด 20.50 นาที และความเข้มข้นของแอมพลิจูด 40% มาใช้ในการศึกษาการพัฒนาเครื่องตีผสมสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานในการทดลองต่อไป

การพัฒนาเครื่องตีผสมสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานพัฒนาโดยผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 0-3% v/v ในชาใบหม่อน (กำหนดสารให้ความหวานซูคราโลส 0.01% w/v และกรดซิตริก 0.08% w/v) และศึกษาสมบัติทางเคมี กายภาพ จุลินทรีย์ และคุณภาพทางประสาทสัมผัส ผลการทดลองพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของทุกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง 210.44-401.00 mg GAE/100 mL, 21.13-46.00 mg QCE/100 mL, 297.63-392.47 μM trolox/100 mL และ 1047.41-1658.52 μM trolox/100 mL ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างที่เติมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน 3% v/v มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำได้ทั้งหมดของทุกตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) นอกจากนี้จากผลการทดสอบของค่าสีแสดงให้เห็นว่าค่า ΔE^* เพิ่มขึ้นเมื่อสารสกัดจากเจียวกู่หลานในน้ำชาใบหม่อนมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าคะแนนความชอบโดยรวมของตัวอย่างที่เติมสารสกัดเจียวกู่หลาน 1 และ 1.5% v/v ได้รับคะแนนความชอบโดยรวมมากกว่า 6 (อยู่ในเกณฑ์ชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง) จากสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสจึงพิจารณาเลือกตัวอย่างที่เติมสารสกัดเจียวกู่หลาน 1.5% v/v เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการแปรรูปด้วยความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบ พบว่าตัวอย่างควบคุม (ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์) มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP สูงกว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ทุกตัวอย่างมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ค่าสี (L^* , a^* และ b^*) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และ ปริมาณ *E. coli* และ coliforms ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการแปรรูปด้วยความร้อนและผลของบรรจุภัณฑ์ต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ของเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดเจียวกุหลาบระหว่างการเก็บรักษาอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำได้ทั้งหมด ของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มลดลงตลอดอายุการเก็บรักษา ในขณะที่ค่า ΔE^* ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา และจากการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์และรา พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ (แบบ LTLT และแบบ HTST) ในบรรจุภัณฑ์ทั้งสองมีอายุการเก็บรักษาได้นานถึง 8 สัปดาห์ แต่ตัวอย่างควบคุม ในบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดจะมีอายุการเก็บรักษาได้เพียง 5 สัปดาห์เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณ *E. coli* และ coliforms < 3 MPN/mL ตลอดอายุการเก็บรักษา เมื่อพิจารณาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ พบว่าเครื่องต้มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกุหลาบที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิสูงเวลาสั้น (HTST) ที่บรรจุในขวดแก้วสีชาที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ดีที่สุด โดยการประยุกต์ใช้สารสกัดจากใบเจียวกุหลาบควรระวังเรื่องการเปลี่ยนแปลงของสีและรสขมจากสารสกัดเจียวกุหลาบ

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ชนิดของตัวทำละลาย อัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง และอุณหภูมิในการสกัด เป็นต้น รวมถึงยังขาดผลการเปรียบเทียบของการใช้เครื่องมืออัลตราซาวด์ชนิดโพรบ และอัลตราซาวด์ชนิดอ่าง นอกจากนี้งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น หากต้องการนำข้อมูลไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมจริงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เอกสารอ้างอิงภาษาไทย

กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. (2548). *แนวทางการผลิตวัตถุดิบปัญจชั้นใน*
กรมวิทยาศาสตร์บริการ. กรุงเทพฯ: ร้านพุ่มทอง.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2560). ประกาศเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยา
ของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 [ออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb/wp-content/uploads/2017/Publish/e-book/micro-ISBN60.pdf> [3 พฤศจิกายน 2563].

กรมหม่อนไหม. (ม.ป.ป.). พันธุ์หม่อน-ไหม พันธุ์ดี. กรุงเทพฯ: กรมหม่อนไหม.

กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 349) พ.ศ. 2556 เรื่อง วิธีการผลิต
เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิตและการเก็บรักษาอาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทชนิดที่มี
ความเป็นกรดต่ำ และชนิดที่ปรับกรด. ราชกิจจานุเบกษาเล่มที่ 130, ตอนพิเศษ 24. (ลงวันที่
20 กุมภาพันธ์ 2556)

กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลยาณ. (2560). การสกัดและวิธีวัดความสามารถ
การต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระ
เกียรติ*, (3)1; 86-94.

กิติพงศ์ อัครกุล และ นฤมล หิมะสุทธิเดช. (2560). ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งการ
เจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากหัวหอมและการประยุกต์ใช้น้ำผักและผลไม้ผสม.
วารสารเทคโนโลยีการอาหารมหาวิทยาลัยสยาม, 12(1); 71-83.

ขวัญจิตต์ อนุกุลวัฒนา และ ชนิดฐา ศรีนวล. (2561). ผลของการแปรรูป การเก็บรักษา และการให้
ความร้อนซ้ำต่อปริมาณและประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของข้าวพร้อมบริโภคบรรจุถุงรี
ทอร์ต. *วารสารวิจัยและพัฒนา มจร.*, 41(3); 299-309.

จรัล ทรัพย์เสรี (2009). DOE ตอน Central Composite Design. For Quality, 16(145); 72-74.

จรรย์ บันสิทธิ์ และ สุทธิดา ไชยราช (2547). การสำรวจเบื้องต้นในการผลิตวัตถุดิบสมุนไพร
ปัญจชั้นในพื้นที่ จ.เชียงใหม่. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

จิตรลดา เหมรา. (2558). *สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural product)*. โครงการวิทยาศาสตร์
ชีวภาพ, กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

- ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์. (2556). *เจียวกู่หลาน* [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=2411 [18 มีนาคม 2563]
- ประเสริฐ ศรีไพโรจน์. (2528). เทคนิคทางเคมี. มหาสารคาม: ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม.
- เย็นจิตร เตชะดำรงสิน. (2547). ข้อมูลสำคัญของพืชสมุนไพรเป้าหมาย (โดยย่อ). *เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องการพัฒนาวัตถุดิบและการแปรรูปสมุนไพรจีนในท้องถิ่น 31 มกราคม-1 กุมภาพันธ์ 2547*, นครราชสีมา.
- วรัญญา วงศ์วานิช และ กิตติชัย บรรจง. (2559). ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดน้ำมันเมล็ดองุ่นด้วยวิธีการแช่และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยสกัด. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 34(3); 9-21.
- วิชุดา จันทร์ข้างแรม. (2561). ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากหม่อน (*Morus alba* Linn.) และกาวไหม (*Bombyx mori*.) เพื่อการตั้งสูตรตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงผิวขาว (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์). สระแก้ว: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- วิทยา บุญวรพัฒน์. (2554). *สารานุกรมสมุนไพรไทย-จีนที่ใช้บ่อยในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: ส.จิตกรการพิมพ์.
- สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2548). *ปัญจพันธ์ Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino. กรุงเทพฯ: 1241 มิราคูลิส จำกัด.
- สรกนก วิมลมั่งคั่ง และ วริษา พงศ์เรขานนท์. (2560). *สมุนไพรเจียวกู่หลานกับฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด*. คณะเภสัชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2556). วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิตและการเก็บรักษาอาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทชนิดที่มีความเป็นกรดต่ำ และชนิดที่ปรับกรด ฉบับที่ 349 [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_fda/4_No349.pdf [15 พฤศจิกายน 2563]
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2562ข). คู่มือรายการตรวจวิเคราะห์อาหารควบคุมเฉพาะและอาหารกำหนดคุณภาพมาตรฐาน 9 ประเภท เพื่อประกอบการขออนุญาต [ออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www.fda.moph.go.th/sites/food/Permission/1.2-Lab_Dmsc.pdf [31 พฤษภาคม 2564].

อรสา ดิสถาพร. (2551). เอกสารวิชาการ เรื่อง การพัฒนาพืชสมุนไพรจีนในประเทศไทย. สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร, กรมส่งเสริมการเกษตร.

อากาศกรณ จันทร์ปรีกษ์, พัชราภรณ์ ดำนิล และ อมรรัตน์ หงส์ผัวัย (2561). ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันจากกากกาแฟ (โรบัสต้า/อะราบิก้า) ด้วยเฮกเซนโดยใช้วิธีหยาดพื้นผิวตอบสนอง. *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, 28(4); 799-811.

เอนก หาลี และ บุญยกฤต รัตนพันธุ์ (2560). การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน 15 ชนิด. *วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี*, 40(2); 283-293.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษ

- Ak, T. and Gülçin, I. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 174(1); 27-37.
- Al-Dhabi, N. A., Ponmurugan, K. and Maran Jeganathan, P. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34; 206-213.
- Anaya-Esparza, L. M., Ramos-Aguirre, D., Zamora-Gasga, V. M., Yahia, E. and Montalvo-González, E. (2018). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Justicia spicigera* leaves. *Food Science and Biotechnology*, 27(4); 1093-1102.
- Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102(4); 1233-1240.
- Atanassova, M. and Bagdassarian, V. (2009). Rutin content in plant products. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 44(2); 201-203.
- Aurora, A. S. (2005). Sugars and sweeteners in foods. *Food Safety and Technology*, 1-7.
- Awotedu, O. L., Okeke, U. E., Ogunbamowo, P. O., Ariwoola, O. S and Omolola, T. O. (2020). Extraction of phytochemical compounds of *Leea guineensis* (G. Don) leaves using non-polar and polar solvents. *European Journal of Medicinal Plants*, 31(2); 24-31.
- Belwal, T., Ezzat, S., Rastrelli, L., Bhatt, I., Daglia, M., Baldi, A., Hari Prasad Devkota, Orhan, I., Patra, J., Gitishree Das, Anandharamakrishnan, C., Gómez-Gómez, L., Nabavi, S. F., Nabavi, S. and Atanasov, A. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *Trends in Analytical Chemistry*, 100; 82-102.

- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “ antioxidant power” : The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1); 70-76.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., and Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5); 965-977.
- Box, G. E. P. and Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2; 455-475.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Science and Technology*, 28(1); 25-30.
- Brecht, J. K., Ritenour, M. A., Haard, M. F. and Chism, G. W. 2008. Postharvest physiology of edible plant tissues. *Fennema's Food Chemistry* (Ed O.R. Fennema, S. Damodaran and K.L. Parkin). Dekker. New York. Ch. 17.
- Bulotta, S. C., Lepore, M., Massimo, S., Montalcini, T., Pujia, A. and Russo, D. (2014). Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine*, 12(1); 1-9.
- Chan, S. W., Lee, C. Y., Yap, C. F., Wan Aida, W. M. and Ho, C. W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16; 203-213.
- Choe, E. and Min, D. B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(4); 345-358
- Chutintrasri, B. and Noomhorm, A. (2006). Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. *Food Science and Technology*, 39(5); 492-495.
- Cornelli, U. (2009). Antioxidant Use in Nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*, 27(2); 175-94.

- Davey, M. W., Van Montagu, M., Dirk, I., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I., Strain, J., Favell, D. and Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80; 825-860.
- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I. and Marín-Arroyo, M. R. (2010). Stability of polyphenolic extracts from grape seeds after thermal treatments. *European Food Research and Technology*, 232(2); 211-220.
- Del-Toro-Sánchez, C. L., Gutiérrez-Lomelí, M., Lugo-Cervantes, E., Zurita, F., Robles-García, M. A., Ruiz-Cruz, S., Antonio Aguilar, J., Morales-Del Rio, J. A. and Guerrero-Medina, P. J. (2015). Storage effect on phenols and on the antioxidant activity of extracts from *Anemopsis californica* and inhibition of elastase enzyme. *Journal of Chemistry*, 2015; 1-8.
- Devanand, L. and Mukhopadhyay, L. (2006). Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1); 41-47.
- Dhawan, V. (2014). Chapter 2 reactive oxygen and nitrogen species: General considerations, 27-47.
- Donald F. H. (2002). Methods and devices for detecting microbial spoilage in food products. *United States Patent Wallach*, 1-9.
- Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G. and Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35; 100547. doi : <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S. and dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytical Chimica Acta*, 597; 179-186.

- Flora, S. J. S. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(4); 191-206.
- Ganeshpurkar, A. and Saluja, A. K. (2017). The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2); 149-164.
- Gregory, S. K. (2011). Quercetin. *Alternative Medicine Review*, 16(2); 172-194.
- Gutteridge, J. M. And Halliwell, B. (1992). Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine. *Free Radical Biology and Medicine*. 12; 93-5.
- Hallam, P.C.H. (2001). Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?. *Journal of the Science Food Agriculture*, 81; 842-852.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, 31(4); 261-272.
- Halliwell, B. (2001). Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-7.
- Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G. and Rakesh, D. D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants [online]. Retrieved from https://www.unido.org/fileadmin/user_media/Publications/Pub_free/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants.pdf [7 Sep 2020].
- Hemwimol, S., Pavasant, P. and Shotipruk, A. (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13; 543-548.
- Hwang, E. S. and Kim, G. H. (2007). Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology*, 229(1-2); 1-10.
- Iannitti, T. and Palmier, B. (2009). Antioxidant therapy effectiveness: An up to date. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 13; 245-278.

- Ivana, M. S. G., Ivan M. S., Nikolic, V. D. (2018). Modelling and optimization of quercetin extraction and biological activity of quercetin-rich red onion skin extract from southeastern Serbia. *Journal of Food and Nutrition Research*, 57(1); 15-26.
- Jamwal, K., Bhattacharya, S. and Puri, S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9; 26-38.
- Jang, H., Lee, J. W., Lee, C., Jin, Q., Lee, M. K., Lee, C. K., Lee, M. K and Hwang, B. Y. (2016). Flavonol glycosides from the aerial parts of *Gynostemma pentaphyllum* and their antioxidant activity. *Archives of Pharmacal Research*, 39(9); 1232-1236.
- Katsube, T., Imawaka, N., Kawano, Y., Yamazaki, Y., Shiwaku, K. and Yamane, Y. (2006). Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chemistry*, 97(1); 25-31.
- Kebede, M. and Admassu, S. (2019). Application of antioxidants in food processing industry: Options to improve the extraction yields and market value of natural products. *Advances In Food Technology and Nutritional Sciences - Open Journal*, 5(2); 38-49.
- Kim, J. H., Shin, H. K., and Seo, C. S. (2014). Optimization of the extraction process for the seven bioactive compounds in Yukmijihwang-tang, an herbal formula, using response surface methodology. *Pharmacognosy Magazine*, 10(39); 606-613.
- Kim, J. W., Kim, S. U., Lee, H. S., Kim, I., Ahn, M. Y. and Ryu, K.S. (2003). Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9 fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1002; 93-99.
- Kleiman, M., Ryu, K. A. and Esser-Kahn, A. P. (2015). Determination of factors influencing the wet etching of polydimethylsiloxane using tetra-

- butylammonium fluoride. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 217(2); 284-291.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A. and Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2); 1-24.
- Krapfenbauer, G., Kinner, M., Gossinger, M., Schonlechner, R. and Berghofer, E. (2006). Effect of thermal treatment on the quality of cloudy apple juice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54; 5453-5460.
- Kristina, F., Barbora, K. and Monika, B. (2020). Potential implications of quercetin and its derivatives in cardioprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5); 1-22.
- Kumar, S. (2014). The importance of antioxidant and their role in pharmaceutical science-A review. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 1(1); 27-44.
- Li, H., Pordesimo, L. and Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37(7); 731-738.
- Li, Y., Lin, W., Huang, J., Xie, Y. and Ma, W. (2016). Anti-cancer effects of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino (jiaogulan). *Chinese Medicine*, 11(1); 1-16.
- Liang, S. X. and Sun, H. W. (2002). Determination of six nutritional elements in Chinese herbal medicines by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 22(5); 847-849.
- Lockwood, B. (2007). *Nutraceuticals: A Guide for Healthcare Professionals. Second ed.* London, Pharmaceutical Press.
- Martin-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., Pedrosa, M. M., Cuadrado, C., Hernandez, T., Diaz, S. and Esteban, R. M. (2009). The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. *Food Chemistry*. 114; 1063-1068.

- Martinez, M. V. and Whitaker, J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6; 195-200.
- Mason, T. J. (1997). Ultrasound in synthetic organic chemistry. *Chemical Society Reviews*, 26(6); 443-451.
- Mena, P., Martí, N., Saura, D., Valero, M. and García-Viguera, C. (2012). Combinatory effect of thermal treatment and blending on the quality of pomegranate Juices. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11); 3186-3199.
- Mohammadpour, H., Sadrameli, S. M., Eslami, F. and Asoodeh, A. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Moringa peregrina* oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. *Industrial Crops and Products*, 131; 106-116.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S. and Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40(2); 223-231.
- Muangrat, R., Pongsirikul, I. and Blanco, P.H. (2017). Ultrasound assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from dried cob of purple waxy corn using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2); 1-11.
- Muluken, K. and Shimelis, A. (2019). Application of antioxidants in food processing industry: Options to improve the extraction yields and market value of natural products. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences - Open Journal*, 5(2); 38-49.
- Nguang, S. L., Yeong, Y. L., Pang, S. F. and Gim bun, J. (2017). Ultrasonic assisted extraction on phenolic and flavonoid content from *Phyllanthus niruri* plant. *Indian Journal of Science and Technology*, 10(2); 1-5.
- Nimse, S. B. and Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35); 27986-28006.

- Noci, F., Riener, J., Walkling-Ribeiro, M., Cronin, D., Morgan, D. and Lyng, J., (2008). Ultraviolet irradiation and pulsed electric fields (PEF) in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple juice. *Journal of Food Engineering*, 85; 141-146
- Onogi, A., Osawa, K., Yasuda, H., Sakai, A., Morita, H. and Itokawa, H. (1993). Flavonol glycosides from the leaves of *Morus alba* L.. *Shoyakugaku Zasshi*, 47; 423-425.
- Ou-yang, Z., Cao, X., Wei, Y., Zhang, W. W. Q., Zhao, M. and Duan, J. (2013). Pharmacokinetic study of rutin and quercetin in rats after oral administration of total flavones of mulberry leaf extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(5); 776-782.
- Park, Y. H., Hong, Y. H. and Park, W. K. (1987). A study on the mineral contents of Dolwoe tea (*Gynostemma pentaphyllum* Makino). *The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 16(2); 105-109.
- Piccolella, S. and Pacifico, S. (2015). Plant-derived polyphenols. *Advances in Molecular Toxicology*, 161-214.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63; 1035-1042.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S. and Chemat, F. (2012). Accelerated methods for sample preparation in food. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 4; 441-455.
- Pisoschi, A. M. and Negulescu, G. P. (2012). Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 1(1); 1-10.
- Prithviraj, K. (2019). Biological activities of flavonoids: An overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4); 1567-1574.
- Puntipa, P., Iwamoto, S., and Ubonrat, S. (2020). Response surface methodology for optimization of cinnamon essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 60; 1-10.

- Rabab, M. A., Riham, S. E. D., Nebal, D. E. T. and Aly, M. E. S. (2021). Optimization for ultrasonic-assisted extraction of *Aframomum melegueta* phenolics using response surface methodology. *Egyptian Journal of Chemistry*, 6(64); 3153-3160.
- Rabie, M. A., Soliman, A. Z., Diaconeasa, Z. S. and Constantin, B. (2014). Effect of pasteurization and shelf life on the physicochemical properties of *Physalis peruviana* L.) juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1051-1060.
- Rahman, M. S. (2007). Preservation using heat and energy. *A Review of Handbook of Food Preservation*, 571-583.
- Rattana, S., Phadungkit, M., and Cushnie, B. (2010). Phytochemical screening, flavonoid content and antioxidant activity. *In Proceedings of The 2nd Annual International Conference of Northeast Pharmacy Research 2010*, Mahasarakham University, Thailand, 60-63.
- Resurreccion, A. V. A. (1998). Consumer sensory testing for product development. *Marylanf: Aspen publishers, Inc.*
- Roidaki, A, Zoumpoulakis, P. G. and Proestos, C. (2015). Comparison of extraction methods for the determination of antioxidant activity in extracts of *Hippophae Rhamnoides* L. and *Lippia Citriodora*. The effect of seasonal collection austin. *Journal of Nutrition & Food Sciences*. 3(1); 1-8.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M. R. and Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49(1); 31-54.
- Saeeduddin, M., Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Awad, F. N., Hua, B., Lei, S. and Zeng, X. (2015). Quality assessment of pear juice under ultrasound and commercial pasteurization processing conditions. *Food Science and Technology*, 64(1); 452-458.

- Šamec, D., Valek-Žulj, L., Martinez, S., Grúz, J., Piljac, A. and Piljac-Žegarac, J. (2016). Phenolic acids significantly contribute to antioxidant potency of *Gynostemma pentaphyllum* aqueous and methanol extracts. *Industrial Crops and Products*, 84; 104-107.
- Samira, S., Mojtaba, A., Asiyeh, M. and Mehdi, G. (2018). Evaluation of removal efficiency of phenol from synthetic aqueous solutions by *Citrullus colocynthis* seed ash. *Environmental Health Engineering and Management Journal*, 5(1); 49-55.
- Sanchez, B. A. O., Celestino, S. M. C., de Abreu Gloria, M. B., Celestino, I. C., Lozada, M. I. O., Júnior, S. D. A., de Alencar, E. R. and de Lacerda de Oliveira, L. (2020). Pasteurization of passion fruit *Passiflora setacea* pulp to optimize bioactive compounds retention. *Food Chemistry: X*, 6(30) ; 100084. doi : <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100084>
- Sánchez, F. M., García, F., Calvo, P., Bernalte, M. J., and González-Gómez, D. (2016). Optimization of broccoli microencapsulation process by complex coacervation using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34; 243-249.
- Sánchez-Salcedo, E. M., Mena, P., García-Viguera, C., Hernández, F. and Martínez, J. J. (2015). (Poly) phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals. *Journal of Functional Foods*, 18; 1039-1046.
- Santos, D., Vardanega, R. and De Almeida, M. A. (2014). Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. *Pharmacognosy Reviews*, 8(16); 88-95.
- Sapers, G. M. (1993). Browning of foods: Control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technology*. 47; 75-84.
- Sarabia, L. A., and Ortiz, M. C. (2009). Response surface methodology. *Comprehensive Chemometrics*, 345-390.

- Sarms, A. D., Mallick, A. R. and Ghosh, A. K. (2010). Free radicals and their role in different clinical conditions: An overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1(3); 185-192.
- Shahidi, F. and Naczk, M. (2004). Nutritional and pharmacological effects of food phenolics. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, 331-402.
- Shalaby, A. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10); 528-539.
- Sharma, N., Alam, T., Goyal, S. K., Fatma, S., Pathania, S. and Niranjana, K. (2018). Effect of different storage conditions on analytical and sensory quality of thermally processed, milk-based germinated foxtail millet porridge. *Journal of Food Science*, 1-9.
- Silvestre, D., Ruiz, P., Martínez-Costa, C., Plaza, A. and López, M.C. (2008). Effect of pasteurization on the bactericidal capacity of human milk. *Journal of Human Lactation*, 24(4); 371-376.
- Simpson, K. L. (1985). Chemical Changes in Natural Food Pigments. *Chemical Changes in Food During Processing*, 409-441.
- Slinkard, K. and Singleton, V. L. (1997). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28; 49-55.
- Stroescu, M., Stoica-Guzun, A., Ghergu, S., Chira, N., and Jipa, I. (2013). Optimization of fatty acids extraction from *Portulaca oleracea* seed using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 43; 405-411.
- Surveswaran, S., Cai, Y., Corke, H. and Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102(3); 938-953.

- Tabaraki, R. and Nateghi, A. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6); 1279-1286.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A. and Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9); 1199-1218.
- Tang, W. and Eisenbrand, G. (2011). Handbook of chinese medicinal plants: chemistry, pharmacology, toxicology. *Weinheim, Wiley-VCH*.
- 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.
- Taylor, J. R. N. (2004). Fermentation: Foods and nonalcoholic beverages. *Encyclopedia of Grain Science*, 380-390.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. and Gerós, H. (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9); 18711-18739.
- Thaipitakwong, T., Numhom, S. and Aramwit, P. (2018). Mulberry leaves and their potential effects against cardiometabolic risks: a review of chemical compositions, biological properties and clinical efficacy. *Pharmaceutical Biology*, 56(1); 109-118.
- Toyoda, M., Tanaka, K., Hoshino, K., Akiyama, H., Tanimura, A., and Saito, Y. (1997). Profiles of potentially anti-allergic flavonoids in 27 kinds of health tea and green tea infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7); 2561-2564.
- Wang, Y. R., Xing, S. F., Lin, M., Gu, Y. L. and Piao, X. L. (2018). Determination of flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum* using ultra-performance liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry and an evaluation of their antioxidant activity in vitro. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 41(8); 437-444.

- Wanyo, P., Siriamornpun, S. and Meeso, N. (2011). Improvement of quality and antioxidant properties of dried mulberry leaves with combined far-infrared radiation and air convection in Thai tea process. *Food and Bioprocess Processing*, 89(1); 22-30.
- Wen, P., Hu, T. G., Linhardt, R. J., Liao, S. T., Wu, H. and Zou, Y. X. (2019). Mulberry: A review of bioactive compounds and advanced processing technology. *Trends in Food Science & Technology*, 83; 138-158.
- Xie, Z., Liu, W., Huang, H., Slavin, M., Zhao, Y., Whent, M., Blackford, J., Lutterodt, H., Zhou, H., Chen, P., Wang, T. T. Y., Wang, S. Yu, L. (2010). Chemical composition of five commercial *Gynostemma pentaphyllum* samples and their radical scavenging, antiproliferative, and anti-inflammatory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21); 11243-11249.
- Xie, Z., Zhao, Y., Chen, P., Jing, P., Yue, J. and Yu, L. (2011). Chromatographic fingerprint analysis and rutin and quercetin compositions in the leaf and whole-plant samples of di and tetraploid *Gynostemma pentaphyllum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7); 3042-3049.
- Yang, C. P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M. D., Nakamuram and N. and Hayashi, N. (2000). Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7); 2732-2735.
- Yang, J., Guo, J. and Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6); 1060-1066.
- Yang, L., Cao, Y. L., Jiang, J. G., Lin, Q. S., Chen, J. and Zhu, L. (2010). Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of Separation Science*, 33(9); 1349-1355.

- Yang, Y. and Zhang, F. (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4); 308-313.
- Yeo, J., Kang, Y. J., Jeon, S. M., Jung, U. J., Lee, M. K., Song, H. and Choi, M. S. (2008). Potential hypoglycemic effect of an ethanol extract of *Gynostemma pentaphyllum* in C57BL/KsJ-db/db Mice. *Journal of Medicinal Food*, 11(4); 709-716.
- Yeoboah, M. D., Kpeli, G., Akyeh, M., and Bimi, L. (2010). Bacteriological quality of ready-to-eat foods sold on and around university of Ghana campus. *Research Journal of Microbiology*. 5(2); 130-136
- Zhao, L., Wang, S., Liu, F., Dong, P., Huang, W., Xiong, L. and Liao, X. (2013). Comparing the effects of high hydrostatic pressure and thermal pasteurization combined with nisin on the quality of cucumber juice drinks. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17; 27-36.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects in superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64; 555-559.
- Zhuang, B., Dou, L.-L., Li, P. and Liu, E.-H. (2017). Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi Cacumen*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134; 214-219.



ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

ก.1 ค่าสีและค่าความแตกต่างของสี (ΔE^*)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่อง chroma meter (Minolta รุ่น CR-400, Japan)

วิธีวิเคราะห์

วัดค่าสีของตัวอย่างด้วยเครื่อง chroma meter ระบบ CIE และบันทึกค่า L^* , a^* และ b^* โดยปรับมาตรฐานเครื่องก่อนการวัดตัวอย่างทุกครั้ง

โดย ค่า L^* แสดงถึง ค่าความสว่าง (lightness) มีค่าตั้งแต่ 0-100
0 แสดงถึง สีดำ และ 100 แสดงถึง สีขาว

ค่า a^* แสดงถึง ค่าสีแดงและเขียว (redness/greenness)
 $+a^*$ แสดงถึง สีแดง และ $-a^*$ แสดงถึง สีเขียว

ค่า b^* แสดงถึง ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (yellowness/blueness)
 $+b^*$ แสดงถึง สีเหลือง และ $-b^*$ แสดงถึง สีน้ำเงิน

คำนวณค่าความแตกต่างของสี (ΔE^*) จากสมการดังนี้

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

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

ข.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง digital refractometer (Hanna รุ่น HI96801, Thailand)

วิธีวิเคราะห์

วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของตัวอย่างด้วยเครื่อง digital refractometer ที่ความเข้มข้น 0-32 °Brix

ข.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตามวิธีของ AOAC (2000)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

2. เครื่อง pH meter (Mettler Toledo รุ่น S220, Switzerland)

วิธีวิเคราะห์

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างด้วยเครื่อง pH meter

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข.3 ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) ในรูปกรดซิตริก ตัดแปลงจากวิธีของ AOAC (2000)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. บิวเรต
2. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 mL
3. (New Classic, Mettler, Switzerland)
4. โถดูดความชื้น (desiccator)

สารเคมี

1. phenolphthalein ($C_{20}H_{14}O_4$) (Ajax Finechem, New Zealand)
2. potassium hydrogen phthalate ($KHC_8H_4O_4$) (A.R. grade, Ajax Finechem, New Zealand)
3. sodium hydroxide (NaOH) (A.R. grade, QReC, New Zealand)

วิธีการเตรียมสารละลาย sodium hydroxide (NaOH) เข้มข้น 0.1 N

ละลาย sodium hydroxide 4.0 g ในน้ำกลั่น เติงขวดปรับปริมาตรขนาด 1 L แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน potassium hydrogen phthalate ($KHC_8H_4O_4$)

อบ potassium hydrogen phthalate ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่ง potassium hydrogen phthalate อย่างละเอียดให้น้ำหนักอยู่ในช่วง 2.0-2.4 g และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL

การหา normality ของสารละลาย sodium hydroxide (NaOH)

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน potassium hydrogen phthalate 25 mL ลงในขวดรูปชมพู่ และหยด phenolphthalein เข้มข้น 1% ลงไป 2 หยด
2. ไตเตรทกับสารละลาย sodium hydroxide จนกระทั่งกลายเป็นสีชมพูอ่อนถาวร (จุดยุติ) ทำการทดลอง 3 ครั้ง และหาปริมาณเฉลี่ยของสารละลาย sodium hydroxide ที่ใช้ในการไตเตรท
3. คำนวณหา normality ของสารละลาย sodium hydroxide (N NaOH) จากสมการดังนี้

$$N \text{ KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4 = \frac{\text{น้ำหนักของ KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4 \text{ (g)} \times 1000}{204.23 \times 100}$$

$$N \text{ NaOH} = \frac{N \text{ KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4 \times \text{ปริมาตรของ KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4 \text{ (g) ที่ใช้ในการไตเตรท}}{\text{ปริมาตรเฉลี่ยของ NaOH (mL)}}$$

โดย น้ำหนักสมมูลของ potassium hydrogen phthalate (MW) = 204.23

วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่าง 5 mL ลงในขวดรูปชมพู่ และหยด phenolphthalein เข้มข้น 1% ลงไป 2 หยด
2. ไตเตรทกับสารละลาย sodium hydroxide จนกระทั่งกลายเป็นสีชมพูอ่อนถาวร (จุดยุติ) ทำการทดลอง 3 ครั้ง
3. คำนวณปริมาณกรดทั้งหมด โดยคิดในรูปของกรดซิตริก (กำหนดให้น้ำหนักสมมูลของกรดซิตริก เท่ากับ 0.064) ตามสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{ปริมาตรของ NaOH (mL)} \times N(\text{NaOH}) \times 100 \times 0.064}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (mL)}}$$

ข.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดย Folin-Ciocalteu ตามวิธีของ Waterhouse (2002)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Fisher scientific รุ่น GENESYS 20, USA)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น Newclassic, Switzerland)
3. กระดาษกรอง Whatman no.1

สารเคมี

1. ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (A.R. grade, VWR Prolabo, France)
2. folin-ciocalteu reagent (Loba Chemie, India)
3. gallic acid (Sigma Aldrich, USA)
4. sodium carbonate (Na_2CO_3) (A.R. grade, Ajax Finechem, Australia)

วิธีการเตรียมสารละลาย sodium carbonate อิมตัว

1. ละลาย sodium carbonate 200.0 g ในน้ำกลั่น 800 mL แล้วนำไปให้ความร้อน เพื่อเร่งการละลายเมื่อละลาย sodium carbonate จนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม sodium carbonate ลงไปเล็กน้อย และทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

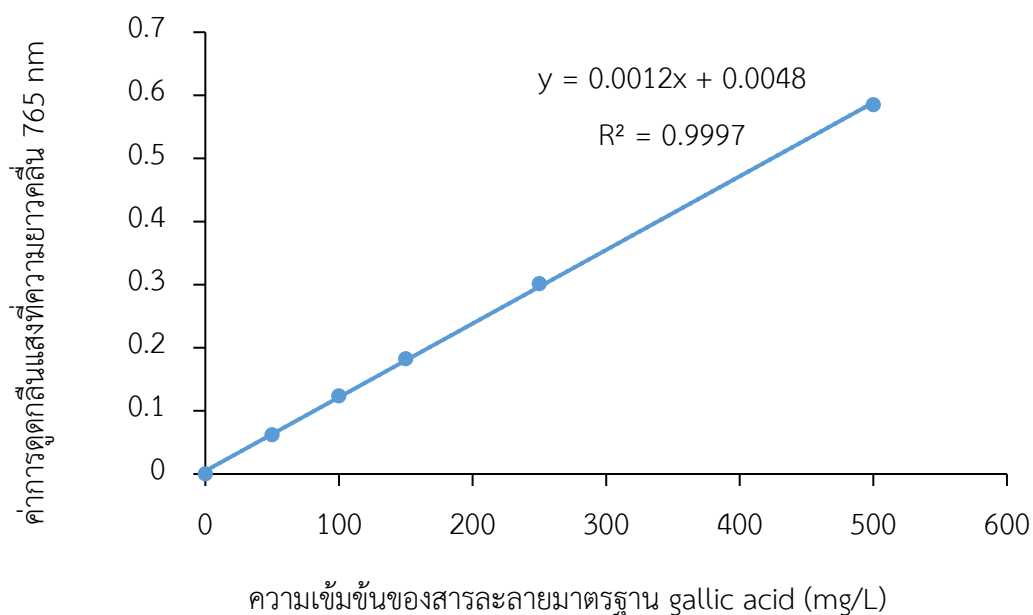
2. กรองสารละลาย sodium carbonate ผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 และปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid และการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ละลาย gallic acid 0.5 g ใน ethanol ปริมาตร 10 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 mL (จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 5 g/L)
2. ปิเปตสารละลาย gallic acid ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาตร 0 0.5 1 1.5 2.5 และ 5 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 mL จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (จะได้ความเข้มข้นของ gallic acid เท่ากับ 0 50 100 150 250 และ 500 mg/L ตามลำดับ)
3. ผสมสารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 100 μ L กับน้ำกลั่นปริมาตร 7 mL และสาร folin-ciocalteau ปริมาตร 500 μ L ในขวดปรับปริมาตร 10 mL ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 8 นาที จากนั้นปิเปตสารละลาย sodium carbonate ปริมาตร 1.5 mL เติมลงในสารละลาย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ในที่มืด
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอ้างอิง
5. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) แสดงดังรูปที่ ข.1

วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 100 μ L ลงในขวดปรับปริมาตร 10 mL
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 7 mL และสาร folin-ciocalteau ปริมาตร 500 μ L ทิ้งไว้ประมาณ 1-8 นาที
3. ปิเปตสารละลาย sodium carbonate ปริมาตร 1.5 mL เติมลงในสารละลาย จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 mL ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงในที่มืด
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 nm และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน (แสดงดังรูปที่ ข.1)



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ข.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดตามวิธีของ Rattana และคณะ (2010)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Fisher scientific รุ่น GENESYS 20, USA)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น Newclassic, Switzerland)

สารเคมี

1. aluminium chloride (AlCl_3) (Ajax Finechem, New Zealand)
2. methanol (CH_3OH) (Fisher Scientific, UK)
3. quercetin (Sigma Aldrich, USA)
4. sodium nitrite (NaNO_2) (KemAus, Australia)

วิธีการเตรียมสารละลาย sodium nitrite (NaNO_2) เข้มข้น 5% w/v

ชั่ง sodium nitrite 5 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL

วิธีการเตรียมสารละลาย aluminium chloride (AlCl_3) เข้มข้น 10% w/v

ชั่ง aluminium chloride 10 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin และการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ชั่ง quercetin 4 mg ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL จากนั้นปรับปริมาตรด้วย methanol สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 mg/mL
2. เตรียมสารละลาย quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 0.025 0.05 0.1 0.2 และ 0.4 mg/mL ดังแสดงในตารางที่ ข.1

ตารางที่ ข.1 วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ

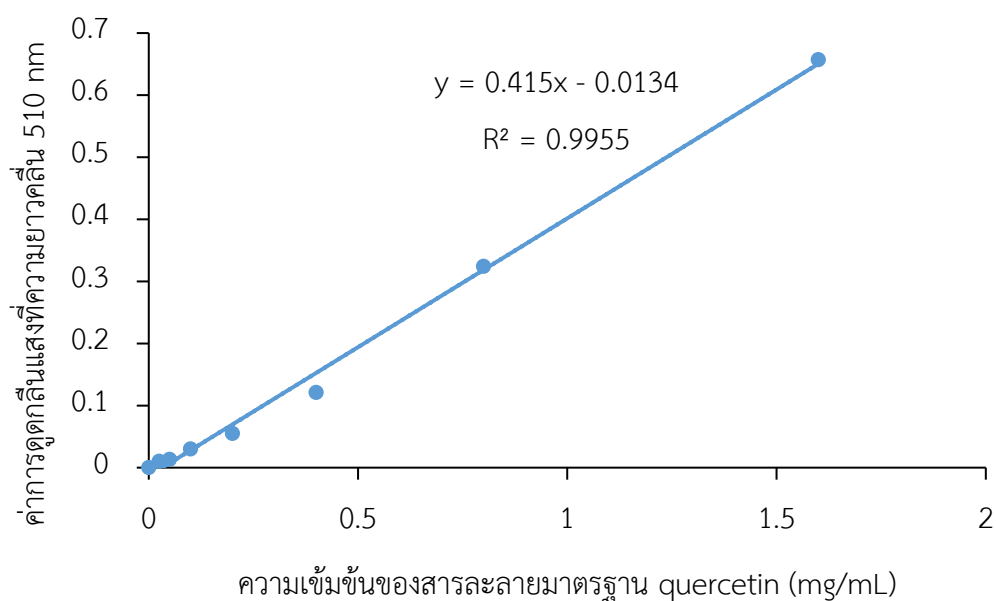
ความเข้มข้นเริ่มต้น (mg/mL)	ปริมาตร quercetin (mL)	ปริมาตร methanol (mL)	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/mL)
0.4	5	5	0.2
0.2	5	5	0.1
0.1	5	5	0.05
0.05	5	5	0.025

3. ปิเปตสารละลาย quercetin ในข้อ 2 ปริมาตร 0.5 mL ลงหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 2 mL และ สารละลาย sodium nitrite (NaNO_2) เข้มข้น 5% w/v ปริมาตร 0.15 mL ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
4. เติมสารละลาย aluminium chloride (AlCl_3) เข้มข้น 10% w/v ปริมาตร 0.15 mL ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2.2 mL และผสมให้เข้ากัน
5. วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 510 nm
6. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin (แกน X) กับ ค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) แสดงดังรูปที่ ข.2

วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 mL ลงหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 2 mL และ สารละลาย sodium nitrite (NaNO_2) เข้มข้น 5% w/v ปริมาตร 0.15 mL ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

2. เติมสารละลาย aluminium chloride (AlCl₃) เข้มข้น 10% w/v ปริมาตร 0.15 mL ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2.2 mL และผสมให้เข้ากัน
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 510 nm และคำนวณปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของ quercetin (ดังแสดงในรูปที่ ข.2)



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข.6 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ดัดแปลงจากวิธีของ Brand-Williams และคณะ (1995)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Fisher scientific รุ่น GENESYS 20, USA)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น Newclassic, Switzerland)

สารเคมี

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

- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) (Sigma Aldrich, USA)
- methanol (CH₃OH) (Fisher Scientific, UK)

วิธีการเตรียมสารละลาย DPPH

- เตรียม stock solution โดยชั่ง DPPH 24 mg ละลายใน methanol 50 mL เติงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL และปรับปริมาตรด้วย methanol จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ DPPH เท่ากับ 6×10^{-4} M (เก็บสารละลาย DPPH ที่อุณหภูมิ 4 °C ไม่เกิน 5 วัน)
- เตรียม daily solution โดยปิเปตสารละลาย DPPH จากข้อ 1 มา 10 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วย methanol จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ DPPH เท่ากับ 1.2×10^{-4} M นำ daily solution ไปวัดค่าดูดกลืนแสงและบันทึกค่าเป็น A_{initial} (ควรมีค่าประมาณ 1.1 ถ้าหากค่าการดูดกลืนแสงมากหรือน้อยกว่า 1.1 ให้เติม methanol หรือสารละลาย DPPH จากข้อ 1 ตามลำดับ เพื่อปรับค่า A_{initial})

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox และการสร้างกราฟมาตรฐาน

- ชั่ง trolox 25 mg ละลายใน methanol ปริมาตร 10 mL แล้วใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL ผสมให้เข้ากัน สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10000 μ M
- เจือจางสารละลาย trolox ความเข้มข้น 10000 μ M ด้วย methanol จนได้ความเข้มข้นในช่วง 82-625 μ M ดังแสดงในตารางที่ ข.2
- ปิเปตสารละลาย trolox ในข้อ 2 ปริมาตร 250 μ L ผสมกับสารละลาย DPPH 4.75 mL และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
- วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยใช้ methanol เป็นตัวอย่างอ้างอิง
- คำนวณผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง ($A_{\text{difference}}$) โดยหักลบค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH (A_{initial}) ด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากตัวอย่าง (A_{final})

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

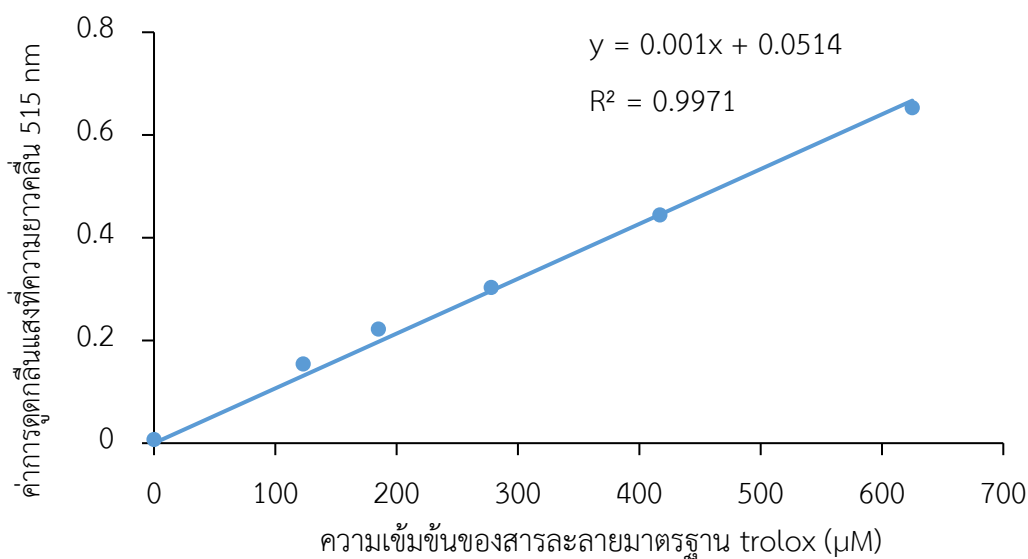
- สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน trolox (แกน X) กับค่า $A_{\text{difference}}$ (แกน Y) แสดงดังรูปที่ ข.3

ตารางที่ ข.2 วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นเริ่มต้น (μM)	ปริมาตร trolox (mL)	ปริมาตร methanol (mL)	ความเข้มข้นสุดท้าย (μM)
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

วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่าง 250 μL ผสมกับ สารละลาย DPPH 4.75 mL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
2. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 nm และคำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ค่า $A_{\text{difference}}$ ที่ได้จากตัวอย่างไปเทียบกับ $A_{\text{difference}}$ ของกราฟมาตรฐานของ trolox



รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ
ด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

ข.7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ดัดแปลง จากวิธีของ Benzie และ Strain (1996)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Fisher scientific รุ่น GENESYS 20, USA)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น Newclassic, Switzerland)

สารเคมี

1. 0.1 M hydrochloric acid (A.R. grade, Ajax Finechem, Australia)
2. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) (Sigma Aldrich, USA)
3. ferric chloride (POCH S.A., Poland)
4. glacial acetic acid (A.R. grade, QRëC, New Zealand)
5. methanol (CH₃OH) (Fisher Scientific, UK)
6. sodium acetate trihydrate (A.R. grade, Ajax Finechem, Australia)
7. tripyridyltriazine (TPTZ) (Sigma Aldrich, USA)

วิธีการเตรียมสารละลาย hydrochloric acid 0.04 M

ละลาย hydrochloric acid เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 4 mL ในน้ำกลั่น 6 mL

วิธีการเตรียมสารละลาย FRAP

1. เตรียมสารละลาย acetate buffer โดยผสม sodium acetate trihydrate 0.3 g กับ glacial acetic acid ปริมาตร 1.6 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
2. เตรียมสารละลาย ferric chloride โดยชั่ง ferric chloride 270 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 mL
3. เตรียมสารละลาย TPTZ โดยชั่ง TPTZ 31.2 mg ลงในสารละลาย hydrochloric acid ความเข้มข้น 0.04 M ปริมาตร 10 mL ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL
4. เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสม acetate buffer 25 mL ferric chloride 2.5 mL และ TPTZ 2.5 mL ตามลำดับ ในบีกเกอร์ และให้ความร้อนสารละลาย FRAP ที่ 37 °C ในอ่างให้ความร้อน ซึ่งจะให้น้ำตาลอมแดง
5. วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย FRAP ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 nm โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวอ้างอิง และบันทึกค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย FRAP เป็น A_{initial}

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox และการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ชั่ง trolox 25 mg ละลายใน methanol ปริมาตร 10 mL แล้วใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL ผสมให้เข้ากัน สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10000 μM
2. นำสารละลาย trolox ความเข้มข้น 10000 μM มาเจือจางด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 82-625 μM ดังแสดงในตารางที่ ข.3
3. ปิเปตสารละลาย trolox ในข้อ 2 ปริมาตร 250 μL ผสมกับสารละลาย FRAP 4.75 mL และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
4. วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 nm โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวอ้างอิง
5. คำนวณผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง ($A_{\text{difference}}$) โดยหักลบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากตัวอย่าง (A_{final}) กับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย FRAP (A_{initial})

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

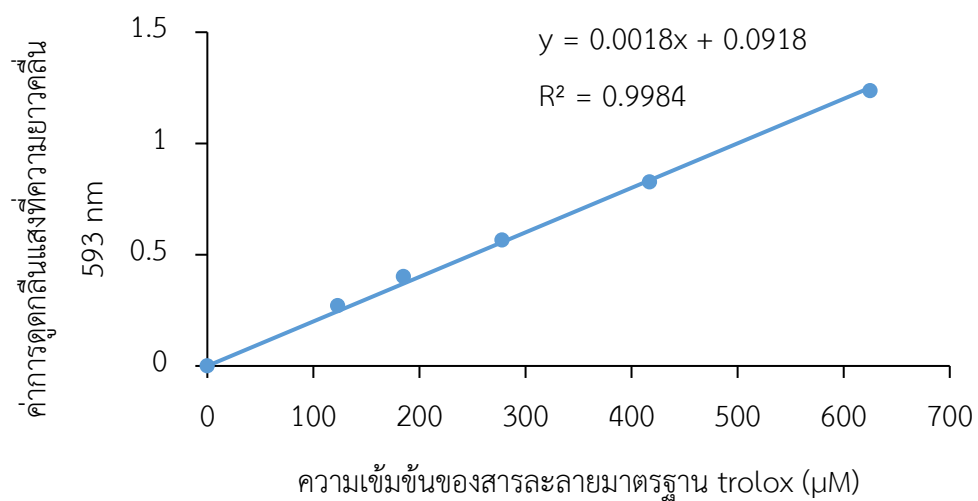
6. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน trolox (แกน X) กับค่า $A_{\text{difference}}$ (แกน Y) แสดงดังรูปที่ ข.4

ตารางที่ ข.3 วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นเริ่มต้น (μM)	ปริมาตร trolox (mL)	ปริมาตร methanol (mL)	ความเข้มข้นสุดท้าย (μM)
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

วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 250 μL ผสมกับสารละลาย FRAP 4.75 mL และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
2. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 593 nm
3. คำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ค่า $A_{\text{difference}}$ ที่ได้จากตัวอย่างเทียบกับ $A_{\text{difference}}$ ของกราฟมาตรฐานของ trolox (แสดงดังรูปที่ ข.4)



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



ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพ

ค.1 การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามวิธีของ AOAC (2000)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. plate count agar (Himedia, India)
2. sodium chloride (NaCl) (A.R. grade, Loba Chemie, India)

วิธีการเตรียมสารละลาย sodium chloride เข้มข้น 0.85% (w/v)

ละลาย sodium chloride 0.85 g ในน้ำกลั่น 100 mL และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA)

ละลาย PCA 23.50 g ในน้ำกลั่น 1 L บรรจุในขวดรูปชมพู่ ปิดด้วยจุกสำลี และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 °C

วิธีวิเคราะห์

1. ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี pour plate โดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (w/v) ในระดับที่เหมาะสม และปิเปตมา 1.0 mL ใส่ลงจานเพาะเชื้อ
2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ (PCA) ลงบนตัวอย่างในจานเพาะเชื้อปริมาตร 15-20 mL เขย่าและหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อและตัวอย่างกระจายตัว และปล่อยให้อาหารแข็งตัว
3. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี และรายงานค่าเป็น colony forming units/mL (CFU/mL)

ค.2 การตรวจนับปริมาณยีสต์และรา ตามวิธีของ AOAC (2000)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. potato dextrose agar (PDA) (Himedia, India)
2. sodium chloride (NaCl) (A.R. grade, Loba Chemie, India)
3. tartaric acid (QReC, New Zealand)

วิธีการเตรียมสารละลาย sodium chloride เข้มข้น 0.85% (w/v)

ละลาย sodium chloride 0.85 g ในน้ำกลั่น 100 mL และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการเตรียมสารละลาย tartaric acid เข้มข้น 10% (w/v)

ละลาย tartaric acid 10 g ในน้ำกลั่น 100 mL และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)

ชั่ง PDA 39.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1 L บรรจุในขวดรูปชมพู่ ปิดด้วยจุกสำลี หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 °C ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยสารละลาย tartaric acid ความเข้มข้น 10% (w/v) ในอัตราส่วน 1:100 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อปริมาณ 15-20 mL เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวและปล่อยให้อาหารแข็งตัว

วิธีวิเคราะห์

1. ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค spread plate โดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (w/v) ในระดับที่เหมาะสม และปิเปตมา 1.0 mL ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวน้ำ
2. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี และรายงานค่าเป็น colony forming units/mL (CFU/mL)

ค.3 การตรวจนับปริมาณ *Escherichia coli* และ coliforms ตามวิธีของ BAM (2001)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. EC broth (Himedia, India)
2. eosin methylene blue (EMB) Agar (Himedia, India)
3. lauryl tryptose broth (Himedia, India)
4. plate count agar (Himedia, India)
5. sodium chloride (NaCl) (Loba Chemie, India)

วิธีการเตรียมสารละลาย sodium chloride เข้มข้น 0.85% (w/v)

ละลาย sodium chloride 0.85 g ในน้ำกลั่น 100 mL และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ lauryl tryptose broth

ชั่ง lauryl tryptose broth ปริมาณ 35.6 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 L และบรรจุในขวดเก็บสารปิดฝา จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ brilliant green lactose bile broth

ชั่ง brilliant green lactose bile broth ปริมาณ 40 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 L และบรรจุในขวดเก็บสารปิดฝา จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth

ชั่ง EC broth ปริมาณ 37 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 L และบรรจุในขวดเก็บสารปิดฝา จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar

ชั่ง EMB agar ปริมาณ 35.96 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 L และบรรจุในขวดเก็บสารปิดฝา จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงถึง 45 °C จึงเทลงในจานเพาะเชื้อปริมาตรจานละ 15-20 mL ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอจนทั่ว โดยหมุนจานเพาะเชื้อและตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA slant

ชั่ง plate count agar ปริมาณ 23.5 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 L และบรรจุในขวดเก็บสารปิดฝา จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงถึง 45 °C ปิเปตลงในหลอดทดลองหลอดละ 9 mL และปิดฝา เอียงหลอดทดลองลงและตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone broth

ชั่ง tryptone broth ปริมาณ 15 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 L และบรรจุในขวดเก็บสารปิดฝา จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที

การวิเคราะห์ด้วยวิธี 3-tube MPN

การตรวจสอบขั้นประมาณการณ์ (presumptive test)

1. เตรียมหลอดทดลอง โดยมีหลอดดักแก๊ส (durham tube) วางคว่ำอยู่ภายในหลอดทดลอง จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ lauryl tryptose broth ลงในหลอดทดลองปริมาตรหลอดละ 9 mL แล้วปิดฝา คว่ำและหงายหลอดทดลองเพื่อไม่ให้มีฟองอากาศเหลืออยู่ภายในหลอดดักแก๊ส
2. เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (w/v) ในระดับที่เหมาะสม และปิเปตตัวอย่างลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ lauryl tryptose broth ที่เตรียมจากข้อที่ 1 ผสมโดยใช้เครื่อง vortex mixer (ฟองอากาศต้องไม่เหลืออยู่ภายในหลอดดักแก๊ส) และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง
3. คัดเลือกหลอดที่เกิดแก๊สและบันทึกผล โดยหลอดที่เกิดแก๊สให้ผลเป็นบวก (positive) และหลอดที่ไม่เกิดแก๊สให้ผลเป็นลบ (negative) นำผลการทดลองเปรียบเทียบกับตารางที่ ค.1 โดยค่าที่ได้เป็น presumptive coliforms แสดงผลเป็น MPN/mL ของตัวอย่าง จากนั้นนำหลอดทดลองที่ให้ผลเป็นบวกไปทดสอบในขั้นต่อไป

การตรวจสอบขั้นยืนยัน (confirmed test) สำหรับเชื้อ coliforms

1. เตรียมหลอดทดลอง โดยมีหลอดดักแก๊สวางคว่ำอยู่ภายใน จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ brilliant green lactose bile broth ปริมาตร 9 mL ลงในหลอดทดลอง และปิดฝา คว่ำและหงายหลอดทดลองเพื่อไม่ให้มีฟองอากาศเหลืออยู่ภายในหลอดดักแก๊ส

2. ถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองในขั้น presumptive test ที่ให้ผลเป็นบวกลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ brilliant green lactose bile broth ที่เตรียมจากข้อที่ 1 ผสมโดยใช้เครื่อง vortex mixer (ฟองอากาศต้องไม่เหลืออยู่ภายในหลอดดักแก๊ส) และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง
3. คัดเลือกหลอดที่เกิดแก๊สและบันทึกผล โดยหลอดที่เกิดแก๊สให้ผลเป็นบวกและหลอดที่ไม่เกิดแก๊สให้ผลเป็นลบ นำผลการทดลองเปรียบเทียบกับตารางที่ ค.1 โดยค่าที่ได้เป็น confirmed coliforms แสดงผลเป็น MPN/mL ของตัวอย่าง

การตรวจสอบขั้นยืนยัน (confirmed test) สำหรับเชื้อ fecal coliforms และ *E. coli*

1. เตรียมหลอดทดลอง โดยมีหลอดดักแก๊สวางคว่ำอยู่ภายใน จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth ลงในหลอดทดลองปริมาตรหลอดละ 9 mL และปิดฝา คว่ำและหงายหลอดทดลองเพื่อไม่ให้มีฟองอากาศเหลืออยู่ภายในหลอดดักแก๊ส
2. ถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองในขั้น presumptive test ที่ให้ผลเป็นบวกลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth ที่เตรียมจากข้อที่ 1 ผสมโดยใช้เครื่อง vortex mixer (ฟองอากาศต้องไม่เหลืออยู่ภายในหลอดดักแก๊ส) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง
3. คัดเลือกหลอดที่เกิดแก๊สและบันทึกผล โดยหลอดที่เกิดแก๊สให้ผลเป็นบวกและหลอดที่ไม่เกิดแก๊สให้ผลเป็นลบ จากนั้นนำผลการทดลองเปรียบเทียบกับตารางที่ ค.1 โดยค่าที่ได้เป็น confirmed fecal coliforms แสดงผลเป็น MPN/mL ของตัวอย่าง

การตรวจสอบขั้นสมบูรณ์ (completed test) สำหรับเชื้อ *E. coli*

1. ใช้ loop ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth ที่เกิดแก๊ส (จากขั้นตอน confirmed test) มา streak บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB-agar และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หากตรวจพบโคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีม่วงหรือดำ หรือมีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (metallic sheen) ให้เลือกโคโลนีดังกล่าวมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA slant และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป
2. ใส่เชื้อใน PCA slant จากข้อที่ 1 ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone broth และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดสาร Kovac's reagent ปริมาตร 0.2-0.3 mL โดยหลอดที่เกิดวงแหวนสีแดงให้ผลเป็นบวกและหลอดที่ไม่เกิดให้ผลเป็นลบ จากนั้นเปรียบเทียบผลการทดลองกับตารางที่ ค.1 โดยค่าที่ได้เป็น confirmed *E. coli* แสดงผลเป็น MPN/mL ของตัวอย่าง

ตารางที่ ค.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธี 3-tube MPN ที่ตัวอย่างความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและแสดงผลเป็น MPN/mL ที่ค่าความเชื่อมั่น 95%

Pos. tubes			MPN/mL	Conf. lim		Pos. tubes			MPN/mL	Conf. lim	
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		Low	High	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		Low	High
0	0	0	<3.0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	<1100	420	4800

ที่มา : BAM (2001)

ภาคผนวก ง

การประเมินทางประสาทสัมผัส

แบบทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

ผลิตภัณฑ์เครื่องตีสมุนไพรร่วมบริโภคมสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน

ชื่อ

วันที่

เพศ () ชาย () หญิง อายุ.....

คำชี้แจง กรุณาทดสอบชิม “เครื่องตีสมุนไพรร่วมบริโภคมสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลาน” แล้วให้คะแนนความชอบในแต่ละคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ตามความรู้สึของผู้ทดสอบมากที่สุด ซึ่งวิธีการชิมแต่ละตัวอย่างให้บ้วนปากด้วยน้ำสะอาดทุกครั้งก่อนจะชิมตัวอย่างต่อไป กำหนดให้

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

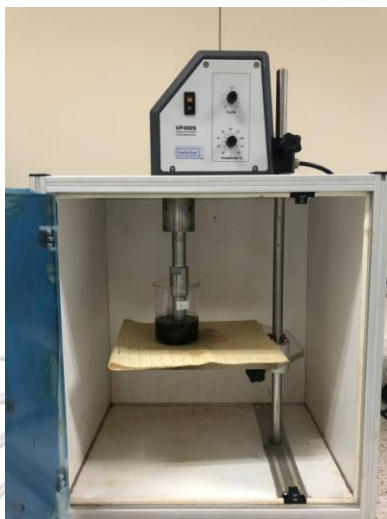
คุณลักษณะ	รหัสตัวอย่าง					
1. สี						
2. กลิ่นรส						
3. กลิ่นโดยรวม						
4. รสหวาน						
5. รสขม						
6. รสเปรี้ยว						
7. ความชอบโดยรวม						

ข้อเสนอแนะ.....

.....

ภาคผนวก จ

ภาพแสดงเครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง



รูปที่ จ.1 การสกัดใบเจียวกู่หลานด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ช่วย



รูปที่ จ.2 การระเหยเอทานอลออกจากสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานด้วยเครื่อง rotary evaporater



รูปที่ จ.3 เครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วใส



รูปที่ จ.4 เครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมบริโภคผสมสารสกัดจากใบเจียวกู่หลานในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้วสีชา

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พิชานันท์ ขำขยัน
วัน เดือน ปี เกิด	26 พฤษภาคม 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อปีการศึกษา 2559 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยี ทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2561
ที่อยู่ปัจจุบัน	47/64 หมู่ 3 ตำบลสุรศักดิ์ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี 20110
ผลงานตีพิมพ์	พิชานันท์ ขำขยัน และ กิติพงษ์ อัครกุล. (2564). ผลของปัจจัยเดี่ยวในการ สกัดโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก ใบเจียวกุหลาบ. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม, 16(1); 95-108.