บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดใบสบู่ดำ (*Jatropha Curcus* Linn.) ที่มีปริมาณของสารประกอบฟีโนลิค ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน สูงที่สุด และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธีบ๊อกซ์ - เบ็นเกน (Box-Behnken Design, BBD) เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนของตัวทำละลายร่วม ที่มีผลต่อผลได้ของการสกัด และวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้ การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็นห้าส่วน ส่วนแรกเป็นการเตรียมใบสบู่ดำอบแห้ง ส่วนที่สองเป็นการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต และตัวทำละลายร่วมเมทานอล โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อผลได้การสกัด ได้แก่ ความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนของตัวทำละลายร่วม ส่วนที่สามเป็นการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีโมดิฟายออลิจินอลดีพีพีเอช (modified original, DPPH) [3] ส่วนที่สี่เป็นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยในการสกัดใบสบู่ดำด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป และส่วนสุดท้ายเป็นการศึกษาความคงตัวของสารประกอบฟีโนลิคในสารสกัดใบสบู่ดำระหว่างการเก็บรักษา

4.1 การเตรียมใบสบู่ดำอบแห้ง

นำใบสบู่ดำที่ตัดก้านแล้วมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดเพื่อลดขนาด แล้วคัดแยกขนาดให้อยู่ในช่วง 1.19 – 2.00 มิลลิเมตร จากนั้นนำใบสบู่ดำอบแห้งมาวิเคราะห์ค่าความชื้น โดยให้ใบสบู่ดำอบแห้งมีความชื้นเหลือไม่เกิน 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง เก็บรักษาใบสบู่ดำอบแห้งที่คัดแยกขนาดแล้วในตู้ควบคุมความชื้นก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

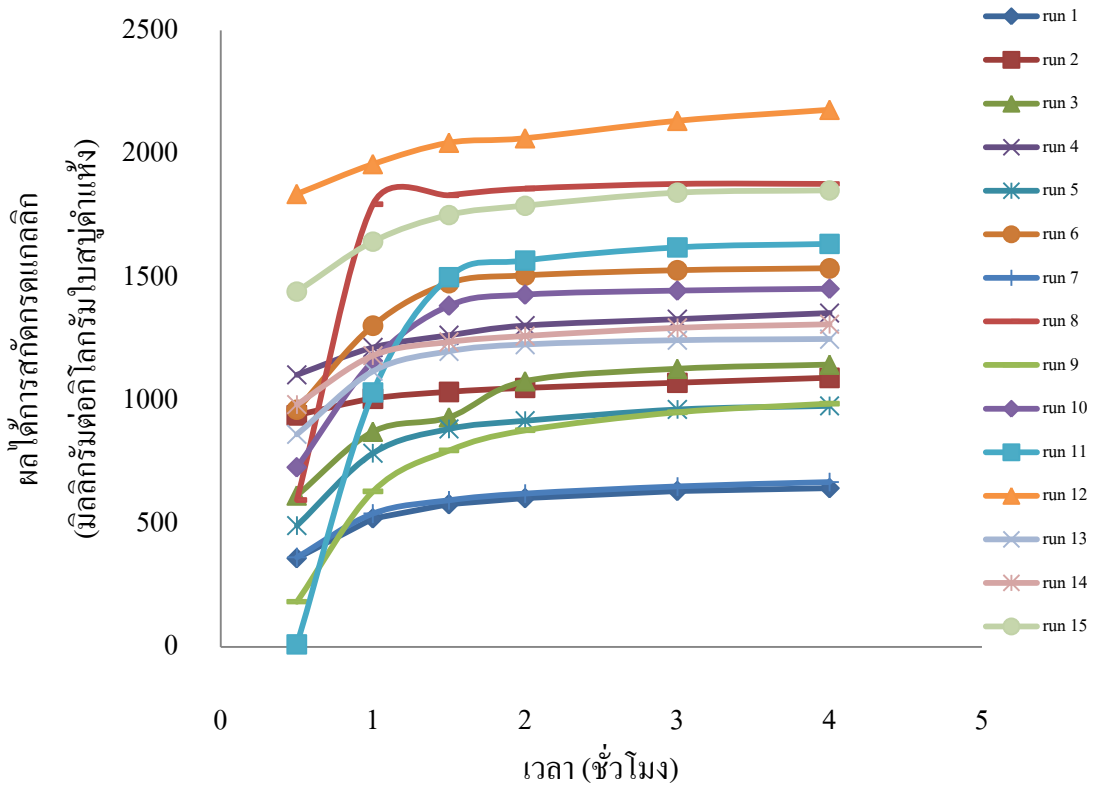
4.2 การสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต

งานวิจัยนี้เป็นการปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำ ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต และตัวทำละลายร่วม ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ใบสบู่ดำอบแห้งขนาด 1.19 – 2.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 5 กรัม ทำการสกัดภายใต้อิทธิพลของตัวแปร 3 ตัว ได้แก่ ความดันที่ 8 25 และ 42 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิที่ 35 60 และ 85 องศาเซลเซียส และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่ 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยกำหนดให้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตไหลเข้าหน่วยสกัดด้วยอัตราการไหล 100 มิลลิลิตรต่อนาที จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือ

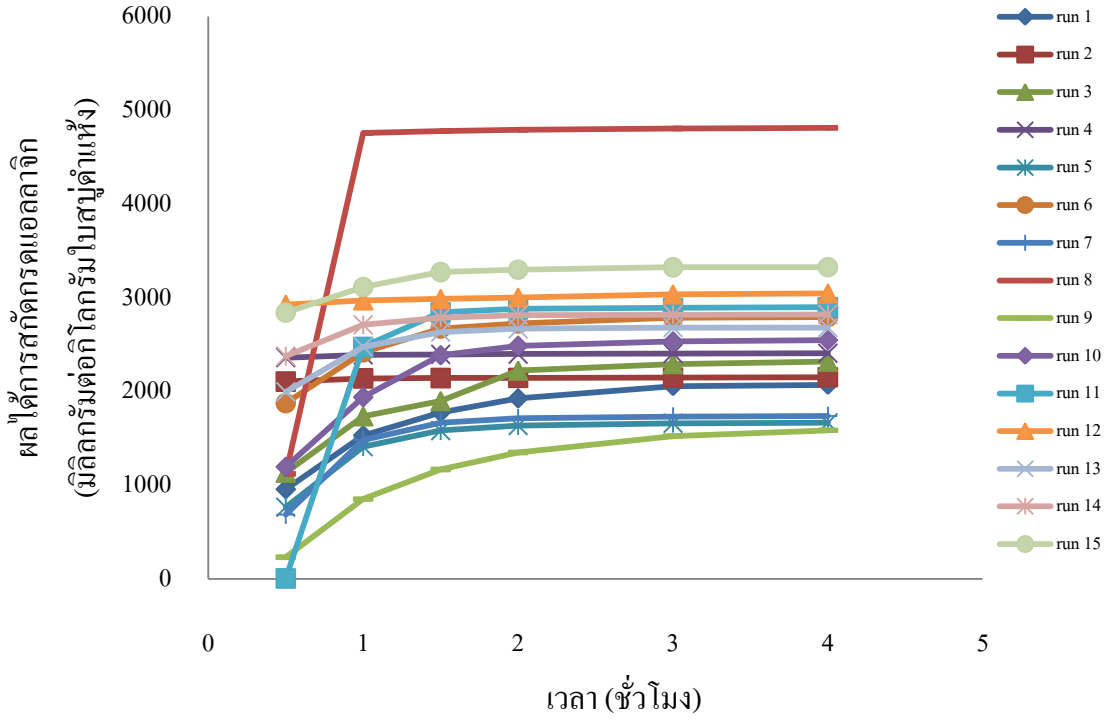
วิกฤตและใช้เมทานอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลายร่วม และใช้เวลาในการสกัด 6 ชั่วโมงจะให้ผลได้การสกัดดีที่สุด โดยการสกัดจะเข้าสู่สมดุลในชั่วโมงที่ 2 [2] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง และใช้เมทานอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลายร่วม โดยออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบ็นเกน (Box-Behnken Design, BBD) ซึ่งเป็นวิธีการใช้หลักทางคณิตศาสตร์ด้านมิติ สร้างตัวแปรทางสถิติโดยการกำหนดจุดศูนย์กลาง (center of point) เท่ากับ 3 สภาวะการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1 และ 3.2 วิเคราะห์ผลการทดลองและแสดงผลการทดลองในรูปพื้นผิวตอบสนอง (response surface)

4.2.1 เปรียบเทียบผลได้การสกัดของกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

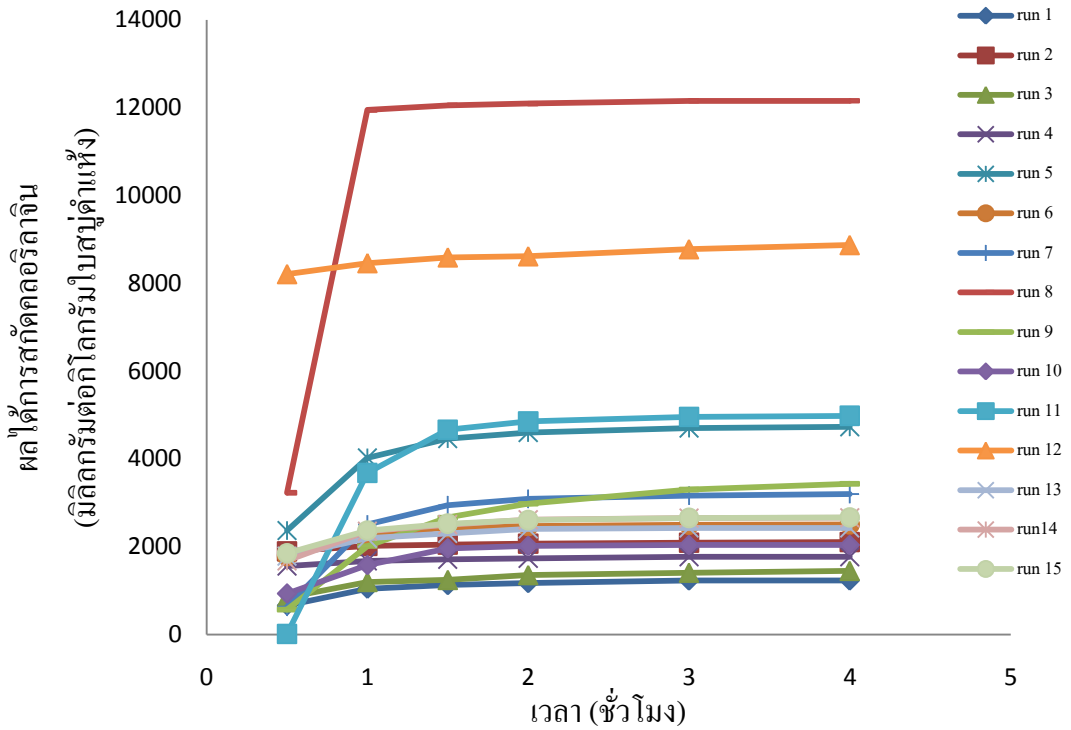
ผลการเปรียบเทียบผลได้การสกัดของกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ โดยออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบ็นเกน (Box-Behnken Design, BBD) สามารถแสดงได้ดังตารางที่ ค.1 - ค.3 จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของกรดแกลลิกที่สกัดได้สูงสุดคือ 2,178.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ โดยสกัดที่ความดัน 25 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (รูปที่ 4.1) และสามารถสกัดกรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน ได้ปริมาณสูงสุดคือ 4,810.61 และ 12,156.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำตามลำดับ (รูปที่ 4.2 และ 4.3) โดยสกัดที่ความดัน 42 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และพบว่าการใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะสามารถสกัดสารประกอบฟีโนลิคออกมาได้เร็วกว่าการใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร



รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของผลได้กรดแกลลิกระหว่างการสกัดใบสบู่ดำ



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของผลได้กรดแอลลาจิกระหว่างการสกัดใบสบู่ดำ



รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงของผลได้คลอริลาจินระหว่างการสกัดใบสบู่ดำ

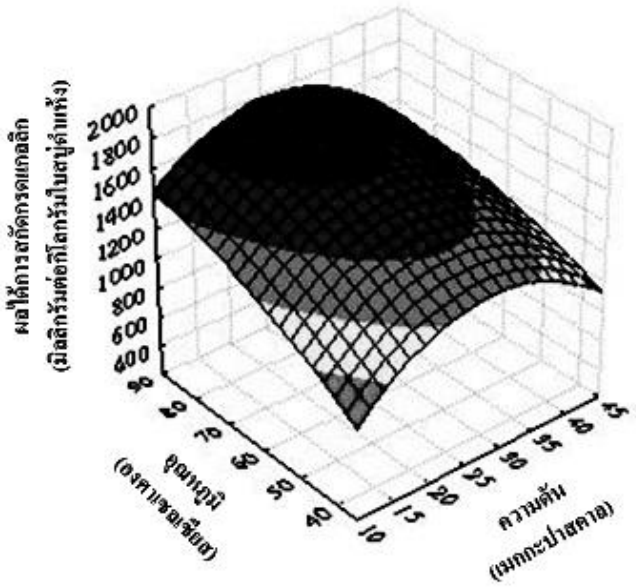
4.2.2 การศึกษาผลของปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.2.2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันและอุณหภูมิต่อผลได้การสกัดกรดแกลลิก

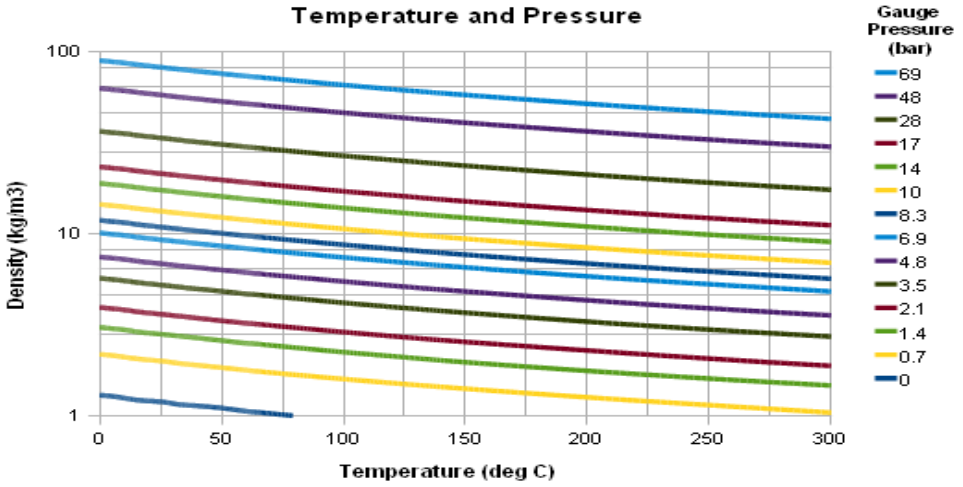
จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่อปริมาณของกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ แสดงในรูปของกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองดังรูปที่ 4.4 จากผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อความดันเพิ่มขึ้นปริมาณของกรดแกลลิกที่สกัดได้จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น โดยในช่วงความดัน 25 – 35 เมกกะปาสคาล เป็นช่วงความดันที่สามารถสกัดกรดแกลลิกได้ปริมาณมากที่สุด เนื่องจากเมื่อความดันเพิ่มขึ้น ความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตจะมีค่าเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.5) ทำให้ระยะทางระหว่างโมเลกุล (intermolecular distance) ของของไหลเหนือวิกฤตกับโมเลกุลของสารที่ต้องการสกัดในใบสบู่ดำมีระยะทางลดลงทำให้โอกาสในการชนกัน (interaction) ระหว่างโมเลกุลของของไหลเหนือวิกฤตกับโมเลกุลของสารที่ต้องการสกัดมีค่าเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นผลได้การสกัดกรดแกลลิกจึงมีค่ามากขึ้น อีกทั้งยังพบว่าการเพิ่มความดันในการสกัดให้สูงขึ้น จะทำให้ความสามารถในการละลายของกรดแกลลิกในของไหลเหนือวิกฤตมีค่าเพิ่มขึ้น จึงสามารถสกัดสารที่มีขั้วและสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เช่น สารประกอบฟีโนลิคได้มากขึ้น แต่เมื่อความดันที่ใช้ในการสกัดมีค่าสูงกว่า 35 เมกกะปาสคาล กลับพบว่ากรดแกลลิกที่สกัดได้กลับมีปริมาณลดลง อาจเป็นเพราะเมื่อความดันเพิ่มขึ้น ความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตจะเพิ่มขึ้น ทำให้ของไหลเหนือวิกฤตมีค่าความหนืดเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 4.6) ทำให้สัมประสิทธิ์การแพร่ของกรดแกลลิกในของไหลเหนือวิกฤตลดลง ซึ่ง

สอดคล้องกับความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และความสามารถในการแพร่ในหัวข้อที่ 2.4.5.2 (รูปที่ 2.12) เป็นผลให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารลดลง ดังนั้นการสกัดที่ความดันสูงมากๆ ปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จึงมีค่าลดลง

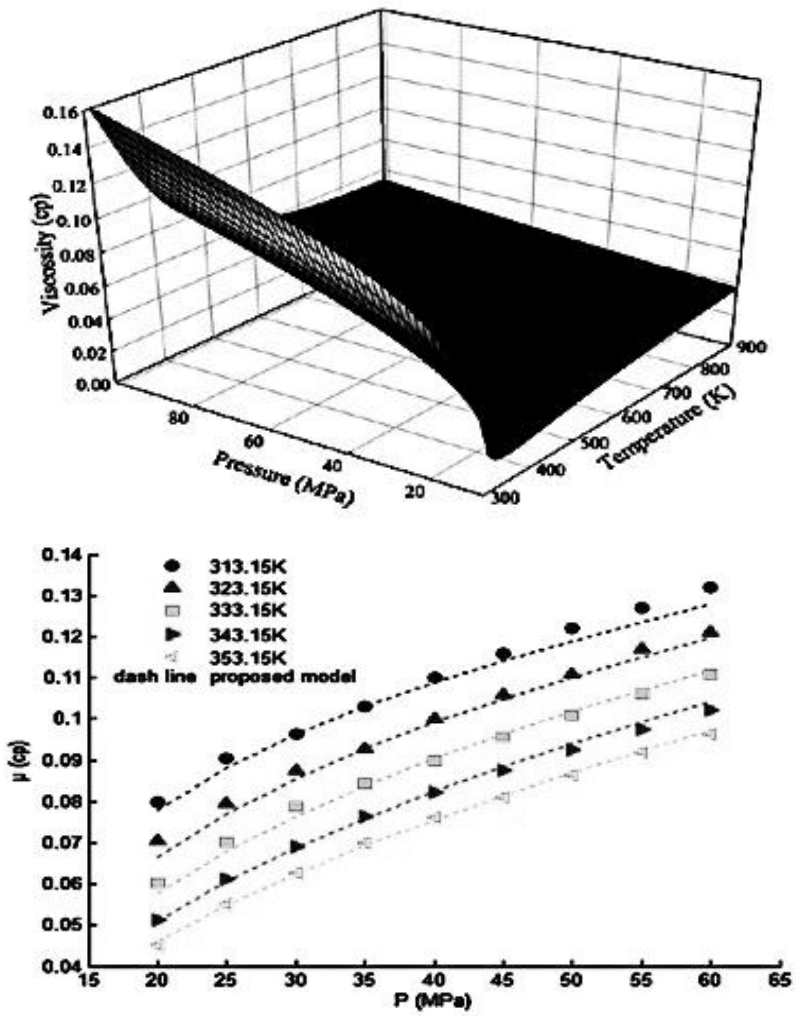
สำหรับผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดจะเห็นได้ว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณของกรดแกลลิกที่สกัดได้จะมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตจะมีค่าลดลง ส่งผลให้ค่าความหนืดลดลง (รูปที่ 4.5 - 4.6) และจากความสัมพันธ์ในหัวข้อที่ 2.4.5.2 พบว่าเมื่อความหนาแน่นและความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าลดลง ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของกรดแกลลิกในของไหลเหนือวิกฤตมีค่าเพิ่มขึ้น (รูปที่ 2.12) นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นค่าความดันไอของตัวถูกละลาย (solute vapor pressure) และค่าการละลายของตัวถูกละลายจะมีค่าเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารมีค่าเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จึงสูงขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิมีค่าสูงมากๆ กลับพบว่าอัตราการสกัดจะมีค่าลดลง เนื่องจากความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตจะมีค่าลดลงเมื่อสกัดที่อุณหภูมิสูง อีกทั้งในการสกัดที่ความดันสูงการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นยังไปลดความหนาแน่นและค่าความสามารถในการละลายของกรดแกลลิกในของไหลเหนือวิกฤต ทำให้อัตราในการสกัดมีค่าลดลง [31, 32, 34]



รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความดันกับอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ



รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤต [35]

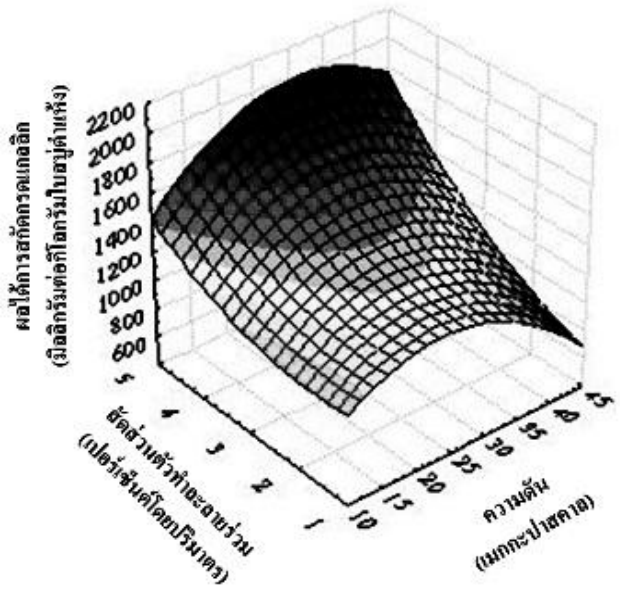


รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และค่าความหนืดของของไหลเหนือวิกฤต [36]

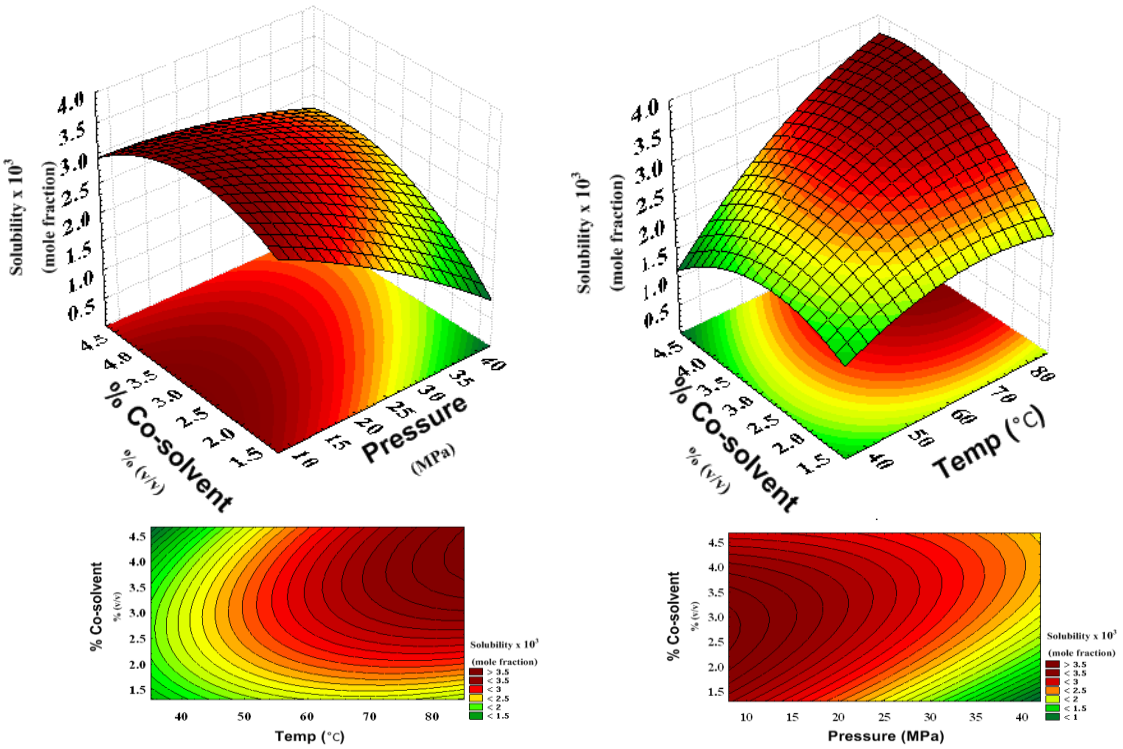
4.2.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันและสัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่อผลได้การสกัดกรดแกลลิก

จากกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าผลได้การสกัดของกรดแกลลิกจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความดันเพิ่มขึ้น โดยการสกัดที่ความดันในช่วง 25 – 35 เมกกะปาสคาล เป็นช่วงความดันที่สามารถสกัดกรดแกลลิกได้ปริมาณสูงที่สุด เนื่องจากเมื่อความดันมีค่าเพิ่มขึ้นความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.5) ทำให้ระยะทางระหว่างโมเลกุล (intermolecular distance) ของของไหลเหนือวิกฤตกับโมเลกุลของสารที่ต้องการสกัดในใบสบู่ดำมีระยะทางลดลงโอกาสในการชนกัน (interaction) ระหว่างโมเลกุลของของไหลเหนือวิกฤตกับสารสำคัญที่ต้องการสกัดจากใบสบู่ดำจึงมีค่าเพิ่มขึ้น ปริมาณของกรดแกลลิกที่สกัดได้จึงเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผลได้การสกัดกรดแกลลิกมีแนวโน้มลดลงเมื่อความดันที่ใช้ในการสกัดสูงเกิน 35 เมกกะปาสคาล เนื่องจากสัมประสิทธิ์การแพร่มีค่าลดลง เพราะความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.6) และผลที่ได้ยังสอดคล้องกับความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และความสามารถในการแพร่ในหัวข้อที่ 2.4.5.2 (รูปที่ 2.12)

ในส่วนของผลของสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัดจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมเพิ่มขึ้น ปริมาณของกรดแกลลิกที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นในทุกช่วงความดัน เนื่องจากกรดแกลลิกเป็นสารมีขั้ว แต่คาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารไม่มีขั้ว ดังนั้นการเติมตัวทำละลายร่วมที่มีขั้วเข้าไปจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้กับของไหลเหนือวิกฤตคือ เพิ่มค่าความมีขั้ว (polarity) ให้ของไหลเหนือวิกฤต และเพิ่มความสามารถในการละลายสารที่ต้องการสกัดให้มีค่าสูงขึ้น (รูปที่ 4.8) โดยช่วยให้สารที่ต้องการสกัดหลุดออกจากโครงข่ายของแข็งของใบสบู่ดำได้ง่ายขึ้น เนื่องจากตัวทำละลายร่วมจะไปช่วยทำลายพันธะระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับโครงข่ายของแข็งของใบสบู่ดำ พันธะไฮโดรเจนระหว่างสารสกัดกับตัวทำละลายร่วมเมทานอลมีความแข็งแรงกว่าพันธะระหว่างสารสกัดกับโครงข่ายของแข็งจึงทำให้สารที่ต้องการสกัดถูกพาออกมาพร้อมกับของไหลเหนือวิกฤตได้มากขึ้น และพบว่าการใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะสามารถสกัดสารที่ต้องการได้ปริมาณมากกว่าการใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร [31, 32]



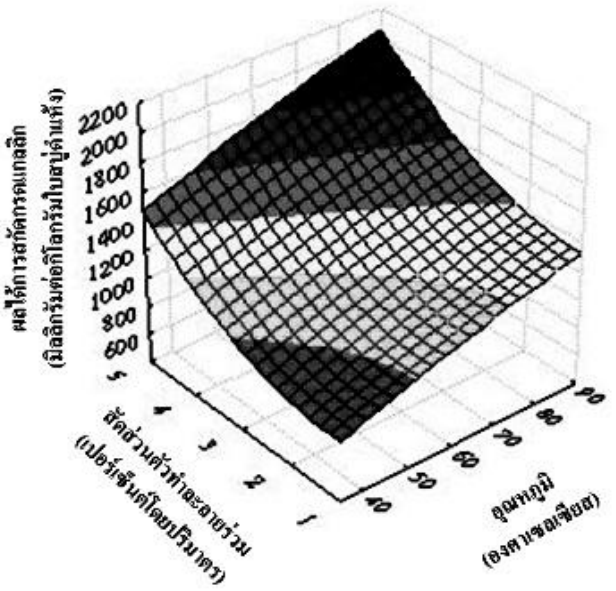
รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความดันกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วม
ที่มีผลต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ



รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการละลายของกรดแกลลิกในคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต
กับสัดส่วนตัวทำละลายร่วม [37]

4.2.2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและสัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่อผลได้การสกัดกรดแกลลิก

จากกราฟรูปที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจะทำให้ปริมาณของกรดแกลลิกที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้น (สอดคล้องกับเหตุผลในหัวข้อ 4.2.2.1) เนื่องจากเมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดให้สูงขึ้นค่าความหนืดและความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตจะมีค่าลดลง ในขณะที่สัมประสิทธิ์การแพร่ของกรดแกลลิกในของไหลเหนือวิกฤตและความสามารถในการละลายของกรดแกลลิกจะมีค่าเพิ่มขึ้น และในส่วนของสัดส่วนตัวทำละลายร่วม พบว่าเมื่อใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมเพิ่มขึ้น ปริมาณของกรดแกลลิกที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นในทุกช่วงอุณหภูมิ (สอดคล้องกับเหตุผลในหัวข้อ 4.2.2.2) เนื่องจากตัวทำละลายร่วมเมทานอลจะช่วยเพิ่มความมีขั้วให้กับของไหลเหนือวิกฤต และเพิ่มความสามารถในการละลายของตัวถูกละลายให้มีค่าสูงขึ้น (รูปที่ 4.8) โดยทำให้สารที่ต้องการสกัดหลุดออกจากโครงข่ายของแข็งของใบสบู่ดำได้มากขึ้น เนื่องจากตัวทำละลายร่วมเมทานอลที่มีความสามารถในการสร้างพันธะไฮโดรเจนจะไปช่วยทำลายพันธะระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับโครงข่ายของแข็งของใบสบู่ดำ ทำให้สารที่ต้องการสกัดหลุดออกจากโครงข่ายของแข็งของใบสบู่ดำเข้าสู่ของไหลเหนือวิกฤตได้ง่ายขึ้น จากผลการศึกษาพบว่าการสกัดโดยใช้อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และสัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะให้ผลได้การสกัดของกรดแกลลิกสูงที่สุด [31, 32, 34]



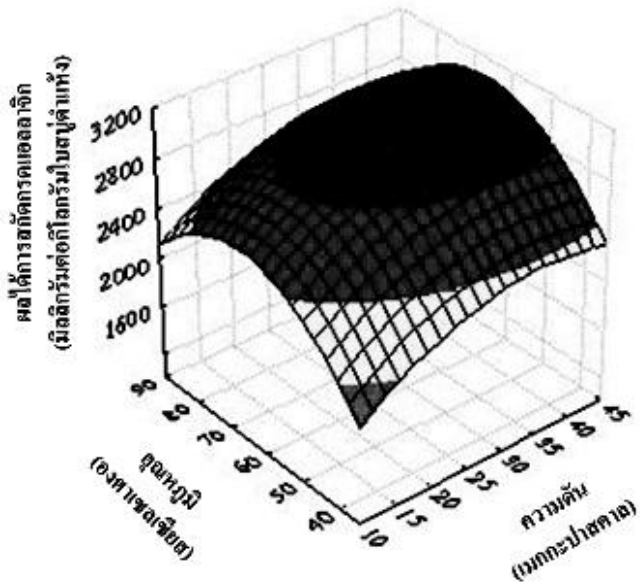
รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วม
ที่มีผลต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

จากผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อผลได้การสกัดกรดแกลลิก พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิและสัดส่วนของตัวทำละลายร่วมเพิ่มขึ้น ผลได้การสกัดของกรดแกลลิกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น สำหรับการเพิ่มความดันที่ใช้ในการสกัดพบว่าเมื่อความดันอยู่ในช่วง 25 –35 เมกกะปาสคาล จะสกัดได้ปริมาณกรดแกลลิกมากที่สุด โดยปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้สูงสุดคือ 2,178.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ

4.2.3 การศึกษาผลของปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.2.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันและอุณหภูมิต่อผลได้การสกัดกรดแอลลาจิก

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่อปริมาณของกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองดังแสดงในรูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วง 35 -70 องศาเซลเซียส ปริมาณของกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จะมีค่าเพิ่มขึ้น (สอดคล้องกับผลได้การสกัดของกรดแกลลิกในหัวข้อที่ 4.2.2.1) [31] แต่เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสูงเกิน 70 องศาเซลเซียส จะทำให้ผลได้การสกัดของกรดแอลลาจิกลดลง เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดมีค่าสูงเกินไปความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตจะมีค่าลดลง และการสกัดที่ความดันสูงการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นยังไปลดความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตทำให้อัตราในการสกัดมีค่าลดลง อีกทั้งที่อุณหภูมิสูงเกิน 70 องศาเซลเซียส อาจทำให้ตัวทำละลายร่วมเมทานอล (จุดเดือดเท่ากับ 64.7 องศาเซลเซียส) บางส่วนระเหยไปประสิทธิภาพในการสกัดกรดแอลลาจิกจึงมีค่าลดลง สำหรับผลของความดันที่ใช้ในการสกัดจะเห็นได้ว่า เมื่อความดันเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณของกรดแอลลาจิกที่สกัดได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงที่ความดัน 35 เมกกะปาสคาล ผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกจะคงที่ เนื่องจากการเพิ่มความดันในช่วงแรกนั้นเมื่อความดันสูงขึ้นความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตจะเพิ่มสูงขึ้น การชนกันระหว่างโมเลกุลของไหลเหนือวิกฤตกับสารที่ต้องการสกัดจากใบสบู่ดำจึงเพิ่มมากขึ้น ทำให้ผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกในช่วงนี้เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตเพิ่มขึ้นถึงจุดๆหนึ่งความหนืดจะมีค่าเพิ่มขึ้นจนทำให้สัมประสิทธิ์การแพร่ของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าลดลง จึงมีผลให้กรดแอลลาจิกที่สกัดได้มีปริมาณลดลง (สอดคล้องกับหัวข้อที่ 4.2.2.1) สำหรับงานวิจัยนี้การสกัดในช่วงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และความดันในช่วง 42 เมกกะปาสคาล เป็นสภาวะที่ให้ผลได้การสกัดของกรดแอลลาจิกสูงที่สุด

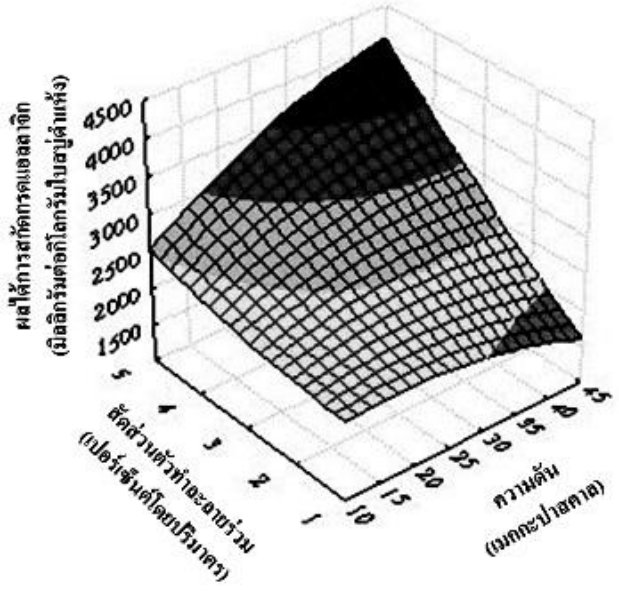


รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความดันกับอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.2.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันและสัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่อผลได้การสกัดกรดแอลลาจิก

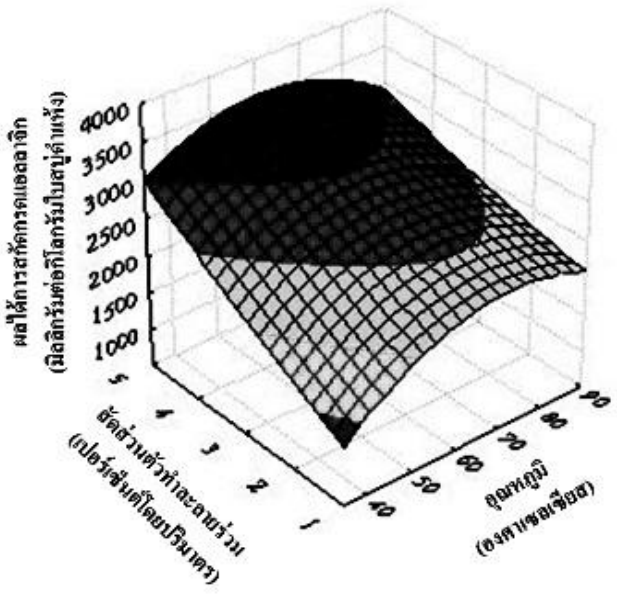
จากกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่าเมื่อใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมเพิ่มขึ้น ปริมาณของกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นในทุกช่วงของความดัน เนื่องจากเมื่อตัวทำละลายร่วมเมทานอลมีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้ค่าความมีขั้วของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าสูงขึ้น ค่าการละลายของกรดแอลลาจิกในของไหลเหนือวิกฤตมีค่ามากขึ้น (สอดคล้องกับหัวข้อที่ 4.2.2.2) สำหรับผลของความดันที่ใช้ในการสกัดพบว่าในกรณีที่ใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เมื่อความดันเพิ่มขึ้นในช่วง 8 – 30 เมกกะปาสคาล ผลได้การสกัดของกรดแอลลาจิกจะมีค่าคงที่ แต่ถ้าเพิ่มความดันสูงกว่า 30 เมกกะปาสคาลขึ้นไป จะทำให้ผลได้การสกัดของกรดแอลลาจิกลดลง แต่การสกัดโดยใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าเมื่อความดันเพิ่มขึ้นผลได้การสกัดของกรดแอลลาจิกจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อใช้สัดส่วนของตัวทำละลายร่วม 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่าความมีขั้วของของไหลเหนือวิกฤต และความสามารถในการละลายของกรดแอลลาจิกมีค่าต่ำ และการเพิ่มความดันให้สูงขึ้นทำให้ความหนาแน่นและความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าสูงขึ้น สัมประสิทธิ์การแพร่ของกรดแอลลาจิกในของไหลเหนือวิกฤตลดลง จึงทำให้การเพิ่มความดันในการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วม 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไม่มีผลต่อการเพิ่มผลได้การสกัดกรดแอลลาจิก อีกทั้งเมื่อความดันสูงมากๆผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกมีค่าลดลง เนื่องจากอิทธิพลของความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าสูง ดังนั้นการเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมให้สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มค่าการละลายให้กับกรดแอลลาจิก และเมื่อเพิ่มความดันความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นเป็นผลให้อัตราการสกัดกรด

แอลลาจิกสูงขึ้น การสกัดที่ความดัน 42 เมกกะปาสคาล และใช้สัดส่วนของตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรสามารถสกัดกรดแอลลาจิกได้สูงที่สุด



รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความดันกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วม
ที่มีผลต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสมุ่นดำ

4.2.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและสัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่อผลได้การสกัดกรดแอลลาจิก
จากรูปที่ 4.12 แสดงกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองของความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้ พบว่าเมื่อสัดส่วนของตัวทำละลายร่วมมีค่าสูงขึ้น ผลได้การสกัดของกรดแอลลาจิกจะมีค่าเพิ่มขึ้นในทุกช่วงของอุณหภูมิที่ใช้สกัด (สอดคล้องกับหัวข้อที่ 4.2.3.2) สำหรับผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดพบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วง 35 – 70 องศาเซลเซียส ผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกจะมีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณภูมิสูงเกินกว่า 70 องศาเซลเซียส ปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จะมีค่าลดลง (สอดคล้องกับหัวข้อที่ 4.2.3.1) เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้สูงเกินจุดเดือดของตัวทำละลายร่วมเมทานอล (จุดเดือดเมทานอลเท่ากับ 64.7 องศาเซลเซียส) ทำให้เมทานอลบางส่วนอาจระเหยไป ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดกรดแอลลาจิกมีค่าลดลง โดยพบว่าการใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่ให้ผลได้การสกัดของกรดแอลลาจิกสูงที่สุด



รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วม
ที่มีผลต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

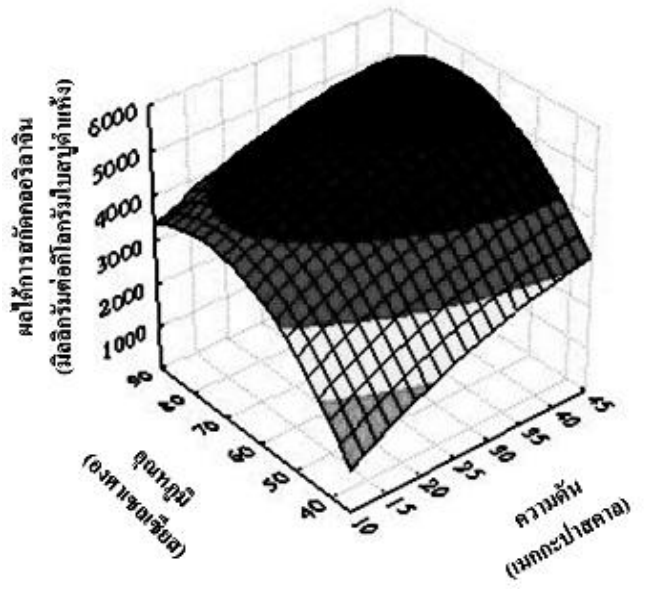
จากผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ พบว่าเมื่อใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมเพิ่มขึ้น จะทำให้ปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นในทุกช่วงของความดัน และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด โดยที่การเพิ่มอุณหภูมิในช่วงไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส จะให้ผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกสูงที่สุด ส่วนผลของความดันที่ใช้ในการสกัดพบว่า เมื่อความดันเพิ่มขึ้นจะทำให้ผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกเพิ่มขึ้น โดยปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้สูงสุดคือ 4,810.61 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ

4.2.4 การศึกษาผลของปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.2.4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันและอุณหภูมิต่อผลได้การสกัดคลอริลาจิน

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่อปริมาณของคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองดังรูปที่ 4.13 พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ปริมาณของคลอริลาจินที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นในทุกช่วงความดันที่ใช้ในการสกัด เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ค่าความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าลดลง และค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นค่าความดันไอและค่าการละลายของตัวถูกละลายจะมีค่าเพิ่มขึ้น (สอดคล้องกับหัวข้อที่ 4.2.2.1) ทำให้ปริมาณของคลอริลาจินที่สกัดได้มีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส กลับพบว่าคลอริลาจินที่สกัดได้มีปริมาณลดลง เนื่องจากความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตจะมีค่าลดลง

เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ทำให้อัตราในการสกัดมีค่าลดลง อีกทั้งที่อุณหภูมิสูงเกินจุดเดือดของเมทานอลอาจเกิดการระเหยของตัวทำละลายร่วมบางส่วน ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดคลอริลาจินลดลง สำหรับผลของความดันที่ใช้ในการสกัดพบว่าเมื่อความดันเพิ่มขึ้นปริมาณของคลอริลาจินที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นทุกช่วงของอุณหภูมิ (สอดคล้องกับหัวข้อที่ 4.2.2.1) เนื่องจากเมื่อความดันเพิ่มขึ้นของไหลเหนือวิกฤตจะมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น โมเลกุลของของไหลเหนือวิกฤตจึงมีโอกาสในการชนกับสารสำคัญที่ต้องการสกัดในใบสบู่ดำมากขึ้น ปริมาณของคลอริลาจินที่ได้จากการสกัดจึงเพิ่มขึ้น ในงานวิจัยนี้พบว่าผลได้การสกัดของคลอริลาจินที่สกัดได้จะมีปริมาณสูงสุดเมื่อสกัดที่ความดันสูง และอุณหภูมิในการสกัดไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส



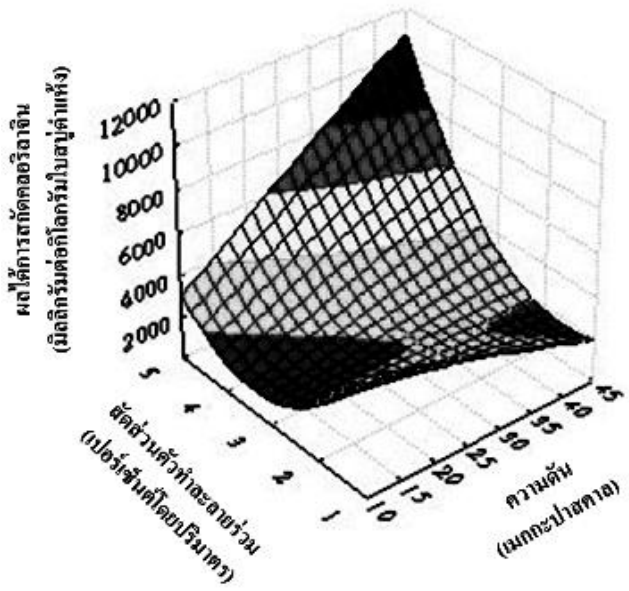
รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความดันกับอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.2.4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันและสัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่อผลได้การสกัดคลอริลาจิน

จากกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันและสัดส่วนตัวทำละลายร่วมดังแสดงในรูปที่ 4.14 สำหรับผลของการเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมพบว่าการสกัดที่ความดันสูงนั้นการเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมให้สูงขึ้น ทำให้คลอริลาจินที่สกัดได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น (สอดคล้องกับหัวข้อที่ 4.2.2.2) แต่อย่างไรก็ตามการสกัดที่ความดันต่ำ พบว่าการเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมในช่วงแรก (1 - 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ทำให้ปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้มีแนวโน้มลดลง อาจเป็นเพราะการใช้ตัวทำละลายร่วม 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำให้ของไหลเหนือวิกฤตมีค่าความเป็นขั้วที่ต่ำและของไหลเหนือวิกฤตมีค่าการละลายเหมาะสมกับส่วนที่ไม่มีขั้วของคลอริลาจินมากกว่าที่

สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำให้ปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วม ในขณะที่การเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมในช่วง 3 – 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าคลอริลาจินที่สกัดได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมช่วยเพิ่มค่าความมีขั้วให้กับของไหลเหนือวิกฤต และช่วยสลายพันธะระหว่างสารสกัดกับโครงข่ายผลึกของแข็งของใบสบู่ดำโดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างตัวทำละลายร่วมเมทานอลกับสารสกัด

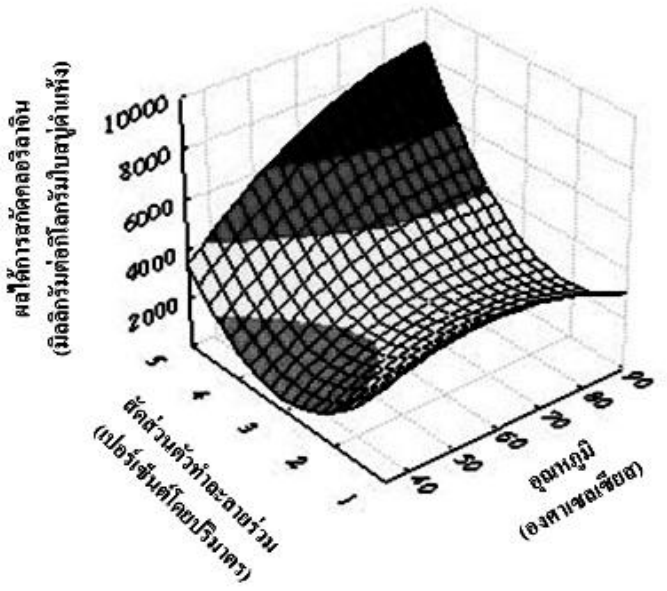
ส่วนผลของความดันที่ใช้ในการสกัดพบว่า เมื่อใช้สัดส่วนตัวทำละลายสูง การเพิ่มความดันทำให้ปริมาณของคลอริลาจินที่สกัดได้เพิ่มขึ้น (สอดคล้องกับหัวข้อที่ 4.2.2.2) แต่การสกัดโดยใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่ำ การเพิ่มความดันกลับทำให้ปริมาณของคลอริลาจินที่สกัดได้มีค่าคงที่แล้วค่อยๆ ลดลง เนื่องจากการใช้สัดส่วนของตัวทำละลายร่วมต่ำนั้นค่าความเป็นขั้วของของไหลเหนือวิกฤตและความสามารถในการละลายของคลอริลาจินมีค่าต่ำ อีกทั้งเมื่อความดันสูงขึ้นความหนาแน่นและความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าสูงทำให้ปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้มีค่าลดลง ดังนั้นการเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมให้สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มค่าการละลายให้กับคลอริลาจิน ส่งผลให้เมื่อความดันเพิ่มสูงขึ้นความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มอัตราการสกัดคลอริลาจินให้สูงขึ้น ทำให้การสกัดคลอริลาจินที่ความดัน 42 เมกกะปาสคาล และใช้สัดส่วนของตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถสกัดคลอริลาจินได้สูงที่สุด



รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความดันกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วม
ที่มีผลต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

4.2.4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและสัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่อผลได้การสกัดคลอริลาจิน

จากรูปที่ 4.15 แสดงกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองของความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วม พบว่าการเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัดในช่วงแรก (1 - 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ให้สูงขึ้นทำให้ปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้มีค่าลดลง แต่ปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมในช่วง 3 – 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยมีผลสอดคล้องกับผลการสกัดคลอริลาจินในหัวข้อ 4.2.4.2 ส่วนผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดพบว่าการสกัดโดยใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่ำ การเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของคลอริลาจินที่สกัดได้น้อยมาก แต่การเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลมากสำหรับการสกัดที่ใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมสูง เนื่องจากเมทานอลมีความสามารถในการสร้างพันธะไฮโรเจนระหว่างไฮโดรเจนของเมทานอลและไฮโดรเจนของคลอริลาจิน ดังนั้นการใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมสูง ทำให้ของไหลเหนือวิกฤตมีค่าความเป็นขั้วสูงและเป็นการเพิ่มการละลายของสารสกัดให้หลุดออกจากโครงข่ายของแข็งภายในของใบสบู่ดำออกไปสู่ของไหลเหนือวิกฤตได้มากกว่าการสกัดโดยใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่ำ นอกจากนั้นการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ทำให้ค่าความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าลดลง และสัมประสิทธิ์การแพร่ของของไหลเหนือวิกฤตและค่าการละลายของคลอริลาจินมีค่าเพิ่มขึ้น (สอดคล้องกับหัวข้อที่ 4.2.2.3) ทำให้การสกัดโดยใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมต่ำ การเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่อการสกัดน้อยกว่าการเพิ่มอุณหภูมิสำหรับการสกัดที่ใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมสูง



รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างผลของอุณหภูมิกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วม
ที่มีผลต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณคลอริลาจินที่สกัดได้ จะพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและความดันให้สูงขึ้นผลได้การสกัดของคลอริลาจินจะเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมทำให้ผลได้การสกัดคลอริลาจินเพิ่มขึ้นเมื่อใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมเพิ่มขึ้นในช่วง 3 - 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยสามารถสกัดคลอริลาจินได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 12,156.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ

จากการศึกษาการสกัดสารประกอบฟีโนลิคทั้งสามชนิด (กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน) พบว่าการสกัดสารประกอบฟีโนลิคทั้งสามชนิดมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ การเพิ่มความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วม ทำให้ผลได้การสกัดสารประกอบฟีโนลิคมีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมจนถึงจุดๆหนึ่งกลับพบว่าผลได้การสกัดสารประกอบฟีโนลิคทั้งสามชนิดมีแนวโน้มแตกต่างกันออกไปคือ การเพิ่มความดัน และอุณหภูมิสำหรับการสกัดกรดแอลลาจิกและคลอริลาจินมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ การเพิ่มความดันให้สูงขึ้นสามารถสกัดกรดแอลลาจิกและคลอริลาจินได้มากขึ้น ซึ่งพบว่าต่างจากการสกัดกรดแกลลิกคือเมื่อเพิ่มความดันเกิน 35 เมกกะปาสคาล ปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้มีค่าลดลง ส่วนผลของอุณหภูมิพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิเกิน 70 องศาเซลเซียส ผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกและคลอริลาจินมีแนวโน้มลดลง แต่ผลได้การสกัดกรดแกลลิกมีค่าเพิ่มขึ้น สำหรับผลของสัดส่วนตัวทำละลายร่วมพบว่า การเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมในการสกัดกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิกมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ เมื่อสัดส่วนตัวทำละลายร่วมเพิ่มขึ้นผลได้การสกัดมีค่าเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมในการสกัดคลอริลาจินกลับพบว่ามีแนวโน้มลดลงก่อนแล้วจึงเพิ่มขึ้น

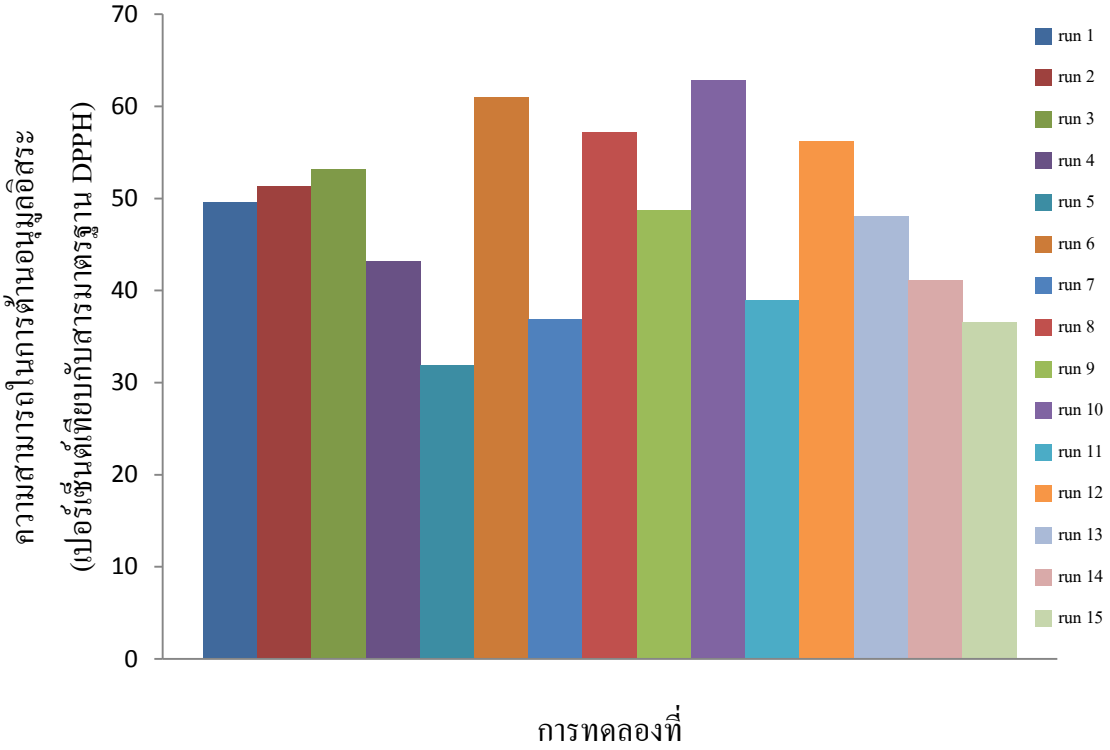
เมื่อเปรียบเทียบการสกัดสารประกอบฟีโนลิค (กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน) จากใบสบู่ดำด้วยวิธีคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตกับวิธีต่างๆ เช่น การสกัดด้วยเครื่องเขย่า (shake) เป็นการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมระหว่างเมทานอลกับน้ำที่อัตราส่วน 30:70 โดยปริมาตรที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การสกัดด้วยวิธีซอกห์เลต (soxhlet) โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิค (ultrasonic) โดยใช้ตัวทำละลายร่วมระหว่างเมทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตรสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) เท่ากับ 7 เป็นเวลา 20 นาที พบว่าการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตในงานวิจัยนี้สามารถสกัดสารประกอบฟีโนลิคทั้งสามชนิดได้ปริมาณสูงกว่าวิธีเขย่า (shaker) และวิธีซอกห์เลต (soxhlet) แต่สกัดได้ปริมาณน้อยกว่าการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิค (ultrasonic) ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีโนลิครวมที่สกัดได้จากวิธีสกัดที่ต่างกัน

วิธีการสกัด	ผลได้การสกัด (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง)		
	กรดแกลลิก	กรดแอลลาจิก	คลอริลาจิน
เขย่า [38]	1,797.13	205.75	1,470.58
ซอกห์เลต [38]	1,985.04	150.76	1,680.99
อัลตราโซนิค [39]	4,770.20	5,528.82	12,573.98
คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต	2,178.2	4,810.61	12,156.35

4.3 การศึกษาผลของปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

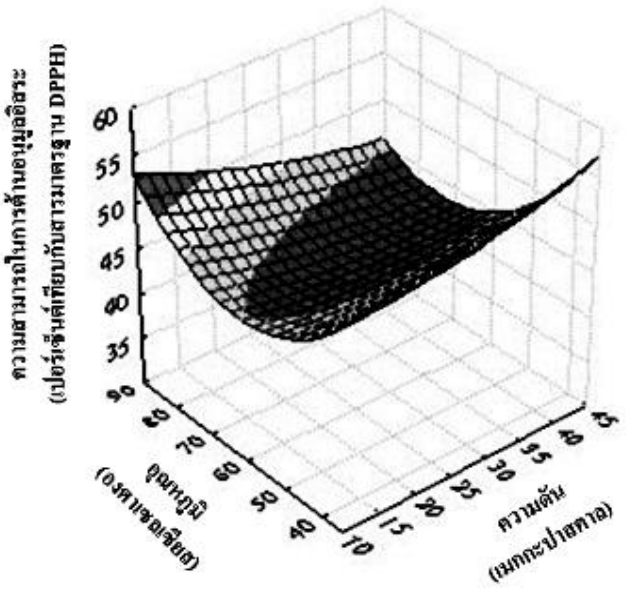
งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการศึกษาถึงผลของความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนของตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำโดยวิเคราะห์ด้วย 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazy (DPPH) ซึ่งเป็นการวัดความสามารถของสารประกอบฟีโนลิคในการรีดิวซ์สาร DPPH โดยนำสารสกัดจากใบสบู่ดำปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ ในเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาณ 3.9 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร [3] จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดใบสบู่ดำที่สกัดที่ความดัน 25 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรการทดลองที่ 10 สารสกัดที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 62.8 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดใบสบู่ดำที่ความดัน 8 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรการทดลองที่ 5 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดเท่ากับ 31.89 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.16 และตารางที่ ค.4)



รูปที่ 4.16 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำ

4.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันและอุณหภูมิที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

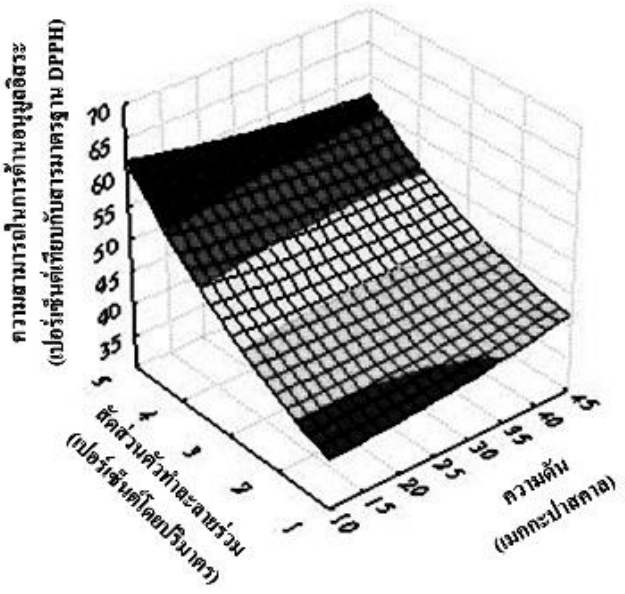
จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ กราฟพื้นผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ของความดัน กับอุณหภูมิ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแสดงดังรูปที่ 4.17 พบว่าความดันที่ใช้ในการสกัดมีผลน้อยมากต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ ส่วนผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิจาก 35 เป็น 60 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง แต่ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงกว่า 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิทำให้อัตราการแพร่ของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าสูงขึ้น จึงสามารถสกัดสารประกอบฟีโนลิคได้ดีขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีค่าสูงขึ้น สำหรับสารสกัดจากใบสบู่ดำที่ได้จากการสกัดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่เสื่อมสลายได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นการสกัดสารที่ความดันสูงและอุณหภูมิต่ำทำให้สารสกัดที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด



รูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันและอุณหภูมิที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

4.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันและสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

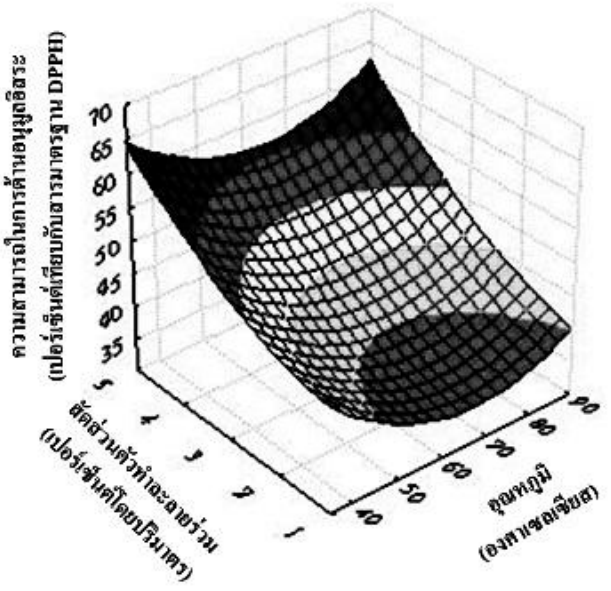
จากกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงดังรูปที่ 4.18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำ จากผลการทดลองพบว่าการสกัดโดยใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมสูง จะให้ผลได้การสกัดของสารประกอบฟีโนลิกที่สูง ทำให้สารสกัดที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากการเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมให้สูงขึ้นจะทำให้ของไหลเหนือวิกฤตมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น จึงสกัดสารประกอบฟีโนลิคได้มากขึ้น ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเพิ่มสูงขึ้น สำหรับผลของความดันที่ใช้ในการสกัด พบว่าความดันมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำน้อยกว่าผลของสัดส่วนตัวทำละลายร่วม จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.3.1 จะเห็นได้ว่าความดันที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าผลของอุณหภูมิและสัดส่วนของตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัด ดังนั้นการสกัดที่ความดันต่ำและใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมสูงนั้น สารสกัดใบสบู่ดำที่ได้จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด



รูปที่ 4.18 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันและสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

4.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

รูปที่ 4.19 แสดงกราฟพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ จากผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มสัดส่วนของตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัดให้สูงขึ้น จะทำให้สารสกัดจากใบสบู่ดำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจากปริมาณของสารประกอบฟีโนลิกที่สูงขึ้นทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงขึ้นด้วย สำหรับการเพิ่มอุณหภูมิจาก 35 องศาเซลเซียส เป็น 60 องศาเซลเซียส ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีค่าลดลงแต่การเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดให้สูงกว่า 60 องศาเซลเซียส จะทำให้สารสกัดที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น อาจเป็นเพราะการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดให้สูงขึ้นสามารถสกัดสารประกอบฟีโนลิคได้ปริมาณมากขึ้น ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสูงขึ้นตามไปด้วย แต่การสกัดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สลายตัวได้ง่ายเมื่ออุณหภูมิสูง ดังนั้นการสกัดที่อุณหภูมิต่ำและใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมสูง จะทำให้สารสกัดใบสบู่ดำที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด



รูปที่ 4.19 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

จากผลการศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ พบว่าการเพิ่มสัดส่วนของตัวทำละลายร่วมจะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกที่สกัดได้จากใบสบู่ดำมีค่าเพิ่มขึ้น และทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีค่าสูงขึ้นด้วย เนื่องจากสารประกอบฟีโนลิกนี้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตามการสกัดที่อุณหภูมิต่ำสารสกัดที่ได้ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นเดียวกัน สำหรับผลของความดันที่ใช้ในการสกัดพบว่าความดันมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยมาก

4.4 สหสัมพันธ์สำหรับทำนายผลได้การสกัดสารประกอบฟีโนลิคและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำ

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีโนลิค ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินจากใบสบู่ดำภายใต้สภาวะการสกัดที่แตกต่างกันคือ ความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนของตัวทำละลายร่วม เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ผลในรูปพื้นผิวตอบสนองจะได้ความสัมพันธ์ของปัจจัยและผลได้การสกัด ซึ่งแสดงในรูปของสมการโพลิโนเมียวอันดับสอง (second-order polynomial equation) ดังสมการที่ 4.1

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{3} b_i X_i + \sum_{i=1}^{3} b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} b_{ij} X_i X_j \quad (4.1)$$

โดยที่ Y คือ ผลได้การสกัดหรือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

b_0 คือ สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของจุดตัด (intercept)

b_i คือ สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear)

b_{ii} คือ สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์กำลังสอง (quadratic)

b_{ij} คือ สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของตัวแปร (interaction terms)

X_i และ X_j คือ ตัวแปรของความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วม

จากผลการทดลองสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำดังตารางที่ ค.1 – ค.3 สามารถหาความสัมพันธ์ในรูปแบบของสมการที่ 4.1 ได้ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป โดยใช้วิธี F-test และ *t*-test ในการหาค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ค่าเอฟ (F-value) ค่าที (*t*-value) และค่าพี (*p*-value) เพื่อบอกนัยสำคัญทางสถิติและนัยสำคัญของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ในสมการที่ 4.1

4.4.1 สหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายปริมาณสารประกอบฟีโนลิคที่สกัดได้จากใบสบู่ดำ

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนของตัวทำละลายร่วม ที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีโนลิคที่สกัดได้จากใบสบู่ดำดังตารางที่ ค.1 – ค.3 จะได้สมการสหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายผลได้การสกัดสารประกอบฟีโนลิค ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน ดังแสดงในสมการที่ (4.2) (4.3) และ (4.4) ตามลำดับ

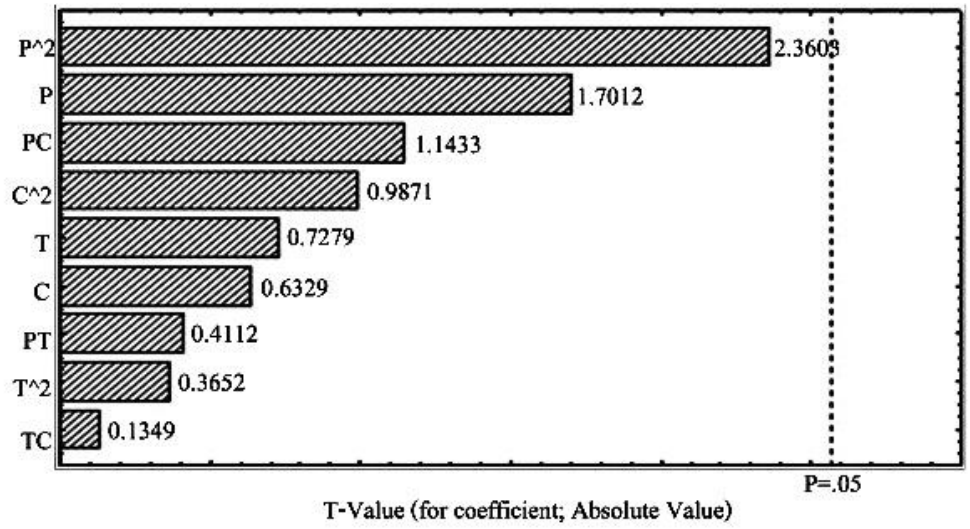
$$Y_{GA} = -333.11 + 61.28P - 1.23P^2 + 23.06T - 0.09T^2 - 195.39C + 37.20C^2 - 0.14PT + 4.87PC + 0.39TC \quad (4.2)$$

$$Y_{EA} = -1890.50 + 16.78P - 0.82P^2 + 112.15T - 0.75T^2 + 150.44C + 11.32C^2 + 0.01PT + 14.29PC - 4.06TC \quad (4.3)$$

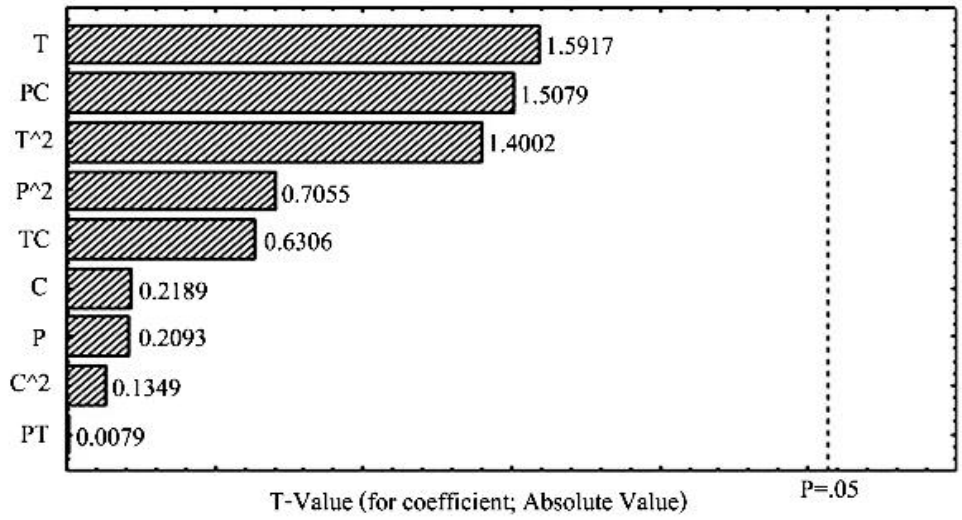
$$Y_{CG} = 8761.35 - 157.12P - 0.22P^2 + 146.14T - 1.41T^2 - 7756.06C + 781.99C^2 - 0.33PT + 82.21PC + 26.42TC \quad (4.4)$$

โดยที่ Y_{GA} คือ ผลได้การสกัดกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ)
Y_{EA} คือ ผลได้การสกัดกรดแอลลาจิก (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ)
Y_{CG} คือ ผลได้การสกัดคลอริลาจิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ)
P คือ ความดัน (เมกกะปาสคาล)
T คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
C คือ สัดส่วนตัวทำละลายร่วม (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)

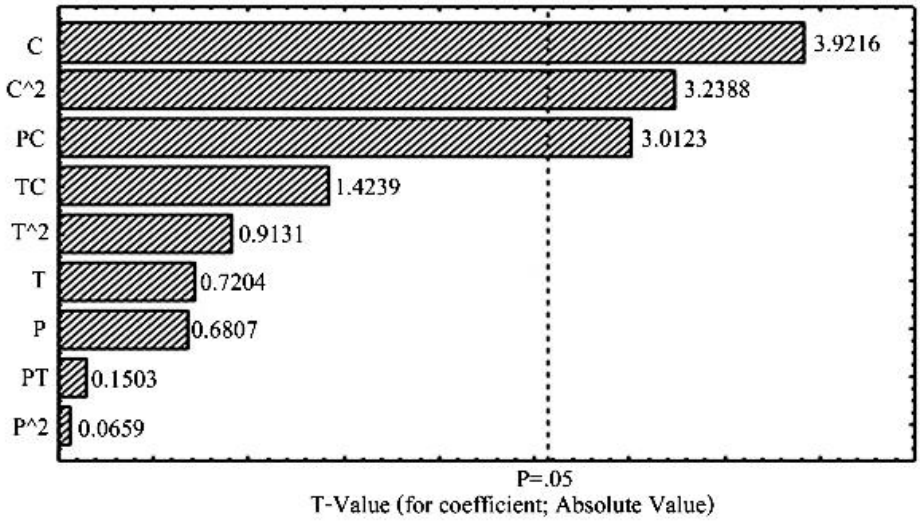
โดยที่นัยสำคัญของแต่ละสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ในสมการโพลิโนเมียวอันดับสองจะพิจารณาจากค่า t และค่า p แสดงดังตารางที่ ค.5 – ค.7 โดยตัวแปรที่มีความสอดคล้องกันจะมีค่าสัมบูรณ์ (absolute) ของ t มาก แต่มีค่า p น้อย และจากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีโนลิคที่สกัดได้กับปัจจัยต่างๆ จากตารางที่ ค.5 – ค.7 พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทุกตัวแปรไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการสกัดกรดแกลลิก แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าตัวแปรที่มีอิทธิพลมากที่สุด คือ เทอมของความสัมพันธ์กำลังสองของค่าความดัน (P^2, p = 0.065) ส่วนความสัมพันธ์ของผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกกับปัจจัยต่างๆ พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทุกตัวแปรไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน และพบว่าตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการสกัดกรดแอลลาจิกมากที่สุด คือ เทอมของความสัมพันธ์เชิงเส้นของอุณหภูมิ (T, p = 0.172) และสำหรับผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลได้การสกัดคลอริลาจินกับปัจจัยต่างๆ พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตัวแปรที่มีนัยสำคัญและมีผลต่อการสกัดคลอริลาจินมากที่สุดคือ เทอมของความสัมพันธ์เชิงเส้นของสัดส่วนตัวทำละลายร่วม (C, p = 0.011) รองลงมาคือเทอมของความสัมพันธ์กำลังสองของสัดส่วนตัวทำละลายร่วม (C^2, p = 0.023) และ เทอมของความสัมพันธ์ของความดันกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วม (P*C, p = 0.029) ตามลำดับแสดงดังรูปที่ 4.20 – 4.22



รูปที่ 4.20 *t*-value ของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์สำหรับสหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายผลได้การสกัดกรดแกลลิก

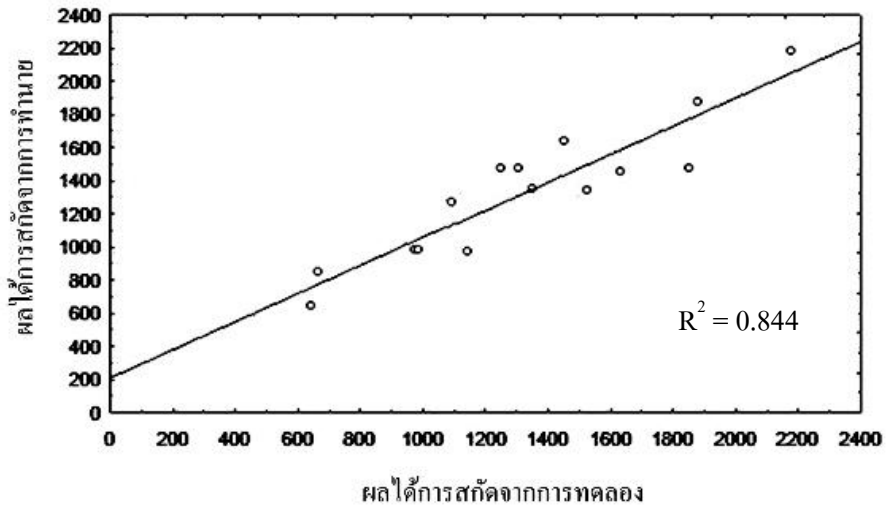


รูปที่ 4.21 *t*-value ของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์สำหรับสหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายผลได้การสกัดกรดแอลลาจิก

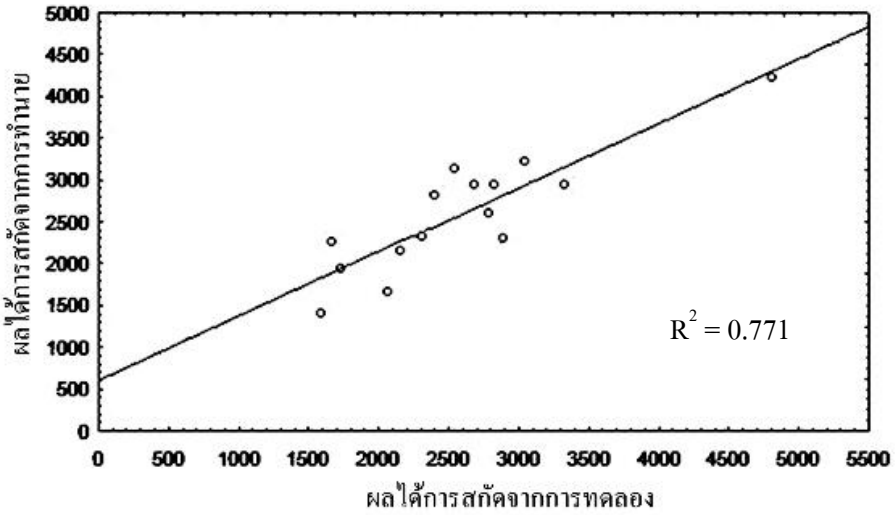


รูปที่ 4.22 *t*-value ของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์สำหรับสหสัมพันธ์
ที่ใช้ทำนายผลได้การสกัดคลอริลาจิน

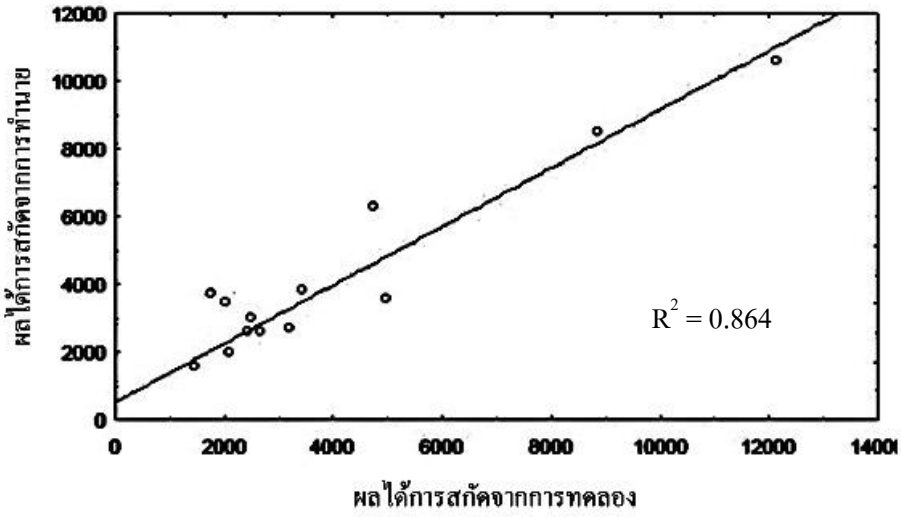
เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลได้การสกัดของสารประกอบฟีโนลิคที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการที่ 4.2 – 4.4 กับปริมาณสารประกอบฟีโนลิคที่สกัดได้จากการทดลอง ตารางที่ ค.1 – ค.3 พบว่าความแตกต่างของผลได้การสกัดของกรดแกลลิกระหว่างค่าที่คำนวณได้กับผลการทดลองมีค่าต่างกันน้อยที่สุด รองลงมาคือ กรดแอลลาจิกและคลอริลาจินตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของผลได้การสกัดสารประกอบฟีโนลิค ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน (ตารางที่ ค.9 – ค.11) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.844 0.771 และ 0.864 ตามลำดับ แสดงในรูปที่ 4.23 - 4.25



รูปที่ 4.23 เปรียบเทียบผลได้การสกัดของกรดแกลลิกที่ได้จากการคำนวณกับผลการทดลอง



รูปที่ 4.24 เปรียบเทียบผลได้การสกัดของกรดแอลลาจิกที่ได้จากการคำนวณกับผลการทดลอง



รูปที่ 4.25 เปรียบเทียบผลได้การสกัดของคลอริลาจินที่ได้จากการคำนวณกับผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองข้างต้น จะเห็นได้ว่าตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อผลได้การสกัดสารประกอบฟีโนลิคแต่ละชนิดแตกต่างกันกล่าวคือ เทอมของความสัมพันธ์กำลังสองของค่าความดันที่ใช้ในการสกัดมีอิทธิพลต่อปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดได้มากที่สุด ส่วนอุณหภูมิส่งผลต่อปริมาณกรดแอลลาจิกที่สกัดได้มากที่สุด และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณของคลอริลาจินที่สกัดได้มากที่สุด

4.4.2 สหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำ

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนของตัวทำละลายร่วม ที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำดังตารางที่ ค.8 จะได้สหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำ ดังสมการที่ 4.5

$$Y_A = 68.86 + 0.36P + 0.01P^2 - 1.19T + 0.01T^2 + 0.34C + 0.89C^2 - 0.01PT - 0.07PC + 0.02TC \quad (4.5)$$

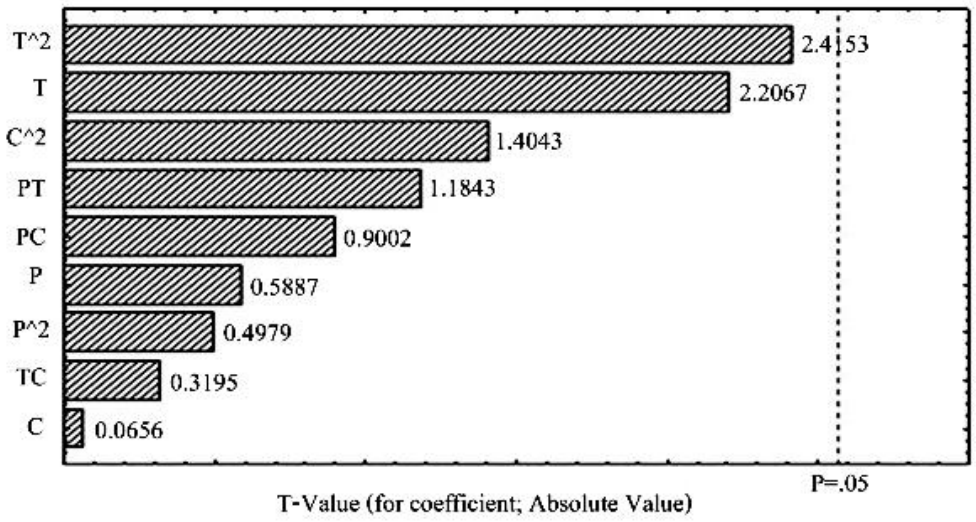
โดยที่ Y_A คือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ (เปอร์เซ็นต์เทียบกับสารมาตรฐาน DPPH)

P คือ ความดัน (เมกกะปาสคาล)

T คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

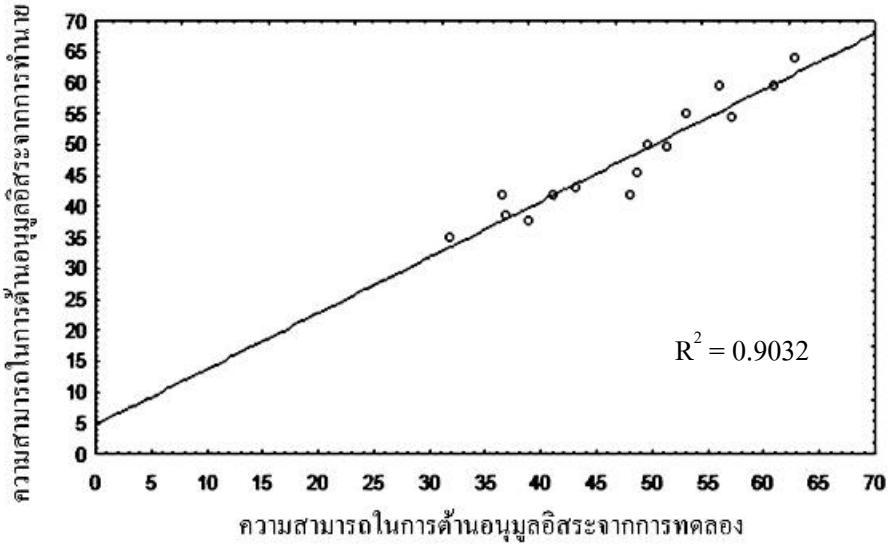
C คือ สัดส่วนตัวทำละลายร่วม (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)

โดยที่นัยสำคัญของแต่ละสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ในสมการโพลิโนเมียวอันดับสองจะพิจารณาจากค่า t และค่า p แสดงดังตารางที่ ค.8 โดยตัวแปรที่มีความสอดคล้องกันจะมีค่าสัมบูรณ์ (absolute) ของ t มาก และมีค่า p น้อย และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำกับปัจจัยต่างๆ จากตารางที่ ค.8 และรูปที่ 4.26 พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทุกตัวแปรที่ศึกษาไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าตัวแปรมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ เทอมของความสัมพันธ์กำลังสองของอุณหภูมิ (T^2, p = 0.061)



รูปที่ 4.26 *t*-value ของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์สำหรับสหสัมพันธ์ที่ใช้ทำนายความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำ

จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองพบว่าเทอมของความสัมพันธ์กำลังสองของอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำสูงที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำที่ได้จากการทดลอง และผลจากการคำนวณด้วยสมการที่ 4.5 พบว่ามีค่าต่างกันเล็กน้อย และจากผลการวิเคราะห์ความแปรปวน (ANOVA) ตารางที่ ค.12 พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (รูปที่ 4.27) มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9032



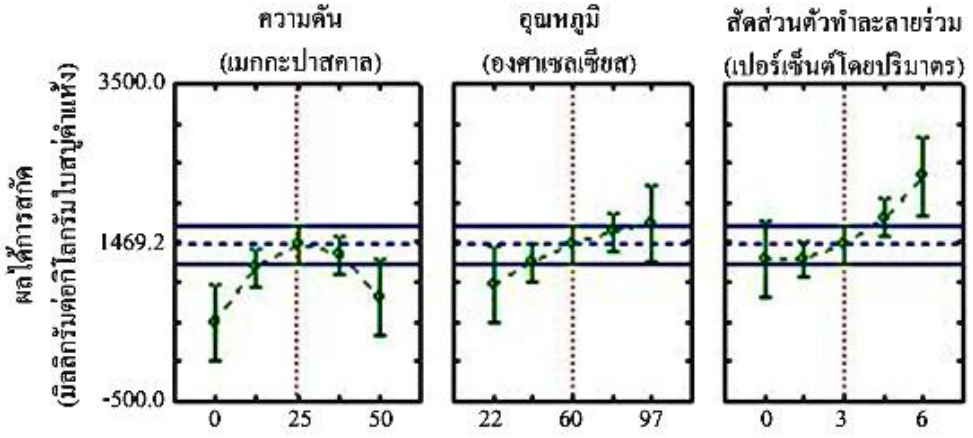
รูปที่ 4.27 เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำที่ได้จากการคำนวณกับผลการทดลอง

4.4.3 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำ

งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการศึกษาโครงสร้างพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วม เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำ ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน กล่าวคือหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อให้ได้ผลได้การสกัดสูงสุดและสารสกัดจากใบสบู่ดำที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

4.4.3.1 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดแกลลิกจากใบสบู่ดำ

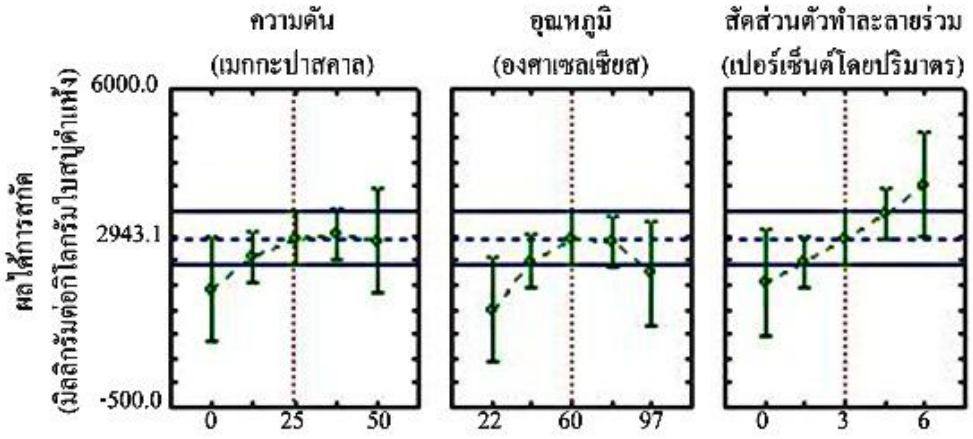
จากผลการทดลองการสกัดกรดแกลลิกจากใบสบู่ดำพบว่าสภาวะที่สามารถสกัดกรดแกลลิกได้สูงสุด คือการสกัดด้วยความดัน 25 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถสกัดกรดแกลลิกได้ 2,178.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ และจากผลการศึกษาโครงสร้างพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อผลได้การสกัดของกรดแกลลิก ดังรูปที่ 4.28 พบว่าสภาวะที่สามารถสกัดกรดแกลลิกได้ปริมาณสูงสุดในงานวิจัยนี้ คือการสกัดที่ความดัน 25 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 6 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะสามารถสกัดกรดแกลลิกได้สูงสุดเท่ากับ 2,622.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ



รูปที่ 4.28 ผลการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดแกลลิกจากใบสบู่ดำ

4.4.3.2 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดแอลลาจิกจากใบสบู่ดำ

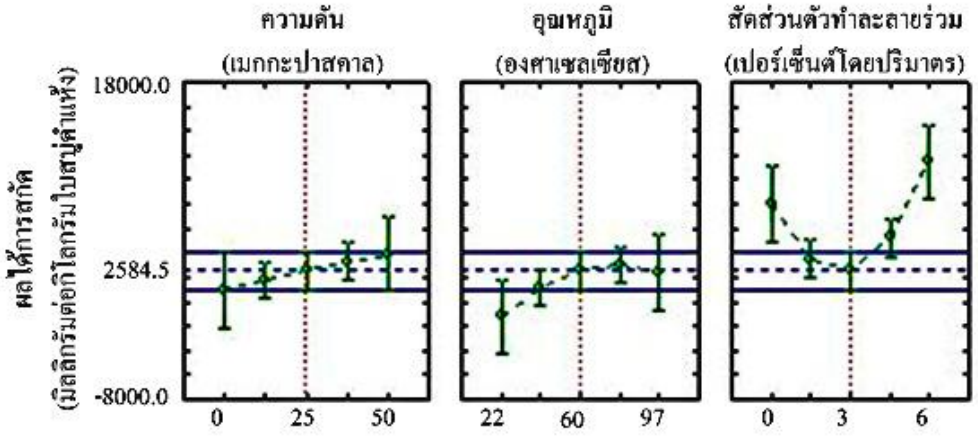
จากรูปที่ 4.29 แสดงผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมของโครงสร้างพื้นผิวตอบสนองที่ใช้ทำนายสภาวะในการสกัดกรดแอลลาจิก ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่าสามารถสกัดกรดแอลลาจิกได้ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 4,700.94 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ เมื่อทำการสกัดที่ความดัน 37.5 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 6 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แต่จากการทดลองพบว่าการสกัดที่ความดัน 42 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถสกัดกรดแอลลาจิกได้สูงสุดเท่ากับ 4,810.61 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ



รูปที่ 4.29 ผลการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดแอลลาจิกจากใบสบู่ดำ

4.4.3.3 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคลอริลาจินจากใบสบู่ดำ

จากผลการทดลองการสกัดคลอริลาจินจากใบสบู่ดำพบว่าสามารถสกัดคลอริลาจินได้สูงสุดเท่ากับ 12,156.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ เมื่อสกัดด้วยความดัน 42 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และจากการศึกษาโครงสร้างพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อผลได้การสกัดของคลอริลาจิน ดังรูปที่ 4.30 พบว่าการสกัดคลอริลาจินที่ความดัน 42 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 78.5 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 6 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นสภาวะที่สามารถสกัดคลอริลาจินได้ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 18,245.46 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ

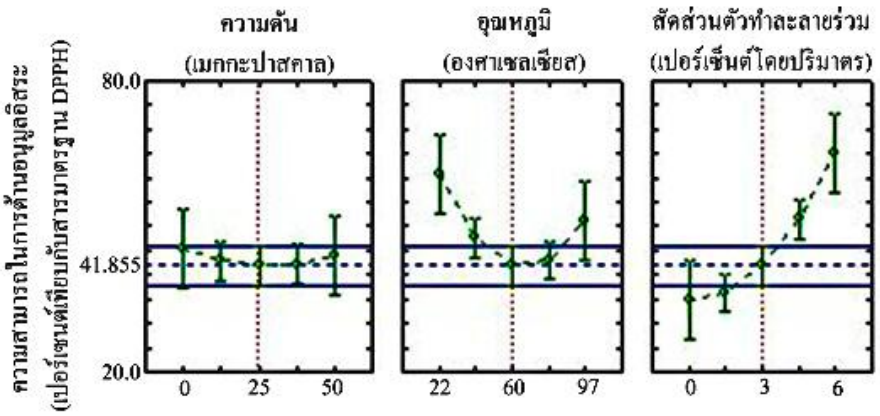


รูปที่ 4.30 ผลการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคลอริลาจินจากใบสบู่ดำ

4.4.3.4 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากใบสบู่ดำที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ จากการทดลองพบว่าสารสกัดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 62.8 เปอร์เซ็นต์เทียบกับสารมาตรฐาน DPPH เมื่อสกัดที่ความดัน 25 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และจากรูปที่ 4.31 แสดงผลการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมของโครงสร้างพื้นผิวตอบสนองเพื่อใช้ทำนายสภาวะในการสกัดสารสกัดจากใบสบู่ดำที่มีความ สามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่าสภาวะการสกัดที่ทำให้ได้สารสกัดจากใบสบู่ดำที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ การสกัดที่ความดัน 8 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม

6 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่สภาวะนี้สารสกัดจากใบสบู่ดำจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 82.88 เปอร์เซ็นต์เทียบกับสารมาตรฐาน DPPH



รูปที่ 4.31 ผลการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากใบสบู่ดำที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดที่ได้จากการทำนายกับผลจากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารประกอบฟีโนลิคให้ได้ปริมาณสูงที่สุดคือ การสกัดที่ความดันปานกลาง (25 เมกกะปาสคาล) เนื่องจากเมื่อความดันมีค่าเพิ่มขึ้น ของไหลเหนือวิกฤตจะมีความหนาแน่นสูงขึ้น ทำให้โมเลกุลของของไหลเหนือวิกฤตมีโอกาสในการชนกับโมเลกุลของสารประกอบฟีโนลิคในใบสบู่ดำมากขึ้น ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีโนลิคที่สกัดได้มีค่ามากขึ้น แต่เมื่อความดันมีค่าสูงมากๆ กลับพบว่าปริมาณสารประกอบฟีโนลิคที่สกัดได้มีแนวโน้มลดลง อาจเป็นเพราะเมื่อความดันเพิ่มขึ้นมาก ทำให้ความหนาแน่นและความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตเพิ่มขึ้น ส่งผลให้สัมประสิทธิ์การแพร่ของไหลเหนือวิกฤตมีค่าลดลง จึงทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดลดลง ส่วนผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดพบว่าการสกัดที่อุณหภูมิสูงจะสามารถสกัดสารประกอบฟีโนลิคได้ปริมาณสูง เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นค่าความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตลดลง สัมประสิทธิ์การแพร่และค่าการละลายของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าสูงขึ้น ทำให้สามารถสกัดสารได้ปริมาณสูง สำหรับผลของสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัดพบว่าการใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมสูงจะสามารถสกัดสารประกอบฟีโนลิคได้ปริมาณสูง เพราะเมื่อเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัดจะช่วยเพิ่มค่าความมีขั้วให้กับของไหลเหนือวิกฤต เพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบฟีโนลิคที่ต้องการสกัด และช่วยทำลายพันธะระหว่างสารประกอบฟีโนลิคที่ต้องการสกัดกับโครงข่ายของแข็งของใบสบู่ดำให้สารประกอบฟีโนลิคหลุดออกจากโครงข่ายของแข็งของใบสบู่ดำได้ง่ายขึ้น จึงสามารถสกัดสารประกอบฟีโนลิคได้ปริมาณสูง ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ

การสกัดเพื่อให้สารที่สกัดได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ การสกัดที่อุณหภูมิต่ำ ความดันต่ำ และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมสูง

4.5 การวิเคราะห์ความคงตัวของสารประกอบฟีโนลิคในสารสกัดจากใบสบู่ดำ

งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการศึกษาความคงตัวของสารประกอบฟีโนลิคในสารสกัดจากใบสบู่ดำ ได้แก่ ปริมาณของกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน รวมถึงศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่ปราศจากแสงและอากาศ โดยคำนวณหาปริมาณที่ลดลงของสารประกอบฟีโนลิคและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้จากสมการที่ 4.6 และ 4.7 [40]

$$R_x = \frac{C_x}{C_{ref}} \times 100 \tag{4.6}$$

$$C_x = C_{ref} - C_t \tag{4.7}$$

โดยที่ R_x คือ ปริมาณของสารที่ลดลงระหว่างการเก็บรักษา (เปอร์เซ็นต์)

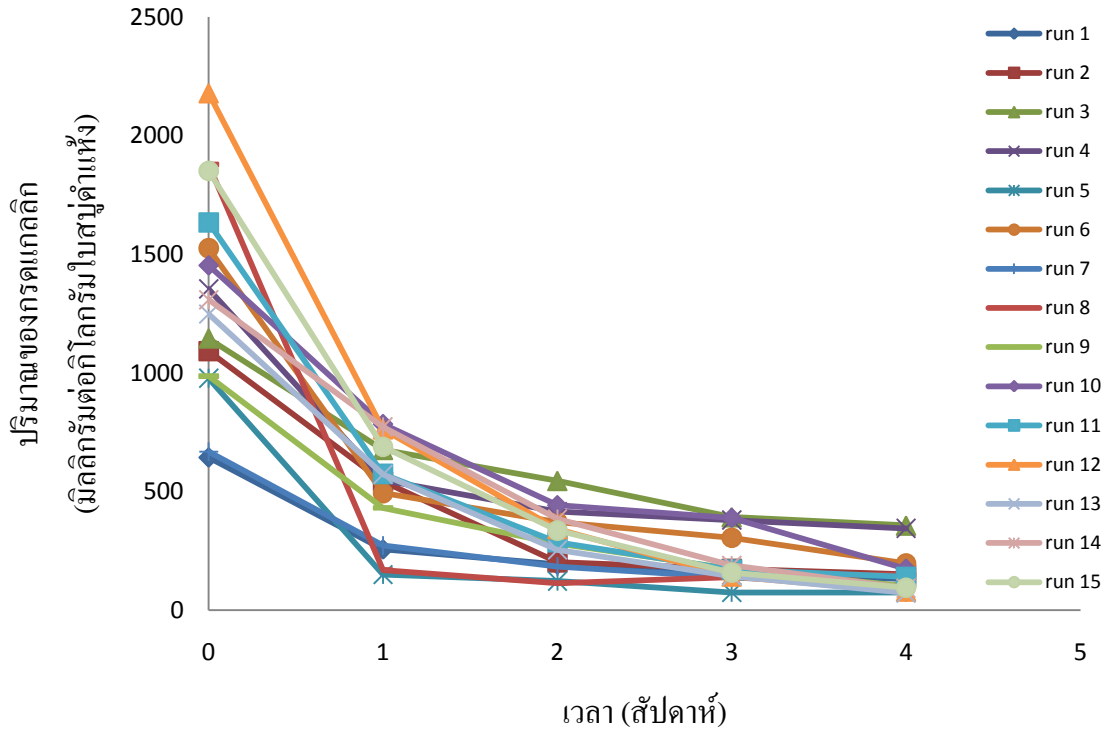
C_x คือ ปริมาณที่ลดลงเมื่อเทียบกับปริมาณเริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง)

C_{ref} คือ ปริมาณสารเริ่มต้น (t=0) (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง)

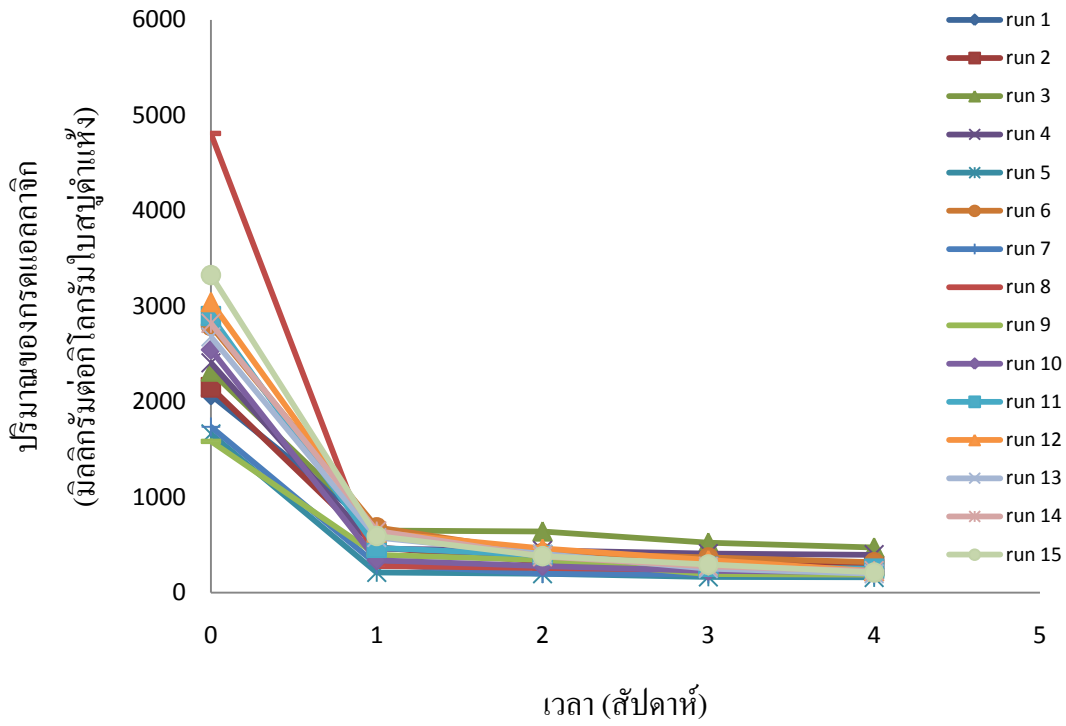
C_t คือ ปริมาณสารที่เวลาต่างๆ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง)

จากการศึกษาความคงตัวของสารประกอบฟีโนลิคในสารสกัดใบสบู่ดำในระหว่างการเก็บรักษา พบว่าสารประกอบฟีโนลิคทั้งสามชนิดได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินมีปริมาณลดลงเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยพบว่าการสกัดที่ความดัน 25 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นสภาวะที่กรดแกลลิกในสารสกัดมีอัตตราการลดลงสูงที่สุดเท่ากับ 96.38 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.32) ในขณะที่การสกัดที่ความดัน 42 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร กรดแอลลาจิกและคลอริลาจินในสารสกัดจะมีปริมาณลดลงสูงที่สุดเท่ากับ 95.68 และ 98.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.33 และ 4.34) การที่สารประกอบฟีโนลิคทั้งสามชนิดในสารสกัดใบสบู่ดำมีปริมาณลดลง อาจเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารสกัดที่เก็บอยู่ในรูปของสารละลายทำให้สารประกอบฟีโนลิคทั้งสามชนิดเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีไปอยู่ในรูปอื่น [41] เช่น คลอริลาจินที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ใกล้เคียงกับสารประกอบแอลลาจิกแทนนิน (ellagitannin)

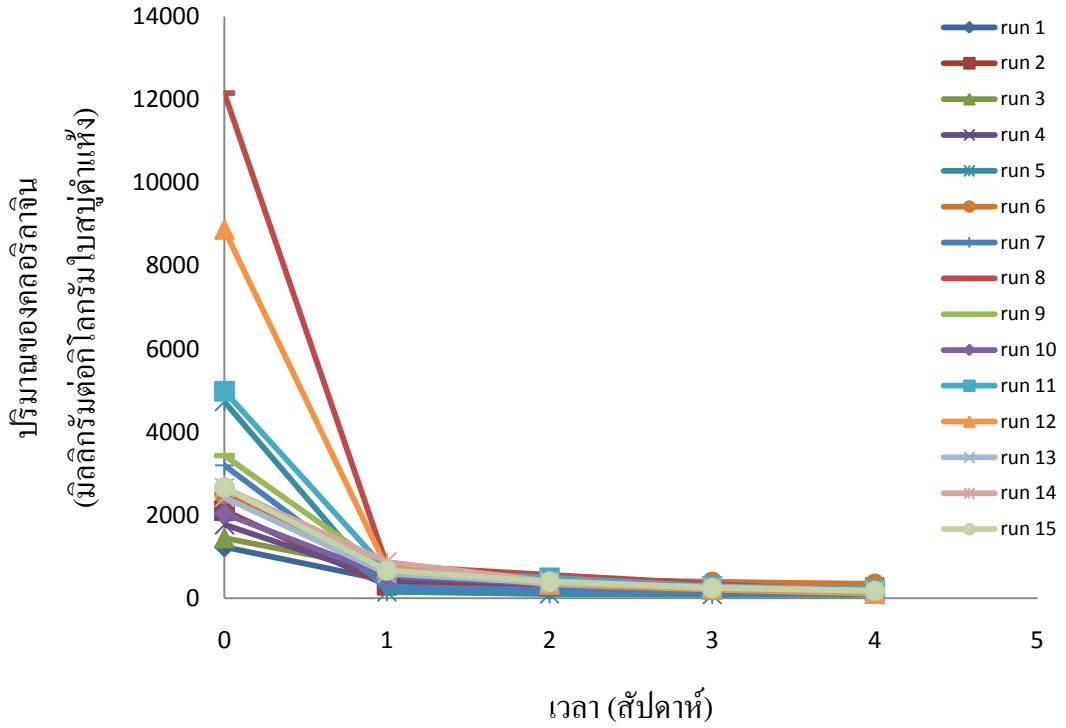
เกิดการแตกตัวเป็นกรดแอลลาจิกและกรดแกลลิก ดังรูปที่ 4.35 - 4.36 [42, 43] หรืออาจเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของแคสทาลาจิน (castalagin) ดังรูปที่ 4.37 [41]



รูปที่ 4.32 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแกลลิกในสารสกัดใบสนุ่ดำระหว่างการเก็บรักษา

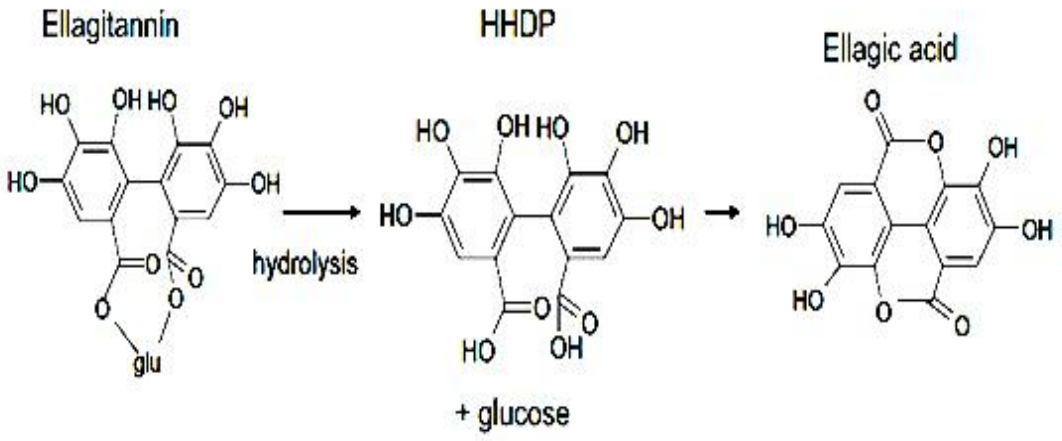


รูปที่ 4.33 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแอลลาจิกในสารสกัดใบสมุ่ดำระหว่างการเก็บรักษา

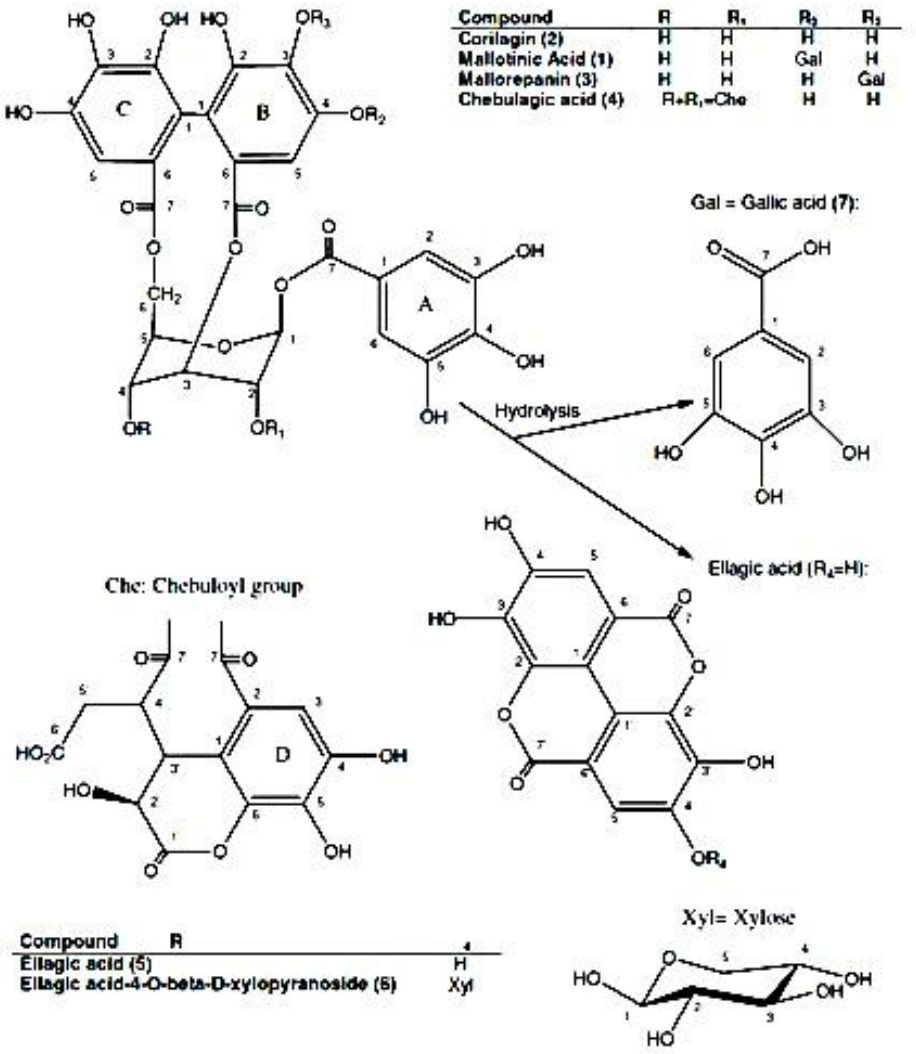


รูปที่ 4.34 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณคลอริลาจินในสารสกัดใบสมุ่ดำระหว่างการเก็บรักษา

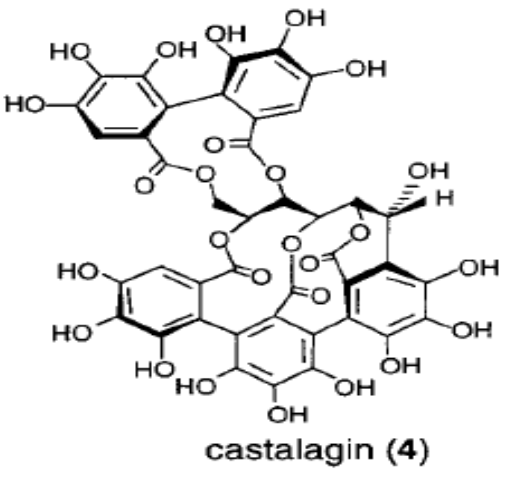
นอกจากนี้ยังพบว่าการสกัดที่ความดัน 42 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นสภาวะการสกัดที่ทำให้สารประกอบฟีโนลิคทั้งสามชนิดมีปริมาณลดลงน้อยที่สุด โดยกรดแกลลิกมีปริมาณลดลงน้อยที่สุดเท่ากับ 68.8 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.32) รองลงมาคือ คลอริลาจินมีปริมาณลดลงเท่ากับ 78.69 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.34) และกรดแอลลาจิกมีปริมาณลดลงเท่ากับ 79.61 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.33)



รูปที่ 4.35 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแอลลาจิกแทนนิน [42]



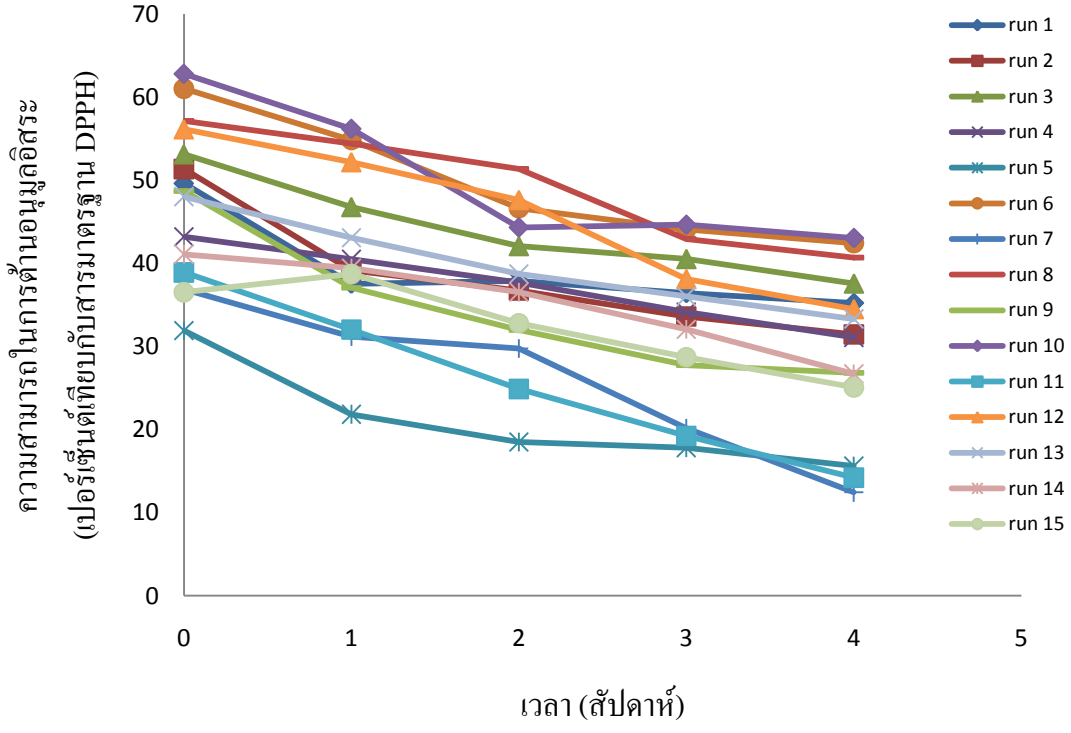
รูปที่ 4.36 การเปลี่ยนโครงสร้างของสารประกอบฟีโนลิคเมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส [43]



รูปที่ 4.37 โครงสร้างของแคสทาลาจิน [41]

จากผลการศึกษาความคงตัวของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ โดยเก็บรักษาสารสกัดจากใบสบู่ดำในขวดสีชาในที่ปราศจากแสงและอากาศที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำมาวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และเปรียบเทียบกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำเริ่มต้น

จากผลการศึกษาพบว่า การสกัดใบสบู่ดำที่ความดัน 42 เมกกะปาสคาล 60 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (รูปที่ 4.38) พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำในระหว่างการเก็บรักษาลดลงสูงที่สุดเท่ากับ 66.3 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือการสกัดที่สภาวะนี้สารสกัดจากใบสบู่ดำมีความคงตัวในการเก็บรักษาน้อยที่สุด ส่วนสภาวะการสกัดที่ได้สารสกัดจากใบสบู่ดำที่มีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษาสูงที่สุดคือการสกัดที่ความดัน 25 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (รูปที่ 4.38) โดยที่สภาวะการสกัดนี้สารสกัดใบสบู่ดำมีการลดลงของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดเท่ากับ 21.92 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.38 การเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำในระหว่างการเก็บรักษา