



การเตรียมสารสกัดจากไข่น้ำด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด

PREPARATION OF EXTRACTS FROM *WOLFFIA ARRHIZA* (L.)

USING ENZYME-ASSISTED EXTRACTION

จารุณีภา เครือวัฒนเวช

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การเตรียมสารสกัดจากไข่น้ำด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด
PREPARATION OF EXTRACTS FROM *WOLFFIA ARRHIZA* (L.)
USING ENZYME-ASSISTED EXTRACTION

จารุณีภา เครือวัฒนเวช

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง



หน้าอนุมัติการค้นคว้าอิสระ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

การค้นคว้าอิสระเรื่อง การเตรียมสารสกัดจากไชน้ำด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด

Preparation of Extracts from *Wolffia arrhiza* (L.) Using
Enzyme-assisted Extraction

ผู้ประพันธ์ จารุณีภา เครือวัฒนเวช

คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

ประธานกรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง

กรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร.อำภา จิมไธสง

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัทวัฒน์ สีขาว

กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง)

คณบดี

(รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสิจิตรประภา)

กิตติกรรมประกาศ

การค้นคว้าอิสระนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์อย่างยิ่งของอาจารย์ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลักที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตรวจสอบและแก้ไขการค้นคว้าอิสระมาโดยตลอดจนกระทั่งการศึกษาโดยอิสระฉบับนี้เสร็จอย่างสมบูรณ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบที่ให้คำแนะนำและแก้ไขงานวิจัยให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น เพื่อให้การศึกษาค้นคว้าอิสระฉบับนี้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ นางสาวธนิตา ประเสริฐ นักวิทยาศาสตร์ และนางสาวโสภณ เตศรีบุรพกุล เจ้าหน้าที่บริหาร ที่คอยให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือตลอดจนการค้นคว้าอิสระในครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณความเอื้อเฟื้อทางด้านวิชาการและห้องปฏิบัติการจากคณาจารย์ทุกท่านและเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโททุกคนในสำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงที่ให้ความช่วยเหลือเป็นกำลังใจซึ่งกันและกันตลอดการศึกษา

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำการศึกษาค้นคว้าอิสระครั้งนี้จนเสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าการศึกษาวิจัยค้นคว้าอิสระครั้งนี้จะเกิดผลประโยชน์ต่อทั้งภาคอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหาร และผู้ที่สนใจทั่วไปหากมีข้อผิดพลาดหรือข้อบกพร่องประการใดผู้วิจัยขอน้อมรับและขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

จารุณีภา เครือวัฒนเวช

ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ	การเตรียมสารสกัดจากไข่น้ำด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด
ผู้ประพันธ์	จารุณีภา เครือวัฒนเวช
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง

บทคัดย่อ

ไข่น้ำ มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นที่กำเนิดในประเทศไทย คือ ผำ เมืองคังประกอบเป็นโปรตีน กรดอะมิโนจำเป็น กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามิน แร่ธาตุ สารสำคัญกลุ่มแคโรทีนอยด์ ไฟโตสเตอรอล และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์สูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมสารสกัดจากไข่น้ำด้วยวิธีสีเขียว และเพื่อประเมินโปรตีน สารประกอบฟีนอลิกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไข่น้ำเพื่อประโยชน์ทางเครื่องสำอาง โดยทำการสกัดไข่น้ำด้วยเอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัดเทียบกับวิธีดั้งเดิม คือ ใช้เอทานอลร้อยละ 70 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดไข่น้ำ พบว่าสารสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 5 ยูนิต/มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 54.25 ± 0.74 มก. BSA/กรัม สารสกัดซึ่งสูงกว่าสารสกัดชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า การใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัดจะช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สารสกัดฟิลเตรทด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 15 ยูนิต/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 7.51 ± 0.04 มก. TEAC/กรัม สารสกัด ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ไม่แตกต่างกับสารสกัดฟิลเตรทด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 15 ยูนิต/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 56.97 ± 0.86 และ 54.92 ± 2.48 มก. TEAC/กรัม สารสกัด ตามลำดับ สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด 58.93 ± 1.03 มก. GAE/กรัม สารสกัด และให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด 323.73 ± 1.93 มก. QE/กรัม สารสกัด รองลงมา ได้แก่ สารสกัดฟิลเตรทด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 15 ยูนิต/มิลลิลิตร ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 45.56 ± 0.46 มก. GAE/กรัม สารสกัด และให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 86.85 ± 0.16 มก. QE/กรัม สารสกัด

คำสำคัญ: ไข่น้ำ, เอนไซม์เซลลูเลส, การสกัดโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัด

Independent Study Title	Preparation of Extracts from <i>Wolffia Arrhiza</i> (L.) Using Enzyme-assisted Extraction
Author	Jarunipa Kruavattanavet
Degree	Master of Science (Cosmetic Science)
Advisor	Assistant Professor Punyawatt Pintathong, Ph. D.

ABSTRACT

Wolffia arrhiza L., also known locally as 'phaam' in Thailand, contains proteins, essential amino acids, unsaturated fatty acids, vitamins, minerals, carotenoids, phytosterols, and high levels of flavonoids. This study aimed to prepare extracts from *Wolffia arrhiza* L. using green extraction methods and to evaluate the protein content, phenolic compounds, and antioxidant activity of duckweed extracts for cosmetic applications. *Wolffia arrhiza* L. was extracted using cellulase-assisted extraction compared to a conventional method using 70% ethanol. Protein content, total phenolic content, flavonoid content, and antioxidant activities of the extracts were analyzed. The extract obtained using cellulase at a concentration of 5 units/mL yielded the highest protein content at 54.25 ± 0.74 mg BSA/g extract, which was significantly higher than the other extraction methods ($p < 0.05$). This indicates that cellulase-assisted extraction enhances protein yield. For antioxidant activity measured by the DPPH assay, the filtrate extract obtained using cellulase at 15 units/mL showed the highest antioxidant activity at 7.51 ± 0.04 mg TEAC/g extract, significantly higher than the other extracts ($p < 0.05$). In the FRAP assay, the crude phenolic extract using 70% ethanol and the filtrate extract using cellulase at 15 units/mL showed no statistically significant difference, with values of 56.97 ± 0.86 and 54.92 ± 2.48 mg TEAC/g extract, respectively. The crude phenolic extract obtained using 70% ethanol had the highest total phenolic content at 58.93 ± 1.03 mg GAE/g extract and the highest total flavonoid content at 323.73 ± 1.93 mg QE/g extract. Following that, the filtrate extract using cellulase at 15 units/mL had a total phenolic content of 45.56 ± 0.46 mg GAE/g extract

and a total flavonoid content of 86.85 ± 0.16 mg QE/g extract.

Keywords: *Wolffia arrhiza* L., Cellulase Enzyme, Cellulase Enzyme Assistant Extraction



สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	3
2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 ไข่น้ำ (Wolffia arrhiza L.)	4
2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร	9
2.3 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	18
2.4 การนำไปใช้ทางเครื่องสำอาง	23
3 วิธีการดำเนินการวิจัย	24
3.1 สารเคมีและวัตถุดิบ	24
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	25
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย	26
4 ผล และอภิปรายผลการวิจัย	30
4.1 ลักษณะทางกายภาพของไข่น้ำ	30
4.2 การทดสอบการละลายของสารสกัดไข่น้ำ	32
4.3 การวัดสีของสารสกัดไข่น้ำ	34
4.4 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	35
5 สรุปผลการศึกษาค้นคว้า	44
5.1 สรุปผลการศึกษา	44
5.2 ข้อเสนอแนะ	45
รายการอ้างอิง	46
ภาคผนวก	52

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 แหล่งที่มาของไข่น้ำ (Wolffia) ทั้ง 11 ชนิด	4
3.1 รายการสารเคมีและวัตถุดิบ	24
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	25
4.1 ผลทดสอบการละลายของสารสกัดไข่น้ำด้วย	33
4.2 ปริมาณสารสกัดหยาบของสารสกัดจากไข่น้ำ	35
4.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total Protein Content) ด้วยวิธี Dye - binding (Bradford assay)	37
4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดไข่น้ำ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu	38
4.5 ปริมาณรวมของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดไข่น้ำ ด้วยวิธี Aluminum Chloride	39
4.6 ตารางผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay	40
4.7 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay	42

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 ลักษณะทางกายภาพของไชน้ำ	6
2.2 ลักษณะของผนังเซลล์พืช	15
2.3 โครงสร้างพื้นฐานของสารพินอลิก	20
2.4 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์	21
4.1 ไชน้ำสดเมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40x	30
4.2 (ก) ภาพไชน้ำก่อนอบ(พืชสด), (ข) หลังอบ(พืชแห้ง) และ (ค) หลังบด	31
4.3 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากไชน้ำ	32



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของปัญหาและความสำคัญ

ไช้เป็นอีกหนึ่งกระแสนิยมที่มาแรงและเป็นทีกล่าวถึงอย่างมาก ในภาคอุตสาหกรรมเกษตร เป็นพืชที่ได้รับความนิยม อยู่ในยุทธศาสตร์นโยบายการขับเคลื่อนใหม่ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในด้านอาหารแห่งอนาคต เพื่อเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร ไช้ มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นที่กำเนิดในประเทศไทย คือ ผ่า ไช้ที่ผ่านการอบแห้งแล้ว อุดมไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ ได้แก่ โปรตีน 45% คาร์โบไฮเดรต 20% ไขมัน 5% และสารอาหารอื่น ๆ 5% ซึ่งปริมาณโปรตีนสูงเทียบเท่ากับถั่วและธัญพืช อีกทั้งยังมีกรดอะมิโนที่ให้โปรตีนคุณภาพสูงไม่แพ้เนื้อสัตว์ และมีเบต้าแคโรทีนประมาณร้อยละ 60 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งคุณค่าทางอาหารของไช้สอดคล้องกับการแก้ปัญหาภาวะทุพโภชนาการของประชากรในแต่ละประเทศ ได้แก่ โรคขาดโปรตีน โรคขาดวิตามินเอ และโรคที่เกิดจากการได้รับเชื้อโหยอาหารต่ำ นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง ถือได้ว่าไช้เป็นซูเปอร์ฟู้ดสุดยอดของแหล่งโปรตีนทดแทน (Appenroth et al., 2018)

องค์ประกอบทางเคมีของไช้เมื่อนำพืชดังกล่าวมาอบแห้งและนำมาสกัดด้วยเอทานอลและหาล่องค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เครื่องมือโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และโครมาโทกราฟีแบบของเหลวความดันสูง ผลการวิเคราะห์พบว่า ไช้ประกอบด้วยสารสำคัญ 8 ประเภท ได้แก่ apigenin-7-O- β -D-glucoside, isovitexin, orientin, isoorientin, luteolin-7-O- β -D-glucoside, isoorientin-6-O- β -D-glucoside และ apigenin-6,8-di-C- β -D-glucoside จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงสามารถวิเคราะห์ได้ว่าการศึกษาไช้จัดเป็นพืชที่มีความน่าสนใจ เพื่อเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในประเภทฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ซึ่งเป็นอนุพันธ์หนึ่งของสารฟีนอลิก (จุฬารัตน ดอกไม้งาม, 2560)

การได้มาของสารสกัดจากไช้นั้นต้องผ่านกระบวนการสกัดสารจากพืชก่อน การสกัดสารจากพืชทำได้หลากหลายวิธี เช่น การสกัดแบบแช่หมักด้วยตัวทำละลาย (Maceration extraction) การสกัดแบบซอกซ์เลต (Soxhlet extraction) เป็นต้น วิธีเหล่านี้ใช้ระยะเวลาในการสกัดค่อนข้างนาน อีกทั้งยังจำเป็นต้องใช้สารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในปริมาณสูง ซึ่งเป็นสารที่ระเหยง่าย อาจส่งผลถึงปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม นำไปสู่มลพิษทางอากาศ ไวไฟง่าย เกิดความเป็นพิษเป็นสารก่อมะเร็งได้ (Garrigues, 2019) ดังนั้นจึงเกิดกระแสการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมอย่างกว้างขวาง

ในปัจจุบันและการใช้เคมีสีเขียว (Green chemistry) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงเป็นศาสตร์แขนงหนึ่งที่มุ่งเน้นการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมมาจากสาเหตุเริ่มต้น เช่น การใช้สารเคมีและผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นพิษ (Designing safer chemicals and products), การปฏิบัติงานโดยเลือกใช้สารละลายและกระบวนการที่ไม่เป็นพิษ (Use safer solvents and reaction conditions) ในการสกัด (ณัฏฐ์คนิน ศุภเมธานนท์ และคณะ, 2559) ดังนั้น การสกัดแบบสีเขียว (green extraction) สามารถให้คำจำกัดความ คือ การวางแผนการพัฒนาในขั้นตอนการใช้สารเคมีต่าง ๆ โดยการหลีกเลี่ยง ลดการใช้ หรือสังเคราะห์สารที่เป็นอันตรายและมีพิษต่อระบบนิเวศ การพัฒนาและวางแผนกระบวนการสกัดที่ประหยัดพลังงาน และการผลิตสารจากธรรมชาติที่สามารถรีไซเคิลได้ โดยให้ความสำคัญกับความปลอดภัยและคุณภาพของสารสกัดที่ได้ การสกัดโดยใช้เอนไซม์ช่วยสกัด (enzyme-assisted extraction) เป็นหนึ่งในการสกัดที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม คือ การสกัดสารโดยใช้เอนไซม์การใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดนั้น มีคุณสมบัติในการแยกสลายสำคัญและองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากพืชที่ศึกษา ทำให้ได้สารสำคัญและผลผลิตเพิ่มมากขึ้น โดยมักใช้ร่วมกับการสกัดทางเคมีเพื่อให้เอนไซม์ช่วยย่อยสลายส่วนประกอบของพืชในขั้นต้นก่อนที่จะทำการสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม (Puri et al., 2012) การสกัดโปรตีนจากพืชโดยใช้เอนไซม์ เช่น เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) และเพกตินเนส (pectinase) จะช่วยในการย่อยสลายโครงสร้างของผนังเซลล์พืช ทำให้โปรตีนที่ถูกยึดเกาะอยู่ในเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมาและละลายในสารละลายสกัดได้มากขึ้น (ทิพวรรณ ทองสุข, 2559) วิธีการนี้ถือเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากลดการใช้ตัวทำละลายเคมี ใช้พลังงานและอุณหภูมิต่ำ ใช้เวลาสกัดน้อย และทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Zhao et al., 2016)

ในทางเครื่องสำอางยังไม่พบการนำสารสกัดจากไผ่ไปใช้ประโยชน์มาก วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการสกัดสารจากไผ่ด้วยวิธีการสกัดแบบสีเขียว ได้แก่ การใช้เอนไซม์ในการช่วยสกัดซึ่งเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไม่ทำลายธรรมชาติเพื่อที่จะสามารถนำไปพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เวชสำอาง หรือยาได้อีกต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อเตรียมสารสกัดจากไผ่ด้วยวิธีสีเขียว

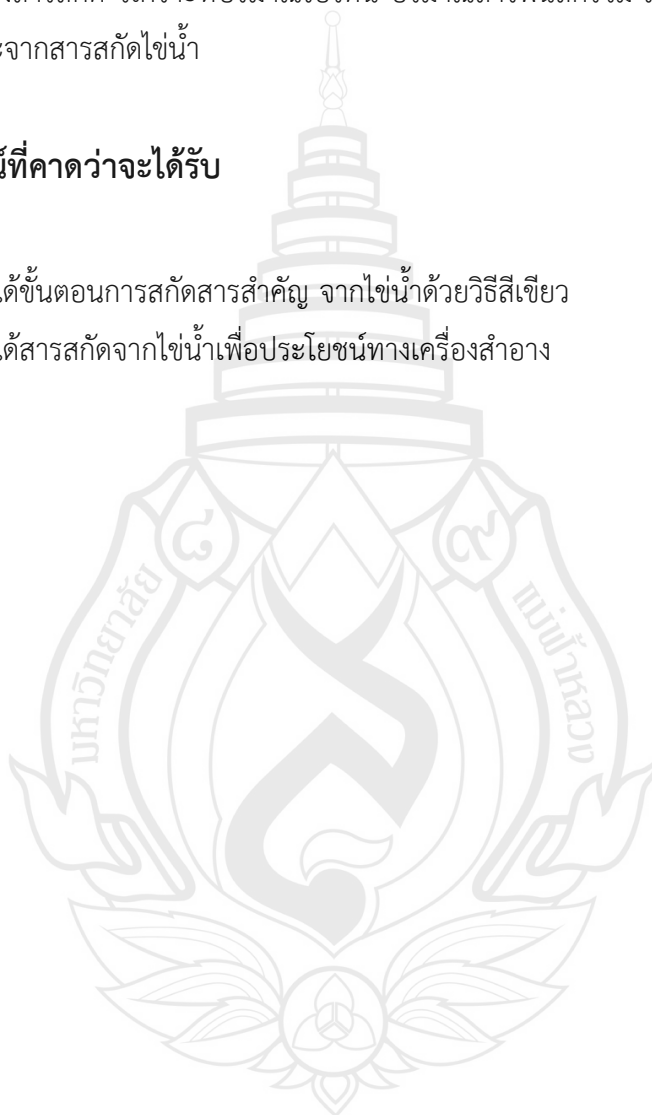
1.2.2 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไผ่เพื่อประโยชน์ทางเครื่องสำอาง

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

เตรียมสารสกัดจากไข่น้ำด้วยวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมและการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด จากนั้นนำสารสกัดมาทดสอบหาความคงตัวทางกายภาพและเคมี โดยการศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานทางกายภาพของสารสกัด วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ปริมาณสารฟีนอลิกรวม สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดไข่น้ำ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ได้ขั้นตอนการสกัดสารสำคัญ จากไข่น้ำด้วยวิธีสีเขียว
- 1.4.2 ได้สารสกัดจากไข่น้ำเพื่อประโยชน์ทางเครื่องสำอาง



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ไข่น้ำ (*Wolffia arrhiza* L.)

ไข่น้ำภาษาถิ่นเรียกว่า ผำ ไข่น้ำถูกจำแนกอยู่ในวงศ์แหน (Lemnaceae) สกุล *Wolffia* มีหลากหลายสายพันธุ์ เป็นพืชน้ำขนาดเล็กชนิดหนึ่งที่เกิดตามแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย เป็นพืชที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการเป็นแหล่งอาหารชนิดใหม่ครบทุกประการ (สุทิน สมบูรณ์, 2550) ไข่น้ำแตกต่างจากแหนชนิดอื่น คือ ไม่มีราก มีขนาดเล็กกว่า และพบได้เฉพาะในแหล่งน้ำบริสุทธิ์เท่านั้น ช่วงเวลาที่พบไข่น้ำได้มาก คือ ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน ซึ่งมีผลผลิตรวม 256 ตันต่อปี (Appenroth et al., 2018) ผำมีทั้งหมด 11 ชนิดโดยมีแหล่งที่มาและการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.1 แต่ชนิดไข่น้ำในไทยที่พบมากที่สุด คือ *W. globosa* (Roxburgh) และ *W. arrhiza* (Linnaeus) Horker ex Wimmer) วิลาสินี ดีปัญญา (2555) โดยความแตกต่างกันของทั้งสองชนิด คือ *W. arrhiza* จะมีความกว้างมากกว่าความยาวมีขนาดใหญ่กว่า *W. globosa* ผิวสีเขียวเข้ม มันวาว ขณะที่ *W. globosa* ลักษณะเฉพาะคือมีความยาวมากกว่าความกว้าง มีขนาดเล็กกว่า มีรูปทรงทรงกระบอกที่ชัดเจน ลักษณะโปร่งแสงกว่า *W. arrhiza* (ภานุมาศ ทองคำ, 2562)

ตารางที่ 2.1 แหล่งที่มาของไข่น้ำ (*Wolffia*) ทั้ง 11 ชนิด

สกุล	ชนิด (Species)	แหล่งที่มา (ประเทศ)
<i>Wolffia</i>	Angusta	มาเลเซีย
<i>Wolffia</i>	Arrhiza	เคนยา, บลาซิล, เยอรมนี
<i>Wolffia</i>	Australiana	นิวซีแลนด์
<i>Wolffia</i>	Borealis	อเมริกา
<i>Wolffia</i>	Brasiliensis	อาร์เจนตินา
<i>Wolffia</i>	Columbiana	อเมริกา
<i>Wolffia</i>	Cylindracea	ซิมบับเว
<i>Wolffia</i>	Elongata	โคลอมเบีย
<i>Wolffia</i>	Globosa	ไทย, อินเดีย

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สกุล	ชนิด (Species)	แหล่งที่มา (ประเทศ)
<i>Wolffia</i>	<i>Microscopica</i>	อินเดีย
<i>Wolffia</i>	<i>Neglecta</i>	ปากีสถาน

ที่มา ดัดแปลงจาก Appenroth et al. (2018)

ไข่น้ำมีการกระจายพันธุ์ที่เด่นชัดในช่วงฤดูหนาวต่อเนื่องกับฤดูร้อน โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ ซึ่งมักพบในแหล่งน้ำนิ่ง ลักษณะเด่นของไข่น้ำ คือ มีดอกที่มีขนาดเล็กที่สุดในโลก โดยดอกจะออกเป็นช่อภายในถุงที่ขอบทาลัส เป็นดอกเดี่ยวและแยกเพศ ซึ่งประกอบด้วยดอกเพศผู้ 1 ดอก (มีเพียงอัณฑะ 2 ช่อง ไม่มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอก) และดอกเพศเมีย 1 ดอก (ไม่มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอก) ซึ่งมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การสืบพันธุ์ (reproduction) ไข่น้ำสามารถสืบพันธุ์ได้ 2 แบบ ได้แก่ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เนื่องจากไข่น้ำเป็นพืชมีดอก โดยการผสมเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียภายในดอก อาศัยแมลงหรือน้ำ ไข่น้ำสามารถสืบพันธุ์ได้ 2 แบบ คือ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เนื่องจากเป็นพืชมีดอก โดยการผสมเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียภายในดอก อาศัยแมลงหรือน้ำในการแพร่กระจายละอองเกสร ซึ่งในประเทศไทยดอกและเมล็ดจะพบประมาณเดือนตุลาคมถึงมกราคม และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) แบ่งทาลัสใหม่ออกทางด้านข้าง ทาลัสใหม่ (daughter frond) ที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็กกว่าทาลัสเดิม (mother frond) โดยระยะเวลาในการเจริญเติบโตจนมีขนาดเท่ากับทาลัสเดิม และหลุดออกเป็นเดี่ยว ๆ ใช้เวลาประมาณ 5-6 วัน สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไข่น้ำ คือ บริเวณที่มีอากาศร้อน และมีแสงแดดมาก โดยทั่วไปจะพบในแหล่งน้ำนิ่ง เช่น บึง หนองน้ำ บ่อเก่า หรือบริเวณที่มีน้ำขัง และมีใบไม้และมูลสัตว์สะสมอยู่ โดยมีระดับน้ำลึกตั้งแต่ 20 เซนติเมตรขึ้นไป ธาตุอาหารหรือปุ๋ยในน้ำเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของไข่น้ำ โดยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อไข่น้ำนั้นเหมือนกับพืชทั่วไป ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม นอกจากนี้ ไข่น้ำยังต้องการพลังงานแสงเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ไข่น้ำมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วในช่วงฤดูหนาวต่อกับฤดูร้อน และจะมีการเจริญเติบโตที่ลดลงในฤดูฝน เนื่องจากความเข้มข้นของธาตุอาหารในฤดูฝนจะเจือจางกว่า และความเข้มข้นแสงก็น้อยกว่า หากสภาพแวดล้อมไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโต ไข่น้ำจะปรับตัวโดยการเปลี่ยนรูปร่างและเข้าสู่ระยะพักที่เรียกว่า turion ซึ่งจะมีลักษณะ คือ สีของไข่น้ำจะเข้มขึ้น และขนาดและโครงสร้างจะลดลง ประกอบด้วยแบ่ง

จำนวนมากและจมอยู่บริเวณก้นบ่อ เนื่องจากความหนาแน่นของไข่น้ำมีการเปลี่ยนแปลง ไข่น้ำจึงมีชีวิตรอดในช่วงฤดูหนาว อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไข่น้ำ คือ ต่ำกว่า 14 องศาเซลเซียส แต่ในระยะ turion สามารถมีชีวิตอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นานหลายสัปดาห์โดยไม่ต้องมีการเจริญเติบโต (วิลาสินี ดิปัญญา, 2555)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไข่น้ำ

ไข่น้ำจัดเป็นพืชน้ำลอยที่มีดอกเล็กที่สุดในกลุ่มพืชดอก มีลักษณะเป็นเม็ดค่อนข้างกลม หรือรูปไข่ มีสีเขียวมันวาว และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.5 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 2.1 ไข่น้ำจัดเป็นพืชที่ไม่มีรากและไม่มีใบ โดยมีโครงสร้างที่เรียกว่าทาลัส (thalus) ซึ่งทาลัสนี้ทำหน้าที่เป็นทั้งต้นและใบ โดยส่วนใหญ่มีอยู่กันเดี่ยวๆ หรือติดกันเป็นคู่ๆ ส่วนใหญ่เป็นเนื้อเยื่อพาราเณไคมา (parenchyma) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์มีชีวิตในลำต้นที่มีสีเขียว โดยมีคลอโรพลาสต์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์แสง และมีช่องอากาศแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ (สุพรรณิ ทิพนี, 2560)



ที่มา สุพรรณิ ทิพนี (2560)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของไข่น้ำ

2.1.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในไข่น้ำ

ผลการศึกษาจากคณะนักวิจัยวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2514 พบว่า ไข่น้ำมีโปรตีนในปริมาณสูง มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ใช้ทรัพยากรในการผลิตน้อย สามารถให้ผลผลิตโปรตีนได้มากกว่าถั่วเหลืองเมื่อเทียบในพื้นที่เพาะปลูกเท่ากัน นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน และอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีความสำคัญอีกมากมาย เช่น เหล็ก แคลเซียม สังกะสี ช่วยเสริมกระดูก การไหลเวียนโลหิต และเพิ่มภูมิคุ้มกัน วิตามินบี12 ช่วยในการทำงานของระบบประสาท ซึ่งไม่พบในผลิตภัณฑ์จากพืชตามธรรมชาติชนิดอื่น วิตามินเอลูทีน ซีอาแซนทิน ช่วยบำรุงสายตา วิตามินบี-คอมเพล็กซ์ วิตามินซี วิตามินอี วิตามินเค โฟเลต ไข่น้ำมีคุณสมบัติเด่น คือ มีโปรตีนสูง และยังมีสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ในปริมาณมาก ทั้งยังย่อยง่าย มีไฟเบอร์สูง ซึ่งดีต่อระบบการ

ย่อยอาหาร และมีแคลอรี แบ่ง น้ำตาล และไขมันต่ำ จึงเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุม น้ำหนัก ที่สำคัญไปกว่านั้น ใข้ยังช่วยดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศได้เทียบเท่ากับป่า ที่สมบูรณ์ในพื้นที่ขนาดเท่ากัน ปริมาณกรดอะมิโนที่พบในใข้มีด้วยกัน 17 ชนิด ประกอบด้วย อะลานีน (alanine, Ala), อาร์จินีน (arginine, Arg), กรดแอสพาร์ติก (aspartic acid, Asp), ซีสเทอีน (cysteine, Cys), กรดกลูตามิก (glutamic acid, Glu), ไกลซีน (glycine, Gly), ฮิสทีดีน (histidine, His), ไอโซลิวซีน (isoleucine, Ile), ลิวซีน (leucine, Leu), ไลซีน (lysine, Lys), เมไทโอนีน (methionine, Met), ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine, Phe), โพรลีน (proline, Pro), ซีรีน (serine, Ser), ทรีโอนีน (threonine, Thr), ทริปโตเฟน (tryptophan, Trp) และวาลีน (valine, Val) ใข้ทุกสายพันธุ์ล้วนประกอบด้วยโปรตีนที่มีคุณภาพ ซึ่งมีอัตราส่วนของกรดอะมิโน จำเป็น นอกจากนี้ยังมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว 48 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณวิตามิน แร่ธาตุ สารสำคัญกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และไฟโตสเตอรอล (phytosterols) (Appenroth et al., 2018)

งานวิจัยโดย Appenroth et al. (2018) แสดงให้เห็นว่า ใข้ที่ผ่านการทำแห้งมีโปรตีนสูง ถึง 45% คาร์โบไฮเดรต 20% โยอาหาร 25% ไขมัน 5% และอื่น ๆ 5% โดยมีปริมาณโปรตีนใน น้ำหนักแห้งที่ใกล้เคียงกับถั่วและธัญพืช และยังประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ให้โปรตีนคุณภาพสูงคล้าย กับเนื้อสัตว์และมีเบต้าแคโรทีนประมาณ 600 กรัม หรือ 100,000 ไมโครกรัม RE ใน 1 กิโลกรัมน้ำ แห้ง เมื่ออายุ 24 วัน ซึ่งคุณค่าทางอาหารของใข้ที่สอดคล้องกับการแก้ปัญหาภาวะทุพโภชนาการ ของประชากรในแต่ละประเทศ ได้แก่ โรคขาดโปรตีน โรคขาดวิตามินเอ และโรคที่เกิดจากเยื่อใย อาหารต่ำ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของใข้ที่ผ่านการอบแห้งและสกัดด้วยเอทานอล โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และของเหลวความดันสูง พบสารสำคัญ 8 ชนิด ได้แก่ apigenin-7-O- β -D-glucoside, vitexin, isovitexin, orientin, isoorientin, luteolin-7-O- β -D-glucoside, isoorientin-6-O- β -D-glucoside และ apigenin-6,8-di-C- β -D-glucoside จากผลการ วิเคราะห์นี้แสดงให้เห็นว่าใข้เป็นพืชที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาในฐานะแหล่งสารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิก (จุฬารรรณ ดอกไม้งาม, 2560) มีข้อมูลเพิ่มเติมว่าใข้มี biochanin A ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ทำหน้าที่ควบคุมการ เจริญเติบโตของพืชชนิดนี้ รวมถึงมีเบต้าแคโรทีนและสารประกอบฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติในการต้าน อนุมูลอิสระ ป้องกันเซลล์เสื่อมสภาพ และลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง (Nini et al., 2016)

งานวิจัยศึกษาผลของการอบสมุนไพรท้องถิ่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 30 ชนิด โดยเน้นการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC) ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH Scavenging Assay และ FRAP) และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาสารสกัดสารจากไข่น้ำที่ทำการเพาะเลี้ยงและนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท พบว่าสารสกัดไข่น้ำจากการเลี้ยงที่ใช้เอทานอลในการสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด มีปริมาณเท่ากับ 35.592 ± 0.129 mgGAE/g extract และทำการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดไข่น้ำด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด โดยใช้ BHT และ Vitamin C เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดไข่น้ำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.019 mg/ml ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับปริมาณสารฟีนอลิกที่ใช้เอทานอลในการสกัดให้ปริมาณที่สูงที่สุด (วรรณนิ จันทร์แก้ว และคณะ, 2562)

รายงานวิจัยของ จุฬารวรรณ์ ดอกไม้งาม (2560) ได้ทำการเตรียมตัวอย่างไขนํ้าแล้วทำการสกัดสารฟีนอลิกด้วยวิธีการสกัดแบบกะ โดยนำผงไขนํ้า 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง และเติมตัวทำละลาย ได้แก่ เอทานอลเข้มข้น 30,50,70,95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง กวนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย ทำการปรับอุณหภูมิโดยใช้เครื่องเขย่าปรับอุณหภูมิ อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ นำไปวิเคราะห์

หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่าเมื่อทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากไข่น้ำโดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลเป็น 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพการสกัดดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และให้ผลได้ของสารสกัดฟีนอลิกที่มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นอื่น ๆ โดยสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ในช่วง 10 นาทีแรกสูงในปริมาณถึง 27.89 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมไข่น้ำ ลักษณะเส้นกราฟจะมีความชันที่คล้ายคลึงกับการสกัดโดยใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นอื่น ๆ คือ ในช่วง 30 นาทีแรกจะมีค่าผลได้ของการสกัดที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจาก 30 นาทีแรก ยังสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเช่นกันแต่มีอัตราการเพิ่มที่น้อยกว่าในช่วงแรกอย่างเห็นได้ชัด เมื่อใช้เวลาเป็น 30-120 นาที สามารถสกัด สารประกอบฟีนอลิกที่ได้เพิ่มขึ้นทีละน้อย จนกระทั่งเกือบคงที่ในเวลา 180 นาที ได้ค่าผลได้สารประกอบ ฟีนอลิกสูงสุดเมื่อใช้เวลาในการสกัด 240 นาที คือ เป็น 39.72 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมไข่น้ำ เมื่อใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าค่าผลได้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากไข่น้ำมีค่าน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดโดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ในช่วง 10 นาทีแรกได้ในปริมาณ 22.02 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมไข่น้ำ ลักษณะเส้นกราฟจะมีความชันที่คล้ายคลึงกับการสกัดโดยใช้ สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นอื่น ๆ คือ ในช่วง 30 นาทีแรกจะมีค่าผลได้ของการสกัดที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจาก 30 นาทีแรก ยังสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเช่นกันแต่มีอัตราการเพิ่มที่น้อยกว่าในช่วงแรกอย่างเห็นได้ชัด เมื่อใช้เวลาเป็น 30-120 นาที สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่ได้เพิ่มขึ้นทีละน้อย จนกระทั่งเกือบคงที่ในเวลา 180 นาที ได้ค่าผลได้สารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเป็น 38.05 มิลลิกรัมสมมูล กรดแกลลิกต่อกรัมไข่น้ำ

2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชสามารถทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีใดหรือใช้ตัวทำละลายใด ก็ได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) ซึ่งในพืชนั้นมีส่วนประกอบทั้งสารออกฤทธิ์เรียกว่าสารสำคัญ และสารไม่ออกฤทธิ์เรียกว่าสารเฉื่อย ดังนั้นเป้าหมายของการสกัดสารสำคัญจากพืชจึงเป็นการแยกเอาสารสำคัญออกมาเพื่อให้ได้สารสกัดเข้มข้นสูงที่สุดและใช้ปริมาณพืชให้น้อยที่สุด

2.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction)

การแยกสารสำคัญจากพืชด้วยตัวทำละลาย เป็นการดึงสารโดยใช้หลักการละลายระหว่างตัวทำละลายกับสารสำคัญในสมุนไพร โดยสิ่งที่สำคัญคือการใช้หลักการละลายของควมมีขั้ว (Polarity) ของตัวทำละลายและสารสำคัญ การละลายของสารสำคัญในตัวทำละลายขึ้นอยู่กับความใกล้เคียงของควมมีขั้วระหว่างทั้งสอง โดยหลักการ Like Dissolves Like อธิบายว่า สารที่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วผ่านแรงไดโพล-ไดโพล (Dipole-Dipole) ในขณะที่สารที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วผ่านแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals Force) วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ประหยัด โดยจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับ การกลั่นที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งอาจทำให้องค์ประกอบทางเคมีและกลิ่นผิดเพี้ยนไปจากเดิม วิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายจึงเป็นทางเลือกที่ได้รับความนิยมในอุตสาหกรรม

วิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายมีหลากหลายรูปแบบ ตัวอย่างเช่น การหมัก (Maceration) การหมักแบบต่อเนื่อง (Percolation) การสกัดโดยใช้คลื่นเสียง (Ultrasonic extraction) และการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave extraction) เป็นต้น การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) หรือ การสกัดด้วยของเหลว (liquid extraction) เป็นกระบวนการที่ใช้ตัวทำละลายที่มีความสามารถในการสกัดของเหลวที่ต้องการสกัดตัวถูกละลายออกจากของเหลวชนิดหนึ่งโดยอาศัยหลักการถ่ายโอนมวลส่วนประกอบหนึ่งจากเฟสของแข็งหรือของเหลวไปยังเฟสของสารละลายที่ใช้ทำการสกัด

ตัวอย่างสารละลายที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญในพืช ซึ่งมักจะนิยมใช้สารละลายดังต่อไปนี้ (1) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพ แต่มีความจำเพาะเจาะจงต่ำทำให้เกิดอิมัลชันได้ง่าย และอาจสลายตัวให้กรดเกลือได้หากใช้กับสารสกัดที่เป็นด่าง (2) อีเธอร์ (Ether) มีประสิทธิภาพในการละลายสารน้อยกว่าคลอโรฟอร์ม แต่มีความจำเพาะเจาะจงในการละลายที่ดีกว่าคลอโรฟอร์ม ข้อควรระวังในการใช้อีเธอร์ คือ เป็นสารที่ระเหยง่าย ระบิดง่าย เกิดออกไซด์ได้ง่ายและดูดน้ำได้ดีมาก (3) เฮกเซน (Hexane) เฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสารที่ไม่มีขั้ว โดยทั่วไปใช้ในการสกัดไขมันออกจากพืช และมีข้อดีคือราคาถูก (4) แอลกอฮอล์ (Alcohol) ที่ใช้มาก คือ เมทานอลและเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติในการละลายสารได้หลากหลาย ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว และยังสามารถใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในพืชได้ (นันทวัน บุญยะประภัศร, 2536)

2.2.2 การสกัดแบบสีเขียว หรือการสกัดที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Green extraction)

ด้วยเหตุที่ปัญหาสิ่งแวดล้อมส่งผลกระทบต่อประชาชนในวงกว้าง จึงเกิดกระแสการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมที่แพร่หลายในปัจจุบัน และมีแนวโน้มที่จะขยายตัวอย่างต่อเนื่อง เคมีสีเขียว (Green chemistry) เป็นสาขาวิชาหนึ่งที่มีมุ่งเน้นการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมตั้งแต่ต้นทางโดยมีหลักการ 12 ประการ (Anastas et al., 1998) ดังนี้ ป้องกันการเกิดของเสีย (Prevent waste), ออกแบบกระบวนการสังเคราะห์ให้สารตั้งต้นถูกนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์มากที่สุด (Atom economy), ออกแบบกระบวนการสังเคราะห์ ที่ไม่เป็นอันตรายหรือเป็นพิษน้อยหรือไม่เป็นพิษ (Less hazardous chemical syntheses), ออกแบบสารเคมีและผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นพิษ (Designing safer chemicals and products), ใช้ตัวทำละลายและกระบวนการที่ปลอดภัย (Use safer solvents and reaction conditions), เพิ่มประสิทธิภาพของการใช้พลังงาน (Design for energy efficiency), ใช้สารหรือวัตถุดิบที่น่ากลับมาใช้ใหม่ได้ (Use renewable feedstock), ลดการเกิดสารอนุพันธ์ (Reduce derivatives), ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalysts), ออกแบบให้ผลิตภัณฑ์ที่ใช้แล้วมีการสลายตัวโดยไม่ก่ออันตราย (Design for degradation), มีการวิเคราะห์อย่างทันทั่วถึงเพื่อป้องกันการเกิดมลภาวะ (Real time analysis for pollution prevention), ใช้สารเคมีที่ลดอัตราการเกิดอุบัติเหตุ (Inherently safer chemistry for accident prevention)

การสกัดด้วยวิธีที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การสกัดสารด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid extraction : SFE), การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงช่วยสกัด (Ultrasound-assisted extraction : UAE), การสกัดด้วยไมโครเวฟช่วยสกัด (Microwave-assisted extraction : MAE), การสกัดด้วยของเหลวความดันสูง (Pressurized liquid extraction : PLE), การสกัดสารโดยใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ (Pulsed electric field extraction : PEFE), การสกัดด้วยตัวทำละลายยูเทคติก (Deep eutectic solvents : DESs), การสกัดด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด (Enzyme-assisted extraction : EAE)

2.2.2.1 การสกัดสารด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid extraction : SFE)

การสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดเป็นการใช้ประโยชน์จากสารที่อยู่ในสถานะที่มีอุณหภูมิและความดันสูงกว่าจุดวิกฤต ซึ่งสารในสถานะนี้มีคุณสมบัติพิเศษคือ สามารถแทรกซึมผ่านของแข็งได้เหมือนแก๊ส และละลายสารได้เหมือนของเหลว ทำให้สามารถนำมาใช้ในการสกัดสารต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างของสารที่นิยมใช้ในกระบวนการนี้ คือ ซุปเปอร์คริติคอลคาร์บอนไดออกไซด์ (มีค่าความดันวิกฤต 73.8 บาร์ และอุณหภูมิวิกฤต 31.1 องศาเซลเซียส) ซึ่งอยู่ในสถานะผสมระหว่างแก๊สและของเหลวและมีคุณสมบัติในการละลายสารที่ไม่มีขั้ว (Non-polar

compound) ได้ดี การสกัดด้วยวิธีนี้มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาเพื่อดึงสารต่าง ๆ เช่น สารให้กลิ่นรส (Flavor agent) สารให้สี (Color agent) น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) คาเฟอีน วิตามิน คอเลสเตอรอล เป็นต้น สารสกัดที่ได้จากวิธีการนี้ มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและ ผู้บริโภคมากกว่าวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่อาจไม่สามารถแยกตัวทำละลายออกมาได้หมดโดยสมบูรณ์ จึงอาจทำให้มีตัวทำละลายตกค้าง (ดวงกมล เรือนงาม, 2557) แต่มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูงและน้ำที่อยู่ในสถานะของไหลวิกฤตยิ่งยวดมีฤทธิ์กัดกร่อน มีต้นทุนที่สูง (Koina et al., 2023)

2.2.2.2 การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasound-assisted extraction : UAE)

เทคนิคการสกัดสารโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง หรืออัลตราโซนิก เป็นการนำคลื่นเสียงความถี่สูงมาใช้ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำ เพื่อแยกสารต้านอนุมูลอิสระออกจากวัตถุดิบ เครื่องมือชนิดนี้มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอก มีความยาวและคลื่นความถี่ที่แตกต่างกันไป โดยเครื่องมือดังกล่าวจะปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในตัวพา ซึ่งในที่นี้คือ น้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ กระบวนการนี้จะก่อให้เกิดฟองก๊าซ ซึ่งมีการหดตัวและขยายตัวเป็นวัฏจักร เมื่อฟองก๊าซขยายตัวจะดึงสารที่อยู่ในวัสดุออกมาละลายในตัวทำละลาย และเมื่อฟองก๊าซแตกออก จะเกิดความดันและความร้อนสูงในบริเวณนั้น ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อของวัสดุฉีกขาด นอกจากนี้ อุณหภูมิที่สูงขึ้นยังช่วยให้สารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการสกัดละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น ประสิทธิภาพของการสกัดด้วยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความถี่ของคลื่นเสียงที่ใช้ โดยความถี่สูงจะช่วยลดเวลาในการสกัด คุณสมบัติของตัวทำละลาย เช่น ความดันไอ โดยตัวทำละลายที่มีความดันไอสูงจะให้ประสิทธิภาพในการสกัดที่ดีกว่าตัวทำละลายที่มีความดันไอต่ำ อุณหภูมิที่ใช้ ซึ่งการสกัดจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิสูง และความเข้มของคลื่นเสียงที่ใช้ วิธีนี้มักถูกนำไปใช้ในการสกัดสารกลุ่มเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolites) จากพืช (ดวงกมล เรือนงาม, 2557) ข้อดีของวิธีนี้ คือ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การแพร่และการละลายใกล้เคียงกับการให้ความร้อน ใช้เวลาในการสกัดน้อย ข้อจำกัด คือ ความไม่สม่ำเสมอในการกระจายพลังงาน ตัวทำละลายต้องมีความดันไอสูงจะสามารถสกัดได้ดีกว่า ปนเปื้อนตัวทำละลาย ยากในการ scale up (Koina et al., 2023)

2.2.2.3 การสกัดด้วยไมโครเวฟ (Microwave -assisted extraction : MAE)

การสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟเป็นการใช้ความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟ ทำให้โมเลกุลน้ำในเซลล์พืชเกิดการสั่นสะเทือนอย่างรุนแรง จนเซลล์แตกออกเนื่องจากความร้อนสูง และปล่อยสารสำคัญที่อยู่ภายในออกมา การสกัดสารสำคัญโดยใช้คลื่นไมโครเวฟเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ ใช้เวลาสกัดน้อย ใช้ตัวทำละลายน้อย ให้ผลผลิตสูง และได้สารสกัดที่มีคุณภาพดีกว่า ต้นทุนต่ำกว่าแบบใช้ความร้อนในการสกัด (อาทิตย์ ดุจเฒ่า และคณะ, 2565)

ข้อจำกัด คือ เป็นการสกัดแบบ non-selective, สารอาจถูกออกซิไดซ์ด้วยความร้อน, มีตัวทำละลายตกค้างอยู่ที่ไม้น้ำ (Koina et al., 2023)

2.2.2.4 การสกัดด้วยของไหลความดันสูง (Pressurized liquid extraction : PLE)

การสกัดด้วยความดันและอุณหภูมิสูงเป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสาร ข้อดีของเทคนิคนี้คือ สามารถลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม มีความสะดวก รวดเร็ว และสามารถนำไปใช้ในการเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรสำหรับโภชนเภสัชภัณฑ์ (nutraceuticals) และการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดด้วยเทคนิค PLE ได้แก่ อุณหภูมิ ความดันตัวทำละลาย และความชื้นของพืชสมุนไพร เป็นต้น (ชุดิมา ลัมมัทวาทิณี และคณะ, 2555) ข้อดีของวิธีนี้ คือ ระยะเวลาการสกัดสั้น ประสิทธิภาพของสารสกัดสูงขึ้น ข้อจำกัด คือ ต้นทุนสูง อุปกรณ์ค่อนข้างมีขั้นตอนเยอะ ประสิทธิภาพต่ำของสารที่ไวต่อความร้อน การสกัดไม่สมบูรณ์เนื่องจากปริมาตรของสารสกัดลดลง (Koina et al., 2023)

2.2.2.5 การสกัดสารโดยใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ (Pulsed electric field extraction : PEFE)

เทคนิคนี้ทำงานโดยการส่งสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มสูงผ่านตัวกลาง ซึ่งจะไปกระทบกับผนังเซลล์ ทำให้ชั้นฟอสโฟลิพิดที่เป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ เกิดเป็นรูพรุนที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Electroporation) และปล่อยสารภายในเซลล์ออกมาภายนอก หากสนามไฟฟ้ามีความเข้มสูงมากพออาจทำให้เซลล์แตก (Disintegration) และปล่อยสารต่าง ๆ ออกมา สนามไฟฟ้าแบบพัลส์มีการประยุกต์ใช้ในหลายด้าน เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียในทางการแพทย์ เพื่อการรักษา และในการสกัดสารจากสิ่งมีชีวิต เป็นต้น นอกจากนี้ การใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่มีความแรงสูงยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวได้ เช่น น้ำผลไม้ที่ผ่านกระบวนการทำให้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ยังมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำผลไม้คั้นสดและยังคงคุณค่าทางโภชนาการได้อีกด้วย (เวสารัช จรเจริญ และคณะ, 2562) ข้อดีของวิธีนี้ คือ ใช้พลังงานต่ำ สามารถทำการสกัดได้อย่างต่อเนื่อง ข้อจำกัด คือ ความยากในเรื่องของการ scale up พารามิเตอร์ที่ใช้ต้องควบคุมอย่างแม่นยำ (Koina et al., 2023)

2.2.2.6 การสกัดด้วยตัวทำละลายยูเทคติก (Deep eutectic solvents : DESs)

เป็นเทคนิคการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นส่วนผสมของตัวรับพันธะไฮโดรเจน (HBA) อย่างน้อยหนึ่งตัวและผู้บริจาคพันธะไฮโดรเจน (HBD) หนึ่งราย รวมถึงกรดคาร์บอกซิลิกและสารประกอบหมู่นีออนอื่น ๆ จากข้อมูลของ (Cai et al., 2019) ปฏิกริยาพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแกร่งระหว่าง HBA และ HBD เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดสำหรับการก่อตัวของ DESs สำหรับผู้บริจาคพันธะไฮโดรเจนมักใช้สารประกอบ เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน กรดคาร์บอกซิลิก (เช่น กรดเบนโซอิก กรดซิตริก กรดซัคซินิก) หรือเอมีน (เช่น ยูเรีย เบนซาไมด์) ศักยภาพในการปฏิสัมพันธ์ทางเคมีของผู้บริจาค

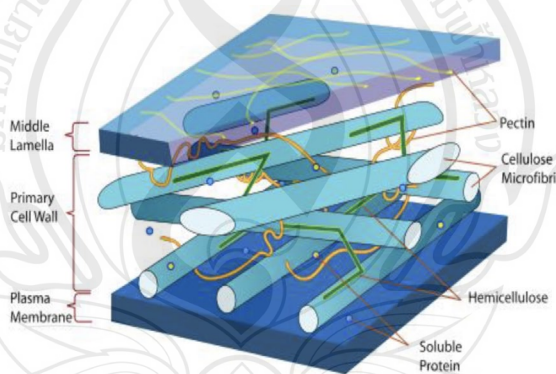
พันธะไฮโดรเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่เอื้อต่อการก่อตัวและประสิทธิภาพของตัวทำละลายยูเทคติก เกลือเฮไลต์ เช่น โคลีนคลอไรด์หรือสังกะสีคลอไรด์ยังสามารถใช้ร่วมกับผู้บริจาคพันธะไฮโดรเจนอื่น ๆ โคลีนคลอไรด์ตามตัวทำละลายยูเทคติกจะเกิดขึ้นกับกรดมาโลนิค ฟีนอล หรือกลีเซอริน อันเป็นผลมาจากปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแกร่งจุลหอยของตัวทำละลายยูเทคติกก็จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับส่วนประกอบแต่ละส่วน ในทางตรงกันข้ามกับตัวทำละลายทั่วไป เช่น เอทานอล เมทานอล เฮกเซน บิวเทน ฯลฯ ตัวทำละลายยูเทคติกกลั่นไม่ระเหย ซึ่งหมายความว่ามีความดันไอต่ำมาก และแทบจะไม่ติดไฟ ความเป็นพิษของตัวทำละลายยูเทคติกก็อยู่ในระดับต่ำ ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพสูง และสารตั้งต้นที่จำเป็นมีราคาไม่แพงง่าย ตัวทำละลายยูเทคติกก็ตามธรรมชาติ (NADES) เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากยิ่งขึ้นเนื่องจากสารตั้งต้นทั้งหมดมาจากแหล่งธรรมชาติ ตัวทำละลายยูเทคติกก็ยังสามารถในการละลายที่ปรับได้ตามเคมีของตัวละลายและสายพันธุ์ที่ใช้ในการสร้างตัวทำละลายยูเทคติกก็ ข้อจำกัด คือ การ scale up มีราคาแพงมาก, สารละลายที่ได้มีความหนาแน่นและตัวทำละลายยูเทคติกก็ตามธรรมชาติบางตัวมีความหนืดสูง ดังนั้นจึงไม่เหมาะสำหรับการสกัดแบบแบทช์ อย่างไรก็ตามตัวทำละลายยูเทคติกก็ตามธรรมชาติที่มีความหนืดสูงกว่าสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดแบบไหลผ่านอัลตราโซนิกได้ (Koina et al., 2023)

2.2.2.7 การสกัดด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด (Enzyme-assisted extraction : EAE)

วิธีการสกัดด้วยเอนไซม์เป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาใช้ช่วยลดปริมาณตัวทำละลายเคมีที่ใช้ในการสกัด สามารถทำการสกัดได้ง่าย ดำเนินการโดยใช้พลังงานและอุณหภูมิต่ำ ใช้ระยะเวลาในการสกัดที่สั้น ส่งผลให้การสกัดมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น, สภาวะของปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง (Zhao et al., 2016) ข้อจำกัด คือ ต้องควบคุมพารามิเตอร์ต่าง ๆ ให้แม่นยำ เช่น อุณหภูมิ pH และความเข้มข้น การสกัดด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด คือ การสกัดสารโดยใช้เอนไซม์เป็นการใช้เอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยองค์ประกอบและสารสำคัญออกจากพืชที่ต้องการศึกษา เพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญและผลผลิตที่มากขึ้น โดยเอนไซม์จะทำหน้าที่ในการทำลายหรือทำให้ผนังเซลล์พืชอ่อนตัวลง เอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้ในการสกัด ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase), เฮมิเซลลูเลส (hemi-cellulase) และเพกตินเนส (pectinase) เป็นต้น การสกัดด้วยเอนไซม์มักใช้ร่วมกับการสกัดด้วยวิธีทางเคมี เนื่องจากสามารถช่วยย่อยส่วนประกอบของพืชได้ในเบื้องต้น ก่อนที่จะทำการสกัดด้วยวิธีทั่วไป (Puri et al., 2012) เอนไซม์เซลลูเลสมีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 4.0-6.0 และ 40-50 องศาเซลเซียสตามลำดับ (Song et al., 2020) เอนไซม์เพกตินเนสมีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 3.0-5.0 และ 10-55 องศาเซลเซียสตามลำดับ (Song et al., 2020) และเอนไซม์ปาเปนมีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 5.0-8.0 และ 50-57 องศาเซลเซียสตามลำดับ

เอนไซม์เป็นสารประกอบโปรตีน และอาจรวมถึงสารชีวโมเลกุลชนิดอื่น ๆ มีคุณสมบัติเด่น คือการเร่งปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจง เอนไซม์แต่ละชนิดมีส่วนที่เรียกว่า Active site ซึ่งจำเพาะต่อสารตั้งต้นและชนิดของปฏิกิริยา ทำให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงในการเร่งปฏิกิริยา และสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่ไม่รุนแรง โดยใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย และไม่ถูกทำลายระหว่างกระบวนการเร่งปฏิกิริยา

การเลือกเอนไซม์สกัดโปรตีนให้เหมาะสมต้องอาศัยความเข้าใจในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช องค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพกทิน โปรตีนในผนังเซลล์ปฐมภูมิประกอบด้วยไมโครไฟบริลเซลลูโลสที่ฝังตัวอยู่ในเมทริกซ์ที่มีลักษณะชุ่มน้ำที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์สองกลุ่มหลัก คือ เฮมิเซลลูโลสและเพกทิน โดยมีโปรตีนที่เป็นโครงสร้างจำนวนเล็กน้อย แต่ละไมโครไฟบริลเซลลูโลสเชื่อมต่อกัน โดยการเชื่อมต่อแบบร่างแหของโมเลกุล เฮมิเซลลูโลสสร้างเป็นโครงข่ายเซลลูโลส-เฮมิเซลลูโลส ขณะที่เพกทินซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ฝังอยู่ในโครงข่ายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ทำหน้าที่สร้างเมทริกซ์ที่กักเก็บน้ำ ป้องกันแรงกดและแรงเฉือน และควบคุมการซึมผ่านของสารเข้าออกผนังเซลล์ ส่วนในบริเวณผนังเชื่อมยึดระหว่างเซลล์ เพกทินจะสร้างโครงสร้างแบบร่างแหที่เชื่อมต่อกัน โดยเกิดจากสายไฮโดรโมกาแล็กทูโรแนนที่เชื่อมโยงกันด้วยสะพานแคลเซียม (ธัญญา สายโอะ๊ะ, 2565)



ที่มา Ladyofhats (2007)

ภาพที่ 2.2 ลักษณะของผนังเซลล์พืช

รายงานวิจัยของ Yadav et al. (2016) เกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบลิกโนเซลลูโลสของแห่นด้วยวิธี Van Soest Method ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ เซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส และลิกนินของแห่น (ไม่ระบุชนิดพันธุ์) พบว่าสัดส่วนขององค์ประกอบทั้งสามชนิดที่วิเคราะห์ได้นั้น มีสัดส่วนของลิกนินในปริมาณต่ำที่สุดที่ร้อยละ 12.0 ในขณะที่องค์ประกอบที่มากที่สุด ได้แก่ เซลลูโลส ที่ร้อยละ 55.2 ตามด้วยเฮมิเซลลูโลสที่พบว่ามีอยู่ประมาณร้อยละ 32.6

งานวิจัยของ Yin et al. (2023) ทำการสกัดฟลาโวนอยด์ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเข้มข้นจากพืชหญ้าถอดปล้อง (*Equisetum arvense* L. หรือ EAL) โดยอาศัยเอนไซม์เซลลูเลสช่วยในการสกัด จากการออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) ด้วยปัจจัยสามตัวและสามระดับ เพื่อให้ได้ผลผลิตรวมของฟลาโวนอยด์สูงสุด ซึ่งสัมพันธ์กับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงสุดของสารสกัดจาก EAL โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดฟลาโวนอยด์รวม คือ ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.52% (จากน้ำหนักวัตถุดิบพื้นฐาน) ทำปฏิกิริยาเอนไซม์นาน 50.58 นาที ที่อุณหภูมิ 49.03 °C อัตราการสกัดฟลาโวนอยด์จากหญ้าถอดปล้องภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้อยู่ที่ 4.88 มก./กรัม ซึ่งสูงกว่าวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (solid-liquid extraction) ถึง 51.23% ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดของสารสกัดที่ได้จากเงื่อนไข ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.50% 49.41 นาที, และ 46.59 °C อยู่ที่ 77.36%

มีรายงานวิจัยได้ศึกษาการสกัดสารฟีนอลิกจากรำข้าวโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดและประเมินคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารสกัดที่ได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัย เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการสกัดสารฟีนอลิกจากรำข้าว เช่น ประเภทเอนไซม์ อุณหภูมิ pH เวลา และความเข้มข้นของเอนไซม์ หาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดสารฟีนอลิก วิเคราะห์สารฟีนอลิกในสารสกัดโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ประเมินกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด วิธีการทดลอง คือ ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการสกัดสารฟีนอลิกจากรำข้าว ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อกระบวนการสกัด ได้แก่ ประเภทเอนไซม์ อุณหภูมิ pH เวลา และความเข้มข้นของเอนไซม์ วิเคราะห์สารฟีนอลิกในสารสกัดโดยใช้เทคนิค HPLC และประเมินกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยผลการทดลองพบว่าเงื่อนไขที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดสารฟีนอลิกจากรำข้าว คือ อุณหภูมิ 35°C pH 3.0 เวลา 4 ชั่วโมง และความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 1.0% ภายใต้เงื่อนไขนี้ ผลผลิตของกรดเฟอรูลิกเพิ่มขึ้นจาก 3.45 ± 0.9 มก./100 กรัมรำข้าว (เมื่อไม่มีการใช้เอนไซม์) เป็น 14.3 ± 2.2 มก./100 กรัมรำข้าว (เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลส 1.0%) การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของสารฟีนอลิก การใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการสกัดสารฟีนอลิกจากรำข้าวสามารถเพิ่มผลผลิตของสารฟีนอลิกได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระมีจำกัด ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความสามารถในการละลายของสารฟีนอลิกหรือปฏิกิริยาทางเคมีอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการสกัด (Martillanes et al., 2021)

งานวิจัยของ Muliasari et al. (2023) เปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Sargassum polycystum* โดยใช้ตัวทำละลายสองชนิด คือ เอทานอล 70% และเอนไซม์เซลลูเลสดิบ (crude cellulase) เพื่อประเมิน

ประสิทธิภาพของแต่ละวิธีในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทะเล วิธีการทดลองนำสาหร่าย *S. polycystum* ถูกเก็บจากพื้นที่ทางตะวันตกของเกาะนุซาเต็งการา (West Nusa Tenggara, NTB) ประเทศอินโดนีเซีย ทำการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ (sonication) โดยใช้ตัวทำละลายสองชนิด ได้แก่ เอทานอล 70% และเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นทำการวัดปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ UV-Vis ผลการทดลอง พบว่าผลผลิตการสกัด สารสกัดจากเอนไซม์เซลลูเลสให้ผลผลิตสูงกว่าสารสกัดจากเอทานอล 70% ถึง 65.5% สารฟีนอลิกรวมพบว่า สารสกัดจากเอทานอลได้ฟีนอลิกรวมเท่ากับ 2.1207 ± 0.0219 มก. GAE/กรัม สารสกัดจากเอนไซม์เซลลูเลสได้ 2.1600 ± 0.0381 มก. GAE/กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติ สารฟลาโวนอยด์รวมพบว่า สารสกัดจากเอทานอล ได้ฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 36.327 ± 0.278 มก. EQ/กรัม สารสกัดจากเอนไซม์เซลลูเลสได้ 43.296 ± 0.151 มก. EQ/กรัม ซึ่งมีความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสดีในการสกัดสารจาก *S. polycystum* มีประสิทธิภาพสูงกว่าเอทานอล 70% โดยเฉพาะในด้านการสกัดสารฟลาโวนอยด์รวม ซึ่งสามารถนำไปพิจารณาใช้เป็นวิธีการสกัดที่ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลชนิดนี้

เอนไซม์เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส กลไกการทำงานมี 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ prohydrolytic step ซึ่งสายโซ่ anhydroglucose จะเกิดการพองตัว และ hydrolytic cleavage ซึ่งเป็นการตัดสายพอลิเมอร์ (ชฎาพร หัตถบุรณ, 2556) กลไกนี้เริ่มต้นด้วยการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของเซลลูโลส โดยเซลลูโลสจะบวมตัวและพันธะไฮโดรเจนจะถูกทำลาย จากนั้น endoglucanase และ exoglucanase จะทำงานร่วมกันเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้ปลายอิสระ และ exoglucanase จะดึงโมเลกุลของ cellobiose ออกจากปลาย ซึ่งจะถูกละลายต่อไปโดย B-glucosidase จนได้น้ำตาลกลูโคสอิสระ (Fan et al., 1987) เอนไซม์เซลลูเลสทำหน้าที่ในการย่อยเซลลูโลส เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสและอินเทอร์มีเดียต โดยทั่วไปเซลลูเลสที่ใช้เป็นเอนไซม์ผสม ซึ่งจะประกอบด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิด คือ Endo-B-glucanase, Exo-β-glucanase และ β-glucosidase

1. Endo-B-glucanase (1,4-B-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.4), Cx: จะสลายพันธะ ปีตา-ไกลโคไซด์ โดย random hydrolysis ทำให้ความหนืดลดลงอย่างรวดเร็ว และมีหมู่รีดิวซิงเพิ่มขึ้นผลิตผลจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและโอลิโกเมอร์

2. Exo-B-glucanase (1,4-B-D-glucan cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91), Cx: เป็น exosplitting-enzyme จะไฮโดรไลซ์เซลลูโลสส่วนที่ไม่เป็นผลึก โดยจะตัดพันธะจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซิงของโมเลกุลเซลลูโลสได้ผลผลิตเป็นเซลโลไบโอส

3. B-glucosidase (B-D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21), Cellobiase จะไฮโดรไลซ์ โมเลกุลของเซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และไฮโดรไลซ์พันธะจากปลายด้านที่ไม่มี หมู่รีดิวซิงของเซลโลเดกซ์ทรินที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก โดยอัตราการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ ปีตากลูโคซิเคสจะเพิ่มขึ้นเมื่อความยาวของสายสับสเตรทสั้นลง และไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสได้รวดเร็ว ที่สุด

2.3 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.3.1 การวิเคราะห์สารสำคัญในพืช

2.3.1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

โปรตีนหลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ไม่ว่าจะเป็นการทำหน้าที่เป็น เอนไซม์หรือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจึงเป็นสิ่งสำคัญ หรือใช้ เพื่อควบคุมมาตรฐาน (standardize) ของสารสกัดหรือผลิตภัณฑ์ในแต่ละกระบวนการผลิต การวัด ปริมาณโปรตีนในพืชสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป วิธีที่นิยมใช้กันมี ดังนี้

1. วิธี Kjeldahl เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีนในตัวอย่างต่าง ๆ รวมถึงพืช วิธีนี้จะทำการย่อยตัวอย่างด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ซึ่งจะเปลี่ยน ไนโตรเจนในโปรตีนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียม จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน ทั้งหมด และคำนวณกลับมาเป็นปริมาณโปรตีน โดยทั่วไปแล้วจะใช้แฟคเตอร์คูณ 6.25 เพื่อแปลง ปริมาณไนโตรเจนเป็นปริมาณโปรตีน เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่มีไนโตรเจนประมาณ 16% ข้อดี คือ เป็นวิธีที่แม่นยำและน่าเชื่อถือ ข้อเสีย คือ ใช้เวลานาน และต้องใช้สารเคมีอันตราย

2. วิธี Dumas เป็นวิธีที่รวดเร็วกว่าวิธี Kjeldahl โดยจะทำการเผาตัวอย่างใน บรรยากาศที่มีออกซิเจนสูง ซึ่งจะทำให้ไนโตรเจนในโปรตีนถูกปล่อยออกมาในรูปของก๊าซไนโตรเจน จากนั้นจึงวัดปริมาณก๊าซไนโตรเจนด้วยเครื่องตรวจวัดความร้อน ข้อดี คือ รวดเร็ว และไม่ต้องใช้ สารเคมีอันตราย ข้อเสีย คือ อาจมีความแม่นยำน้อยกว่าวิธี Kjeldahl ในตัวอย่างบางชนิด (Dumas, 1826)

3. วิธี Lowry เป็นวิธีที่ใช้หลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับสารเคมี บางชนิด ซึ่งจะทำให้เกิดสารสีน้ำเงิน จากนั้นจึงวัดปริมาณสารสีน้ำเงินด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ข้อดี คือ ง่ายและรวดเร็ว ข้อเสีย คือ มีความแม่นยำน้อยกว่าวิธี Kjeldahl และ Dumas และอาจถูกรบกวนจากสารเคมีบางชนิดในตัวอย่าง (Lowry, 1951)

4. วิธีไบยูเรต โดยมีหลักการ คือ สารที่มีพันธะเพปไทด์ในโมเลกุลตั้งแต่สองพันธะขึ้นไปสามารถทดสอบได้ด้วยสารละลายไบยูเรต หรือ คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตในสารละลายเบส ซึ่งไอออน Cu^{2+} ในสารละลายไบยูเรตจะสร้างพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับอะตอมของไนโตรเจนที่ตำแหน่งพันธะเพปไทด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารเชิงซ้อนที่มีสีม่วง ทั้งนี้ ความเข้มของสีม่วงที่ได้จะสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนในสารละลาย โดยหากได้สารละลายสีม่วงเข้ม แสดงว่ามีโปรตีนมาก แต่หากได้สารละลายสีม่วงจาง แสดงว่ามีปริมาณโปรตีนน้อย

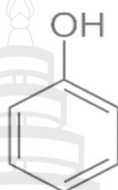
5. วิธี Bradford หรือ Dye - binding การตรวจสอบหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Dye - binding หรือวิธี Bradford ซึ่งเป็นเทคนิคที่รวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำ ทำได้ง่ายและมีความไว (sensitivity) สูงกว่าวิธีดั้งเดิม (Lowry method) หลักการของวิธีนี้คือ สารสี Coomassie Brilliant Blue G-250 หรือ Bradford's reagent ที่มีประจุลบ จะจับกับโปรตีนอย่างจำเพาะในสถานะกรดเข้มข้น ผ่านพันธะ hydrophobic และ ionic โดยปกติสาร Coomassie Brilliant Blue G-250 จะมีสีแดงอมน้ำตาลที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีน จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน โดยความเข้มของสีจะแปรผันตามปริมาณโปรตีน ซึ่งสามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่ายและรวดเร็ว ข้อเสีย คือ มีความแม่นยำน้อยกว่าวิธี Kjeldahl และ Dumas และอาจถูกรบกวนจากสารเคมีบางชนิดในตัวอย่าง (Bradford, 1976)

การตรวจสอบหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford มีความจำเพาะต่อโปรตีนมากกว่ามีความรวดเร็วและง่ายกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการประมวลผลที่ใช้เวลานานการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl เนื่องจากไนโตรเจนที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีนี้อาจมาจากสารประกอบ ไนโตรเจนชนิดอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนด้วยก็ได้เช่น กรดนิวคลีอิก เป็นต้น การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแต่ละวิธีจะมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป การเลือกวิธีที่เหมาะสมในการวัดปริมาณโปรตีนในพืช จะต้องพิจารณาถึงปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิดของพืช ปริมาณโปรตีนที่คาดว่าจะพบ ความแม่นยำที่ต้องการ และงบประมาณที่มี วิธี Kjeldahl และ Bradford Assay เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางสำหรับการกำหนดปริมาณโปรตีนทั้งหมด โปรตีนเป็นกลุ่มของโมเลกุลอินทรีย์ขนาดใหญ่ที่ซับซ้อนซึ่งมีความสำคัญต่อเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดและประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น เอนไซม์ ฮอรโมน และแอนติบอดี ซึ่งจำเป็นต่อการทำงานที่เหมาะสมของสิ่งมีชีวิต ตลอดจนการเจริญเติบโตและการพัฒนาการ สามารถสกัดและประเมินโปรตีนได้ด้วยวิธีต่าง ๆ

2.3.1.2 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกจากพืช (Phenolic Compound)

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compound) คือ กลุ่มของสารอนุพันธ์ทุติยภูมิ (Secondary Product) ที่พบในพืช ผัก ผลไม้ และธัญพืชจากแหล่งในธรรมชาติ โดยเกิดจาก

กระบวนการเมตาบอลิซึมในขั้นที่สอง (Secondary Metabolites) มีบทบาทและหน้าที่สำคัญในการสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตของพืช โครงสร้างทางโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก คือ อนุพันธ์ของวงแหวนอะโรมาติกเบนซีนหนึ่งวงหรือมากกว่าที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) ต่ออยู่เป็นหลักอย่างน้อยหนึ่งหมู่ และมีหมู่แทนที่ในตำแหน่ง ออโท (orto), เมตา (meta) หรือพารา (para) สารประกอบฟีนอลิกจะมีโครงสร้างที่หลากหลาย โครงสร้างพื้นฐาน คือ ฟีนอล (phenol) ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ ดังแสดงในภาพที่ 2.4 (จุฬารัตน ดอกไม้งาม, 2560)



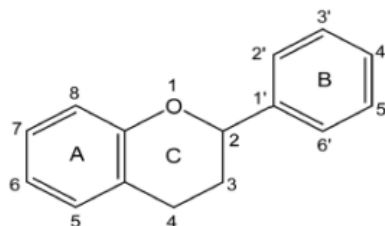
ที่มา จุฬารัตน ดอกไม้งาม (2560)

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกในพืชจัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ กระจายตัวอยู่ในบริเวณผนังเซลล์ cell walls, หรือ แวกิวโอล (cell vacuole) ของพืช เทคนิคที่ใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากพืชมีหลากหลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (Solvent Extraction) การสกัดด้วยคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic-Assisted Extraction) การสกัดแบบวิธีซอกซ์เลต (Soxhlet Extraction) การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave Extraction) การสกัดด้วยของไหลยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) โดยเทคนิคการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากพืชที่ได้รับความนิยมแพร่หลาย คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพเป็นกระบวนการที่ง่ายไม่ซับซ้อน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างแพร่หลาย

2.3.1.3 การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์จากพืช (Flavonoid Compound)

สารประกอบฟลาโวนอยด์ เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่พบได้ทั่วไปในอาหารจากพืช เช่น ผักและผลไม้ ฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนอลเบนโซไพโรน (phenylbenzopyrones) ที่มีคาร์บอน 15 อะตอม (C6-C3-C6) เรียงกันเป็น 3 วง คือ วง A, B และ C โดยวง A และ B เป็นวงแหวนเบนซีน (benzene ring) และวง C เป็นวงแหวนเฮเทอโรไซคลิกไพแรน (heterocyclic pyran ring) ที่อยู่ตรงกลาง (วิภาพ สุทนต์, 2556, น. 567-582) สารประกอบฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติมีมากกว่า 4,000 ชนิด โดยส่วนใหญ่อยู่ในรูปฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลตั้งแต่หนึ่งหมู่ขึ้นไปในโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอยด์ และจะสร้างพันธะกับโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (glucose), แรมโนส (rhamnose), อะราบินโนส (arabinose) และไซโลส (xylose) (Narikawa, 2000)



ที่มา จุฬารรรณ ดอกไม้งาม (2560)

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์พบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล และเกสรดอกไม้ ฟลาโวนอยด์เป็นสารสี (soluble pigments) ที่พบในส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยเฉพาะในดอก ทำให้มีสีสันสวยงาม โดยทั่วไปจะมีสีแดง สีเหลือง สีม่วง และสีน้ำเงิน โดยส่วนของน้ำตาลมักจะจับที่ตำแหน่ง 3, 5 หรือ 7 ส่วนใหญ่มักจะพบ สารประกอบฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ในส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ของดอกไม้และผลไม้ บางครั้งสามารถพบสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่เป็นอะไกลโคน (aglycone) ในเนื้อไม้ (Larson, 1988) สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารเมแทบอลิท์ขั้นทุติยภูมิในพืชที่สังเคราะห์จากการดอะมิโนที่มีวงแหวน (aromatic amino acids) ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ไทโรซีน (tyrosine) และมาโลเนต (malonate) โดยมีบทบาทเป็นสารให้สีที่สำคัญในพืช ช่วยในการป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต และช่วยในการตรึงไนโตรเจน (Suttana, 2013) นอกจากนี้ สารประกอบฟลาโวนอยด์ยังมีความสำคัญต่อการสร้างรงควัตถุในพืชทำหน้าที่เป็นไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) เพื่อช่วยป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ ช่วยป้องกันแสงอุลตราไวโอเลต ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยต้านอนุมูลอิสระ

2.3.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นอะตอมที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จึงมีความไม่เสถียรและว่องไวในการทำปฏิกิริยาถูกใช้กับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย (Gulcin, 2020) การทำปฏิกิริยานี้อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ เช่น ทำลายโครงสร้าง DNA เปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์ทำงานผิดปกติ และเป็นสาเหตุของความเสื่อมของเซลล์ ความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และริ้วรอยก่อนวัยอันควร (Buachoon et al., 2021) อนุมูลอิสระสามารถถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ที่สามารถดักจับ อนุมูลอิสระ หยุดการก่อตัวใหม่ของอนุมูลอิสระได้ และยับยั้งปฏิกิริยาถูกใช้ของอนุมูลอิสระก่อนที่โมเลกุลสำคัญ จะถูกทำลาย โดยมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) การยับยั้งการ ทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Metal chelation)

หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (Synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (Buachoon & Manjit, 2018) สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่อยู่ในรูป สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และ แอนโทไซยานิน เป็นต้น

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นขั้นตอนการวิเคราะห์และประเมินคุณภาพของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่สกัดจากพืชสมุนไพร ใช้วัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบ (crude extract) เพื่อเปรียบเทียบสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้ในวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน และนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยหลักการวัดการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องมือยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.3.2.1 การวิเคราะห์ DPPH radical scavenging method DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrozyl)

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่นิยมใช้ในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยหลักการ คือ เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชัน จะทำให้ DPPH มีความเสถียรเนื่องจากได้รับไฮโดรเจนอะตอมจากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงแดงไปเป็นไม่มีสีหรือสีจางลง ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Maisuthisakul et al., 2007) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น แสดงดังนี้



2.3.2.2 การวิเคราะห์ Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay

FRAP assay เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็ก โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเหล็กและ TPTZ (2,3,5-triphenyl-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-diene chloride) หลักการ คือ สารต้านอนุมูลอิสระจะให้อิเล็กตรอน จึงจัดเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) FRAP assay จึงเป็นการวัด Total Antioxidant Capacity (TAC) โดยวัดจากความสามารถในการรีดิวซ์ โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก Fe-TPTZ (ferric tripyridyltriazine) เป็นสารทดสอบ ซึ่งสารต้านออกซิเดชันจะรีดิวซ์อะตอมของเหล็กในสารนี้ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe-IPTZ ที่มีสีน้ำเงิน และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร (วารุณี ปิยะเบญจรัฐ, 2561)

2.4 การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

โปรตีนจากไข่ผำสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางเพื่อ (1) ปกป้องผิวจากอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระจากไข่ผำช่วยลดความเสียหายของเซลล์ผิวหนังจากอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุของริ้วรอยและความหมองคล้ำ (2) ลดการอักเสบของผิวหนัง ฤทธิ์ด้านการอักเสบของไข่ผำช่วยบรรเทาอาการระคายเคืองและอักเสบของผิวหนัง (3) เพิ่มความชุ่มชื้นและยืดหยุ่น โปรตีนจากไข่ผำช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงและยืดหยุ่นให้กับผิวหนัง



บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและวัตถุดิบ

ตารางที่ 3.1 รายการสารเคมีและวัตถุดิบ

ชื่อสาร	สูตรโมเลกุล	ผู้ผลิต
กรดไฮโดรคลอริก	HCL	CHINA
โซเดียมไฮดรอกไซด์	NaOH	GERMANY
โซเดียมไนไตรท์	NaNO ₃	GERMANY
น้ำกลั่น	H ₂ O	THAI
สาร 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิด	C ₁₈ H ₁₃ N ₅ O ₆	USA
สารมาตรฐานกรดแกลลิก	C ₇ H ₆ O ₅	GERMANY
สารมาตรฐานโทรลล็อกซ์	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	USA
สารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ เฟอริก-คลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต	FeCl ₃ ·6H ₂ O	Australia
สารมาตรฐานโปรตีนอัลบูมินซีรัม	C ₈ H ₂₁ NOSi ₂	CHINA
สารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ 2,4,6-ไตร (2-ไพริดีล)-เอส-ไตรอะซีน ใน 40 มิลลิโมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก	C ₁₈ H ₁₂ N ₆	USA
สารมาตรฐานเควอซิทีน	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	USA
สารมาตรฐานฟีนอล โพลีน-ซีโอคัลทู	C ₆ H ₆ O	USA
สีย้อม (0.01% w/w Coomassie brilliant blue G-250)	C ₄₇ H ₄₈ N ₃ NaO ₇ S ₂	USA
อะซิติกแอซิด	C ₈ H ₁₂ Si	THAI

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชื่อสาร	สูตรโมเลกุล	ผู้ผลิต
อลูมิเนียมคลอไรด์ โซลูชัน	AlCl_3	NEW ZEALAND
เอทานอลร้อยละ 70	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	THAI
เอนไซม์เซลลูเลส	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	USA

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

ชื่อเครื่องมือ	ยี่ห้อ/รุ่น	ผู้ผลิต
กระดาษกรอง	ยี่ห้อ : Whatman	England
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	ยี่ห้อ : Precisa	Switzerland
	รุ่น : XB 2200c	
เครื่องเขย่าสาร	ยี่ห้อ : Lebnert	SVN
	รุ่น : Orbit 1000	
เครื่องเขย่าสารพร้อมควบคุมอุณหภูมิ	ยี่ห้อ : Julabo	Germany
	รุ่น : SW22	
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง	ยี่ห้อ : Thermo Fisher Scientific	USA
	รุ่น : GENESYS- 10S	
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง	ยี่ห้อ : QIS	China
	รุ่น : B200	
เครื่องปั่นเหวี่ยง	ยี่ห้อ : HERMLE	Germany
	รุ่น : Z 206 A	
เครื่องปั่น	ยี่ห้อ : PHILIPS	THAI
	รุ่น : 2117	
เครื่องระเหยสารแบบหมุน	ยี่ห้อ : EYELA	Japan
	รุ่น : A-1000S	

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ชื่อเครื่องมือ	ยี่ห้อ/รุ่น	ผู้ผลิต
เครื่องผสมสาร	ยี่ห้อ : OHAUS รุ่น : VXMNAL	USA
เครื่องดูจ่ายสารละลายอัตโนมัติ	ยี่ห้อ : GILSON	FRANCE
ตู้อบลมร้อน	ยี่ห้อ : Memmet รุ่น : UF110	Germany
ตู้เย็นเก็บสาร	ยี่ห้อ : Haier	THAI
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	ยี่ห้อ : MEMMERT รุ่น : WB 29	Germany

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างไขน้ำ

ซื้อไขน้ำที่ทำการเพาะเลี้ยงในบ่อด้วยน้ำสะอาดจากจังหวัดกาฬสินธุ์ นำไขน้ำมาทำความสะอาดหลังจากนั้นเกลี่ยให้มีความหนาสม่ำเสมอจนก้นภาชนะแล้ว ให้นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 วัน ไขน้ำที่ผ่านการอบแห้ง ทำการบดให้ละเอียดเป็นผง เก็บตัวอย่างบรรจุใส่ถุงห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และเก็บรักษาผงไขน้ำในโถดูดความชื้นเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.3.2 การเตรียมสารสกัดจากไขน้ำ

3.3.2.1 การสกัดโปรตีนจากไขน้ำ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัด

ผสมผงไขน้ำที่บดละเอียดกับอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.5 ให้เข้ากัน ในอัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับสภาพผนังเซลล์ของไขน้ำด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยศึกษาที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 3 ระดับ ได้แก่ เอนไซม์ 5, 10, 15 ยูนิต/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์ ระยะเวลาย่อย 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ ด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 2 นาที นำไปกรองผ่านกรวยกรองบุชเนอร์ นำส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอน เติมด้วยเอทานอล ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลเท่ากับ 70% เป็นการทำให้ปริมาตรเพิ่มขึ้นและช่วยเสริมการสกัด จากนั้นใช้แท่งแม่เหล็กกวนสารกวนเบา ๆ 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน

นำสารสกัดส่วนใสไปประเหยตัวทำละลายออกเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน นำส่วนของตะกอนโปรตีนไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน 45 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณร้อยละของผลผลิต และนำไปวิเคราะห์ (ดัดแปลงจาก ธัญญา สายโธ๊ะ, 2562)

3.3.2.2 การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากไข่น้ำ

การสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกจากไข่น้ำด้วยวิธีดั้งเดิมแบบเขย่า โดยนำผงไข่น้ำที่เตรียมไว้มาผสมกับเอทานอลร้อยละ 70 อัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่องเขย่าสาร ความเร็วรอบ 200 rpm หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มารองผ่านกระดาษกรอง นำไปผ่านกระบวนการระเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบหมุน จะได้สารสกัดหยาบ (crude extracts) นำไปชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ คำนวณหา %yield บันทึกและสังเกตผล และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป (ดัดแปลงจากวิธีของ วชิราภรณ์ พูนัน, 2562)

3.3.3 การศึกษาความคงตัวและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารสกัดไข่น้ำ

บันทึกผล ถ่ายภาพลักษณะทางกายภาพ, ทดสอบการละลาย, ถ่ายภาพสีของสารสกัด, ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดไข่น้ำ ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

3.3.4 การวิเคราะห์

3.3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณผลได้

คำนวณปริมาณผลได้ของสารสกัด ดังแสดงในสมการ

$$\% \text{yield} = (\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้} / \text{น้ำหนักไข่น้ำแห้งที่ใช้ในการสกัด}) \times 100$$

3.3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไข่น้ำ

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total Protein Content) ด้วยวิธี Dye - binding (Bradford assay)

เตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA ปิเปตสารสกัดจากไข่น้ำลงในหลอดทดลองเติม DI Water, Bradford reagent ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร ตั้งอุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นเติม 4% NaOH ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ทำการวิเคราะห์สารสกัดไข่น้ำ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA เพื่อหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดที่ได้ รายงานผลปริมาณ BSA equivalent (มก BSA/กรัม สารสกัด) (อ้างอิงจาก Bradford et al., 1976)

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Total Phenolic compounds, TPC)

ปีเปตสารสกัดจากใข่น้ำลงหลอดทดลอง เติมสาร Folin ciocaltue's reagent, DI Water, 7.5% sodium carbonate ผสมสารด้วยเครื่องเขย่าสาร ตั้งไว้อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์สารสกัดใข่น้ำ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก เพื่อหาค่าความเข้มข้นฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้ รายงานผลเป็นปริมาณ Gallic acid equivalent (มก. GAE/กรัม สารสกัด) (อ้างอิงจาก Siddiqui et al., 2017)

3. การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content, TFC)

ปีเปตสารสกัดจากใข่น้ำลงไปในหลอดทดลอง เติม DI Water, 5%NaNO₂, 10%AlCl₃ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งไว้อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม 4%NaOH ผสมสารด้วยเครื่องเขย่าสาร ตั้งไว้อุณหภูมิห้อง 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ทำการวิเคราะห์สารสกัดใข่น้ำ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานเคอร์เซติน เพื่อหาค่าความเข้มข้นฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ได้ รายงานผลเป็นปริมาณ Quercetin equivalent (มก QE/กรัม สารสกัด) (อ้างอิงจาก Fattah et al., 2014)

3.3.4.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใข่น้ำ

1. การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใข่น้ำด้วยวิธี DPPH scavenging assay

ปีเปตสารสกัดใข่น้ำใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0.1 mM และ เอทานอลร้อยละ 95 ลงไป ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ทำการวิเคราะห์สารสกัดใข่น้ำ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะนำมาใช้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์ รายงานผลเป็นปริมาณค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (มก TEAC/กรัม สารสกัด) (Baliyan et al., 2022)

2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay

ทำการบีบคั้นสารสกัดไข่น้ำลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย FRAP รีเอเจนต์และอะซิเตรทบัฟเฟอร์ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร ที่ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำสารสกัดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณและเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโธร็อกซ์ เพื่อรายงานผลในรูปแบบของปริมาณความสามารถในการมอบอิเล็กตรอน (มก TEAC /กรัม สารสกัด) (อ้างอิงจาก Fernandes, et al., 2016)

3.3.4.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองโดย ANOVA และ Duncan's new Multiple Range Test ($p=0.05$) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics version 25

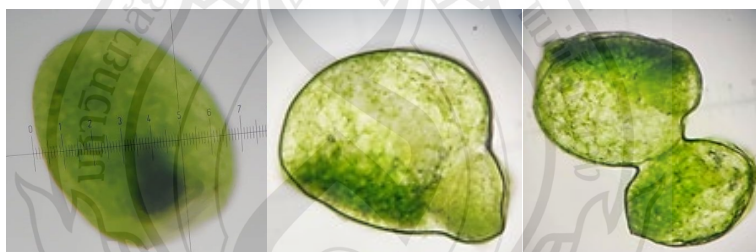


บทที่ 4

ผล และอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ลักษณะทางกายภาพของไข่น้ำ

จากการทดลองส่องกล้องจุลทรรศน์ของไข่น้ำสดสายพันธุ์ *W. arrhiza* พบว่าไข่น้ำมีลักษณะเป็นทรงกลมสีเขียว มีความกว้างมากกว่าความยาว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ (ภานุมาศ ทองคำ, 2562) พบว่าไข่น้ำทั้งสองชนิด คือ *W. arrhiza* และ *W. globosa* มีความแตกต่างกัน คือ *W. arrhiza* จะมีความกว้างมากกว่าความยาวมีขนาดใหญ่กว่า *W. globosa* ผิวสีเขียวเข้ม มันวาว ขณะที่ *W. globosa* จะมีความยาวมากกว่าความกว้าง ขนาดเล็กกว่าและมีรูปทรงเป็นทรงกระบอกมากกว่า *W. arrhiza* มีลักษณะโปร่งแสง มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding) แบ่งทาลีสใหม่ออกทางด้านข้าง ทาลีสใหม่ (daughter frond) ที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็กกว่าทาลีสเดิม (mother frond) ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ภาพไข่น้ำสดเมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40x

ลักษณะทางกายภาพของไข่น้ำก่อนอบ (พืชสด) มีสีเขียวอ่อน ลักษณะเม็ดกลมเล็กละเอียด เมื่อนำไปทำการอบ พบว่าหลังอบ (พืชแห้ง) สีของไข่น้ำจะมีสีเขียวเข้มขึ้น มีการเกาะกลุ่มกันเป็นแพแห้ง น้ำหนักเบา จากนั้นนำไข่น้ำแห้งไปดลละเอียดด้วยเครื่องปั่น หลังบดจะได้ผงไข่น้ำละเอียดที่มีสีเขียว ดังภาพที่ 4.2



(ก)

(ข)

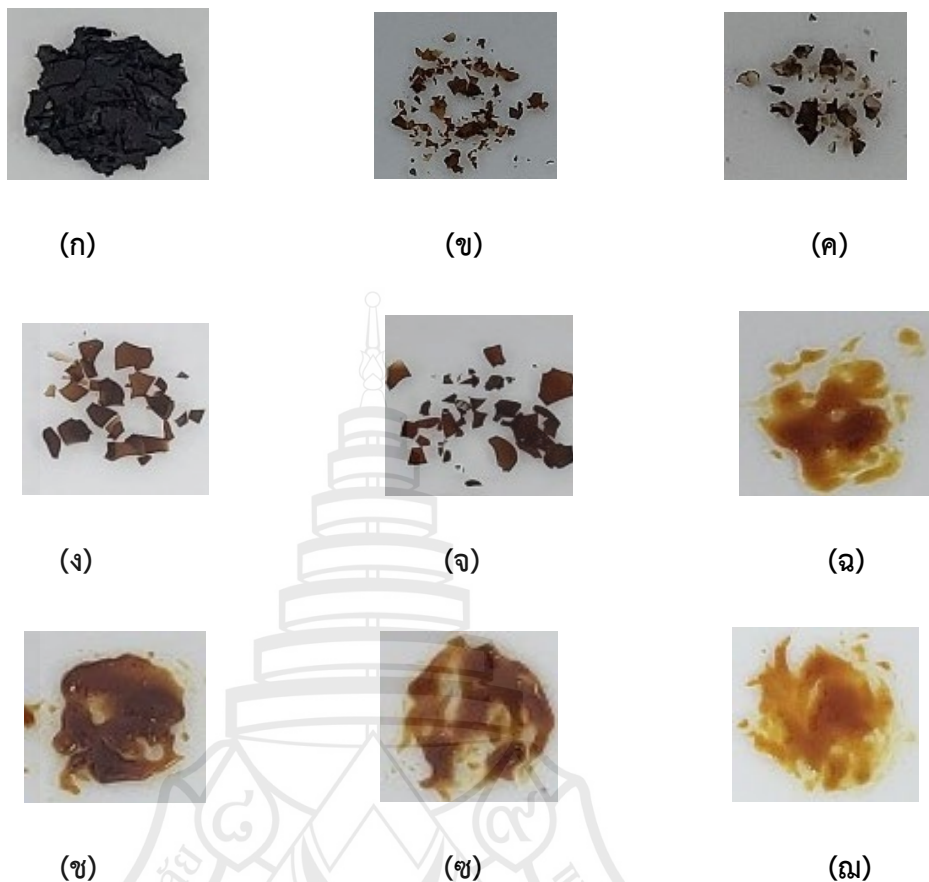
(ค)

ภาพที่ 4.2 (ก) ภาพไข่น้ำก่อนอบ, (ข) หลังอบ และ (ค) หลังบด

จากการวิเคราะห์ค่า Solid content (%) และ Water content (%) ของน้ำหนักระหว่างก่อนและหลังอบโดยเฉลี่ยพบว่า ค่า Solid content (%) มีค่าเท่ากับ 9.30 ± 0.27 และ Water content (%) มีค่าเท่ากับ 90.70 ± 0.27

ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดไข่น้ำ

จากการทดลองสกัดสารสกัดไข่น้ำด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่า สารสกัดหยาบฟีนอลิก ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีลักษณะทางกายภาพที่เหนียวหนืด เกาะตัวกัน มีสีเขียวเข้ม สารสกัดโปรตีน มีลักษณะเป็นตะกอนผงแห้งสีน้ำตาลเข้ม เช่นเดียวกับกับสารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 5, 10, 15 ยูนิต/มิลลิลิตร สารสกัดฟิเตรทที่นำไประเหยแห้งออกพบว่า สารมีลักษณะเหนียวหนืด สีน้ำตาลเข้ม เช่นเดียวกับกับ สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 5, 10, 15 ยูนิต/มิลลิลิตร ดังภาพที่ 4.3 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดไชน้ำ ภาพ (ก) สารสกัดหยาบพินอลิก, (ข) สารสกัดโปรตีน, (ค) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตร, (ง) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตร, (จ) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร (ฉ) สารสกัดฟิเตรท, (ช) สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตร, (ซ) สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตร, (ฌ) สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร

4.2 การทดสอบการละลายของสารสกัดไชน้ำ

จากการทดสอบการละลายของสารสกัดไชน้ำ โดยนำสารสกัดไชน้ำมาทำการละลายกับตัวทำละลายทั้งสามตัว ได้แก่ (1) น้ำปราศจากประจุ, (2) เอทานอลร้อยละ 95 และโพรพิลีนไกลคอล ปริมาตรอย่างละ 1 มิลลิลิตร โดยทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดทีละ 1 มิลลิกรัม จนไปสูงสุดที่ 50 มิลลิกรัม พบว่า (1) สารสกัดโปรตีน ละลายน้ำปราศจากประจุได้สูงสุด 0.5% w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.55 ไม่ละลายเอทานอล ไม่ละลายโพรพิลีนไกลคอล (2) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตร ละลายน้ำปราศจากประจุได้สูงสุด 0.5% w/v ค่าความเป็นกรด-ด่าง

เท่ากับ 8.91 ไม่ละลายเอทานอลร้อยละ 95 ไม่ละลายโพรพิลีนไกลคอล (3) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตร ละลายน้ำปราศจากประจุได้สูงสุด 0.5%w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.76 ไม่ละลายเอทานอลร้อยละ 95 ไม่ละลายโพรพิลีนไกลคอล (4) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร ละลายน้ำปราศจากประจุได้สูงสุด 0.5%w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.44 ไม่ละลายเอทานอลร้อยละ 95 ไม่ละลายโพรพิลีนไกลคอล (5) สารสกัดฟิลเตรท ละลายน้ำปราศจากประจุได้สูงสุด 5%w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.43 ไม่ละลายเอทานอลร้อยละ 95 ละลายโพรพิลีนไกลคอลได้สูงสุด 1%w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างได้เท่ากับ 6.23 (6) สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตร ละลายน้ำปราศจากประจุได้สูงสุด 5%w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.43 ไม่ละลายเอทานอลร้อยละ 95 ละลายโพรพิลีนไกลคอลได้สูงสุด 1%w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.32 (7) สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตร ละลายน้ำปราศจากประจุได้สูงสุด 5%w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.47 ไม่ละลายเอทานอลร้อยละ 95 ละลายโพรพิลีนไกลคอลได้สูงสุด 1%w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.34 (8) สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร ละลายน้ำปราศจากประจุได้สูงสุด 5% w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.54 ไม่ละลายเอทานอลร้อยละ 95 ละลายโพรพิลีนไกลคอลได้สูงสุด 1% w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.39 (9) สารสกัดหยาบฟีนอลิกละลายน้ำปราศจากประจุได้สูงสุด 0.5% w/v ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.84 ละลายเอทานอลร้อยละ 95 ได้ 0.5% w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.59 ละลายโพรพิลีนไกลคอลได้ 1% w/v ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.55 ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การทดสอบการละลายของสารสกัดไข่น้ำ

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสูงสุด ที่ละลายได้ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ร้อยละ (%)	ค่า กรด-ด่าง
น้ำปราศจาก ประจุ	สารสกัดโปรตีน	0	5	0.5	8.55
		5	5	0.5	8.91
		10	5	0.5	8.76
		15	5	0.5	8.44
	สารสกัดฟิลเตรท	0	50	5	6.43
		5	50	5	6.43
		10	50	5	6.47

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสูงสุด ที่ละลายได้ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ร้อยละ (%)	ค่า กรด-ด่าง
เอทานอล ร้อยละ 95	สารสกัดฟิลเตรท	15	50	5	6.54
	สารสกัดหยาบ	-	10	1	6.84
	ฟีนอลิก				
	สารสกัดโปรตีน	0	ไม่ละลาย	-	-
		5	ไม่ละลาย	-	-
		10	ไม่ละลาย	-	-
		15	ไม่ละลาย	-	-
	สารสกัดฟิลเตรท	0	ไม่ละลาย	-	-
		5	ไม่ละลาย	-	-
		5	10	1	6.32
		10	10	1	6.34
		15	10	1	6.39
	สารสกัดหยาบ	-	10	1	5.55
	ฟีนอลิก				

4.3 สีของสารสกัดไข่น้ำ

จากการถ่ายภาพลักษณะทางกายภาพของสารสกัดไข่น้ำโดยการดูสีของสารสกัดด้วยตาเปล่าพบว่า สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และสารสกัดฟิลเตรทมีสีเขียวอมน้ำตาลที่เข้มกว่ากว่าสารสกัดโปรตีน เนื่องจากสารสกัดไข่น้ำด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และสารสกัดฟิลเตรทต้องใช้ความร้อนในการระเหยตัวทำละลายออกซึ่งใช้อุณหภูมิที่สูงและใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน มีผลทำให้คลอโรฟิลล์ ซึ่งเป็นรงควัตถุให้สีเขียวของไข่น้ำเปลี่ยนเป็นฟิโอฟิติน (Pheophytins) ทำให้สีของไข่น้ำมีความเข้มข้นเป็นสีเขียวอมน้ำตาล (ภานุมาศ ทองคำ, 2562)

4.4 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.4.1 ปริมาณสารสกัดหยาบของสารสกัดจากไช้

จากการทดลองการสกัดไช้ด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่า (1) สารสกัดโปรตีนเท่ากับ 3.80 ± 0.28 (2) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตรเท่ากับ 4.50 ± 0.14 (3) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตร เท่ากับ 5.70 ± 0.14 (4) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตรเท่ากับ 8.10 ± 0.42 (5) สารสกัดฟิเตรทเท่ากับ 12.9 ± 1.27 (6) สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตรเท่ากับ 26.6 ± 0.85 (7) สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตรเท่ากับ 26.2 ± 0.28 (8) สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร เท่ากับ 25.5 ± 0.71 (9) สารสกัดหยาบฟีนอลิกจากไช้ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 เท่ากับ 19.75 ± 0.02 ไกล่เคียงกับรายงานวิจัยของ (สุพรรณิ ทิพนี, 2560) ได้ทำการสกัดไช้ร่วมกับเอทานอลพบว่า ได้ปริมาณสารสกัดหยาบร้อยละ 12.25 ของไช้แห้ง ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารสกัดหยาบของสารสกัดจากไช้

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณสารสกัดหยาบ ของสารสกัดจากไช้
สารสกัดโปรตีน	0	3.80 ± 0.28
	5	4.50 ± 0.14
	10	5.70 ± 0.14
	15	8.10 ± 0.42
สารสกัดฟิเตรท	0	12.9 ± 1.27
	5	26.6 ± 0.85
	10	26.2 ± 0.28
	15	25.5 ± 0.71
สารสกัดหยาบฟีนอลิก	-	19.75 ± 0.02

4.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไข่

4.4.2.1 ปริมาณโปรตีนรวม

การทดลองวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม (Total Protein Content) ด้วยวิธี Dye-binding (Bradford assay) พบว่าสารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 หน่วย/มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 54.25 ± 0.74 มก BSA/กรัม สารสกัด ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาได้แก่ สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 หน่วย/มิลลิลิตร และสารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 หน่วย/มิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 48.34 ± 0.59 และ 47.59 ± 0.53 มก BSA/กรัม สารสกัด ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากการที่ใช้เอนไซม์ในปริมาณสูงเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการย่อยโปรตีนทุติยภูมิ (over-hydrolysis) ซึ่งไม่เพียงแต่ทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ แต่ยังย่อยโปรตีนที่เพิ่งถูกปลดปล่อยให้กลายเป็นกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ขนาดเล็กที่ไม่สามารถตกตะกอนได้ ซึ่งเอนไซม์มีปฏิกิริยาต่อสารที่ไม่ต้องการในวัสดุ เช่น ไขมันหรือส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งทำให้การสกัดโปรตีนไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ได้ลดลง นอกจากนี้ เอนไซม์ในปริมาณมากยังอาจเร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน (denaturation) หรือการรวมตัวกันของโปรตีน (aggregation) โดยเฉพาะในสภาวะที่มี pH และอุณหภูมิเฉพาะ ทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอนก่อนที่จะสามารถแยกหรือวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งการย่อยผนังเซลล์อย่างรุนแรงอาจปลดปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์หรือเส้นใยในปริมาณมากจนส่งผลต่อความหนืดของระบบ ซึ่งรบกวนกระบวนการกระจายตัวและแยกโปรตีนโดยวิธีการหมุนเหวี่ยง สุดท้าย ในกรณีที่มีเอนไซม์เข้มข้นสูงแต่ยับยั้งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอง (self-inhibition) หรือเกิด feedback inhibition จากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา เอนไซม์จึงทำงานได้ไม่เต็มที่ ซึ่งล้วนส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอาจได้ผลผลิตที่สูงกว่าในบางกรณี (Iyer et al., 2022) ในส่วนของสารสกัดฟิเตรทและสารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 หน่วย/มิลลิลิตร ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 16.08 ± 0.36 และ 16.35 ± 0.30 มก BSA/กรัม สารสกัด ตามลำดับ สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีค่าโปรตีนน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 7.76 ± 0.12 มก BSA/กรัม สารสกัด ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน มก BSA/กรัม สารสกัด
สารสกัดโปรตีน	0	24.67±0.24 ^c
	5	54.25±0.74 ^a
	10	48.34±0.59 ^b
	15	47.59±0.53 ^b
สารสกัดฟิลเตรท	0	16.08±0.36 ^d
	5	13.26±0.06 ^f
	10	14.44±0.34 ^e
	15	16.35±0.30 ^d
สารสกัดหยาบฟีนอลิก	-	7.76±0.12 ^g

หมายเหตุ ตัวอักษรยกพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

4.4.2.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดไซ้ น้ำ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

จากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดไซ้ น้ำ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 58.93 ± 1.03 มก GAE/กรัม สารสกัด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ (จุฬารรรณ ดอกไม้งาม, 2560) ทำการสกัดไซ้ น้ำ ด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ได้ค่าผลได้สารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดเท่ากับ 40.23 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัม น้ำหนัก ร่องลงมา ได้แก่ สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 45.56 ± 0.46 มก GAE/กรัม สารสกัด และสารสกัดสารสกัดฟิลเตรท มีค่าน้อยที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 31.89 ± 0.39 มก GAE/กรัม สารสกัด ดังแสดง

ตารางที่ 4.4 เอนไซม์เซลลูเลสมีประสิทธิภาพในการสกัดสารฟีนอลิกน้อยกว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 70 เนื่องจากกลไกการทำงานที่ต่างกัน เอนไซม์เซลลูเลสมีหน้าที่หลักในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช การใช้เอนไซม์มีจุดมุ่งหมายเพื่อทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์ ทำให้สารประกอบภายในเซลล์ เช่น สารฟีนอลิกถูกปลดปล่อยออกมาได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของเอนไซม์จะจำเพาะเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิดิกในเซลลูโลสเป็นหลัก และอาจมีผลกระทบต่อการปลดปล่อยสารฟีนอลิกที่จับอยู่กับส่วนประกอบอื่น ๆ ของผนังเซลล์ เช่น ลิกนิน หรือเพกติน ได้ไม่ดีเท่าที่ควร ในส่วนของเอทานอลร้อยละ 70 เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง ทำให้สามารถละลายสารประกอบที่มีความหลากหลายของขั้วได้ดี รวมถึงสารฟีนอลิกหลายชนิดที่มีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว การใช้เอทานอลร้อยละ 70 ช่วยในการสกัดสารฟีนอลิกโดยการแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช ละลายสารประกอบเป้าหมายและนำออกมา การผสมกับน้ำจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายสารฟีนอลิกที่มีความขั้วสูงได้ดีขึ้น (ภัทรพร ผูกคล้าย, 2553)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดไข่น้ำ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณฟีนอลิกรวม (มก. GAE/กรัม สารสกัด)
สารสกัดฟิลเตรท	0	31.89±0.39 ^e
	5	32.91±0.19 ^d
	10	43.13±0.28 ^c
	15	45.56±0.46 ^b
สารสกัดหยาบฟีนอลิก	-	58.93±1.03 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรยกพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

4.4.2.3 ปริมาณรวมของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดไข่น้ำ ด้วยวิธี Aluminum Chloride

จากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดไข่น้ำ ด้วยวิธี Aluminum Chloride พบว่าสารสกัดทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 323.73±1.93 มก. QE/กรัม สารสกัด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ (จุฬารรรณ ดอกไม้งาม, 2560) ทำการสกัดไข่น้ำด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ได้ค่าผลได้ของสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุดเท่ากับ 258.09 มิลลิกรัมสมมูลสารเคซินต่อกรัมน้ำหนัก ร่องลงมา ได้แก่ สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้

เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 86.85 ± 0.16 มก. QE/กรัม สารสกัด และ สารสกัดฟิเตรทมีค่าน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 69.01 ± 0.09 มก. QE/กรัม สารสกัด ดังแสดง ตาราง ที่ 4.5 การที่เอนไซม์เซลลูเลสมีประสิทธิภาพในการสกัดสารฟลาโวนอยด์น้อยกว่าการใช้เอทานอล ร้อยละ 70 เนื่องจากกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน เอนไซม์เซลลูเลสมีหน้าที่หลักในการย่อยสลาย เซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช การใช้เอนไซม์มีจุดมุ่งหมายเพื่อทำลายโครงสร้าง ของผนังเซลล์ เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วระดับปานกลาง ซึ่งสามารถละลายสารฟลาโวนอยด์ ได้ดีโดยเฉพาะฟลาโวนอยด์ที่มีความเป็นขั้วน้อยหรือปานกลาง สามารถแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช และดึงสารออกมาได้มาก (ภัทรพร ผูกคล้าย, 2553) โดยไม่ต้องพึ่งการย่อยสลายผนังเซลล์ ด้วยเอนไซม์ เอทานอลสามารถสกัดฟลาโวนอยด์ได้หลากหลายชนิด รวมถึงทั้งแบบอิสระและที่จับอยู่ กับน้ำตาล (glycosides) ในขณะที่เอนไซม์อาจช่วยปลดปล่อยฟลาโวนอยด์บางชนิดเท่านั้น ประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับชนิดเอนไซม์และโครงสร้างของผนังเซลล์พืช

ตารางที่ 4.5 ปริมาณรวมของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดไข่น้ำ ด้วยวิธี Aluminum Chloride

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (มก. QE/กรัม สารสกัด)
สารสกัดฟิเตรท	0	69.01 ± 0.09^e
	5	72.94 ± 0.19^d
	10	77.62 ± 0.17^c
	15	86.85 ± 0.16^b
สารสกัดหยาบฟีนอลิก	-	323.73 ± 1.93^a

หมายเหตุ ตัวอักษรยกพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

4.4.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากไช้

4.4.3.1 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay

จากการทดลองวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay พบว่าสารสกัด สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 7.51 ± 0.04 มก. TEAC/กรัม สารสกัด รองลงมา คือ สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 4.86 ± 0.08 มก. TEAC/กรัม สารสกัด สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตร ไม่แตกต่างกับสารสกัดหยาบพินอลิก ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 4.37 ± 0.17 และ 4.42 ± 0.03 มก. TEAC/กรัม สารสกัด ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.6 ซึ่งมีรายงานที่สอดคล้องเกี่ยวข้องกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยงานวิจัยของ Jiang (2014) ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากรากกล้วยาคา จากนั้นทดสอบ DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) เพื่อประเมินกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากรากของพืช ผลการทดสอบพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จาก *Rhizoma imperata* มีความสามารถในการยับยั้ง DPPH โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด ซึ่งบ่งชี้ถึงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่ดีของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้โดยสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH และ OH ได้อย่างมีนัยสำคัญ พบว่ากระบวนการสกัดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสมีประสิทธิภาพสูงในการสกัดเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดอื่น ๆ ซึ่งในกรณีนี้การใช้เอนไซม์เซลลูเลสจะช่วยให้สารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระเพิ่มความเข้มข้นในตัวอย่างสกัด ทำให้สามารถแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระได้ดีขึ้นในระหว่างการทดสอบ

ตารางที่ 4.6 ตารางผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี

DPPH scavenging assay

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มก TEAC/กรัม สารสกัด
สารสกัดฟิลเตรท	0	3.88 ± 0.04^d
	5	4.37 ± 0.17^c
	10	4.86 ± 0.08^b

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มก TEAC/กรัม สารสกัด
สารสกัดฟิลเตรท	15	7.51±0.04 ^a
สารสกัดหยาบพีนอลิก	10	4.42±0.03 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรยกพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

4.4.3.2 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay

จากการทดลองวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay พบว่าสารสกัดใช้น้ำด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ไม่แตกต่างกับสารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 56.97 ± 0.86 และ 54.92 ± 2.48 มก. TEAC/กรัม สารสกัด ตามลำดับ สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตร แตกต่างกับสารสกัดฟิลเตรท 10 ยูนิต/มิลลิลิตร และสารสกัดฟิลเตรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงตารางที่ 4.7 ซึ่งมีรายงานการวิจัยที่สอดคล้องได้ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากกากผลแบล็คเคอแรนท์ พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้โดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) พบว่ามีค่าเท่ากับ 59.66 ± 0.06 ไมโครโมลาร์เฟอร์รัสสมมูลต่อกรัมของตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัดสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดมีศักยภาพในการเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) ที่สามารถเปลี่ยน Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสะท้อนถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดจากกากผลแบล็คเคอแรนท์ (Kapasakalidis et al., 2009)

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก เชิงซ้อน มก. TEAC/กรัม สารสกัด
สารสกัดฟิลเตรท	0	34.32±1.65 ^d
	5	39.02±1.09 ^c
	10	42.06±1.04 ^b
	15	54.92±2.48 ^a
สารสกัดหยาบฟีนอลิก	-	56.97±0.86 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรยกพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

จากผลการวิจัยทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไข่น้ำที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัดให้ปริมาณโปรตีนรวมในปริมาณสูง และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี เนื่องจากการใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัด มีคุณสมบัติในการย่อยองค์ประกอบและสารสำคัญออกจากพืชที่ศึกษาเพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญและผลผลิตสูงขึ้น ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ โครงสร้างของผนังเซลล์จะถูกทำลายทำให้โปรตีนที่ถูกจับยึดอยู่ภายในเซลล์ละลายออกมาในสารละลายสกัดได้มากขึ้น (ทิพวรรณ ทองสุข, 2559) อีกทั้งเป็นวิธีการสกัดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายเคมีที่ใช้ในการสกัดดำเนินการโดยใช้พลังงานและอุณหภูมิต่ำใช้ระยะเวลาการสกัดที่สั้นส่งผลให้การสกัดมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น (Zhao et al., 2016) วิธีนี้สามารถสกัดได้ทั้งโปรตีนและฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพร้อมกันได้ใน การสกัดครั้งเดียว ซึ่งเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมในปริมาณสูง แต่ปริมาณโปรตีนรวมให้ค่าที่น้อยกว่ามากอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และสารอนุพันธ์ซึ่งมีวงแหวน เบนซีนอยู่ในสูตรโครงสร้าง จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วสูง เช่น เมทานอล เอทานอล แต่ละลายได้น้อยในน้ำ หรือกล่าวได้ว่าสารดังกล่าวมีสภาพขั้ว (Polarity) ใกล้เคียงกับเอทานอลร้อยละ 70 จึงละลายในเอทานอลร้อยละ

70 ได้ดีกว่า (ภัทรพร ผูกคล้าย, 2553) ดังนั้นการนำวิธีการสกัดด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัดถือว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดโปรตีน และสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ หรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง หรือ อาหาร ต่อไปได้



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

วิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมสารสกัดจากไข่น้ำด้วยวิธีสีเขียว และ เพื่อประเมินสารประกอบฟีนอลิก โปรตีน และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดไข่น้ำเพื่อประโยชน์ทางเครื่องสำอาง

จากการทดลองพบว่า การใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการสกัดสารจากไข่น้ำส่งผลให้ปริมาณโปรตีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเพิ่มขึ้น โดยที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในความเข้มข้น 5 ยูนิต/มิลลิลิตร ทำให้ได้ผลผลิตโปรตีนสูงสุด 54.25 ± 0.74 มิลลิกรัม BSA ต่อกรัมสารสกัด ซึ่งตามมาด้วยความเข้มข้น 10 และ 15 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดไข่น้ำ พบว่าสารสกัดหยาบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ให้ปริมาณสูงสุด 58.93 ± 1.03 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัด ซึ่งมีค่าสูงกว่าสารสกัดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สารสกัดที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในความเข้มข้น 15 ยูนิต/มิลลิลิตร มีปริมาณรองลงมา เท่ากับ 45.56 ± 0.46 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัด ขณะที่สารสกัดฟิเตรทที่มีปริมาณต่ำสุด 31.89 ± 0.39 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัด สำหรับสารฟลาโวนอยด์รวม สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่ได้จากเอทานอลร้อยละ 70 ยังให้ปริมาณสูงที่สุด 323.73 ± 1.93 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด โดยสารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในความเข้มข้น 15 ยูนิต/มิลลิลิตร มีปริมาณรองลงมา เท่ากับ 86.85 ± 0.16 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด ในด้านฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH สารสกัดฟิเตรท 15 ยูนิต/มิลลิลิตร แสดงผลสูงสุด เท่ากับ 7.51 ± 0.04 มิลลิกรัม TEAC ต่อกรัมสารสกัด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสารสกัดอื่น ๆ ($p < 0.05$) ส่วนในการทดสอบโดยวิธี FRAP assay พบว่า สารสกัดฟีนอลิกจากเอทานอลร้อยละ 70 และสารสกัดฟิเตรท 15 ยูนิต/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 56.97 ± 0.86 และ 54.92 ± 2.48 มิลลิกรัม TEAC ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ผลการวิเคราะห์การประเมินสารประกอบฟีนอลิก องค์ประกอบโปรตีนและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดไช้ น้ำนำไปต่อยอดการวิจัยและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในอนาคต

5.2.2 ในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการวิจัยโดยเพิ่มตัวทำละลายให้หลากหลายมากขึ้น

5.2.3 ควรนำสารสกัดไช้ น้ำไปวิเคราะห์องค์ประกอบหรือสารสำคัญเพิ่มเติม

5.2.4 ในการศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษาเกี่ยวกับชนิดของเอนไซม์อื่น ๆ ที่ใช้ในการสกัดให้หลากหลายชนิดมากยิ่งขึ้น



รายการอ้างอิง

- ขวัญดาว แจ่มแจ่ม. (2555). สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดผักพื้นบ้านในจังหวัดกำแพงเพชร. *วารสารวิทยาศาสตร์ มนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏ*, 13(2).
- จุฬารวรรณ์ ดอกไม้งาม. (2560). การศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากไข่น้ำและการประยุกต์ใช้สำหรับเครื่องสำอางประเภทเอนแคปซูเลชันอิมัลชัน (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชุติมา ลิ้มมัททวาริทธิ์ และสนทยา ลิ้มมัททวาริทธิ์. (2555). การสกัดพืชสมุนไพรโดยการสกัดด้วยของไหลความดันสูง. *วารสารไทยเภสัชวิทยนิพนธ์ (ฉบับการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์) มศก.*, 7.
- ดวงกมล เรือนงาม. (2557). การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ. *Journal of Science Ladkrabang*, 23(2), 120–139.
- ทิพวรรณ ทองสุข. (2559). การสกัดโปรตีนและน้ำตาลจากรำข้าวสาคัดน้ำมัน. *นเรศวรวิจัยครั้งที่ 12: วิจัยและนวัตกรรมกับการพัฒนาประเทศ*. มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ธนัญญา สายโื้อะ. (2565). ผลของการปรับสภาพและเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสมบัติทางเคมี-กายภาพ และกิจกรรมทางชีวภาพของสารสกัดจากไข่น้ำ (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ณัฐคุณิน ศุภเมธานนท์, พิมพา สร้อยสูงเนิน, สิริรัตน์ ลิคนันท์, ณัฏชา พันธมา, ปนัดดา เพชรล้วน, สุภารัตน์ สมบัติศรี . . . อาทิตย์ อัสวสุชี. (2559). เคมีสีเขียว. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, 18(3).
- นันทวัน บุญยะประภัศร. (2536). การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชในยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. (เล่มที่ 1, หน้า 116–129). ภาควิชาเภสัชวินิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ภัทรพร ผูกคล้าย และธัญญรัตน์ เชื้อสะอาด. (2553). การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในพรอพอลิส. *มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่เฉลิมพระเกียรติ*.
- ภาณุมาศ ทองคำ. (2562). ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไข่ฟ้าแห้งและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร. *มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิร*.
- วรรณิณี จันทรแก้ว, อัมพร รัตนมุสิก, วไลยา เหลือแหล่ และกัญญารัตน์ รักษาแก้ว. (2562). องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไข่น้ำจากธรรมชาติและการเลี้ยง. *คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย*.

- วนิดา ปานอุทัย. (2563). ผำ: พืชน้ำขนาดเล็กและแหล่งโปรตีนทางเลือกเพื่อสุขภาพ. วิชาการอาหาร, 50(4).
- วชิราภรณ์ พูนัน. (2562). วิธีการสกัดสารสกัดหยาบจากพรอพอลิสของชันโรงที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร.
- วรุณี ปิยะบุญจรัส. (2561). การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารให้ความหวานและสารเสริมอื่นๆที่มีผลต่อระดับสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ชาเขียว. วิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต.
- วิชมนี ยืนยงพุทธกาล, สันทัด วิเชียรโชติ, วัชร บัญญอนอม และสุรางค์ ทองสุวรรณ. (2561). ผลของสภาวะการสกัดต่อคุณภาพของเส้นใยอาหารผงจากกากมะตูม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 20(3), 110–123.
- วิลาลินี ดีปัญญา. (2555). การพัฒนาผลิตภัณฑ์ใช้น้ำแผ่น. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.
- เวสาร์ช จรเจริญ, พานิช อินต๊ะ และ สุเปญญา จิตตพันธ์. (2562). การประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์เพื่อสกัดสารจาก *Chlorella vulgaris* TISTR8580. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 23(3), 1253–1267.
- ศิริภัทร์ พลอยทับทิม. (2565). การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่ด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด. สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.
- สุพรรณิ ทิพนี. (2560). การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและความคงตัวของเคมีของสารสำคัญในสารสกัดใช้น้ำ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.
- สุภาภรณ์ กรณีย์. (2560). สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดเข้มข้นในใบที่ได้จากแห่นในประเทศไทย. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สร้อย เพชร เนตร อนงค์, พีระพงศ์ กิติภาวงศ์, ศรีโสภา เรืองหนู และอรุณพร อธิรัตน์. (2558). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมกับระยะเวลาการสกัดและการศึกษาความคงตัวของผงยาตำรับตรีผลา. *Thammasat Medical Journal*, 15(3), 472–479.
- อภิเดช แสงดี, เบญจรงค์ วังคะฮาด, อุดมลักษณ์ มณีโชติ, ปิยะเนตร จันทรธิระติกุล และ อาณัติ จันทรธิระติกุล. (2555). การจำแนกชนิดของไข่น้ำโดยการหาลำดับเบสของยีนในคลอโรพลาสต์. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 3(29).

- อาทิตย์ ดุจเฒ๊ะ, ชนวัฒน์ นิทัศน์วิจิตร, กาญจนา นาคประสม, หยาดฝน ทะนงการกิจ และ นักรบ นาคประสม. (2565). การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเงาะก๊วย. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 27(3), 1765–1781.
- Anastas, P. T., & Warner, J. C. (1998). *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford University Press.
- Appenroth, K.-J., Sree, K. S., Bohm, V., Hammann, S., Vetter, W., Leiterer, M., & Jahreis, G. (2017). Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food. *Food Chemistry*, 217, 266–273.
- Appenroth, K.-J., Sree, K. S., Bog, M., Ecker, J., Seeliger, C., Böhm, ... Jahreis, G. (2018). Nutritional value of the duckweed species of the genus *Wolffia*. *Journal of Food Chemistry*, 252, 342–349.
- Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F. A., & de la Guardia, M. (2019). Green extraction techniques in green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 248–253.
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C. M. (2022). Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4), 1326.
- Boonsaner, M., & Hawker, D. W. (2013). Evaluation of food chain transfer of the antibiotic oxytetracycline and human risk assessment. *Chemosphere*, 93(6), 1009–1014.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Cai, C., Yu, W., Wang, C., Liu, L., Li, F., & Tan, Z. (2019). Green extraction of cannabidiol from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) using deep eutectic solvents coupled with further enrichment and recovery by macroporous resin. *Journal of Molecular Liquids*, 287, 110957.
- Chaiwut, P., Pintathong, P., & Rawdkuen, S. (2010). Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. *Process Biochemistry*, 45(7), 1172–1175.

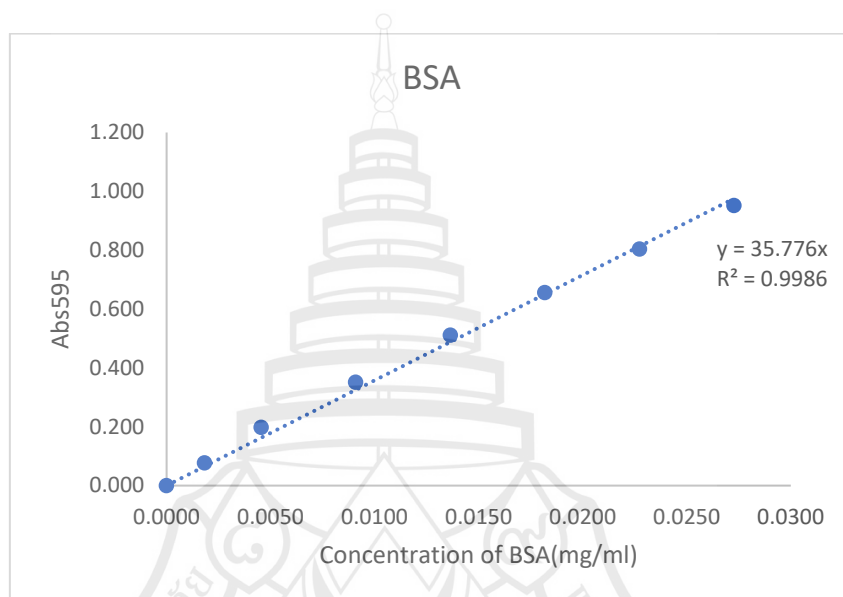
- Chaiwut, P., Rawdkuen, S., & Benjakul, S. (2010). Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol–salts biphasic system. *Process Biochemistry*, 45(7), 1148–1155.
- Caldas, T. W., Mazza, K. E., Teles, A. S., Mattos, G. N., Brígida, A. I. S., Conte-Junior, C. A., & Tonon, R. V. (2018). Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 111, 86–91.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.
- Das, S., Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2021). Integrated strategies for enzyme assisted extraction of bioactive molecules: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191, 899–917.
- Dumas, J. B. (1826). Procédé nouveau pour déterminer la composition des matières organiques. *Annales de Chimie et de Physique*, 31, 113–130.
- Fattahi, S., Zabihi, E., Abedian, Z., Pourbagher, R., Ardekani, A. M., Mostafazadeh, A., & Akhavan-Niaki, H. (2014). Total phenolic and flavonoid contents of aqueous extract of stinging nettle and in vitro antiproliferative effect on HeLa and BT-474 cell lines. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 3(2), 102.
- Fernandes, R. D. P. P., Trindade, M. A., Tonin, F. G., Lima, C. G. D., Pugine, S. M. P., Munekata, P. E. S., De Melo, M. P. (2016). Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: Cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 451–460.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Biological Chemistry*, 73, 627–650.

- Garrigues, S., Armenta, S., & de la Guardia, M. (2010). Green strategies for decontamination of analytical wastes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(7), 592–601.
- Iyer, A., Guerrier, L., Leveque, S., & others. (2022). High throughput method development and optimised production of leaf protein concentrates with potential to support the agri-industry. *Food Measure*, 16(1), 49–65.
- Jiang, L. F. (2014). Cellulase-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Rhizoma imperata*. *Carbohydrate Polymers*, 108, 99–102.
- Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., & Gordon, M. H. (2009). Effect of a cellulase treatment on extraction of antioxidant phenols from black currant (*Ribes nigrum* L.) pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4342–4351.
- Kızıl, G., Kızıl, M., Yavuz, M., Emen, S., & Hakimoğlu, F. (2008). Antioxidant activities of ethanol extracts of *Hypericum triquetrifolium* and *Hypericum scabroides*. *Pharmaceutical Biology*, 46(4), 231–242.
- Koina, I. M., Sarigiannis, Y., & Hapeshi, E. (2023). Green extraction techniques for the determination of active ingredients in tea: Current state, challenges, and future perspectives. *Separations*, 10(2), 121.
- Ladyofhats. (2007). *A section of the cell wall in plant cell*. N.P.
- Landolt, E. (1992). Lemnaceae duckweed family. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 10–14.
- Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4), 969–978.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M., & Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100(4), 1409–1418.
- Narikawa, T., Shinoyama, H., & Fujii, T. (2000). A β -rutosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(6), 1317–1319.
- Nini, W. (2016). Chemical constituents of *Wolffia globosa* - Flavone. *Bioscience*, 1(1), 1–4.

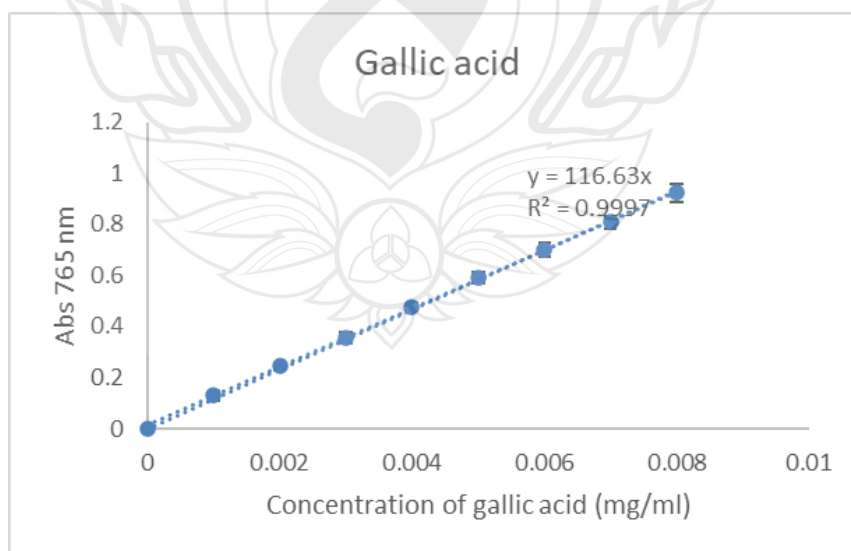
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37–44.
- Pekal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7, 1776–1782.
- Prakongpan, T., Nitithamyong, A., & Luangpituksa, P. (2002). Extraction and application of dietary fiber and cellulose from pineapple cores. *Journal of Food Science*, 67, 1308–1313.
- Ribeiro, S. A. O., Nicacio, A. E., Zanqui, A. B., Biondo, P. B. F., de Abreu-Filho, B. A., Visentainer, J. V., & Matsushita, M. (2016). Improvements in the quality of sesame oil obtained by a green extraction method using enzymes. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 464–470.
- Siddiqui, N., Rauf, A., Latif, A., & Mahmood, Z. (2017). Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 12(4), 360–363.
- Somdee, T., Phadungkit, M., & Yangyuen, S. (2015). Antioxidant compounds and activities in selected fresh and blanched vegetables from Northeastern Thailand. *Chiang Mai Journal of Science*, 43(4), 834–844.
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6(1), 11.1–11.8.
- Yadav, D., Barbora, L., Bora, D., Mitra, S., Rangan, L., & Mahanta, P. (2017). An assessment of duckweed as a potential lignocellulosic feedstock for biogas production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 253–259.
- Zhao, Y. M., Wang, J., Wu, Z. G., Yang, J. M., Li, W., & Shen, L. X. (2016). Extraction, purification and anti-proliferative activities of polysaccharides from *Lentinus edodes*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 136–144.

ภาคผนวก

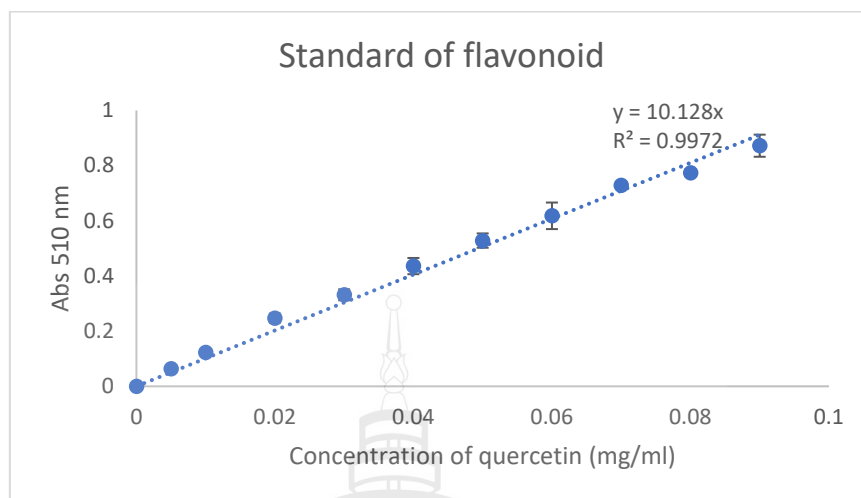
กราฟสารมาตรฐานที่ใช้ทดสอบ



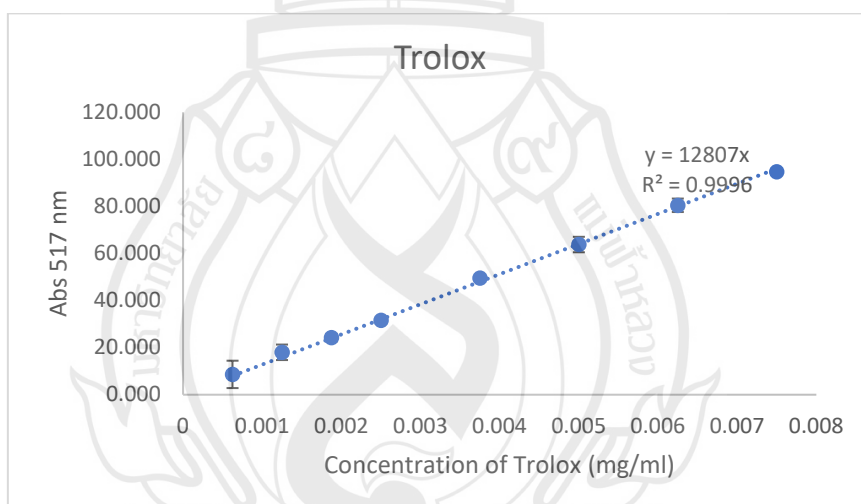
ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี Dye - binding (Bradford assay)



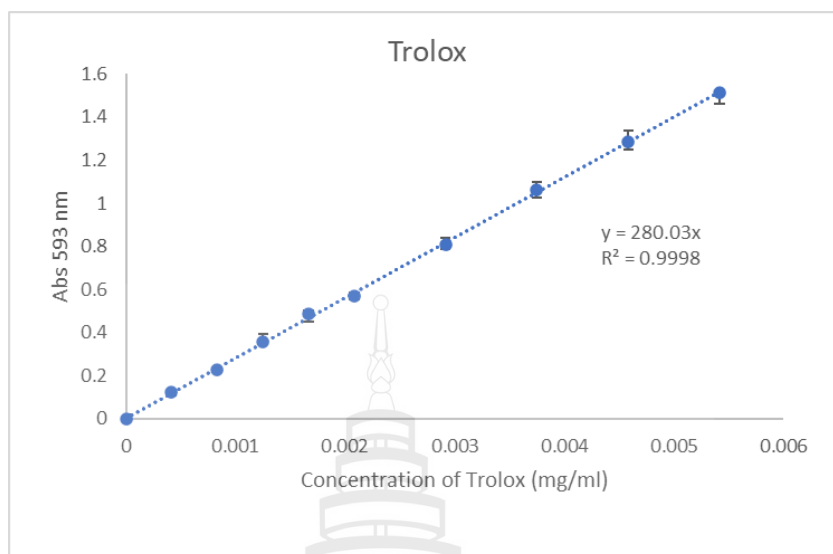
ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐาน quercetin ด้วยวิธี Aluminum Chloride



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธี DPPH scavenging assay



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธี Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay

