



ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์และฤทธิ์ทางชีวภาพ
ของสารสกัดสำหรับยารักษา



โดย
รัชกฤษ ปัทมโสภาสกุล

คุณฉันทิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาคุณฉันทิพนธ์บัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์
วิทยาลัยเภสัชศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีการศึกษา 2566



**EFFECT OF EXTRACTION METHODS ON SULFATED POLYSACCHARIDES
CONTENT AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF
GRACILARIA FISHERI EXTRACTS**

BY

RATCHAKRICH PATTHAMASOPASAKUL



**A DISSERTATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN PHARMACY
COLLEGE OF PHARMACY**

**GRADUATE SCHOOL, RANGSIT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2023**

คุณฉันทิพนธ์เรือง

ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์และฤทธิ์ทางชีวภาพ
ของสารสกัดสาหร่ายผสมนาง

โดย

รัชกฤษ ปัทมโสภาสกุล

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาปรัชญาคุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีการศึกษา 2566

ผศ.ดร.ภญ.รมย์ฉัตร ชูโตประพัฒน์
ประธานกรรมการสอบ

ผศ.ดร.ภญ.ปิยนุช ทองผาสุก
กรรมการ

ผศ.ดร.ภญ.อรรวรรณ เทียรณ์พงษ์
กรรมการ

ผศ.ดร.ภก.เชาวลิต มณฑล
กรรมการ

ดร.ภญ.อภิรดา สุคนธ์พันธุ์
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ศ.ดร.สื้อจิตต์ เพ็ชรประสาน)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

13 มิถุนายน 2567

Dissertation entitled

**EFFECT OF EXTRACTION METHODS ON SULFATED POLYSACCHARIDES
CONTENT AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF
GRACILARIA FISHERI EXTRACTS**

by

RATCHAKRICH PATTHAMASOPASAKUL

was submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Doctor of Philosophy in Pharmacy

Rangsit University
Academic Year 2023

Asst. Prof. Romchat Chutoprapat, Ph.D.
Examination Committee Chairperson

Asst. Prof. Piyanut Tongpasuk, Ph.D.
Member

Asst. Prof. Orawan Theanphong, Ph.D.
Member

Asst. Prof. Chaowalit Monton, Ph.D.
Member

Apirada Sucontphunt, Ph.D.
Member and Advisor

Approved by Graduate School

(Prof. Suejit Pechprasarn, Ph.D.)

Dean of Graduate School

June 13, 2024

กิตติกรรมประกาศ

คุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อ.ดร.ภญ.อภิรดา สุคนธ์พันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาคุษฎีนิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาในด้านวิชาการ ตรวจสอบความสมบูรณ์ของเล่ม คุษฎีนิพนธ์ การเขียนบทความวิจัย ตลอดจนรวมถึงการดูแลใส่ใจตลอดเวลาขณะที่ทำการทดลอง เป็นผลให้การทำวิจัยนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอขอบพระคุณท่านไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ภญ.รมย์ฉัตร ชูโตประพัฒน์ ประธานกรรมการสอบคุษฎีนิพนธ์ ผศ.ดร.ภญ.อรวรรณ เทียรพงษ์ ผศ.ดร.ภญ.ปิยนุช ทองผาสุก และ ผศ.ดร.ภก.เชาวลิต มณฑล กรรมการสอบคุษฎีนิพนธ์ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะ ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย รวมถึงข้อคิดเห็น ในเชิงวิชาการ ที่ทำให้การทำวิจัยมีความคล่องตัว ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด และความสมบูรณ์ ของคุษฎีนิพนธ์ ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.บุญยศรีศรี สุขเขียว หัวหน้าภาควิชาเคมี รวมถึงบุคลากรภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่เป็นกำลังใจ ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก เรื่องสถานที่สำหรับการทดลอง อีกทั้งยังร่วมกันเป็นแรงผลักดัน กระทั่งผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้ และ รศ.ดร.กานดา ว่องไวลิขิต ผู้มีความเมตตา และให้ความช่วยเหลือในการเขียนบทความจนประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี

ท้ายสุดนี้ ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา คณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา ความรู้ ให้ผู้วิจัยได้ศึกษาดำรง เอกสารอ้างอิง รวมถึงทุก ๆ ท่านที่มีความเกี่ยวข้องกับ การทำวิจัยใน ครั้งนี้ ด้วยความเคารพอย่างสูง ไว้ ณ โอกาสนี้

รัชกฤษ ปัทมโสภาสกุล

ผู้วิจัย

6105288 : รัชกฤษ ปัทมโสภาสกุล
 ชื่อคุณิพนธ์ : ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสาหร่ายพมนาง
 หลักสูตร : ปรัชญาคุณิพนธ์ิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์
 อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.ณญ.อภิรดา สุนทรพันธุ์

บทคัดย่อ

สาหร่ายพมนางเป็นสาหร่ายสีแดงที่มีสารสำคัญ คือ ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อแบคทีเรีย งานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสาหร่ายพมนาง โดยเริ่มจากการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสโดยใช้น้ำ และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 80 ผลการศึกษาพบว่า การสกัดด้วยน้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ร้อยละผลผลิต ปริมาณซัลเฟต พุทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเพื่อพัฒนาการสกัดสาหร่ายพมนางต่อด้วยวิธีการใช้ไมโครเวฟ และคลื่นเสียงความถี่สูง โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดด้วยไมโครเวฟ ที่ส่งผลให้ร้อยละผลผลิตและปริมาณซัลเฟตสูงที่สุด คือ เวลา 30 วินาที อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสาหร่ายพมนาง 9.5:1 มิลลิลิตรต่อกรัม และกำลังไมโครเวฟ 450 วัตต์ ส่วนสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง คือ เวลา 32 นาที อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสาหร่ายพมนาง 15:1 มิลลิลิตรต่อกรัม และกำลังของคลื่นความถี่สูงระดับ 3 เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธีการแพร่ผ่านวุ้นของสารสกัดที่สกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของวิธีการสกัดทั้งสามวิธี พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียสเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสแตฟฟีโลค็อกคัส ออเรียส และสแตฟฟีโลค็อกคัส อีพีเดอร์มิดิส ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่สุด คือ การสกัดด้วยน้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส

(คุณิพนธ์มีจำนวนทั้งสิ้น 78 หน้า)

คำสำคัญ: ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์, สาหร่ายพมนาง, ฤทธิ์ทางชีวภาพ, การหาค่าที่เหมาะสม

6105288 : Ratchakrich Patthamasopasakul
 Dissertation Title : Effect of Extraction Methods on Sulfated Polysaccharides Content
 and Biological Activities of *Gracilaria fisheri* Extracts
 Program : Doctor of Philosophy in Pharmacy
 Dissertation Advisor : Apirada Sucontphunt, Ph.D.

Abstract

Gracilaria fisheri is a red seaweed which composed of sulfated polysaccharides as the active compound. It exhibits antioxidant and antibacterial activities. The study aims to investigate the effects of extraction methods on the quantity of sulfated polysaccharides and the biological activities of the extracted seaweed compounds. Initially, various solvents were compared, including water and ethanol at concentrations of 20% and 80%, for extraction using heating process at 50 °C for 2 hours. The results showed that water extraction yielded the highest yield percentage of sulfated polysaccharides and exhibited the best antioxidant and antibacterial properties. Therefore, water was chosen as the solvent for further development of extraction using microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction, employing the Box-Behnken experimental design. Optimal conditions for microwave-assisted extraction, maximizing both extraction yield and sulfate content, were found to be 30 seconds at a solvent-to-seaweed ratio of 9.5:1 mL/g and a microwave power of 450 watts. For ultrasound-assisted extraction, the optimal conditions were 32 minutes at a solvent-to-seaweed ratio of 15:1 mL/g and an ultrasound power level of 3. Statistical analysis revealed that only water extraction at 50 °C significantly inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Thus, it can be concluded that the most suitable extraction method is water extraction for 2 hours at 50 °C.

(Total 78 pages)

Keywords: Sulfated polysaccharides, *Gracilaria fisheri*, Biological Activity, Optimization

Student's Signature Dissertation Advisor's Signature

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ณ
บทที่ 1	บทนำ
	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 นิยามคำศัพท์ สัญลักษณ์ และอักษรย่อ	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2	ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง
	5
2.1 สาหร่ายผมนาง (<i>Gracilaria fisheli</i>)	5
2.2 เทคนิคการสกัดสาร (Extraction techniques)	10
2.3 การออกแบบการทดลอง (, DOE)	16
2.4 แนวทางการออกแบบการทดลอง	18
2.5 การออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน	19
2.6 การออกแบบพื้นผิวการตอบสนอง (Response Surface Design)	21
บทที่ 3	วิธีการดำเนินงานวิจัย
	23
3.1 ตัวอย่าง	23
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี	23

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	3.3 การสกัดสารหยาบผง	25
	3.4 การวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต โดยวิธี sulfate turbidity assay	31
	3.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu	31
	3.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity)	32
	3.7 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Agar Well Diffusion Method)	34
	3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	35
บทที่ 4	ผลการวิจัย	36
	4.1 ผลการศึกษาวิธีการสกัด	36
	4.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)	38
	4.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)	39
	4.4 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย	41
	4.5 การศึกษาการสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ (Microwave-Assisted-Extraction, MAE) ด้วยวิธี OFAT	42
	4.6 ผลของสภาวะของการสกัดด้วยไมโครเวฟ (MAE) ต่อปริมาณร้อยละผลผลิตในการสกัดตามการออกแบบบ็อกซ์-เบห์เคน	45
	4.7 ผลของสภาวะของการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (UAE) ต่อผลผลิตในการสกัดตามการออกแบบบ็อกซ์-เบห์เคน	54
บทที่ 5	บทสรุปและข้อเสนอแนะ	66
	5.1 สรุปผลการวิจัย	66
	5.2 ข้อเสนอแนะ	67

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บรรณานุกรม	68
ประวัติผู้วิจัย	78



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพม nang ที่ได้จาก การสกัด โดยวิธีการต่าง ๆ	9
2.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายพม nang	10
2.3 ตัวอย่าง Box-Behnken Design ที่มี 3 ปัจจัย	20
3.1 ปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบบ็อก-เบห์นเคน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพร้อยละ ผลผลิตของสาหร่ายพม nang ด้วยวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ	28
3.2 ปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบบ็อก-เบห์นเคน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพร้อยละ ผลผลิตของสาหร่ายพม nang ด้วยวิธีการสกัดด้วยอัลตราโซนิก	29
4.1 ร้อยละผลผลิตและปริมาณซัลเฟตของสารสกัดภายใต้สภาวะการสกัดที่ แตกต่างกัน	37
4.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบ	38
4.3 ผลของการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบทั้ง 6 สภาวะ ด้วยวิธี agar well diffusion method	41
4.3 ANOVA สำหรับแบบจำลองค่าเชิงกำลังสอง (quadratic) ของปริมาณ ร้อยละผลผลิต	48
4.4 ANOVA สำหรับแบบจำลองค่าเชิงกำลังสอง (quadratic) ของปริมาณ ซัลเฟต	52
4.5 ค่าทำนาย (predicted value) ค่าทดลอง (experimental value) และร้อยละ ความคลาดเคลื่อน (percent error) ในการทำนาย สำหรับผลตอบสนอง ของปริมาณร้อยละผลผลิตและปริมาณซัลเฟต ด้วยวิธี MAE	54
4.6 ANOVA สำหรับแบบจำลองค่าเชิงกำลังสอง (quadratic) ของปริมาณ สารสกัด	57

สารบัญตาราง (ต่อ)

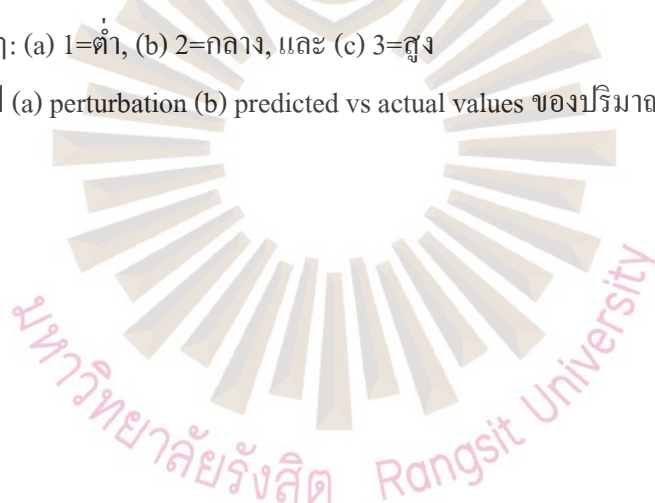
ตารางที่	หน้า
4.7 ANOVA สำหรับแบบจำลองค่าเชิงกำลังสอง (quadratic) ของปริมาณ ซัลเฟต (UAE)	60
4.8 ค่าทำนาย (Predicted value), ค่าทดลอง (experimental value) และร้อยละ ความคลาดเคลื่อน (percent error) ในการทำนาย สำหรับผลตอบสนอง ของปริมาณสารสกัดและปริมาณซัลเฟต ด้วยวิธี UAE	61
4.9 เปรียบเทียบค่าร้อยละผลผลิตสารสกัด ปริมาณซัลเฟต จากการสกัด 3 วิธี ที่แตกต่างกัน คือ T50 MAE และ UAE	63
4.10 เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จากการสกัด 3 วิธีที่แตกต่างกัน คือ T50 MAE และ UAE	64

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างสาหร่ายพม nang	6
2.2	องค์ประกอบที่พบในสารกลุ่มซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์	7
2.3	โครงสร้างทางเคมีของคาร์ราจีแนน	8
2.4	โครงสร้างทางเคมีของวุ้น	8
2.5	โครงสร้างทางเคมีของซัลเฟตกาแลกแตน	8
2.6	กลไกการสกัด	11
2.7	การสกัดโดยวิธีการแช่เย็น	12
2.8	Soxhlet apparatus	13
2.9	เครื่องอัลตราโซนิก	14
2.10	คลื่นเสียงความถี่สูงที่ทำให้เกิดการสั่น และฟองอากาศ	14
2.11	เครื่องสกัดโดยใช้ไมโครเวฟ	15
2.12	การถ่ายเทมวลและการถ่ายเทความร้อนของไมโครเวฟเปรียบเทียบกับ การสกัดแบบดั้งเดิม	16
2.13	การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล	17
2.14	Box-Behnken Design กรณีศึกษา 3 ปัจจัย	20
2.15	พื้นผิวการตอบสนองแบบกราฟิก	22
2.16	พื้นผิวการตอบสนองแบบสามมิติ	22
4.1	ร้อยละผลผลิตการสกัดที่ได้โดยใช้วิธี OFAT มีความแปรปรวนตามการ เปลี่ยนแปลงใน (a) ระยะเวลา (b) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสาหร่าย พม nang และ (c) กำลังไมโครเวฟ	44
4.2	พื้นผิวการตอบสนองของปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดเมื่อมีการใช้ กำลังไมโครเวฟระดับต่าง ๆ: (a) 300 W, (b) 450 W, และ (c) 600 W	46
4.3	กราฟ (a) perturbation (b) predicted vs actual values, and (c) externally studentized residuals vs. run number ของร้อยละผลผลิตสารสกัด	47

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.4	พื้นผิวการตอบสนองของปริมาณซัลเฟตเมื่อมีการใช้กำลังไมโครเวฟระดับต่าง ๆ: (a) 300 W, (b) 450 W, และ (c) 600 W	50
4.5	กราฟ (a) perturbation (b) predicted vs actual values, and (c) externally studentized residuals vs. run number ของปริมาณซัลเฟต	51
4.6	พื้นผิวการตอบสนองของปริมาณสารสกัดเมื่อมีการใช้คลื่นความถี่สูงระดับต่าง ๆ: (a) 1=ต่ำ, (b) 2=กลาง, และ (c) 3=สูง	55
4.7	กราฟ (a) perturbation (b) predicted vs actual values ของปริมาณสารสกัด	56
4.8	พื้นผิวการตอบสนองของปริมาณซัลเฟต เมื่อมีการใช้คลื่นความถี่สูงระดับต่าง ๆ: (a) 1=ต่ำ, (b) 2=กลาง, และ (c) 3=สูง	58
4.9	กราฟ (a) perturbation (b) predicted vs actual values ของปริมาณซัลเฟต	59



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

สาหร่ายพมมานาง (*Gracilaria fisheri*) เป็นสาหร่ายสีแดง จัดอยู่ในวงศ์ Gracilariaceae พบได้ทั้งในภาคตะวันออกและภาคใต้ และพบมากในทางตอนใต้ของประเทศไทย โดยเฉพาะในฝั่งอันดามัน องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายพมมานางส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น อะการ์ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น (Muthukumar, Chidambaram, & Sukumaran, 2021; Praiboon, Chirapart, Akakabe, Bhumibhamond, & Kajiware, 2006) ตามข้อมูลที่ได้รับการรายงาน พบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพของสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในสาหร่ายพมมานางประกอบด้วย ฤทธิ์ด้านการอักเสบ ด้านไวรัส การย่อยของระบบทางเดินอาหาร ด้านแบคทีเรีย ด้านอนุมูลอิสระ และปรับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Devi, Suganthi, Kesila, & Pandian, 2008; Ghosh et al., 2004; Imjongjairak et al., 2016; Jun et al., 2018; Karnjana, Soowannayan, & Wongprasert, 2019; Khongthong et al., 2021; Olasehinde, Olaniran, & Okoh, 2020)

การสกัดสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพมมานาง สามารถทำได้หลายวิธี ส่วนใหญ่พบว่าเป็นการสกัดแบบดั้งเดิม โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และ/หรือน้ำ เป็นตัวทำละลาย รวมทั้งยังพบว่าการสกัดที่ระยะเวลา และอุณหภูมิ ที่แตกต่างกัน จะมีอิทธิพลต่อปริมาณสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในสารสกัดหยาบของสาหร่ายพมมานาง ดังนั้น เพื่อให้ได้ปริมาณสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด ดังนั้น จำเป็นต้องใช้เทคนิคการสกัดแบบสมัยใหม่เข้ามาประยุกต์ใช้ รวมถึงการนำวิธี One-Factor-at-a-Time (OFAT) และ Design of Experiments (DOE) เข้ามาช่วยในการระบุสภาวะที่เหมาะสมหรือที่ดีที่สุดสำหรับการสกัดด้วยวิธีการสมัยใหม่ วิธีการดังกล่าวนอกจากจะทำให้ได้ปริมาณสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดแล้ว ข้อดีอีกประการหนึ่งคือใช้ตัวทำละลายน้อย ใช้ระยะเวลาดสั้น สามารถทำซ้ำได้ มีความจำเพาะ และสามารถใช้ได้กับสารที่ทน และ ไม่ทนความร้อน (Belokurov, Narkevich, Flisyuk, Kaukhova, & Aroyan, 2019; JMP Statistical Discovery LLC, 2022; Monton et al., 2023; Monton, Sampaopan, Pichayakorn, Panrat, & Suksaeree, 2022)

จากการพิจารณาข้อมูลที่ได้รับการรายงาน พบว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทะเลหลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยเฉพาะฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นการหาตัวทำละลาย และวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ จากสาหร่ายผสมนาง โดยใช้วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม และวิธีการสกัดแบบสมัยใหม่ รวมถึงฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผสมนาง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาถึงตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดสาหร่ายผสมนาง
- 1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดที่มีผลต่อปริมาณซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผสมนาง
- 1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผสมนาง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการสกัดสาหร่ายผสมนาง โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 และ น้ำ เป็นตัวทำละลาย ที่ระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง
- 1.3.2 ศึกษาปริมาณสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณฟีนอลทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผสมนาง
- 1.3.3 ศึกษาถึงสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสาหร่ายผสมนางโดยวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ (MAE) และ อัลตราโซนิก (UAE) โดยใช้ OFAT method และแบบจำลองของ Box-Behnken experimental design
- 1.3.4 ศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผสมนาง

1.4 นิยามศัพท์ สัญลักษณ์ และอักษรย่อ

ABTS	หมายถึง	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid)
ANOVA	หมายถึง	Analysis of variance
BaCl ₂	หมายถึง	Barium chloride
BHT	หมายถึง	butylated hydroxytoluene
df	หมายถึง	degrees of freedom
DOE	หมายถึง	Design of Experiments
DPPH	หมายถึง	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
<i>E. coli</i>	หมายถึง	<i>Escherichia coli</i>
FRAP	หมายถึง	Ferric Reducing Ability of Plasma
g	หมายถึง	Gram
<i>G. fisheri</i>	หมายถึง	<i>Gracilaria fisheri</i>
HCl	หมายถึง	Hydrochloric acid
hrs.	หมายถึง	Hours
IC ₅₀	หมายถึง	ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาที่ร้อยละ 50
K ₂ SO ₄	หมายถึง	Potassium sulfate
MAE	หมายถึง	Microwave-Assisted Extraction
mg	หมายถึง	Milligram
mL	หมายถึง	Milliliter
Na ₂ CO ₃	หมายถึง	Sodium carbonate
nm	หมายถึง	nanometer
OFAT	หมายถึง	One-Factor-at-a-Time
<i>P. aeruginosa</i>	หมายถึง	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. aureus</i>	หมายถึง	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	หมายถึง	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. pyogenes</i>	หมายถึง	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SPs	หมายถึง	Sulfated polysaccharide
Std.	หมายถึง	Standard

TSA	หมายถึง	Tryptic Soy Agar
TSB	หมายถึง	Tryptic Soy Broth
UAE	หมายถึง	Ultrasonic-Assisted Extraction
v/v	หมายถึง	volume by volume
W	หมายถึง	Watt
μL	หมายถึง	Microliter

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ทราบถึงตัวทำลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดสาหร่ายพม nang
- 1.5.2 ทราบถึงเทคนิคการสกัดที่เหมาะสม สำหรับการสกัดสาหร่ายพม nang
- 1.5.3 ทราบถึงปริมาณเซลล์ฟอสโฟลิแคคคาไรด์จากสาหร่ายพม nang ที่ได้จากวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน
- 1.5.4 ทราบถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพม nang
- 1.5.5 ผลการทดลองที่ได้สามารถเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพม nang ไปประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรมต่อไป
- 1.5.6 ข้อมูลที่ได้จะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของสาหร่ายพม nang ในอนาคต

บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายผมนาง

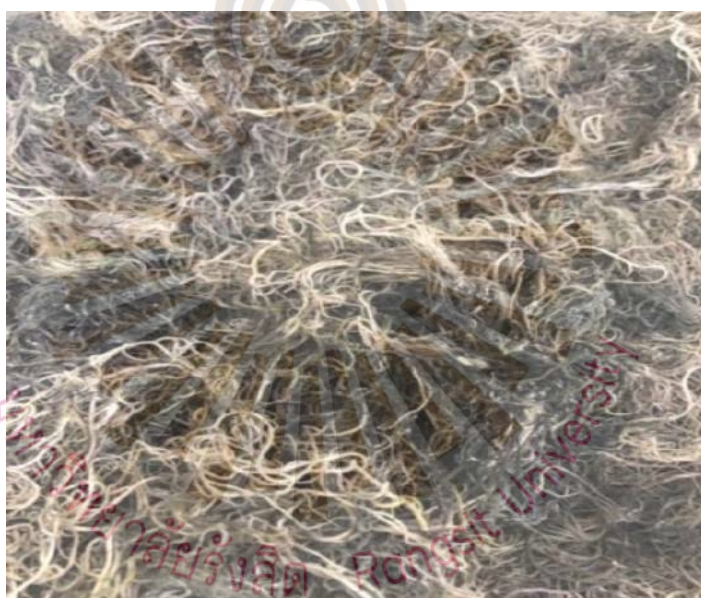
สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) เป็นสาหร่ายสีแดง จัดอยู่ในสกุล *Gracilaria* วงศ์ Gracilariaceae ไฟลัม Rhodophyta พบได้ทั้งในประเทศเขตร้อน และเขตอบอุ่น เช่น สหรัฐอเมริกา บราซิล เม็กซิโกชิลี แอฟริกาใต้ จีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น และไทย เป็นต้น ซึ่งในประเทศไทยสามารถพบสาหร่ายผมนางได้บริเวณชายฝั่งของภาคใต้ เช่น จังหวัดนราธิวาส ปัตตานี ระนอง สงขลา พัทลุง สุราษฎร์ธานี ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ และฝั่งภาคตะวันออก เช่น ตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ (วิรเทพ ศรีปราชญ์, วิโรจน์ กิตติคุณ, ภัคพงศ์ ปวงสุข, และธวัชชัย ศุภดิษฐ์, 2554) ลำต้น (talus) ของสาหร่ายผมนางมีลักษณะอวบน้ำ ลักษณะเป็นพุ่ม สูงประมาณ 9.92-12.89 เซนติเมตร แตกแขนงเป็นโคนสั้น ๆ แขนงมีลักษณะเป็นเส้นกลมยาว มีสีน้ำตาล ม่วงเข้ม เขียว หรือสีอื่น ๆ ขึ้นอยู่กับเมื่อดึงขึ้นจากโคลนโรพลาสติก เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6-2.3 มิลลิเมตร โคนคอด ปลายเรียวแหลม ซึ่งสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จะพบได้ตามผนังเซลล์ของสาหร่ายผมนาง รากมีขนาดเล็ก รูปถ้วย พบมากบริเวณชายฝั่งที่ระดับความลึก 1-2 เมตร (กาญจนาภรณ์ ถ้วนโนมนต์, 2536; ปาริฉัตร สังข์ทอง, 2563; Pattarach, Phetcharat & Mayakun, 2019)

2.1.2 ประโยชน์ของสาหร่ายผมนาง

2.1.2.1 ด้านอาหาร สาหร่ายผมนางสามารถนำมาบริโภคเป็นอาหาร หรือนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร และเครื่องดื่มนานาประเภทต่าง ๆ เช่น แยม ไอศกรีม เยลลี่ เป็นต้น นอกจากนี้สาหร่ายผมนางยังเป็นแหล่งสำคัญที่ให้ผงวุ้น (agar)

2.1.2.2 ด้านการเกษตร สาหร่ายพม nang สามารถนำมาใช้ทำปุ๋ย รวมถึงอาหารของสัตว์น้ำบางประเภท และนอกจากนั้นยังมีข้อมูลว่า สารสกัดสาหร่ายพม nang ช่วยป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งกุลาดำ

2.1.2.3 ด้านการแพทย์ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในสาหร่ายพม nang มีรายงานว่ามีคุณลักษณะทางชีวภาพที่มีความหลากหลาย เช่น ด้านการแข็งตัวของเลือด, ด้านแบคทีเรีย, ด้านไวรัส, ด้านอนุมูลอิสระ, ด้านการอักเสบ และปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Devi et al, 2008; Ghosh et al., 2004; Imjongjairak et al., 2016; Jun et al., 2018; Kamjana et al., 2019; Kamjana, Rattanapit, Asuvapongpatana, Withyachumnarnkul, & Wongprasert, 2011; Khongthong et al., 2021; Muthukumar et al, 2021; Nabil-Adam et al., 2020; Olasehinde, Olaniran, & Okoh, 2020; Thanigaivel, Chandrasekaran, Mukherjee, & Thomas, 2016; Woraprayote et al., 2023)



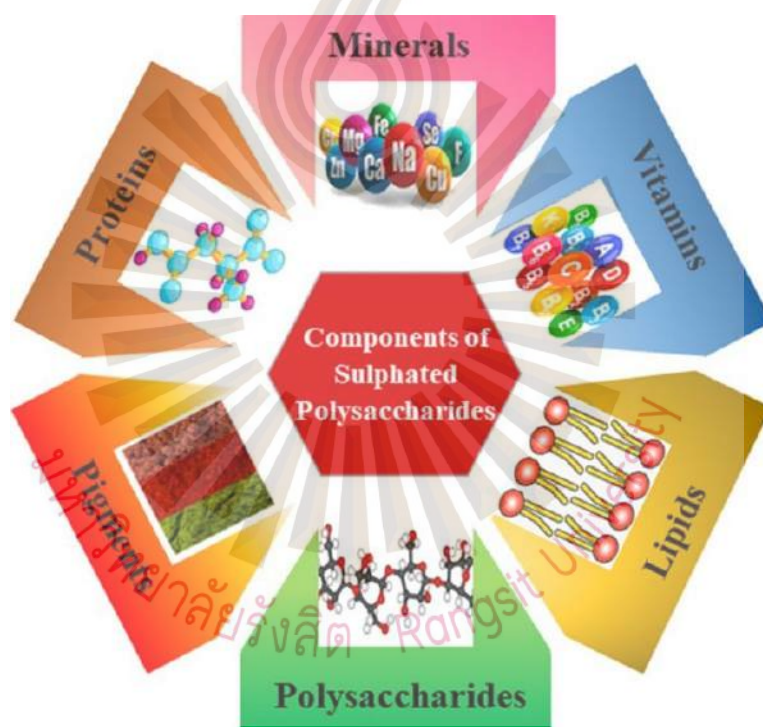
รูปที่ 2.1 ตัวอย่างสาหร่ายพม nang
ที่มา : ผู้วิจัย

2.1.3 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในสาหร่ายพม nang

องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายพม nang ประกอบไปด้วยสารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเฉพาะซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบละลายได้ดีในน้ำ โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบประกอบไปด้วยหน่วยที่ซ้ำกันของอะกาโรไบโอส (agarobiose) ที่เกิดจากไดแซ็กคาไรด์ประกอบไป

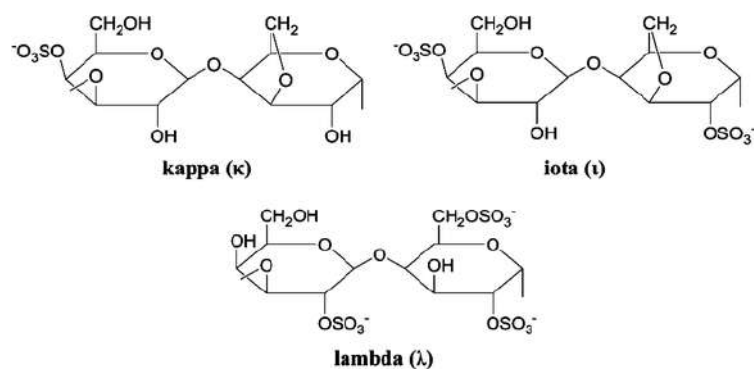
ด้วยน้ำตาล 2 หน่วย คือ D-galactose และ 3, 6 – anhydro-L-galactose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก โดยโครงสร้างสามารถเขียนแบบย่อได้ดังนี้ $\text{Gal-}\beta(1\rightarrow 4)\text{-3,6-anhydro-L-Gal}$ ซึ่ง Gal จะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิลหรือซัลเฟต ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้เช่นคาร์ราจีแนน (carrageenan) วัณ (agar) และกาแลกแตน (galactans) เป็นต้น องค์ประกอบที่พบในสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์แสดงในรูปที่ 2.2 นอกจากสารในกลุ่มซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว ยังสามารถพบสารกลุ่มอื่น ๆ เช่น เทอร์ปีนอยด์ และ ฟีนอลิก (Rormwong, Sakpetch, Choojit, & Kanjan, 2023; Torres, Santosb, Chow, & Santos, 2019)

ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์แสดงในรูปที่ 2.3-2.5



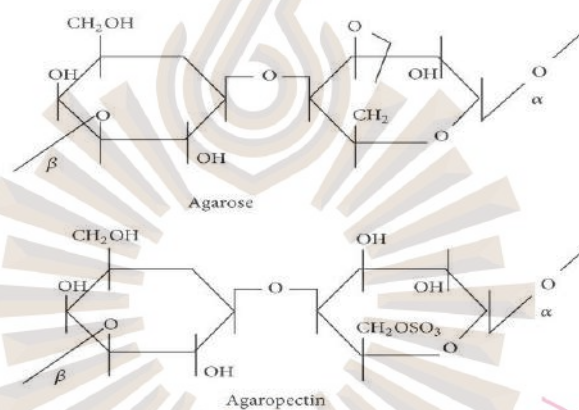
รูปที่ 2.2 องค์ประกอบที่พบในสารกลุ่มซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์

ที่มา : Muthukumar et al., 2021



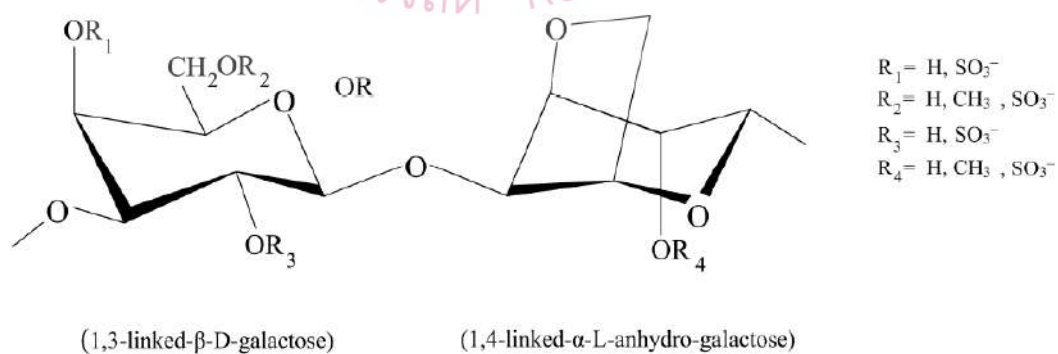
รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของคาร์ราจีแนน

ที่มา : Chauhan & Saxena, 2016



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของวุ้น

ที่มา : Banoozadeh et al., 2015



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของซัลเฟตกาแลกแตน

ที่มา : Chumsook, Praiboon, & Fu, 2023

2.1.4 การสกัดสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนาง

การสกัดสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนางสามารถทำได้ด้วยวิธีที่หลากหลาย เช่น การสกัดด้วยวิธีที่ใช้ความร้อน และการสกัดด้วยวิธีไม่ใช้ความร้อน จากข้อมูลที่ได้รับจากรายงานแล้วพบว่าปริมาณสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ จะขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด และอุณหภูมิที่เลือกใช้ (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนางที่ได้จากการสกัดโดยวิธีการต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณซัลเฟต (%)	เอกสารอ้างอิง
น้ำ	25	16	6.86	Imjongjairak et al., 2014
	25		7.05	Imjongjairak et al., 2016
	35-40	4	12.7	Wongprasert, Rudtanatip, & Praiboon, 2014
	55	16	8.95	Imjongjairak et al., 2014
	55		10.71	Imjongjairak et al., 2016
	85	2	84.1 ± 2.30 mg/g	Khongthong et al, 2021
	90	3	12.20	Charoensiddhi et al., 2022
	100	1	18.52	Rormwong et al., 2023
เอทานอล	100	24		Karnjana et al., 2019

2.1.5 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายผมนาง

ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนาง แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ซึ่งสามารถดูรายละเอียดได้ในตารางที่ 2.2

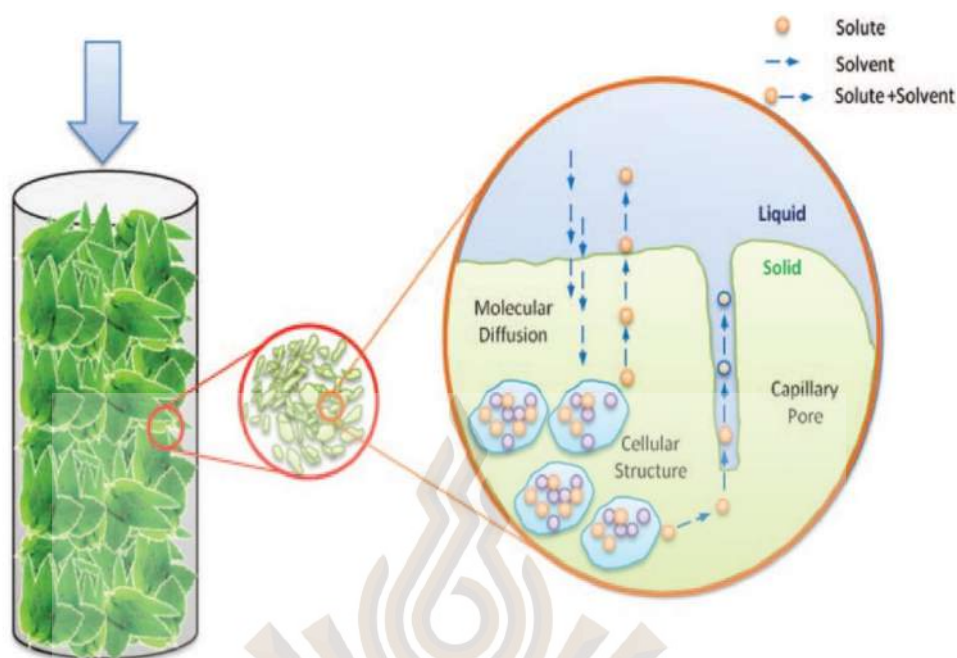
ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางชีวภาพของสาหร่ายผสมนาง

สารตัวอย่าง	องค์ประกอบทางเคมี	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสารอ้างอิง
สารสกัดน้ำ	Sulfated polysaccharides	ต้านมะเร็ง	Sae-Lao et al., 2017; Sae-Lao, Tohtong, Bates, & Wongprasert, 2017
สารสกัดน้ำ	Sulfated polysaccharides	ต้านอนุมูลอิสระ	Imjongjairak et al., 2016
สารสกัดน้ำ	Sulfated polysaccharides	การย่อยในระบบทางเดินอาหาร	Charoensiddhi et al., 2022
สารสกัดน้ำ	Sulfated galactans	ต้านจุลชีพ	Rudtanatip, Withyachumnarnkul, & Wongprasert, 2015
สารสกัดน้ำ	Sulfated galactans	กระตุ้นภูมิคุ้มกัน	Wongprasert, Rudtanatip, & Praiboon, 2014

2.2 เทคนิคการสกัด (Extraction techniques)

การสกัด (extraction) หมายถึง การแยกเอาสารต่าง ๆ ทั้งที่อยู่ในรูปของแข็งและของเหลว ออกมาจากจากตัวอย่างที่ต้องการสกัด โดยกระบวนการการสกัดจะอาศัยหลักการต่อไปนี้

- 1) การละลายของสารในตัวทำละลาย (solvent) ที่เหมาะสม คือ สารที่มีคุณสมบัติมีขั้วจะละลายได้ในตัวทำละลายที่มีขั้ว สารที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายไม่มีขั้ว
- 2) การสกัดจะเริ่มจากการแพร่ของตัวทำละลายเข้าสู่เซลล์ของพืช ทำให้เซลล์ของพืชบวม พอง และละลายแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกมาได้ในตัวทำละลายชนิดนั้น ๆ (รัตน อินทรานุ ปกรณ์, 2547)



รูปที่ 2.6 กลไกการสกัด

ที่มา : Rostagno & Prado, 2013

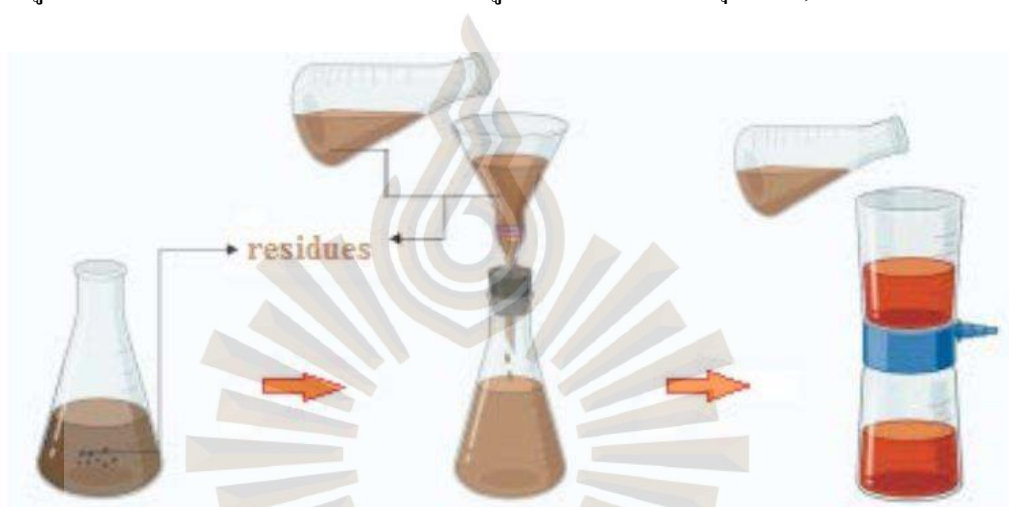
การสกัดมีหลายวิธีที่เลือกใช้กันในปัจจุบัน โดยขึ้นอยู่กับพืชหรือสารที่ต้องการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในกระบวนการสกัด ซึ่งแต่ละวิธีมีคุณลักษณะที่ดีและไม่ดีที่แตกต่างกัน ดังนั้นลักษณะของเครื่องมือสำหรับการสกัดก็จะแตกต่างกันไปด้วย

ในปัจจุบันเทคนิคการสกัดแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การสกัดแบบดั้งเดิม (classical extraction methods) และ การสกัดสมัยใหม่ (modern extraction methods)

การสกัดแบบดั้งเดิม เป็นหนึ่งในกระบวนการสกัดที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะการสกัดสารสำคัญที่มาจากพืช ซึ่งในวิธีการสกัดจะใช้ตัวทำละลายในปริมาณมาก และระยะเวลานานในการสกัดกว่าจะเสร็จสมบูรณ์ ตัวอย่างของวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม เช่น การแช่ขุ่ย (maceration) และการสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction) เป็นต้น

2.2.1 การแช่เยื่อ (maceration)

การแช่เยื่อเป็นวิธีในการสกัดที่ไม่ใช้ความร้อน ซึ่งสามารถทำได้โดยการแช่พืชหรือสารตัวอย่างที่ต้องการจะสกัดลงในตัวทำละลายในภาชนะปิด ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3-7 วัน พร้อมทั้งใช้เครื่องเขย่าเป็นครั้งคราวเพื่อช่วยเร่งให้ตัวทำละลายและสารตัวอย่างสัมผัสกันได้มากขึ้น เมื่อครบกำหนดเวลา กรองสารสกัดที่ได้ หลังจากนั้นนำกากไปแช่ซ้ำในตัวทำละลายชนิดเดิม ทำซ้ำอยู่เช่นนี้จนกว่าการสกัดจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

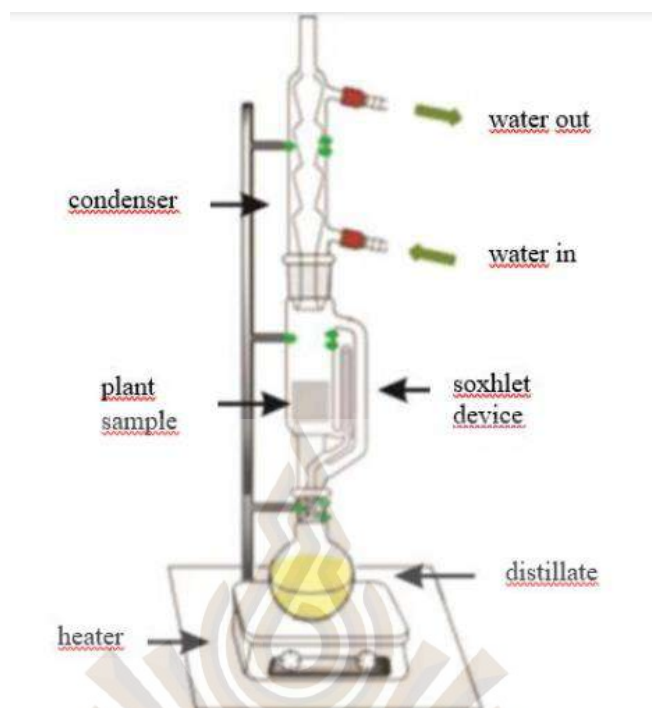


รูปที่ 2.7 การสกัดโดยวิธีการแช่เยื่อ

ที่มา : Verep, Ateş, & Karaoğlu, 2023

2.2.2 การสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction)

การสกัดแบบต่อเนื่องเป็นการสกัดโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า continuous extractor หรือ soxhlet apparatus (รูปที่ 2.8) ซึ่งเป็นระบบปิด โดยใส่ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดค่อนข้างต่ำไว้ที่ขวดก้นกลมด้านล่าง แล้วให้ความร้อน ตัวทำละลายจะระเหยขึ้นไปตาม vapour tube ผ่าน condenser กลับตัวเป็นหยดไหลลงผ่านตัวอย่างที่บรรจุใน thimble และละลายสารองค์ประกอบในตัวอย่างออกมา เมื่อตัวทำละลายที่มีสารที่สกัดอยู่สูงถึงระดับหนึ่งจะถูก siphon ไหลกลับลงไปยังขวดก้นกลมด้านล่าง แล้วระเหยขึ้นมามากครั้ง ทำการสกัดซ้ำไปซ้ำมาเช่นนี้จนสกัดเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)



รูปที่ 2.8 Soxhlet apparatus

ที่มา : Verep et al., 2023

ข้อดีของวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (Rasul, 2018; Zhou et al., 2022)

- (1) ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก
- (2) เหมาะกับตัวอย่างที่มีปริมาณมาก
- (3) สามารถใช้ตัวทำละลายได้หลากหลาย

ข้อเสียของวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (Rasul, 2018; Zhou et al., 2022)

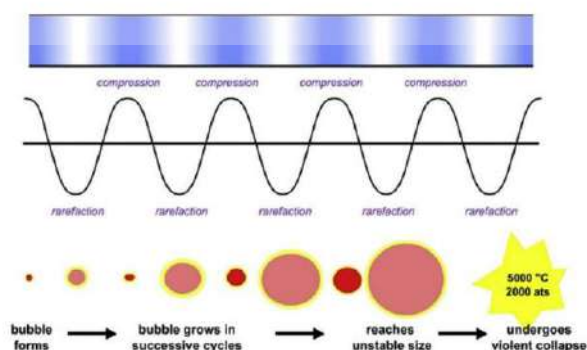
- (1) กระบวนการสกัดแบบดั้งเดิมใช้เวลานาน
- (2) ใช้ตัวทำละลายที่มาก ทำให้เกิดการสิ้นเปลือง

การสกัดแบบสมัยใหม่ ถือว่าเป็นวิธีที่มีตรงกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากใช้สารตัวอย่างและปริมาณของตัวทำละลายในปริมาณน้อย ตัวอย่างของวิธีการสกัดด้วยวิธีการแบบสมัยใหม่ เช่น การ

สกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic-assisted extraction) และ การสกัดโดยใช้ไมโครเวฟ (microwave-assisted extraction) เป็นต้น

2.2.3 การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic-assisted extraction)

การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่อยู่ในช่วง 20 -2,000 กิโลเฮิร์ตซ์ โดยเครื่องอัลตราโซนิก หรือ ultrasonic bath (รูปที่ 2.9) เพื่อช่วยในการแยกสารสำคัญออกจากสารตัวอย่าง โดยอาศัยการสั่นสะเทือน เกิดเป็นฟองอากาศที่มีขนาดเล็ก (cavitation) ที่บริเวณพื้นผิวของตัวอย่างที่อยู่ในตัวทำละลาย ทำให้เกิดแรงกระแทกเกิดขึ้น (รูปที่ 2.10) เมื่อฟองอากาศมีการขยายตัว จะส่งผลให้ผนังเซลล์มีการแตกซึ่งมีผลมาจากการกระแทกและคลื่นที่เกิดขึ้น ทำให้องค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ภายในเซลล์ละลายออกมา (อารีรัตน์ ชื่อดี, 2560; Monton et al., 2022; Monton et al., 2023)



รูปที่ 2.10 คลื่นเสียงความถี่สูงที่ทำให้เกิดการสั่น และฟองอากาศ

ที่มา : Vinatoru, Mason, & Calinescu, 2017

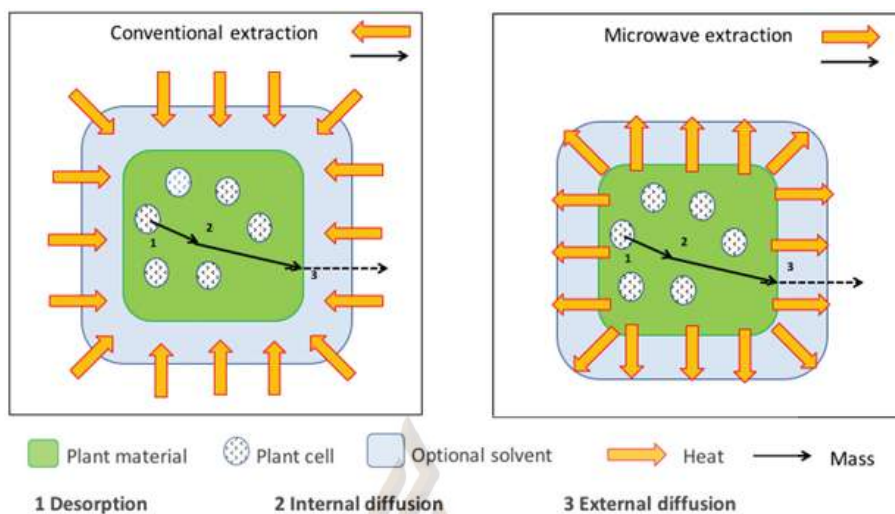
2.2.4 การสกัดโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave-assisted extraction)

การสกัดด้วยไมโครเวฟเป็นกระบวนการสกัดโดยใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่อยู่ในช่วง $3 \times 10^2 - 3 \times 10^5$ เมกะเฮิร์ตซ์ และความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 0.01 - 1 เมตร ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ (เครื่องสกัดโดยใช้ไมโครเวฟแสดงในรูปที่ 2.11) โดยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจะทำให้โมเลกุลที่มีขั้วในตัวอย่างไม่ต้องการสกัดเกิดการจذبเรียงตัวใหม่ โดยโมเลกุลที่มีขั้วบางส่วนเกิดแรงต้านการเคลื่อนที่ ทำให้มีความร้อนเกิดขึ้น ซึ่งจะเป็นการอาศัยการถ่ายเทความร้อนจากภายนอกเข้าสู่ภายในตัวอย่างที่ต้องการสกัด (รูปที่ 2.12) นอกจากนี้การที่โมเลกุลมีจัดเรียงตัวใหม่ ส่งผลให้เกิดการชนหรือการเสียดสีกันเกิดขึ้น ทำให้เซลล์แตก และองค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ภายในเซลล์ละลายออกมา (อารีรัตน์ ชื่อดี, 2560; Monton et al., 2022; Monton et al., 2023)



รูปที่ 2.11 เครื่องสกัดโดยใช้ไมโครเวฟ

ที่มา: You, 2018



รูปที่ 2.12 การถ่ายเทมวลและการถ่ายเทความร้อนของไมโครเวฟเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

ที่มา : Rosa, Ferrari, & Veronesi, 2018

ข้อดีของวิธีการสกัดแบบสมัยใหม่ (Mohammad Azmin et al., 2016; Zhoe et al., 2022)

- (1) ลดการใช้ตัวทำละลาย
- (2) ลดระยะเวลา
- (3) สามารถทำซ้ำได้
- (4) เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

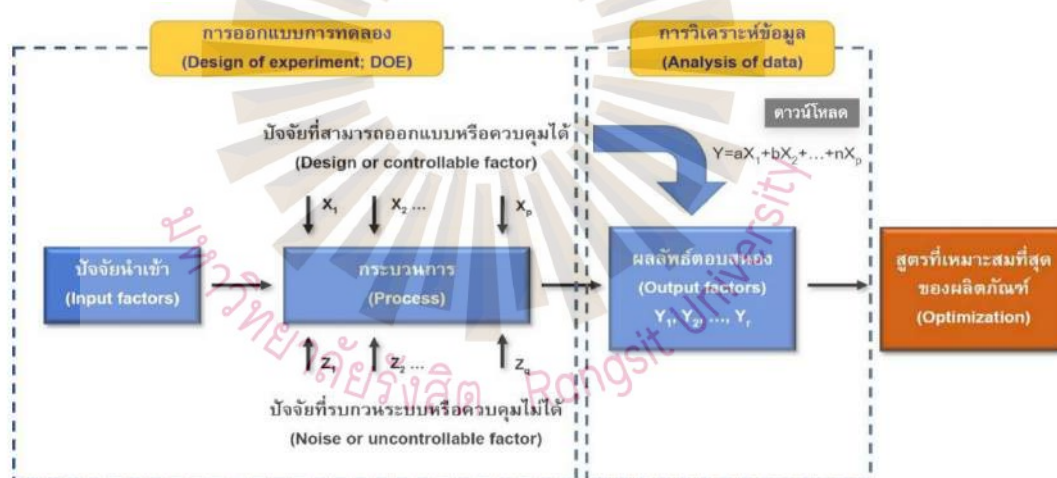
ข้อเสียของวิธีการสกัดแบบสมัยใหม่ (Mohammad Azmin et al., 2016; Zhoe et al., 2022)

- (1) ไม่เหมาะกับตัวอย่างที่มีปริมาณมาก
- (2) มีขีดจำกัดในการเลือกตัวทำละลาย เช่น อุณหภูมิสูงหรือความดันสูง
- (3) ผู้สกัดต้องมีความชำนาญในการเครื่องมือ

2.3 การออกแบบการทดลอง (Design of Experiment, DOE)

การออกแบบการทดลอง หมายถึง กระบวนการวางแผนและจัดการการทดลองอย่างเป็นระบบ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แม่นยำและเชื่อถือได้ การออกแบบการทดลองช่วยในการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อผลลัพธ์ของการทดลอง และช่วยในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร

ต่าง ๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการทดลอง ซึ่งสามารถอธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัยนำเข้า ที่ส่งผลถึงคุณภาพของผลผลิตผ่านกระบวนการ ซึ่งวิธีการศึกษาสามารถพิจารณาถึงปัจจัยตอบสนองหลายปัจจัยพร้อมกันได้ในเวลาเดียวกัน เพื่อช่วยลดจำนวนการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ละปัจจัย (ภูมินทร์ สุริยาอัมพร, วรรณัท รังสิมาวงศ์, และ ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์, 2565) ในการออกแบบการทดลอง จะช่วยให้เกิดการวางแผนการทำงานอย่างเป็นระบบ ซึ่งทำให้สามารถหาความสัมพันธ์เชิงสถิติระหว่างปัจจัยที่ทำการศึกษาที่จะเกิดขึ้น (X) กับผลตอบสนอง (Y) โดยสามารถลดจำนวนการทดลองลงแต่ยังคงไว้ซึ่งประสิทธิภาพสูงสุด ในปัจจุบันการใช้วิธีการออกแบบการทดลองมีโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติช่วยให้ทำการศึกษาง่ายมากยิ่งขึ้น เช่น Minitab, Statistical Analysis Software (SAS) และ Design-expert[®] เป็นต้น (Zhang & Mao, 2017) วิธีการในการหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของผลิตภัณฑ์ เป็นการคำนวณทางสถิติซึ่งมีการกำหนดคุณลักษณะที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อย่างชัดเจน โดยที่คุณลักษณะที่ต้องการในผลิตภัณฑ์มักจะเป็นค่าที่ต้องมากที่สุดหรือค่าที่ต้องการน้อยที่สุด ขั้นตอนและวิธีการในการออกแบบและการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นได้แสดงในรูปที่ 2.13 (Yu et al., 2014)



รูปที่ 2.13 การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

ที่มา : ภูมินทร์ สุริยาอัมพร และคณะ, 2565

2.3.1 ขั้นตอน และกระบวนการในการออกแบบการทดลอง ประกอบไปด้วย

- 2.3.1.1 กำหนดหัวข้อ วัตถุประสงค์ เพื่อระบุปัญหาและเป้าหมายที่ต้องการ
- 2.3.1.2 กำหนดตัวแปรต้นที่มีผล รวมถึงค่าและช่วงของตัวแปรต้นที่ต้องการศึกษา
- 2.3.1.3 กำหนดตัวแปรตามที่ต้องการศึกษา และเครื่องมือในการวัด เพื่อให้ถูกต้องและแม่นยำ
- 2.3.1.4 เลือกวิธีการให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการทดลอง เช่น แบบสุ่มแบบแฟกทอเรียล และ แบบพื้นที่ผิวการตอบสนอง
- 2.3.1.5 ทำการทดลอง เพื่อกำหนดจำนวนการทดลอง การจัดกลุ่มตัวอย่าง ระบุเงื่อนไขและทดลองอย่างละเอียด
- 2.3.1.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

2.3.2 ประโยชน์ของการออกแบบการทดลอง มีดังนี้

- 2.3.2.1 เพิ่มความแม่นยำ ลดความผันแปรที่ไม่พึงประสงค์ กับผลลัพธ์ที่ต้องการ
- 2.3.2.2 ทำให้ทราบค่าที่เหมาะสมของปัจจัยเพื่อให้เกิดค่าตัวแปรตอบสนองตรงตามที่ต้องการ
- 2.3.2.3 สามารถแยกผลกระทบจากปัจจัยหลักที่ต้องศึกษาออกจากปัจจัยรบกวนได้
- 2.3.2.4 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตัดสินใจ โดยมีพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์และสถิติรองรับ (สุชาดา พิริยะประสาธน์, 2554)

2.4 แนวทางการออกแบบการทดลอง

การออกแบบสำหรับการทดลองมีหลายวิธี ดังนี้

- 2.4.1 การศึกษาแบบแฟกทอเรียล 3^{k-p} เป็นวิธีที่ช่วยในการศึกษาตัวแปรต้นหลายตัวแปรในเวลาเดียวกัน และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรเหล่านั้นได้ การศึกษาแบบแฟกทอเรียลมีประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพและลดจำนวนการทดลองที่ต้องทำการทดลอง แต่วิธีการนี้ไม่เหมาะสมในการศึกษาปัจจัยเชิงปริมาณทั้งหมด

2.4.2 การศึกษาแบบแฟกทอเรียลเต็ม 3^k เป็นวิธีการออกแบบการทดลองที่ใช้เมื่อมีตัวแปรต้น (Factors) k ปัจจัย และแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ (Levels) โดยการศึกษาแบบแฟกทอเรียลเต็มจะพิจารณาการผสมผสานของทุกระดับของตัวแปรต้นแต่ละปัจจัย จึงเรียกว่า แฟกทอเรียลเต็ม ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดและครอบคลุมทุกความสัมพันธ์ที่เป็นไปได้ระหว่างตัวแปร อย่างไรก็ตาม การใช้วิธีนี้ต้องใช้งบประมาณ (ค่าใช้จ่ายในการทดลอง) มากเนื่องจากจำนวนการทดลองที่สูงกว่าแผนอื่น ๆ

2.4.3 การออกแบบเชิงองค์ประกอบศูนย์กลาง ใช้สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และหาค่าปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลอง วิธีการออกแบบเชิงองค์ประกอบศูนย์กลาง เป็นอีกหนึ่งองค์ประกอบของเทคนิคพื้นผิวการตอบสนอง (Response Surface Methodology) ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาเชิงปริมาณ แต่เชิงคุณภาพที่มีปัจจัยเพียงระดับเดียวยังคงไม่เหมาะสมถ้าเลือกใช้วิธีการนี้ในการศึกษา อย่างไรก็ตาม การออกแบบการทดลองนี้ยังคงต้องมีการปรับค่าต่าง ๆ เพื่อให้การทดลองมีความถูกต้อง และแม่นยำเพิ่มมากขึ้น

2.4.4 การทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน เป็นการศึกษาผลกระทบที่เกิดจากตัวแปรต้นที่ส่งผลต่อผลตอบสนองในการทดลอง เริ่มต้นจากการแบ่งตัวแปรต้นเป็น 3 ระดับ เพื่อลดจำนวนของการทดลอง แต่ยังคงไว้ซึ่งแบบจำลองที่มีความแม่นยำ และถูกต้องในการประเมินผลตอบสนอง การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนจะมีจุดกลาง เพื่อใช้ในการหาค่ากลาง และประเมินความถูกต้องที่ปรากฏบนพื้นผิวการตอบสนอง การออกแบบนี้มีประสิทธิภาพและนิยมใช้สำหรับการศึกษาปัจจัยที่มี 3 ระดับ โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการสร้างสมการความสัมพันธ์เมื่อปัจจัยเป็นเชิงปริมาณ เช่น เวลา ความเข้มข้น ความดัน อุณหภูมิ เป็นต้น (ณรงค์ชัย สถาพรวิจิตร, 2549; สถาพรหมั่นสิน, 2557)

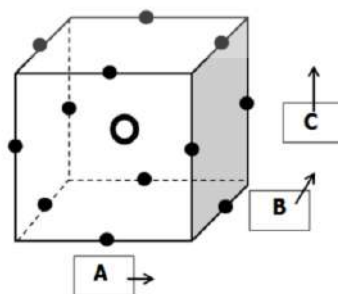
2.5 การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

ในปี 1960 ได้มีการพัฒนาการออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ และลดระยะเวลาในการทำการทดลอง โดยแบ่งออกเป็นสามปัจจัย เพื่อใช้สำหรับการสร้างพื้นผิวตอบสนอง การออกแบบนี้ใช้หลักการของการศึกษาแบบแฟกทอเรียลเต็มรูปแบบ 2^2 รวมกับจุดกึ่งกลาง (Central Points) โดยค่า k คือ จำนวนปัจจัยบ็อกซ์-เบห์นเคน โดย

สร้างตารางเพื่อใช้สำหรับออกแบบแผนการทดลองเพื่อใช้กับปัจจัยที่ใช้ในการทดลองได้สูงสุดไม่เกิน 16 ปัจจัย ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 2.3 (สถาพร หมั่นสิน, 2557)

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่าง Box-Behnken Design ที่มี 3 ปัจจัย

run	A	B	C
1	-	-	0
2	-	+	0
3	+	-	0
4	+	+	0
5	-	0	-
6	-	0	+
7	+	0	-
8	+	0	+
9	0	-	-
10	0	+	+
11	0	-	-
12	0	+	+
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0



รูปที่ 2.14 Box-Behnken Design กรณีสึกษา 3 ปัจจัย

ที่มา : สถาพร หมั่นสิน, 2557

2.6 การออกแบบพื้นผิวการตอบสนอง (Response Surface Design)

การออกแบบพื้นผิวการตอบสนอง เป็นการออกแบบการทดลอง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรต้น และตัวแปรตาม โดยเฉพาะตัวแปรต้นที่ส่งผลต่อตัวแปรตาม โดยทำการสร้างแผนสำหรับการทดลองที่ครอบคลุมบริเวณของพื้นที่ผิวการตอบสนอง ซึ่งเป็นพื้นที่ผิวที่แสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นและตัวแปรตามที่น่าสนใจ จากนั้นใช้ข้อมูลที่ได้จากการทดลองดำเนินการตามแผนที่วางไว้ เพื่อปรับปรุงและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในกระบวนการทดลอง

$$y = f(X_1 - X_2) + \varepsilon$$

โดย y คือ ค่าความคาดหวังของการตอบสนอง

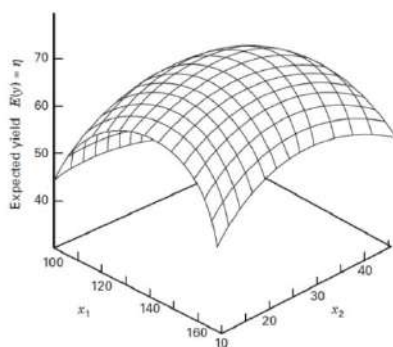
ε คือ ค่าความผิดพลาดในการตอบสนอง

ดังนั้น $E(y) = f(X_1 - X_2) = \eta$ สามารถเขียนสมการพื้นผิวการตอบสนองใหม่ได้

ดังนี้

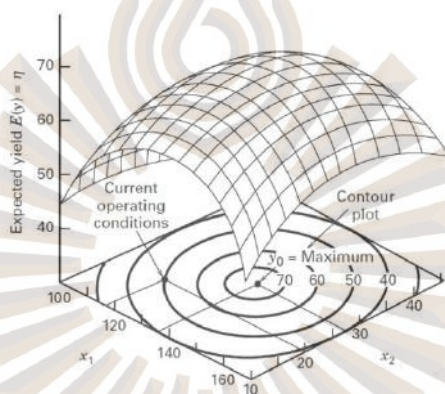
$$\eta = f(X_1 - X_2)$$

โดยจะเรียกว่า พื้นผิวการตอบสนองแบบกราฟิก ดังรูปที่ 2.15 โดยที่ η จะถูกพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง X_1 และ X_2 เพื่อช่วยให้ผู้วิจัยสามารถมองเห็นแนวโน้ม และรูปร่างของพื้นที่ผิวการตอบสนองได้ง่าย และชัดเจนมากขึ้น โดยมักจะวางแผนรูปร่างของพื้นผิวการตอบสนองแบบสามมิติ (ถนัดกิจ ศรีโชค, 2563) ดังแสดงในรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.15 พื้นผิวการตอบสนองแบบกราฟิก

ที่มา : ถนัดกิจ ศรีโชค, 2563



รูปที่ 2.16 พื้นผิวการตอบสนองแบบสามมิติ

ที่มา : ถนัดกิจ ศรีโชค, 2563

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่าง

สารหายผมนางแห้ง มาจากตำบลเกาะยาว อำเภอมืองสงขลา จังหวัดสงขลา ประเทศไทย
ในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2565 และนำมาบดโดยใช้เครื่องบดแล้วเก็บไว้ในที่แห้งจนถึงเวลาใช้งาน

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์

- 1) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Top-load Balances 2 decimal place ยี่ห้อ Ohaus, USA)
- 2) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical Balances 4 decimal place ยี่ห้อ Ohaus, USA)
- 3) เครื่องกลั่นระเหยสารสุญญากาศ (Rotary evaporator ยี่ห้อ Heidolph, Germany)
- 4) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo Fisher, G10S, China)
- 5) เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน (Hotplate Stirrer ยี่ห้อ Ika C-Max HS7, Germany)
- 6) เครื่องไมโครเวฟ (ยี่ห้อ Samsung, MS23K3513AW, Malaysia)
- 7) เครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic bath ยี่ห้อ Power sonic410, Korea)
- 8) เครื่องเขย่าสารควบคุมอุณหภูมิ (Shaking Incubator ยี่ห้อ Vision, Korea)
- 9) ไมโครปิเปต (Micropipette ยี่ห้อ Mettler Toledo, Switzerland)
- 10) ตู้เพาะเชื้อ (Incubator ยี่ห้อ Contherm, New Zealand)
- 11) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave ยี่ห้อ Jibimed, China)

3.2.2 สารเคมี

- 1) Potassium sulfate (Ajax Finechem, Australia)
- 2) Barium chloride 2-hydrate (Kemaus, Australia)
- 3) Ethanol (RCI Labscan, Thailand)
- 4) *L*-Ascorbic acid (Sigma, United States)
- 5) Hydrochloric acid (Macron chemical, China).
- 6) Glacial acetic acid (RCI Labscan, Thailand)
- 7) Gallic acid (Merck, Germany)
- 8) Methanol (RCI Labscan, Thailand)
- 9) Folin-Ciocalteu solution (Merck, Germany)
- 10) Sodium carbonate (Kemaus, Australia)
- 11) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Aldrich, United States)
- 12) Sodium acetate (Loba Chemie Pvt. Ltd, India)
- 13) 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (Sigma, United States)
- 14) Ferric chloride (Loba chemie, India)
- 15) Ferrous sulphate (Univar, Australia)
- 16) 2,2-azobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)
(Sigma-Aldrich, United States)
- 17) Potassium persulfate (Sigma-Aldrich, UK)
- 18) Tryptic soy agar (TSA) (HiMedia, India)
- 19) Tryptic soy broth (TSB) (HiMedia, India)
- 20) Ciprofloxacin CIP-5 (Becton, Dickinson and company, United States)

3.2.3 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก หมวดวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชา
วิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

- 1) *Staphylococcus aureus* (ATCC25923)
- 2) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228)
- 3) *Streptococcus pyogenes* (ATCC19615)

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

- 1) *Escherichia coli* (ATCC25922)
- 2) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853)

3.3 การสกัดสารหอยผมนาง

การสกัดสารหอยผมนาง ได้ทำการประยุกต์มาจากวิธีของงานวิจัย (นพรัตน์ มะเห, ปิยรัตน์ สิริวงษ์ไพศาล, และอุไรวรรณ วัฒนกุล, 2553)

3.3.1 การสกัดสารหอยผมนางด้วยวิธีการแช่

3.3.1.1 ชั่งสารหอยผมนางน้ำหนัก 100 กรัม

3.3.1.2 เติมห่วงทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 20 และ น้ำ 500 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้อัตราส่วนของสารหอยผมนางต่อตัวทำละลาย 1:5 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำซ้ำ 3 การทดลอง

3.3.1.3 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.3.1.4 กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® No. 1 ขณะร้อน แยกส่วนกากทิ้ง และเก็บส่วนของสารละลายไว้

3.3.1.5 นำส่วนสารละลายไปทำการระเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารสูญญากาศ

3.3.1.6 คำนวณหาร้อยละผลผลิต ตามสมการ

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = [\text{น้ำหนักแห้งของสารสกัด (กรัม)} / \text{น้ำหนักแห้งของสารหอยผมนาง (กรัม)}] \times 100$$

3.3.2 การกำหนดระดับของปัจจัยการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟโดยใช้วิธี One Factor at a Time (OFAT)

ขั้นตอนการทดลองด้วยวิธี OFAT ในการศึกษาผลของ 3 ปัจจัยต่อการสกัดด้วยไมโครเวฟ (MAE) ได้แบ่งออกเป็นสามขั้นตอนหลัก ๆ ดังนี้

3.3.2.1 การศึกษาผลของระยะเวลาในการสกัดสาหร่ายพมนาง

- (1) ชั่งน้ำหนักสาหร่ายพมนาง 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
- (2) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร (อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสาหร่ายพมนาง 5:1 มิลลิลิตรต่อกรัม)
- (3) ทำการสกัดด้วยไมโครเวฟที่ 450 วัตต์ ระยะเวลา 20, 30, 40, 50 และ 60 วินาที ทำซ้ำ 3 การทดลอง
- (4) กรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman® No. 1 หนึ่งรอบ และระเหยสารให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- (5) บันทึกน้ำหนักผลผลิต และคำนวณร้อยละผลผลิต

3.3.2.2 การศึกษาผลของอัตราส่วนตัวทำละลายต่อสาหร่ายพมนาง

- (1) ชั่งน้ำหนักสาหร่ายพมนาง 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
- (2) ทำการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนตัวทำละลายต่อตัวถูกละลาย ที่ใช้ในแต่ละการทดลอง คือ 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 และ 10:1 มิลลิลิตรต่อกรัม โดยการใช้ น้ำกลั่น ปริมาตร 40, 50, 60, 70, 80, 90, และ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ
- (3) ทำการสกัดด้วยไมโครเวฟที่ 450 วัตต์ เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำ 3 การทดลอง
- (4) กรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman® No. 1 หนึ่งรอบ และระเหยสารให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- (5) บันทึกน้ำหนักผลผลิต และคำนวณร้อยละผลผลิต

3.3.2.3 การศึกษาผลของกำลังไมโครเวฟ

- (1) ชั่งน้ำหนักสาหร่ายผมนาง 10 กรัมใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
- (2) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร (อัตราส่วนตัวทำละลายต่อตัวถูกละลาย 9:1 มิลลิลิตรต่อกรัม)
- (3) ทำการสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ เปลี่ยนแปลงกำลังไมโครเวฟที่ใช้ คือ 100, 300, 450, 600 และ 800 วัตต์ เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำ 3 การทดลอง
- (4) กรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman[®] No. 1 ขนระร่อน และระเหยสารให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง
- (5) บันทึกน้ำหนักผลผลิต และคำนวณร้อยละผลผลิต

3.3.3 การทดลองเพื่อประเมินผลของปัจจัยโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design) ในการสกัดด้วยไมโครเวฟ

ทำการทดลองเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่สำคัญในการสกัดด้วยไมโครเวฟ คือ ระยะเวลา อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสาหร่ายผมนาง และกำลังไมโครเวฟ การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน ถูกกำหนดไว้ดังตารางที่ 3.1 การศึกษาระยะเวลาในการสกัดที่ 20, 30, และ 40 วินาที อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสาหร่ายผมนางที่อัตราส่วน 8.1, 9.1 และ 10.1 มิลลิลิตรต่อกรัม และกำลังไมโครเวฟถูกกำหนดที่ 300, 450 และ 600 วัตต์ ซึ่งถูกกำหนดไว้ที่ค่าระดับ ต่ำ (-1) กลาง (0) และสูง (+1) จากนั้นทำการทดสอบและติดตามผลการทดลองที่ร้อยละผลผลิตในการสกัด และปริมาณซัลเฟต วิเคราะห์ผลโดยใช้ Design-Expert[®] v. 11 (Stat-Ease, Inc., USA) จากนั้นทำการรายงานพื้นที่ผิวการตอบสนอง (Response surface Methodology, RSM) โดยการวิเคราะห์และคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร สามารถหาได้จากค่า regression model จาก $y = \text{constant} + a(A) + b(B) + c(C) + d(AB) + e(AC) + f(BC) + g(A^2) + h(B^2) + i(C^2)$ และรายงานความสัมพันธ์ที่ได้โดยพิจารณาจากค่า R^2 เพื่อบ่งบอกถึงความเหมาะสมของแบบจำลองที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ตารางที่ 3.1 ปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพร้อยละผลผลิตของ
สาหร่ายพม nang ด้วยวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ

Std. order	Run	Coded value			Uncoded value		
		Microwave time (s)	Solvent- to-solid ratio (mL/g)	Microwave power (W)	Microwave time (s)	Solvent- to-solid ratio (mL/g)	Microwave power (W)
7	1	-1	0	+1	20	9:1	600
13	2	0	0	0	30	9:1	450
11	3	0	-1	+1	30	8:1	600
9	4	0	-1	-1	30	8:1	300
3	5	-1	+1	0	20	10:1	450
15	6	0	0	0	30	9:1	450
16	7	0	0	0	30	9:1	450
12	8	0	+1	+1	30	10:1	600
6	9	+1	0	-1	40	9:1	300
8	10	+1	0	+1	40	9:1	600
14	11	0	0	0	30	9:1	450
4	12	+1	+1	0	40	10:1	450
5	13	-1	0	-1	20	9:1	300
10	14	0	+1	-1	30	10:1	300
1	15	-1	-1	0	20	8:1	450
17	16	0	0	0	30	9:1	450
2	17	+1	-1	0	40	8:1	450

3.3.4 การทดลองเพื่อประเมินผลของปัจจัยโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ บ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design) ในการสกัดด้วยอัลตราโซนิค

ทำการทดลองเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่สำคัญในการสกัดด้วยอัลตราโซนิค คือ
ระยะเวลา อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสาหร่ายพม nang และคลื่นเสียงความถี่สูง การออกแบบการ

ทดลองบ็อกซ์-เบห์นเคน ถูกกำหนดไว้ดังตารางที่ 3.2 การศึกษาระยะเวลาในการสกัดที่ 20, 40, และ 60 นาที อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสาหร่ายพมวงที่อัตราส่วน 5.1, 10.1 และ 15.1 มิลลิตรต่อกรัม และคลื่นเสียงความถี่สูงถูกกำหนดที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งถูกกำหนดไว้ที่ค่าระดับ ต่ำ (-1) กลาง (0) และ สูง (+1) จากนั้นทำการทดสอบและติดตามผลการทดลองที่ร้อยละผลผลิตในการสกัด และปริมาณ ซัลเฟต วิเคราะห์ผลโดยใช้ Design-Expert[®] v. 11 (Stat-Ease, Inc., USA) จากนั้นทำการรายงานพื้นที่ ผิวการตอบสนอง (Response surface Methodology, RSM) โดยการวิเคราะห์และคำนวณ ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร สามารถหาได้จากค่า regression model จาก $y = \text{constant} + a(A) + b(B) + c(C) + d(AB) + e(AC) + f(BC) + g(A^2) + h(B^2) + i(C^2)$ และรายงานความสัมพันธ์ที่ได้โดยพิจารณา จากค่า R^2 เพื่อบ่งบอกถึงความเหมาะสมของแบบจำลองที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ตารางที่ 3.2 ปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพร้อยละผลผลิตของ สาหร่ายพมวง ด้วยวิธีการสกัดด้วยอัลตราโซนิก

Std. order	Run	Coded value			Uncoded value		
		Ultrasonic time (min)	Solvent-to-solid ratio (mL/g)	Ultrasonic power*	Ultrasonic time (min)	Solvent-to-solid ratio (mL/g)	Ultrasonic power*
13	1	0	0	0	40	10	2
5	2	-1	0	-1	20	10	1
4	3	+1	+1	0	60	15	2
9	4	0	-1	-1	40	5	1
10	5	0	+1	-1	40	15	1
12	6	0	+1	+1	40	15	3
7	7	-1	0	+1	20	10	3
15	8	0	0	0	40	10	2
3	9	-1	+1	0	20	15	2
17	10	0	0	0	40	10	2
1	11	-1	-1	0	20	5	2
2	12	+1	-1	0	60	5	2

ตารางที่ 3.2 ปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพร้อยละผลผลิตของสารหายผมนาง ด้วยวิธีการสกัดด้วยอัลตราโซนิก (ต่อ)

Std. orfer	Run	Coded value			Uncoded value		
		Ultrasonic time (min)	Solvent-to-solid ratio (mL/g)	Ultrasonic power*	Ultrasonic time (min)	Solvent-to-solid ratio (mL/g)	Ultrasonic power*
16	13	0	0	0	40	10	2
8	14	+1	0	+1	60	10	3
11	15	0	-1	+1	40	5	3
6	16	+1	0	-1	60	10	1
14	17	0	0	0	40	10	2

* 1=ต่ำ, 2=กลาง, 3=สูง

3.3.5 การเพิ่มประสิทธิภาพ และการพิสูจน์ข้อเท็จจริง

สถานะที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้วิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ และอัลตราโซนิก ถูกนำข้อมูลของร้อยละผลผลิต และปริมาณซัลเฟต ไปทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Design expert version 11 เพื่อสร้าง contour plot, Perturbation plot และ Predicted vs. Actual plot ทำการรายงานสถิติ ANOVA จากนั้นทำการคัดเลือกสถานะการสกัดที่ดีที่สุด โดยใช้ Desirability function โดยกำหนดให้ร้อยละผลผลิตปริมาณซัลเฟตที่สูงที่สุด มาทำการสกัดสถานะที่ดีที่สุดซ้ำอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องของการทำนาย (n=3) เพื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองจริง เพื่อนำข้อมูลมาคำนวณค่าร้อยละความคลาดเคลื่อน

สูตรหาค่าร้อยละความคลาดเคลื่อน

ร้อยละความคลาดเคลื่อน = (ค่าจากการทดลอง – ค่าจากการพยากรณ์) x 100/ ค่าจากการทดลอง

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต โดยวิธี sulfate turbidity assay (พิชญุตม์ ศรีใส, 2563)

3.4.1 เตรียมสารละลาย sulfate turbidity conditioning reagent โดยตวงกลีเซอริน 100 มิลลิลิตร เติมน้ำไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 100 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติมน้ำไฮโปฟอสฟอรัส 200 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 150 กรัม ปั่นบนเครื่องกวนสารแม่เหล็กจนกระทั่งเป็นสารละลาย เติมน้ำ 600 มิลลิลิตร และปั่นอีก 24 ชั่วโมง

3.4.2 เตรียมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ในน้ำ

3.4.3 เติมน้ำ 4 M ไฮโดรคลอริก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (เพื่อย่อยสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์) จากนั้นต้มเคี่ยวเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.4.4 นำสารละลายที่ย่อยแล้วใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร เติมน้ำ sulfate turbidity conditioning reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.4.5 เติมน้ำเบเรียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 6 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 3 การทดลอง

3.4.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ความยาวคลื่น 420 nm

3.4.7 คำนวณหาปริมาณซัลเฟตจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารละลายโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และรายงานผลในหน่วย ไมโครกรัม/ 10 มิลลิกรัมของสารสกัดหยาบ

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu (Wojdyło, Oszmiański, & Czemerys, 2007)

3.5.1 เตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบสำหรับหาน้ำหนักที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในเมทานอล

3.5.2 นำตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu 2 มิลลิลิตร

3.5.3 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมน้ำโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 20 (Na_2CO_3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันและทำการเก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำ 3 การทดลอง

3.5.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer)

3.5.5 ใช้กรดแกลลิก (gallic acid) ในเมทานอลความเข้มข้นของ 20, 40, 60, 80, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน

3.5.5 จำนวนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดโดยใช้กราฟเส้นตรงของกรดแกลลิก และแสดงเป็นมิลลิกรัมของแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดหยาบ (mg gallic acid equivalent/g extract)

3.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity)

3.6.1 DPPH Assay (ปรับปรุงวิธีมาจาก Baluchamy & Subramanian, 2023)

3.6.1.1 เตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบสำหรับพมณางที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.6.1.2 ปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 mM DPPH ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 การทดลอง

3.6.1.3 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

3.6.1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer)

3.6.1.5 ใช้วิตามินซีที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน จำนวนร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ} = [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{sample}}) \times 100] / Abs_{\text{control}}$$

โดย Abs_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม
(สารละลาย DPPH ในเมทานอล)

Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

3.6.1.6 นำร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ไปสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ จากนั้นทำการคำนวณหาค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรง

3.6.2 ABTS assay (ปรับปรุงวิธีมาจาก Dudonne, Vitrac, Coutiere, Woillez, & Merillon, 2009)

3.6.2.1 เตรียมสารละลาย ABTS โดย ผสม 7 mM 2,2-azobis (3-ethylbenzothialso line-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) กับ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 2.45 mM

3.6.2.2 เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.6.2.3 นำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วยเอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.700 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 nm

3.6.2.4 เตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบสำหรับพบนางที่ความเข้มข้น 1-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล

3.6.2.5 นำสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS⁺⁺ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำ 3 การทดลอง

3.6.2.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer)

3.6.2.7 ใช้วิตามินซีที่ความเข้มข้น 1-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน คำนวณร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS โดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ} = [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{sample}}) \times 100] / Abs_{\text{control}}$$

โดย Abs_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม (สารละลาย ABTS⁺⁺ ในเอทานอล)

Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

3.6.2.8 นำร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ไปสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ จากนั้นทำการคำนวณหา IC_{50} จากสมการเส้นตรง

3.7 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Agar Well Diffusion Method)

3.7.1 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

- 1) *Staphylococcus aureus* (ATCC25923)
- 2) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228)
- 3) *Streptococcus pyogenes* (ATCC19615)

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

- 1) *Escherichia coli* (ATCC25922)
- 2) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853)

3.7.2 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.7.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

- (1) ชั่ง Tryptic Soy Broth (TSB) 15 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำ 500 มิลลิลิตร
- (2) นำไปใส่ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เป็นระยะเวลา 30 นาที
- (3) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3.7.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น

- (1) ชั่ง Tryptic Soy Agar (TSA) 40 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำ 1,000

มิลลิลิตร

- (2) นำไปใส่ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เป็นระยะเวลา 30 นาที
- (3) ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่น และเทอาหารลงในเพลท
- (4) ตั้งให้อาหารชนิดวุ้นแข็งตัว และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3.7.3 วิธีเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

3.7.3.1 ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) 3 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลอง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ต้องการทดสอบใส่ลงไปในหลอดทดลอง

3.7.3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.3.3 นำสารละลายของเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาปรับความขุ่นให้ได้เทียบเท่ากับ 0.5 McFarland's standard

3.7.3.4 นำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วมาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น โดยใช้สำลีพันปลายไม้

3.7.3.5 เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นทำการเจาะหลุมโดยใช้ cork borer No.4

3.7.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Baluchamy & Subramanian, 2023)

3.7.4.1 เตรียมสารตัวอย่างหยาบ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำ

3.7.4.2 ปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่เตรียมไว้ ทำซ้ำ 3 การทดลอง

3.7.4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.4.5 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสที่เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญเติบโต โดยใช้เวอร์เนีย (Vernier caliper)

3.7.4.6 ใช้แผ่นยา ciprofloxacin ขนาด 5 ไมโครกรัม เป็นสารมาตรฐาน

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มหรือมากกว่า 2 กลุ่มการทดลอง จะทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี one-way ANOVA และตามด้วยการวิเคราะห์ post hoc ด้วย Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics 22.0 (IBM, New York, USA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p\text{-value} < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาวิธีการสกัด

4.1.1 การคัดเลือกตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

การเลือกใช้ตัวทำละลายที่ดีในการสกัดเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการสกัดสารอย่างมีประสิทธิภาพ (Kuda & Ikemori, 2009) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงต้องการศึกษาประสิทธิภาพการสกัดสารรายผสมด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน 3 ชนิด คือ เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 และน้ำ ใช้ระยะเวลาในการสกัดที่ 1 และ 2 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิในการสกัดที่ 50 องศาเซลเซียส เพื่อหาตัวทำละลายที่จะให้ปริมาณร้อยละผลผลิต และปริมาณซัลเฟตสูงที่สุด

พบว่า การสกัดด้วยน้ำที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ให้ร้อยละของสารสกัดหายามากที่สุด ที่ร้อยละ 7.20 ± 0.99 ของน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ การสกัดด้วยน้ำที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง ให้ร้อยละของสารสกัดหายาที่ร้อยละ 5.19 ± 0.51 ของน้ำหนักแห้ง ส่วนการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่ระยะเวลา 2 และ 1 ชั่วโมง ให้ร้อยละของผลผลิต คือ 4.21 ± 0.95 , 3.67 ± 0.59 ตามลำดับ และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ที่ระยะเวลา 2 และ 1 ชั่วโมง ให้ร้อยละของผลผลิต คือ 2.97 ± 0.14 และ 2.32 ± 0.10 ตามลำดับ โดยวิธีการสกัดสารรายผสมด้วยน้ำให้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดมากกว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย เนื่องจากน้ำมีความมีขั้วสูง (ค่าไดโพลอิเล็กทริก 80) ซึ่งสูงกว่าเอทานอลที่มีค่าไดโพลอิเล็กทริก 24 ที่แสดงความมีขั้วที่น้อยกว่าน้ำจึงส่งผลให้น้ำตาลอิสระสามารถละลายในน้ำได้ดีกว่า และพบว่า การสกัดที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ให้ร้อยละผลผลิตดีที่สุด ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า (นพรัตน์ มะเห และคณะ, 2553)

ตารางที่ 4.1 ร้อยละผลผลิตและปริมาณซัลเฟตของสารสกัดภายใต้สภาวะการสกัดที่แตกต่างกัน

ตัวทำละลาย	เวลาในการสกัด	ร้อยละผลผลิต	ปริมาณซัลเฟต
ความเข้มข้น	(ชั่วโมง)		($\mu\text{g}/10\text{ mg}$)
เอทานอลร้อยละ 80	1	2.32 ± 0.10^a	155.86 ± 0.34^a
เอทานอลร้อยละ 80	2	$2.97 \pm 0.14^{a,b}$	167.43 ± 4.17^b
เอทานอลร้อยละ 20	1	3.67 ± 0.59^c	181.94 ± 2.56^c
เอทานอลร้อยละ 20	2	$4.21 \pm 0.59^{a,c}$	196.06 ± 1.02^d
น้ำ	1	5.19 ± 0.51^b	203.31 ± 7.83^c
น้ำ	2	7.20 ± 0.99^d	215.86 ± 2.67^f

"a-f" หมายถึง ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี one-way ANOVA และตามด้วยการวิเคราะห์ post hoc ด้วย Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p\text{-value} < 0.05$)

4.1.2 ปริมาณซัลเฟต

การวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตในสารสกัดสำหรับยารักษาโรค ใช้วิธีการตรวจวัดความขุ่นของซัลเฟต เมื่อทำปฏิกิริยากับ sulfate turbidity conditioning reagent โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมซัลเฟต พบว่าสารสกัดหยาบสำหรับยารักษาโรคที่ได้จากการสกัดทั้ง 6 สภาวะ มีปริมาณของซัลเฟตในปริมาณที่แตกต่างกันออกไป โดยจากผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยน้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีปริมาณซัลเฟตสูงสุดอยู่ที่ 215.86 ± 2.07 ไมโครกรัมต่อ 10 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นการสกัดด้วยตัวทำละลายมีขั้วสูงสุด และระยะเวลาการสกัดที่สั้นที่สุด รองลงมาคือ การสกัดด้วยน้ำที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง มีปริมาณซัลเฟต 203.314 ± 7.83 ไมโครกรัมต่อ 10 มิลลิกรัม ส่วนสารสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่ระยะเวลา 2 และ 1 ชั่วโมง มีปริมาณซัลเฟต 196.06 ± 1.018 , 181.941 ± 2.55 ไมโครกรัมต่อ 10 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งลดความมีขั้วของตัวทำละลายลง และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ที่มีขั้วต่ำสุด ที่ระยะเวลา 2 และ 1 ชั่วโมง พบปริมาณซัลเฟต 167.431 ± 4.17 และ 155.863 ± 0.34 ไมโครกรัมต่อ 10 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของความมีขั้วของตัวทำละลายและระยะเวลาการสกัดต่อปริมาณซัลเฟตที่ได้ ดังจะเห็นได้ว่าน้ำมีความสามารถในการละลายซัลเฟตมากกว่า เนื่องจากลักษณะของไอออนลบของซัลเฟตที่ส่งเสริมให้เกิดปฏิกิริยากับน้ำได้ดี ในทางกลับกันเมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายละลายความสามารถในการละลายซัลเฟตลดลง ลักษณะของความมีขั้วของเอทานอลที่เป็นตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว ส่งผลให้เกิดการละลายซัลเฟตใน

สารห่วยผสมนางได้ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Imjongjairak et al., 2015) ซึ่งพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นให้กับตัวทำละลายส่งผลต่อปริมาณของซัลเฟตที่ได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ผลการทดลองยังสามารถสรุปได้ว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาการสกัดส่งผลให้ปริมาณซัลเฟตเพิ่มขึ้นด้วย

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

การวิเคราะห์ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด ใช้วิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งมีกรดแกลลิกเป็นสารละลายมาตรฐาน โดยการศึกษาจะทำการเปรียบเทียบสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดทั้ง 6 สภาวะ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบสารห่วยผสมนาง

สารประกอบ	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GA/g extract)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	
			DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	ABTS (µg/mL)
ความเข้มข้น				
เอทานอลร้อยละ 80	1	1.57±0.03 ^a	16.09±0.05 ^a	61.33±0.82 ^a
เอทานอลร้อยละ 80	2	1.82±0.05 ^b	15.56±0.32 ^b	59.24±0.34 ^a
เอทานอลร้อยละ 20	1	1.85±0.04 ^b	15.52±0.15 ^b	56.43±3.07 ^b
เอทานอลร้อยละ 20	2	2.00±0.05 ^c	14.96±0.10 ^c	54.78±2.55 ^b
น้ำ	1	2.38±0.14 ^d	8.23±0.20 ^d	46.05±0.69 ^c
น้ำ	2	2.55±0.08 ^c	8.06±0.10 ^c	44.49±0.07 ^c
วิตามินซี		NA	4.75±0.05 ^f	31.75±0.22 ^d

"a-f" หมายถึง ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี one-way ANOVA และตามด้วยการวิเคราะห์ post hoc ด้วย Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p-value < 0.05)

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบสารห่วยผสมนางทั้ง 6 สภาวะ คำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกดังต่อไปนี้ $y = 0.06x + 0.1109$ และแสดงไว้ใน

ตารางที่ 4.2 จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบสาหร่ายผมนางที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง เป็นสารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (2.55 ± 0.08 mg GA/g extract) อันดับที่ 2 คือ สารสกัดหยาบด้วยน้ำที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง (2.38 ± 0.14 mg GA/g extract) ตามด้วยสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่ระยะเวลา 2 และ 1 ชั่วโมง (2.00 ± 0.05 และ 1.85 ± 0.04 mg GA/g extract) ตามลำดับ และสารสกัดหยาบที่มีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุดคือ สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ที่ระยะเวลา 2 และ 1 ชั่วโมง (1.82 ± 0.05 mg GA/g extract และ 1.57 ± 0.03 mg GA/g extract) ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่พบมีความสัมพันธ์กับชนิดตัวทำละลายและเวลาในการสกัด ซึ่งแสดงถึงความสำคัญในการเลือกตัวทำละลายและเวลาในการสกัดสาหร่ายผมนางที่เหมาะสม

4.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีการทดสอบด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Activity และวิธี ABTS radical scavenging activity แสดงผลด้วยค่า IC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 4.2

4.3.1 DPPH Radical Scavenging Activity

การทดสอบ DPPH radical scavenging activity test ใช้ DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระ โดยสารละลาย DPPH มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบสาหร่ายผมนาง แสดงผลในตารางที่ 4.2 จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงสุด โดยมีค่า IC_{50} น้อยที่สุด เท่ากับ 8.06 ± 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยการสกัดด้วยน้ำที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง เท่ากับ 8.23 ± 0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่ระยะเวลา 2 และ 1 ชั่วโมง โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 14.96 ± 0.10 , 15.52 ± 0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ที่

ระยะเวลา 2 และ 1 ชั่วโมง โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 15.56 ± 0.32 และ 16.09 ± 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลของร้อยละผลผลิต และปริมาณซัลเฟต คือ การสกัด น้ำดีที่สุกตามด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และ ระยะเวลาในการสกัด 2 ชั่วโมงดีกว่า 1 ชั่วโมง

4.3.2 ABTS Radical Scavenging Activity

วิธี ABTS Radical Scavenging Activity ใช้สาร 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diazonium salt (ABTS) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารอนุมูลอิสระ โดยสาร ABTS จะถูกทำให้อยู่ในรูปของสารอนุมูลอิสระที่มีประจุบวก $ABTS^{+\bullet}$ (Free radical cation) ซึ่งให้สีเขียวแกมฟ้า เมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะได้สารละลายที่มีสีอ่อนลง ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบสำหรับพมนางแสดงผลในตารางที่ 4.2 พบว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 44.49 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 46.05 ± 0.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่ระยะเวลา 2 และ 1 ชั่วโมง โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 54.78 ± 2.55 , 56.43 ± 3.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ที่ระยะเวลา 2 และ 1 ชั่วโมง โดย IC_{50} เท่ากับ 59.24 ± 0.34 และ 61.33 ± 0.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบทั้ง 6 สภาวะ ด้วยวิธีการ ABTS มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณซัลเฟต ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และผลของการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแปรผันตรงกับปริมาณฟีนอลิก และปริมาณซัลเฟต ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Costa et al. (2010), Nagahawatta et al. (2023) และ Wang et al. (2009) ซึ่งการมีกลุ่มซัลเฟตในปริมาณมากกระจายตัวอยู่ในซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ จะมีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากกลุ่มซัลเฟตสามารถกระตุ้นอะตอมของไฮโดรเจนของคาร์บอนได้ ซึ่งส่งผลต่อการให้อะตอมของไฮโดรเจนที่ดี (Wang et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตามส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น น้ำหนักโมเลกุลของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ เม็ดสี

และโปรตีน ที่พบในสาหร่ายก็อาจส่งผลต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกัน (Devi et al., 2008) นอกจากนี้กลุ่มซัลเฟตยังมีบทบาทสำคัญในการกำหนดโครงสร้างทางเคมีของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้โครงสร้างเสถียร และทนต่อการสลายตัวมากขึ้น ด้วยการรักษาคุณสมบัติต้านออกซิเดชันขององค์ประกอบเหล่านี้เอาไว้ (Qiu et al., 2022)

4.4 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

การประเมินคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบทั้ง 6 สภาวะ ใช้วิธี agar well diffusion method พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่ายพม nang ที่สกัดด้วยน้ำเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อสายแกรมบวกที่ทดสอบได้ 2 เชื้อ คือ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ด้วยเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้งมีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 16.28 ± 4.75 มิลลิเมตร และ 15.33 ± 3.27 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลของการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบทั้ง 6 สภาวะ ด้วยวิธี agar well diffusion method

ตัวอย่าง	ขนาดเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้ง (mm)									
	แกรมบวก					แกรมลบ				
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. pyogenes</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
เอทานอล ร้อยละ 80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
เอทานอล ร้อยละ 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
น้ำ	0	16.28 ± 4.75	0	15.33 ± 3.27	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin	20.47 ± 0.70		30.91 ± 0.80		16.88 ± 0.58		20.43 ± 0.35		0	

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบสาหร่ายพม nang อาจมาจากกลุ่มซัลเฟตซึ่งมีลักษณะที่สามารถทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์แกรมบวก

มีผลให้เกิดความไม่สมบูรณ์ของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียและนำไปสู่การลดความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* (Huang, Shen, Morris, & Xie, 2019) ในขณะที่สารสกัดจากสาหร่ายพม nang ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเชื้อสายแกรมลบ เช่น *E. coli* และ *P. aeruginosa* ซึ่งอาจเกิดจากชั้นไขมันภายนอกผนังเซลล์ที่กีดขวางการเข้าถึงของสารไปสู่เซลล์ (Huang et al., 2019) เนื่องจากสารสกัดหยาบสาหร่ายพม nang สามารถละลายได้ดีในชั้นของน้ำ จึงส่งผลให้ไม่สามารถผ่านชั้นไขมันของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ จึงทำให้ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบได้ โดยผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับการวิจัยที่ดำเนินการโดย Kim et al. (2007) ที่ได้รายงานว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่ายแดง (*Ulva lactuca*) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* และ *S. aureus*

ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองทั้งหมด คือ ร้อยละผลผลิตที่ได้จากการสกัด ปริมาณซัลเฟต ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดหยาบสาหร่ายพม nang สกัดด้วยน้ำ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ผลดีที่สุดในการทดสอบ ดังนั้นจึงคัดเลือกน้ำเป็นตัวทำละลายในการทดลองต่อไป เพื่อที่จะพัฒนาวิธีการสกัดเพิ่มเติม โดยจะทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ และ คลื่นเสียงความถี่สูง และทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อเลือกกระดับตัวแปรไปใช้โดยใช้วิธี OFAT เพื่อเปรียบเทียบปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 3 ปัจจัย คือ ระยะเวลาในการสกัด อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อสาหร่ายพม nang และกำลังไมโครเวฟ

4.5 การศึกษาการสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ (Microwave-Assisted-Extraction, MAE) ด้วยวิธี OFAT

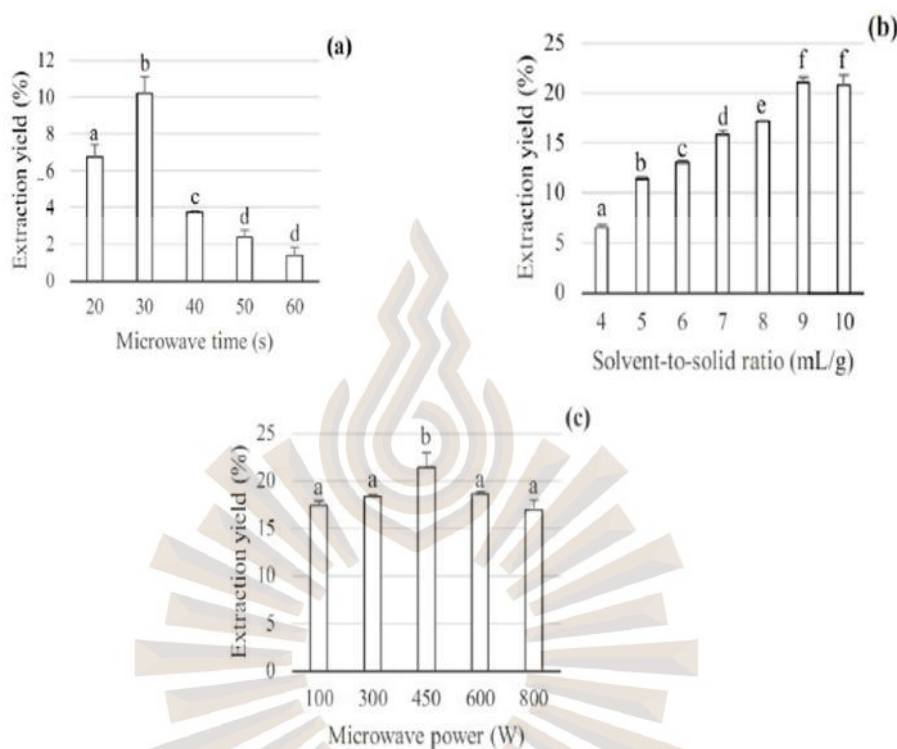
การทดสอบเบื้องต้นเพื่อเลือกกระดับตัวแปร โดยใช้วิธี OFAT ซึ่งให้ความสำคัญกับตัวแปรที่มีผลต่อปริมาณซัลเฟตที่ได้ เช่น ระยะเวลาในการสกัด อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อสาหร่ายพม nang และกำลังไมโครเวฟ ซึ่งจะพิจารณาจากค่าร้อยละผลผลิตจากกระบวนการสกัดที่ได้จากการใช้วิธี OFAT ด้วยระดับต่าง ๆ ของปัจจัย (แสดงในรูปที่ 4.1) เมื่ออัตราส่วนของน้ำต่อสาหร่ายพม nang ถูกกำหนดไว้ที่ 5:1 มิลลิลิตรต่อกรัม และกำลังไมโครเวฟที่ใช้เท่ากับ 450 วัตต์ พบว่าการเพิ่มระยะเวลาในสกัดจาก 20 วินาทีเป็น 30 วินาที ส่งผลให้ปริมาณร้อยละผลผลิตเพิ่มจากร้อยละ 6.73 ± 0.69 เป็นร้อยละ 10.19 ± 0.90 และเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในทางกลับกันการเพิ่ม

ระยะเวลาในการสกัดเพิ่มเติมหลังจาก 30 วินาที ไปยัง 60 วินาที ทำให้ปริมาณร้อยละผลผลิตลดลงจากร้อยละ 10.19 ± 0.90 เป็นร้อยละ 1.03 ± 0.44 ซึ่งส่งผลให้ปริมาณร้อยละผลผลิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 4.1a ดังนั้น ที่ระยะเวลา 30 วินาทีคือระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสมที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสารหยาบผง และกำลังไมโครเวฟต่อไป

เมื่อระยะเวลาในการสกัดถูกกำหนดไว้ที่ 30 วินาที กำลังไมโครเวฟถูกกำหนดไว้ที่ 450 วัตต์ พบว่า การเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสารหยาบผงมีแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงปริมาณร้อยละผลผลิตอย่างชัดเจน คือ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผงจาก 4:1 เป็น อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผงจาก 9:1 ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้จากวัตถุดิบได้มากขึ้นจากร้อยละ 6.51 ± 0.356 เป็นร้อยละ 21.06 ± 0.572 ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผงจาก 9:1 เป็นอัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผงจาก 10:1 ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้จากวัตถุดิบได้ลดลงจากร้อยละ 21.06 ± 0.572 เป็นร้อยละ 20.79 ± 0.1001 ซึ่งมีความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ปรากฏการณ์นี้สามารถอธิบายได้ว่าเป็นการเพิ่มความแตกต่างของความเข้มข้นที่เกิดขึ้นโดยการเพิ่มปริมาณของตัวทำละลาย จะส่งผลให้กระบวนการเคลื่อนที่ของมวลสารสูงขึ้น โอกาสในการชนกันระหว่างสารและอนุภาคของตัวทำละลายสูงขึ้น จึงทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Hibbert, Welham, & Zein, 2019) ดังนั้น จากรูปที่ 4.1b แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารสกัดเพิ่มขึ้นเมื่อมีอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสารหยาบผงเพิ่มขึ้น โดยมีค่าสูงสุดที่อัตราส่วน 9:1 มิลลิลิตรต่อกรัม พบว่าผลการวิจัยนี้แตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษา โดยที่ให้ผลของอัตราส่วน 35:1 หรือ 50:1 ตัวทำละลายต่อตัวถูกละลาย ให้ผลลัพธ์การสกัดสูงสุดโดยใช้เทคนิคการต้ม (Rormwong et al., 2023) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ปริมาณของตัวทำละลายที่มากกว่าผลการทดลองที่ได้จากการสกัดที่ใช้เทคนิค MAE ที่ใช้ปริมาณของสารตัวอย่างที่น้อยกว่า

เมื่อระยะเวลาในการสกัดถูกกำหนดไว้ที่ 30 วินาที อัตราส่วนของน้ำต่อสารหยาบผงถูกกำหนดไว้ที่ 9:1 มิลลิลิตรต่อกรัม พบว่า การเพิ่มกำลังไมโครเวฟจาก 100 วัตต์ เป็น 450 วัตต์ ส่งผลให้ปริมาณร้อยละผลผลิตเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 17.39 ± 0.52 เป็นร้อยละ 21.46 ± 1.55 และเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในทางกลับกันการเพิ่มกำลังไมโครเวฟเพิ่มเติมหลังจาก 450 วัตต์เป็น 800 วัตต์ ทำให้ปริมาณร้อยละผลผลิตจากกระบวนการสกัดลดลงจากร้อยละ 21.46 ± 1.55 เป็นร้อยละ 16.92 ± 1.03

ซึ่งเป็นการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 4.1c ดังนั้น กำลังไมโครเวฟ 450 วัตต์ คือ กำลังไมโครเวฟในการสกัดที่เหมาะสมที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสาหร่ายพม nangต่อไป



รูปที่ 4.1 ร้อยละผลผลิตการสกัดที่ได้โดยใช้วิธี OFAT มีความแปรปรวนตามการเปลี่ยนแปลงใน

(a) ระยะเวลา (b) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสาหร่ายพม nang และ (c) กำลังไมโครเวฟ

ตัวอักษรที่แตกต่างกันเหนือกราฟแต่ละแท่งแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ

ทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี ANOVA แบบ one-way ANOVA

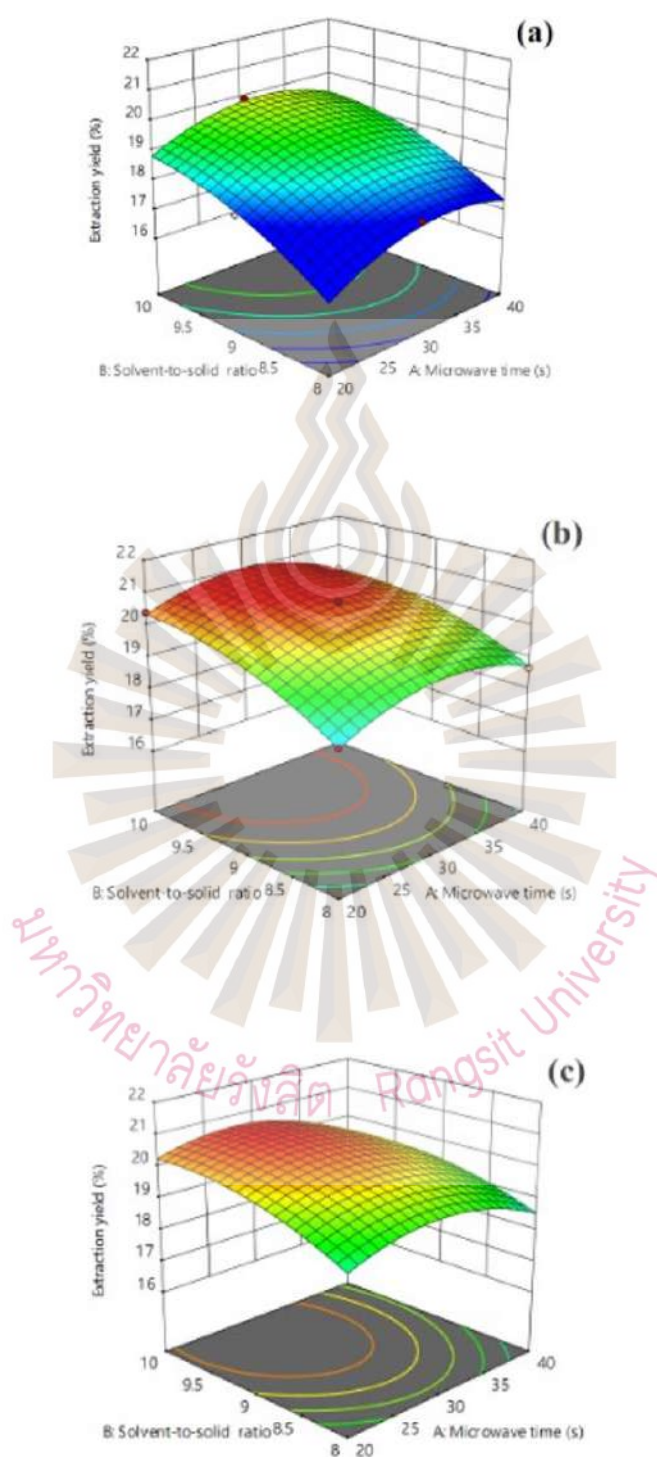
ด้วย Tukey's HSD post hoc analysis ($p < 0.05$)

เมื่อทำการเพิ่มระยะเวลาในการสกัดจะเพิ่มร้อยละผลผลิตการสกัดมากขึ้น เมื่อเพิ่มกำลังไมโครเวฟในการสกัด และระยะเวลาในการสกัด ทำให้เซลล์ของพืชบวมและเกิดการแตกตัวของเซลล์พืช และโครงสร้างเสียความสมดุลส่งผลให้เพิ่มปริมาณของร้อยละผลผลิตในการสกัด (Taqi, Farcot, Robinson, & Binner, 2020) อย่างไรก็ตาม การใช้ระยะเวลาที่สัมพัทธ์นานเกินไปในไมโครเวฟ และกำลังไมโครเวฟที่สูงอาจทำให้เกิดการเสื่อมสลายขององค์ประกอบที่ต้องการ ซึ่งส่งผลให้มีการลดปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ (Imjongrak et al., 2015) รูปที่ 4.1a และ 4.1c ปริมาณ

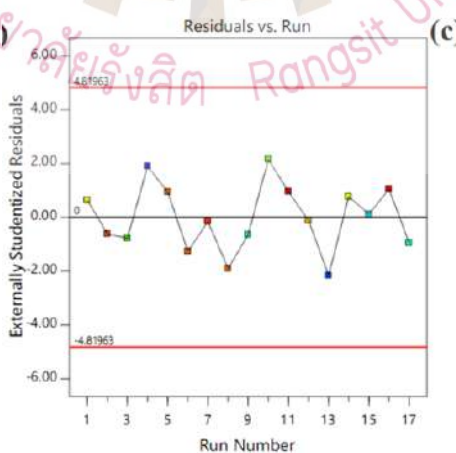
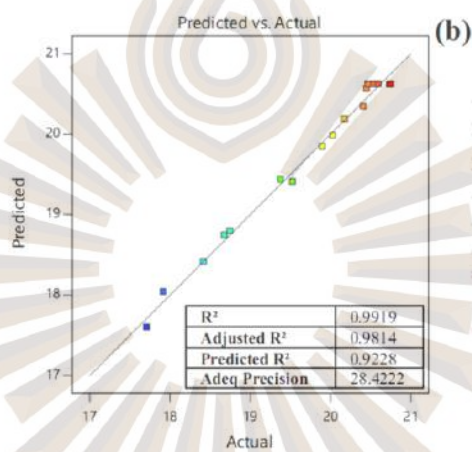
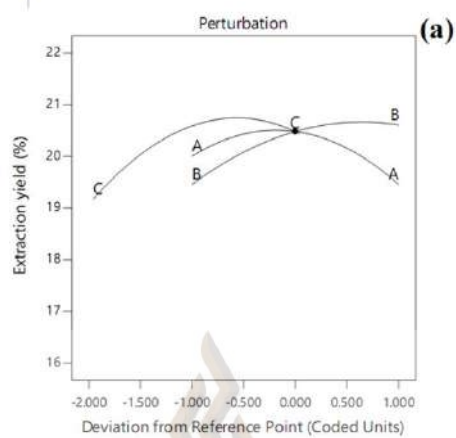
ร้อยละผลผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อกำลังไมโครเวฟเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิที่เกิดขึ้นจากการทดลอง อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะช่วยให้ความสามารถในการละลายและการกระจายตัวของอนุภาคในน้ำซึ่งทำให้เกิดการผลิตรายการเริ่มต้นมากขึ้น อย่างไรก็ตามแนวโน้มของปริมาณร้อยละผลผลิตจะกลับมามีผลลดลง เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นต่อไป โดยอุณหภูมิทำให้เกิดการขัดขวางของปฏิกิริยาระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์และกลุ่มแทนที่ เช่น กลุ่มซัลเฟตและกลุ่มเมทอกซิล ซึ่งมีผลต่อการลดปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ (Imjongjairak et al., 2016)

4.6 ผลของสถานะของการสกัดด้วยไมโครเวฟ (MAE) ต่อปริมาณร้อยละผลผลิตในการสกัดตามการออกแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน

ในขั้นตอนนี้เริ่มต้นทำการศึกษาด้วยวิธี OFAT เพื่อคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณการสกัดจากการสกัดด้วยไมโครเวฟ (MAE) หลังจากนั้นทำการพัฒนาวิธีการในการสกัดต่อไป โดยใช้การออกแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน โดยรวม 3 ปัจจัยที่ได้ทำการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ด้วยวิธี OFAT คือ ระยะเวลาในการสกัด (20, 30 และ 40 วินาที) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสารหยาบผง (8:1, 9:1 และ 10:1 มิลลิลิตรต่อกรัม) และกำลังไมโครเวฟ (300, 450 และ 600 วัตต์) และทำการกำหนดค่าตัวเลข ระดับต่ำ(-1) กลาง(0) และสูง(+1) ตามลำดับ รูปที่ 4.2 แสดงพื้นที่ผิวการตอบสนองที่แสดงปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดที่ได้ผ่านการออกแบบการทดลอง จากการวิเคราะห์และคำนวณความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปร พบว่า ทั้งระยะเวลาในการสกัด และกำลังไมโครเวฟมีค่าสูงสุดที่ระดับกลาง อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสารหยาบผงที่เหมาะสมที่สุดอยู่ระหว่างระดับกลางและสูง (รูปที่ 4.2 และ 4.3a) อีกทั้ง ค่า R^2 เท่ากับ 0.9919 ซึ่งมีค่าที่สูง แสดงให้เห็นถึงค่าที่ตรงกันระหว่างค่าที่ทำนายและค่าจริง ค่า predicted R^2 เท่ากับ 0.9228 ที่มีความใกล้เคียงกับค่า adjusted R^2 เท่ากับ 0.9814 โดยมีความแตกต่างน้อยกว่า 0.2 เป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องของโมเดล และ Adequate precision ซึ่งเป็นการวัดอัตราส่วนระหว่างสัญญาณและสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise) เกินกว่า 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเดลเป็นที่น่าเชื่อถือได้ (รูปที่ 4.3b) การตรวจสอบโดยการกระจายตัวของข้อมูลที่อยู่ภายใต้เส้นสีแดง โดยเทียบกับหมายเลขของการทดลอง ซึ่งยืนยันว่าข้อมูลมีการกระจายอย่างสุ่ม ภายในช่วงเส้นกำกับสีแดง (รูปที่ 4.3c) แสดงให้เห็นว่าข้อมูลทุกตัวกระจายภายในช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (Duangjit et al., 2012; Duangjit, Mehr, Kumpugdee-Vollrath, & Ngawhirunpat, 2014)



รูปที่ 4.2 พื้นผิวการตอบสนองของปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดเมื่อมีการใช้กำลังไมโครเวฟระดับต่าง ๆ: (a) 300 W, (b) 450 W, และ (c) 600 W



รูปที่ 4.3 กราฟ (a) perturbation (b) predicted vs actual values, and (c) externally studentized residuals vs. run number ของร้อยละผลผลิตสารสกัด

การวิเคราะห์ ANOVA ของข้อมูลร้อยละผลผลิตสารสกัดถูกนำมาเปรียบเทียบกับ โมเดลที่สร้างขึ้นเพื่อดูความสำคัญของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อร้อยละผลผลิตสารสกัด (ตารางที่ 4.2) พบว่า โมเดลที่ใช้วิเคราะห์มีความแตกต่างกันทางสถิติที่มีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$ การวิเคราะห์นี้พบว่าปัจจัยที่เลือกทั้งหมดมีอิทธิพลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ค่า lack of fit ที่ไม่มีนัยสำคัญ ยืนยันว่าค่าที่ทำนายจากโมเดลเข้ากับข้อมูลจริงที่ได้จากการทดลองอย่างเหมาะสม การตรวจสอบค่าในแต่ละตัวแปร เป็นที่ชัดเจนว่ามีปัจจัยส่วนใหญ่ที่มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำค่าระยะเวลาในการสกัด (A) อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผง (B) และกำลังไมโครเวฟ (C) มาทำการวิเคราะห์และคำนวณความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปร (regression model) เพื่อทำการหาค่า $y = \text{constant} + a(A) + b(B) + c(C) + d(AB) + e(AC) + f(BC) + g(A^2) + h(B^2) + i(C^2)$ พบว่า อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผง (B) และ กำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟ (C) มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิต อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ ระยะเวลาในการสกัด (A) มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิต อย่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำข้อมูลอันตรกิริยา (interaction) ระหว่าง 2 ตัวแปรมาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ระยะเวลาในการสกัดและกำลังไมโครเวฟ อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อสารหยาบผงและกำลังไมโครเวฟ มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ระยะเวลาในการสกัดและ อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อสารหยาบผง มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิต ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และส่วนสุดท้ายเมื่อนำข้อมูลของตัวแปรมายกกำลังสอง (quadratic) เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ทั้ง 3 ปัจจัยมีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.3 ANOVA สำหรับแบบจำลองค่าเชิงกำลังสอง (quadratic) ของปริมาณร้อยละผลผลิต

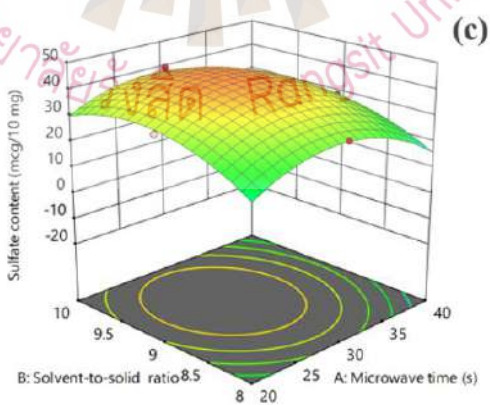
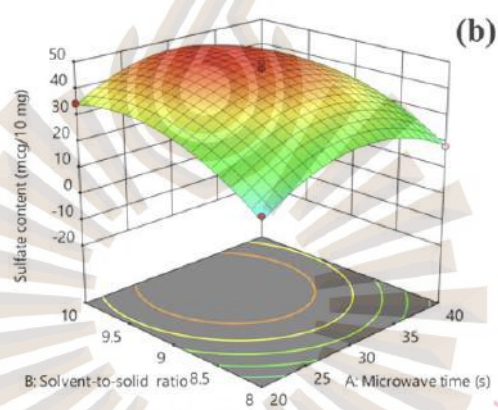
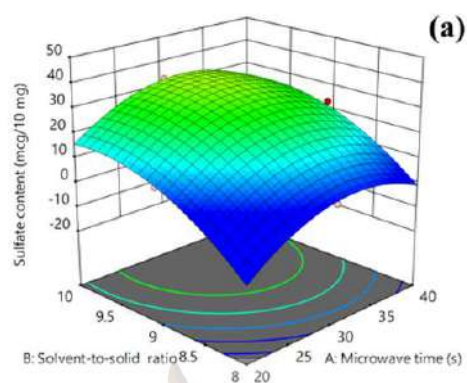
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	16.4300	9	1.8300	94.98	< 0.0001*
A-Microwave time	0.0162	1	0.0162	0.84	0.3892
B-Solvent-to-solid ratio	5.7000	1	5.7000	296.25	< 0.0001*
C-Power	3.2600	1	3.2600	169.78	< 0.0001*
AB	0.0600	1	0.0600	3.12	0.1206
AC	0.4422	1	0.4422	23.00	0.0020*
BC	0.3136	1	0.3136	16.31	0.0049*
A ²	2.3700	1	2.3700	123.19	< 0.0001*

ตารางที่ 4.3 ANOVA สำหรับแบบจำลองค่าเชิงกำลังสอง (quadratic) ของปริมาณร้อยละผลผลิต (ต่อ)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
B ²	0.8432	1	0.8432	43.86	0.0003*
C ²	2.7800	1	2.7800	144.58	< 0.0001*
Residual	0.1346	7	0.0192		
Lack of Fit	0.0740	3	0.0247	1.63	0.3172
Pure Error	0.0606	4	0.0152		
Cor Total	16.5700	16			

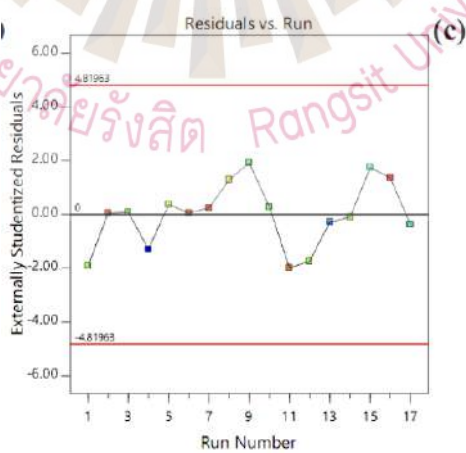
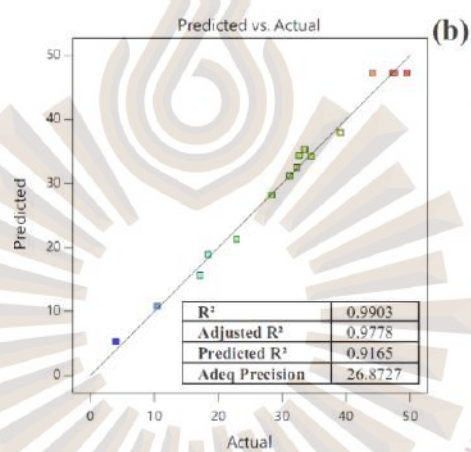
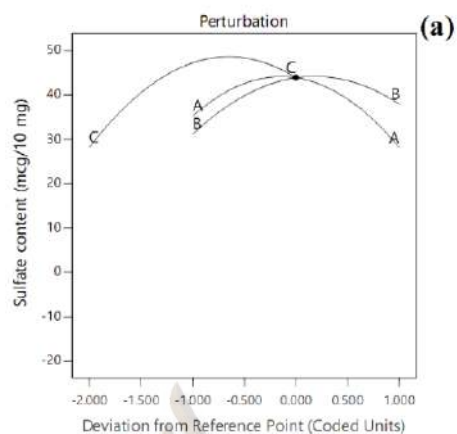
เครื่องหมาย (*) แสดงถึงค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

รูปที่ 4.4 แสดงพื้นผิวการตอบสนองที่แสดงปริมาณซัลเฟตที่ได้ผ่านการออกแบบการทดลอง ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันกับผลลัพธ์ของร้อยละผลผลิตจากการสกัดการวิเคราะห์ผล พบว่าค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับทั้งสามปัจจัย คือ ระยะเวลาในการสกัด และกำลังไมโครเวฟ โดยที่ทั้งสองปัจจัยแสดงค่าสูงสุดที่ระดับกลาง ในขณะที่อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสาหร่ายพมนาง แสดงค่าสูงสุดที่ระดับกลางและสูง (รูปที่ 4.4 และ 4.5a) ที่ค่า R² เท่ากับ 0.9903 ซึ่งมีค่าที่สูง แสดงให้เห็นถึงค่าที่ตรงกันระหว่างค่าที่ทำนายและค่าจริง ค่า predicted R² เท่ากับ 0.9165 ที่มีความใกล้เคียงกับค่า adjusted R² เท่ากับ 0.9778 โดยมีความแตกต่างน้อยกว่า 0.2 เป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องของโมเดล และ Adequate precision ซึ่งเป็นการวัดอัตราส่วนระหว่างสัญญาณและสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise) เกินกว่า 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเดลเป็นที่น่าเชื่อถือได้ (รูปที่ 4.5b) การตรวจสอบโดยการดูการกระจายของข้อมูลที่อยู่ภายใต้เส้นสีแดง โดยเทียบกับหมายเลขของการทดลอง ซึ่งยืนยันว่าข้อมูลมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ ในช่วงเส้นสีแดงที่กำหนด (รูปที่ 4.5c) แสดงให้เห็นว่าข้อมูลทุกตัวตั้งอยู่ภายในช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (Duangjit et al., 2012; Duangjit et al., 2014)



รูปที่ 4.4 พื้นผิวการตอบสนองของปริมาณซัลเฟตเมื่อมีการใช้กำลังไมโครเวฟระดับต่าง ๆ: (a) 300

W, (b) 450 W, และ (c) 600 W



รูปที่ 4.5 กราฟ (a) perturbation (b) predicted vs actual values, and (c) externally studentized residuals vs. run number ของปริมาณซัลเฟต

การวิเคราะห์ ANOVA ของข้อมูลปริมาณซัลเฟตถูกนำมาเปรียบเทียบกับโมเดลที่สร้างขึ้น เพื่อดูความสำคัญของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณซัลเฟต (ตารางที่ 4.4) พบว่ามีโมเดลที่ใช้วิเคราะห์มีความแตกต่างกันทางสถิติที่มีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$ การวิเคราะห์นี้พบว่าปัจจัยที่เลือกทั้งหมดมีอิทธิพลต่อปริมาณซัลเฟตอย่างมีนัยสำคัญโดยรวม นอกจากนี้ ค่า lack of fit ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยืนยันว่าค่าที่ทำนายจากโมเดลเข้ากับข้อมูลจริงที่ได้จากการทดลองอย่างเหมาะสม การตรวจสอบค่าในแต่ละตัวแปร เป็นที่ชัดเจนว่าปัจจัยส่วนใหญ่มีผลต่อปริมาณซัลเฟตอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำค่าระยะเวลาในการสกัด (A) อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผง (B) และ กำลังไมโครเวฟ (C) มาทำการวิเคราะห์และคำนวณความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปร (regression model) เพื่อทำการหาค่า $y = \text{constant} + a(A) + b(B) + c(C) + d(AB) + e(AC) + f(BC) + g(A^2) + h(B^2) + i(C^2)$ พบว่า อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผง (B) และกำลังไมโครเวฟ (C) มีผลต่อปริมาณซัลเฟตอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ระยะเวลาในการสกัด (A) มีผลต่อปริมาณซัลเฟตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่นำข้อมูลมาดูอันตรกิริยา (interaction) ระหว่าง 2 ตัวแปรมาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ระยะเวลาในการสกัดและไมโครเวฟ อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อสารหยาบผงและกำลังไมโครเวฟ มีผลต่อปริมาณซัลเฟตอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ระยะเวลาในการสกัดและอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อสารหยาบผง มีผลต่อปริมาณซัลเฟตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และส่วนสุดท้ายเมื่อนำข้อมูลของตัวแปรมายกกำลังสอง (quadratic) เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ทั้ง 3 ปัจจัยมีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.4 ANOVA สำหรับแบบจำลองกำลังสอง (quadratic) ของปริมาณซัลเฟต

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	2952.78	9	328.09	79.14	< 0.0001*
A-Microwave time	5.68	1	5.68	1.37	0.2799
B-Solvent-to-solid ratio	577.32	1	577.32	139.27	< 0.0001*
C-Microwave power	491.40	1	491.40	118.54	< 0.0001*
AB	2.48	1	2.48	0.60	0.4648
AC	76.69	1	76.69	18.50	0.0036*
BC	103.77	1	103.77	25.03	0.0016*
A ²	624.23	1	624.23	150.58	< 0.0001*

ตารางที่ 4.4 ANOVA สำหรับแบบจำลองค่าเชิงกำลังสอง (quadratic) ของปริมาณซัลเฟต (ต่อ)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
B ²	366.78	1	366.78	88.48	< 0.0001*
C ²	528.60	1	528.60	127.51	< 0.0001*
Residual	29.02	7	4.15		
Lack of Fit	14.10	3	4.70	1.26	0.4003
Pure Error	14.92	4	3.73		
Cor Total	2981.80	16			

เครื่องหมาย (*) แสดงถึงค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จากนั้นทำการเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทำนายเพื่อให้ได้ปริมาณของร้อยละผลผลิต และปริมาณซัลเฟตสูงที่สุด ซึ่งปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดที่ถูกเลือกมาจากการทำนายประกอบไปด้วยปัจจัยต่อไปนี้ คือ ระยะเวลาในการสกัด 30.32 วินาที อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อสารหยาบผง 9.42:1 มิลลิลิตรต่อกรัม และกำลังไมโครเวฟ 471.72 วัตต์ จะมีผลทำให้ได้ผลของปริมาณร้อยละผลผลิตสูงที่สุด และปริมาณซัลเฟตมากที่สุดได้ในเวลาเดียวกัน โดยที่ปัจจัยที่เลือกนี้มีค่าความพึงพอใจของสภาวะเท่ากับ 1.000 อย่างไรก็ตาม เพื่อให้เกิดความสะดวกในการทำการทดลองมากยิ่งขึ้น จึงได้ทำการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่เหมาะสมที่สุด โดยเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการสกัดเป็น 30 วินาที อัตราส่วนของตัวทำละลายและสารหยาบผงเป็น 9.5:1 มิลลิลิตรต่อกรัม และเนื่องจากมีข้อจำกัดในการตั้งค่าของไมโครเวฟจึงทำการปรับเปลี่ยนกำลังไมโครเวฟเป็น 450 วัตต์ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง (n=3) โดยเตรียมการทดลองโดยใช้วิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ และปรับการตั้งค่าสภาวะต่างๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้น เพื่อใช้ในการทดลองเพื่อหาปริมาณร้อยละผลผลิต และปริมาณซัลเฟต ผลการทดลองพบว่าค่าที่ได้จากการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ทำนายเอาไว้ โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนที่น้อยมากในช่วงร้อยละ 0-3.0 ในค่าร้อยละผลผลิต และร้อยละ 1.58-1.82 ในค่าปริมาณซัลเฟต เมื่อแสดงข้อมูลในชุดการทดลองทั้ง 3 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 4.5) ข้อมูลที่ได้นี้สามารถยืนยันว่าการทำนายโดย Design-Expert[®] ถูกต้องและเชื่อถือได้ โดยเทคนิคที่สกัดด้วยไมโครเวฟที่ใช้ในงานวิจัยไม่ใช่ว่าเพียงสามารถทำให้ได้ร้อยละผลผลิต และปริมาณซัลเฟตสูงเท่านั้น แต่เทคนิคการสกัดด้วยไมโครเวฟยังเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและใช้ระยะเวลาในการสกัดที่น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการต้มที่มีการรายงานมาจากรงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Imjongjairak et al., 2016; Rormwong et al., 2023; Sakaew et al., 2022;

Wongprasert et al., 2014) นอกจากนี้วิธีการนี้ช่วยลดระยะเวลาในการสกัดจากชั่วโมงเป็นวินาทีได้อีกด้วย

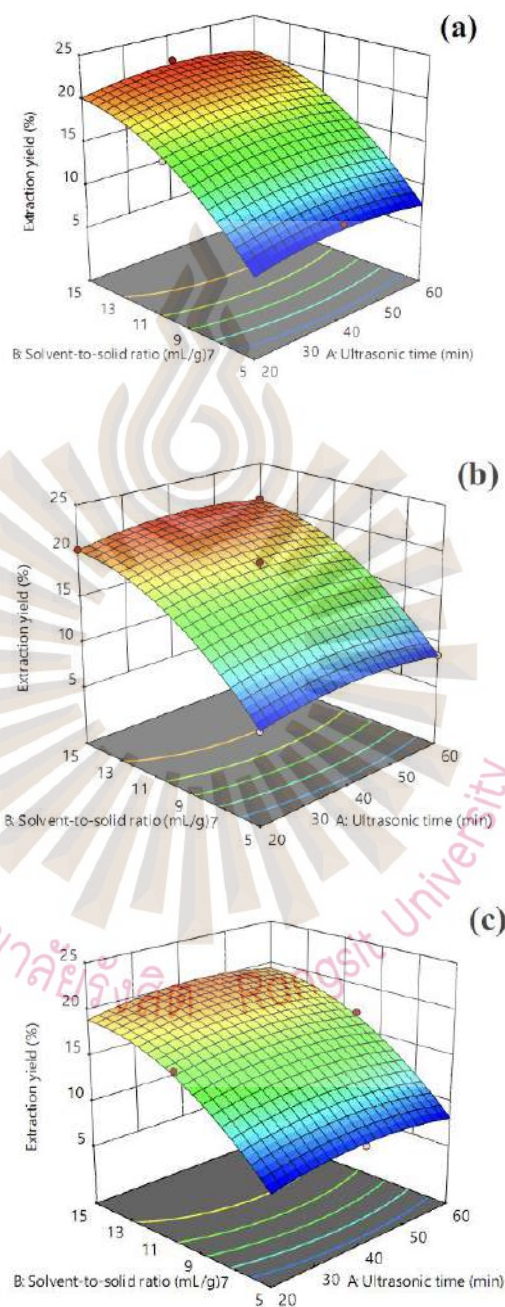
ตารางที่ 4.5 ค่าทำนาย (predicted value) ค่าทดลอง (experimental value) และร้อยละความคลาดเคลื่อน (percent error) ในการทำนาย สำหรับผลตอบสนองของปริมาณร้อยละผลผลิตและปริมาณซัลเฟต ด้วยวิธี MAE

Response	ค่าทำนาย	ชุด	ค่าการทดลอง (n = 3)	ความคลาดเคลื่อน (%)
ร้อยละผลผลิต (%)	20.93	1	20.93 ± 0.14	0.00
		2	20.32 ± 0.28	-3.00
		3	20.68 ± 0.28	-1.21
ปริมาณซัลเฟต (µg/10 mg)	49.16	1	49.95 ± 2.55	1.58
		2	48.28 ± 1.67	-1.82
		3	48.28 ± 2.55	-1.82

4.7 ผลของสภาวะของการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (UAE) ต่อผลผลิตในการสกัดตามการออกแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน

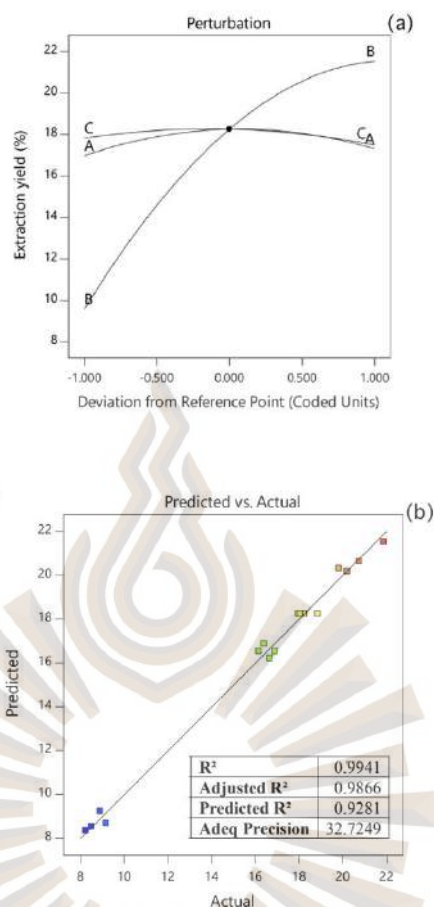
การศึกษาด้วยเทคนิค UAE เพื่อทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัด จากนั้นทำการพัฒนาวิธีการในการสกัดต่อไป โดยการใช้การออกแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน เพื่อทำการศึกษา 3 ปัจจัย คือ ระยะเวลาในการสกัด (20, 40, และ 60 นาที) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสาหร่ายพม nang (5:1, 10:1, และ 15:1 มิลลิลิตรต่อกรัม) และกำลังคลื่นเสียงความถี่สูง (1=ต่ำ, 2=กลาง, และ 3=สูง) และทำการกำหนดค่าตัวเลขของการออกแบบเป็นระดับต่ำ (-1) กลาง (0) และสูง (+1) ตามลำดับ รูปที่ 4.6 พื้นผิวการตอบสนองที่แสดงปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดที่ได้ออกมาผ่านการออกแบบการทดลอง จากการวิเคราะห์ผล พบว่าระยะเวลาที่สกัดและกำลังคลื่นเสียงความถี่สูงไม่มีผลต่อร้อยละผลผลิต ในขณะที่อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสาหร่ายพม nang ที่สูง ส่งผลให้ร้อยละของผลผลิตสูงด้วย (รูปที่ 4.6 และ 4.7a) อีกทั้งค่า R^2 เท่ากับ 0.9941 ซึ่งมีค่าที่สูง แสดงให้เห็นถึงความตรงกันที่ดีระหว่างค่าที่ทำนายและค่าจริง ค่า predicted R^2 เท่ากับ 0.9281 มีค่าใกล้เคียงกับค่า adjusted R^2 เท่ากับ 0.9866 โดยมีความแตกต่างกันน้อยกว่า 0.2 เป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นถึงความ

ถูกต้องของโมเดล ความแม่นยำของโมเดล ซึ่งเป็นการวัดอัตราส่วนระหว่างสัญญาณและสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise) เกินกว่า 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเดลเป็นที่น่าเชื่อถือได้ (รูปที่ 4.7b)



รูปที่ 4.6 พื้นผิวการตอบสนองของปริมาณสารสกัดเมื่อมีการใช้คลื่นความถี่สูงระดับต่าง ๆ:

(a) 1=ต่ำ, (b) 2=กลาง, และ (c) 3=สูง



รูปที่ 4.7 กราฟ (a) perturbation (b) predicted vs actual values ของปริมาณสารสกัด

การวิเคราะห์ ANOVA ของข้อมูลปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดถูกนำมาเปรียบเทียบกับโมเดลที่สร้างขึ้นเพื่อดูความสำคัญของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัด (ตารางที่ 4.6) พบว่ามีโมเดลที่ใช้วิเคราะห์มีความแตกต่างทางสถิติที่มีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$ การวิเคราะห์นี้พบว่าปัจจัยที่เลือกทั้งหมดมีอิทธิพลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ค่า lack of fit ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยังยืนยันว่าค่าที่ทำนายจากโมเดลเข้ากับข้อมูลจริงที่ได้จากการทดลองอย่างเหมาะสม การตรวจสอบค่าในแต่ละตัวแปร ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำค่าระยะเวลาในการสกัด (A) อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผง (B) และกำลังคลื่นเสียงความถี่สูง (C) มาทำการวิเคราะห์และคำนวณความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปร (regression model) เพื่อทำการหาค่า $y = \text{constant} + a(A) + b(B) + c(C) + d(AB) + e(AC) + f(BC) + g(A^2) + h(B^2) + i(C^2)$ พบว่า อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผง มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ระยะเวลาในการสกัดและ

กำลังคลื่นเสียงความถี่สูง มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อนำข้อมูลดูอันตรกิริยา (interaction) ระหว่าง 2 ตัวแปรมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความสัมพันธ์ของทั้ง 3 ปัจจัย มีผลต่อค่าร้อยละผลผลิตสารสกัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสุดท้ายเมื่อนำข้อมูลของตัวแปรมายกกำลังสอง (quadratic) เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ระยะเวลาในการสกัด อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผง มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ แต่กำลังคลื่นเสียงความถี่สูง มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

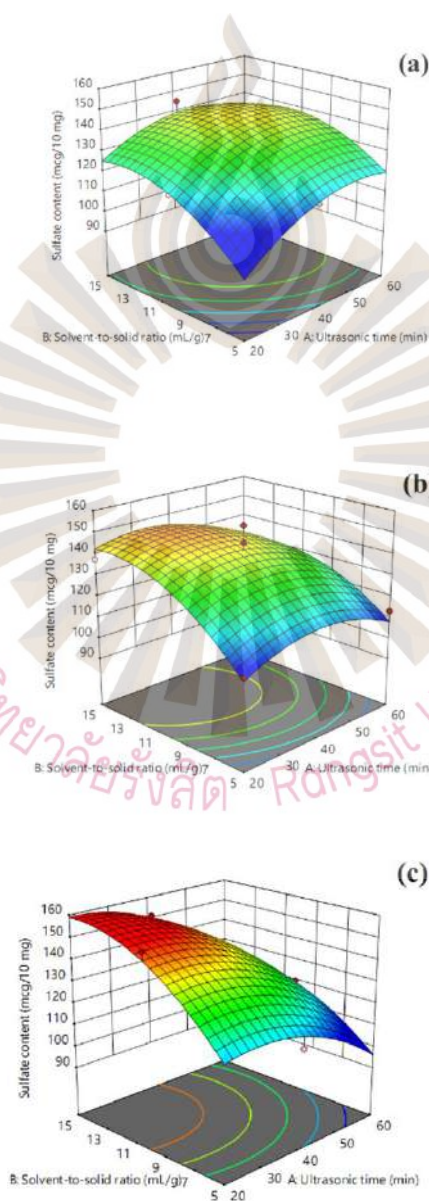
ตารางที่ 4.6 ANOVA สำหรับแบบจำลองค่าเชิงกำลังสอง (quadratic) ของปริมาณสารสกัด

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	327.16	9	36.35	132.07	< 0.0001*
A-Ultrasonic time	0.2113	1	0.2113	0.7675	0.4100
B-Solvent-to-solid ratio	285.68	1	285.68	1037.98	< 0.0001*
C-Ultrasonic power	0.2222	1	0.2222	0.8074	0.3987
AB	0.0182	1	0.0182	0.0662	0.8043
AC	2.778E-06	1	2.778E-06	0.0000	0.9976
BC	0.7656	1	0.7656	2.78	0.1393
A ²	5.22	1	5.22	18.98	0.0033*
B ²	30.82	1	30.82	111.97	< 0.0001*
C ²	1.50	1	1.50	5.45	0.0522
Residual	1.93	7	0.2752		
Lack of Fit	1.43	3	0.4765	3.83	0.1135
Pure Error	0.4971	4	0.1243		
Cor Total	329.08	16			

เครื่องหมาย (*) แสดงถึงค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

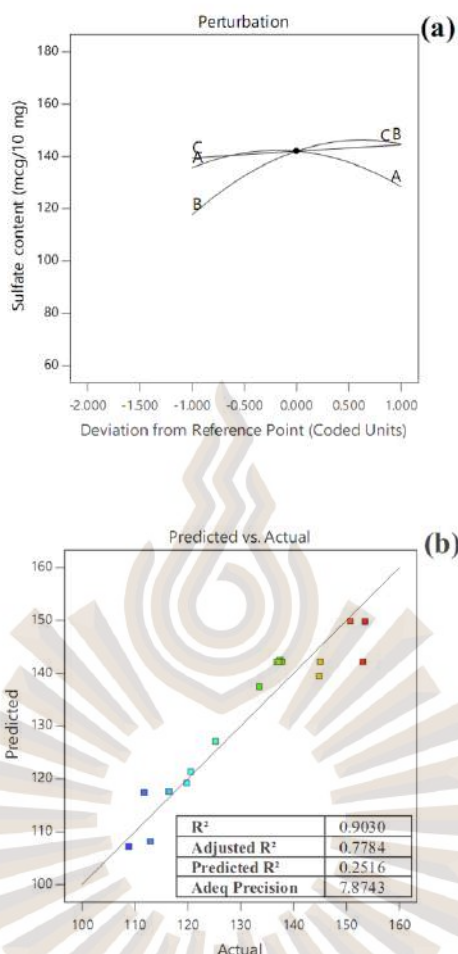
รูปที่ 4.8 แสดงพื้นผิวการตอบสนองที่แสดงปริมาณซัลเฟตที่ได้ออกมาผ่านการออกแบบการทดลอง จากการวิเคราะห์ผล พบว่า ปริมาณซัลเฟตจะสูงที่สุดเมื่อใช้ระยะเวลาการสกัดต่ำ อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผงสูงและกำลังคลื่นเสียงความถี่สูง (รูปที่ 4.8 และ 4.9a) อีกทั้งค่า

R^2 เท่ากับ 0.9030 ซึ่งมีค่าที่สูง แสดงให้เห็นถึงความตรงกันที่ดีระหว่างค่าที่ทำนาย และค่าจริง ค่า predicted R^2 เท่ากับ 0.2516 ซึ่งมีค่าต่ำกว่ากับ adjusted R^2 เท่ากับ 0.7748 โดยมีความแตกต่างกันเกิน 0.2 แสดงให้เห็นว่าไม่สอดคล้องระหว่างโมเดลที่ได้จากข้อมูล ซึ่งโมเดลอาจจะมีความเชื่อถือในการทำนายข้อมูลในชุดข้อมูลที่ใช้สร้างโมเดล แต่มีปัญหาในการทำนายข้อมูลนอกชุดข้อมูลที่ใช้สร้างโมเดล ดังนั้นควรตรวจสอบโมเดลและปรับปรุงให้มีความเหมาะสมมากขึ้นโดยใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น เพิ่มข้อมูล ลดความซับซ้อนของโมเดล เป็นต้น



รูปที่ 4.8 พื้นผิวการตอบสนองของปริมาณซัลเฟต เมื่อมีการใช้คลื่นความถี่สูงระดับต่าง ๆ:

(a) 1=ต่ำ, (b) 2=กลาง, และ (c) 3=สูง



รูปที่ 4.9 กราฟ (a) perturbation (b) predicted vs actual values ของปริมาณซัลเฟต

การวิเคราะห์ ANOVA ของข้อมูลปริมาณซัลเฟตถูกนำมาเปรียบเทียบกับโมเดลที่สร้างขึ้น เพื่อดูความสำคัญของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณซัลเฟต (ตารางที่ 4.7) พบว่าโมเดลที่ใช้วิเคราะห์มีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$ การวิเคราะห์นี้พบว่าปัจจัยที่เลือกทั้งหมดมีอิทธิพลต่อปริมาณซัลเฟตอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ค่า lack of fit ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยังยืนยันว่าค่าที่คาดการณ์จากโมเดลเข้ากับข้อมูลจริงที่ได้จากการทดลองอย่างเหมาะสม การตรวจสอบค่าในแต่ละตัวแปร ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำค่า ระยะเวลาในการสกัด (A) อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารหยาบผง (B) และกำลังคลื่นความถี่สูง (C) มาทำการวิเคราะห์และคำนวณความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปร (regression model) เพื่อทำการหาค่า $y = \text{constant} + a(A) + b(B) + c(C) + d(AB) + e(AC) + f(BC) + g(A^2) + h(B^2) + i(C^2)$ พบว่า อัตราส่วนตัว

ทำละลายต่อสำหรับพม nang มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ระยะเวลาในการสกัดและกำลังคลื่นความถี่สูง มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อนำข้อมูลระหว่าง 2 ตัวแปรมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการสกัดและกำลังคลื่นความถี่สูง มีผลต่อร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนอันตรกิริยาระหว่างระยะเวลาในการสกัดและอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อสำหรับพม nang อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อสำหรับพม nang และกำลังคลื่นเสียงความถี่สูง มีผลต่อร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนสุดท้ายเมื่อนำข้อมูลของตัวแปรมาถ่วงกำลังสอง (quadratic) เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ระยะเวลาในการสกัด อัตราส่วนตัวทำละลายต่อสำหรับพม nang มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ แต่กำลังคลื่นเสียงความถี่สูง มีผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.7 ANOVA สำหรับแบบจำลองค่าเชิงกำลังสอง (quadratic) ของปริมาณซัลเฟต (UAE)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	3244.99	9	360.55	7.24	0.0080*
A-Ultrasonic time	103.86	1	103.86	2.09	0.1918
B-Solvent-to-solid ratio	1469.67	1	1469.67	29.53	0.0010*
C-Ultrasonic power	51.99	1	51.99	1.04	0.3408
AB	66.21	1	66.21	1.33	0.2866
AC	544.48	1	544.48	10.94	0.0130*
BC	28.03	1	28.03	0.5631	0.4775
A ²	422.28	1	422.28	8.48	0.0226*
B ²	500.00	1	500.00	10.05	0.0157*
C ²	0.1099	1	0.1099	0.0022	0.9638
Residual	348.39	7	49.77		
Lack of Fit	148.58	3	49.53	0.9914	0.4819
Pure Error	199.82	4	49.95		
Cor Total	3593.39	16			

เครื่องหมาย (*) แสดงถึงค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จากนั้นทำการเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทำนายเพื่อให้ได้ปริมาณของร้อยละผลผลิต และปริมาณซัลเฟตสูงที่สุด ซึ่งปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดถูกเลือกมาจากการทำนายผลประกอบไปด้วยปัจจัยดังต่อไปนี้ คือ ระยะเวลาในการสกัด 32 นาที อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสารหยาบผง 15:1 มิลลิลิตรต่อกรัม และ กำลังคลื่นเสียงความถี่สูงเบอร์ 3 (สูง) จะทำให้ได้ผลของปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัด และปริมาณซัลเฟตมากที่สุดในเวลาเดียวกัน โดยปัจจัยที่เลือกนี้มีค่าความพึงพอใจของสภาวะเท่ากับ 1.000 จากนั้นทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง ($n=3$) โดยเตรียมการทดลองโดยใช้วิธีการสกัดด้วยคลื่นความถี่สูง และปรับการตั้งค่าสภาวะต่างๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้น เพื่อใช้ในการทดลองเพื่อหาปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัด และปริมาณซัลเฟต ผลการทดลอง พบว่าค่าที่ได้จากการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ทำนายเอาไว้ โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนที่น้อยมากในช่วงร้อยละ 0.30-3.70 ในค่าร้อยละผลผลิตสารสกัด ส่วนค่าปริมาณซัลเฟตมีค่าความคลาดเคลื่อนร้อยละ 1.52-16.65 เนื่องจากการทำการทดลองด้วยวิธี UAE ควบคุมความร้อนที่เกิดจากเครื่องมือในการทดลองค่อนข้างยาก (ตารางที่ 4.8) ข้อมูลที่ได้นี้สามารถยืนยันว่าการทำนายโดย Design-Expert® ถูกต้องและเชื่อถือได้ โดยเทคนิคที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่มีการปรับปรุงในงานวิจัยไม่ใช่เพียงสามารถทำให้ได้ร้อยละผลผลิต และปริมาณซัลเฟตได้ดีเท่านั้น แต่เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงยังเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการต้มที่มีการรายงานมาจากการวิจัยก่อนหน้านี้ (Imjongjairak et al., 2016; Rormwong et al., 2023; Sakaew et al., 2022; Wongprasert et al., 2014)

ตารางที่ 4.8 ค่าทำนาย (Predicted value), ค่าทดลอง (experimental value) และร้อยละความคลาดเคลื่อน (percent error) ในการทำนาย สำหรับผลตอบสนองของปริมาณสารสกัดและปริมาณซัลเฟต ด้วยวิธี UAE

Response	Predicted value	Batch	Experimental value ($n = 3$)	Error (%)
Extraction yield (%)	20.05	1	20.17 ± 0.47	0.59
		2	20.82 ± 0.28	3.70
		3	20.11 ± 0.31	0.30
Sulfate content ($\mu\text{g}/10 \text{ mg}$)	115.90	1	114.16 ± 2.78	-1.52
		2	132.59 ± 6.36	12.59
		3	139.06 ± 6.14	16.65

เมื่อพิจารณาวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธีที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่างจากสาหร่ายพม nang ซึ่งได้แก่ การใช้วิธีการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส (T50) การสกัดโดยใช้ไมโครเวฟ (MAE) และการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (UAE) พบว่า การศึกษาวิธีการสกัดสาหร่ายพม nang ทั้ง 3 วิธีการมีความแตกต่างกันในการสกัดสาร โดยการสกัดด้วยน้ำโดยการให้ความร้อนที่ 2 ชั่วโมงให้ประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อทำการศึกษาตัวทำละลาย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการลดระยะเวลาในการสกัดที่ใช้ระยะเวลาในการสกัดจากชั่วโมงเป็นวินาทีด้วยการสกัดสาหร่ายพม nang ด้วยไมโครเวฟ แต่เนื่องจากไมโครเวฟมีการใช้เรื่องของอุณหภูมิที่สูงเข้ามาเกี่ยวข้อง ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการเปรียบเทียบการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง เพื่อลดปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิสูง และจากการศึกษาการสกัดทั้ง 3 วิธีพบว่า ปริมาณของร้อยละผลผลิตที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธี คือ การใช้วิธีการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส การสกัดด้วยไมโครเวฟ และการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง มีค่าเท่ากับร้อยละ 7.20 ± 0.99 , 20.64 ± 0.31 และ 20.37 ± 0.23 ตามลำดับ ซึ่งการสกัดด้วยวิธีการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส (T50) แตกต่างจากการสกัดด้วยไมโครเวฟและการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการสกัดด้วยไมโครเวฟและการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และปริมาณซัลเฟตมีค่าเท่ากับ 215.87 ± 2.07 ไมโครกรัมต่อ 10 มิลลิกรัม 48.84 ± 0.96 ไมโครกรัมต่อ 10 มิลลิกรัม และ 128.60 ± 12.65 ไมโครกรัมต่อ 10 มิลลิกรัม ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p < 0.05$ ดังตารางที่ 4.9 ผลลัพธ์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างวิธีการต่าง ๆ เนื่องจากการใช้ความร้อนในกระบวนการสกัดซัลเฟต สามารถมีผลต่อโครงสร้างและคุณสมบัติของซัลเฟตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการสลายพันธะของพอลิเมอร์ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ (sulfate polymer) ในสภาวะความร้อนที่สูง การใช้ความร้อนสามารถกระตุ้นกระบวนการสลายพันธะพอลิเมอร์ได้ และอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้การเชื่อมโยงกันระหว่างกลุ่มซัลเฟตและพอลิแซ็กคาไรด์หลุดหรือแยกออกจากกันระหว่างการสกัด ซึ่งส่งผลให้ปริมาณซัลเฟต กระจายในสารสกัดลดลง (Rodríguez, Matulewicz, Noseda, Ducatti, & Leonardi, 2009) ในกรณีที่ให้ความร้อนสูงเกินไป และอาจทำให้สารตัวอย่างไม่สมบูรณ์หรือเสียหายได้ ดังนั้น การควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อนในกระบวนการสกัดเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องพิจารณา เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ต้องการออกมามีคุณภาพและถูกต้อง เมื่อทำการพิจารณาจากร้อยละผลผลิตพบว่า การสกัดด้วยน้ำ การใช้วิธีการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส มีปริมาณร้อยละผลผลิตที่ต่ำกว่า การสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟ และวิธีคลื่นเสียงความถี่สูง ซึ่งเป็นผลมาจากความร้อนที่ไม่เท่ากันของวิธีการสกัด ดังนั้นความร้อนที่สูงมากขึ้น อาจส่งผลต่อการละลายของสารชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในองค์ประกอบของสาหร่ายพม nang ที่สามารถละลายปนออกมากับความร้อนที่เกิดขึ้นได้ และการสกัดด้วยไมโครเวฟมีการปล่อยคลื่นไมโครเวฟที่ส่งผลต่อการแตกของเซลล์ได้ดีกว่าวิธีอื่น ๆ

อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ได้ดีกว่าวิธีการอื่น ๆ ทำให้สารที่ละลายออกมาจากสาหร่ายพมวง อาจจะมีการปนของสารชนิดอื่นๆ ที่ไม่ต้องการได้ เช่น โพรตีน หรือ ไขมัน ส่งผลให้มีร้อยละผลผลิตที่สูง แต่พบปริมาณของซัลเฟตที่ต่ำกว่า การใช้วิธีการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียสได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบค่าร้อยละผลผลิตสารสกัด ปริมาณซัลเฟต จากการสกัด 3 วิธีที่แตกต่างกัน

วิธีการสกัด	ค่าร้อยละผลผลิต	ปริมาณซัลเฟต ($\mu\text{g}/10\text{ mg}$)
T50	7.20 ± 0.99^a	215.86 ± 2.066^a
MAE	20.64 ± 0.31^b	48.84 ± 0.96^b
UAE	20.37 ± 0.23^b	128.60 ± 12.65^c

a-c หมายถึง แสดงถึง ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี one-way ANOVA ตามด้วยการวิเคราะห์ pos hoc ของ Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p\text{-value} < 0.05$)

การประเมินประสิทธิภาพของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ของการสกัดที่แตกต่างกัน 3 วิธีระหว่างอุณหภูมิในการสกัดส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากสาหร่ายพมวง (ดังตารางที่ 4.10 พบการเปลี่ยนแปลงในปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมด ในสารสกัดอยู่ใน 2.55 ± 0.08 (mg GA/g) ใน T50 และ 1.80 ± 0.17 (mg GA/g) ใน UAE และ 1.57 ± 0.04 (mg GA/g) ใน MAE มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 4.10 เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่ติดอยู่กับกลุ่มของไฮดรอกซิลของน้ำตาลภายในสายโซ่ของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์หรือในโปรตีนที่ได้จากการสกัด (Sabeena Farvin & Jacobsen, 2013) ดังนั้นอุณหภูมิที่ต่ำมีส่วนทำให้ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์บวม ส่งผลให้ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่เกาะกับสารประกอบฟีนอลิกสามารถสกัดออกมาได้ง่ายส่วนการสกัดโดยใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้สารประกอบที่เกี่ยวข้อง เช่น ฟีนอลและโปรตีนจากสายโซ่ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์เกิดความเสียหาย หรือเสียหายไป ส่งผลต่อปริมาณของสารประกอบที่เกี่ยวข้องลดลง ดังนั้นปริมาณฟีนอลของสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิในการสกัด เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนและสารประกอบฟีนอลิกในการสกัดเกิดการรวมตัว และเกิดการตกตะกอนได้ (Siriwardhana et al., 2008) สำหรับการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการ

ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH และ ABTS แสดงค่า IC_{50} ของวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธี ดังตารางที่ 4.10 ค่า IC_{50} ของวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน อุณหภูมิที่แตกต่างกัน แสดงผลในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลที่ได้สืบเนื่องมาจากวิธีการสกัด การใช้วิธีการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส ใช้อุณหภูมิในการสกัดที่ต่ำกว่า การสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟ และ วิธีคลื่นเสียงความถี่สูง ซึ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแปรผันตรงกันกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธี ดังนั้นอุณหภูมิที่ส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณซัลเฟตที่พบ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีส่วนที่แปรผันตรงกันกับปริมาณฟีนอลิกและปริมาณซัลเฟตด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จากการสกัด 3 วิธีที่แตกต่างกัน คือ T50 MAE และ UAE

สารตัวอย่าง	ปริมาณฟีนอลิก	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ		เส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้ง	
	ทั้งหมด	DPPH	ABTS	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	(mg GA/g)	IC_{50} (μ g/mL)	IC_{50} (μ g/mL)	(mm)	(mm)
T50	2.55±0.08 ^a	8.06±0.10 ^a	44.49±0.07 ^a	16.28±4.75	15.33±3.27
MAE	1.57±0.04 ^b	16.23±0.24 ^b	61.73±0.57 ^b	0	0
UAE	1.80±0.17 ^c	15.69±0.19 ^c	56.07±0.99 ^c	0	0

a-c หมายถึง ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี one-way ANOVA ตามด้วยการวิเคราะห์ post hoc ของ Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p -value < 0.05)

การประเมินคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดทั้ง 3 วิธี โดยใช้วิธี agar well diffusion method แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยวิธีการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อสายแกรมบวกอย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ด้วยเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้งขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 16.28±4.75 มิลลิเมตร และ 15.33±3.27 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน ciprofloxacin ขนาด 5 ไมโครกรัม สารสกัดจากสาหร่ายพมนาง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ผ่านกลุ่มซัลเฟตซึ่งมีลักษณะที่สามารถทำลายกระบวนการการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งส่งผล

ต่อความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียและนำไปสู่การลดความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* ตามลำดับ (Huang et al., 2019)



บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดสารหทัยผมนาง โดยเริ่มจากได้ศึกษาตัวทำละลาย เอทานอลเข้มข้นร้อยละ เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 20 และ น้ำ พบว่า ร้อยละผลผลิต ปริมาณซัลเฟต ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก การวัดค่าดัชนีการดูดกลืนแสงด้วยวิธี DPPH ABTS และฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด คือ การใช้ น้ำเป็นตัวทำละลายที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัด และสารสกัดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี

ดังนั้นน้ำจึงเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดที่จะนำมาศึกษาต่อโดยใช้วิธี MAE และ UAE เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารหทัยผมนาง โดยการใช้การออกแบบแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน ซึ่ง ได้ทำการหาสภาวะที่มีผลต่อปริมาณของสารสกัดซัลเฟตฟอลิแซ็กคาไรด์จากสารหทัยผมนาง พบว่า สภาวะที่ดีที่สุดในการสกัดด้วย MAE ได้แก่ ระยะเวลาในการสกัด (30 วินาที) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสารหทัยผมนาง (9.5:1 มิลลิลิตรต่อกรัม) และกำลังไมโครเวฟ (450 วัตต์) พบร้อยละผลผลิตการสกัด (20.32-20.93%) และปริมาณซัลเฟต (48.28-49.95 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$) การสกัดด้วยวิธี UAE สภาวะที่ดีที่สุดในการสกัด ได้แก่ ระยะเวลาในการสกัด (32 นาที) อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อสารหทัยผมนาง (15:1 มิลลิลิตรต่อกรัม) และกำลังคลื่นเสียงความถี่สูง (เบอร์ 3) โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทำนายผลการทดลองสำหรับการเพิ่มร้อยละผลผลิตการสกัด (20.11-20.82%) และปริมาณซัลเฟต (114.16-139.06 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$) ซึ่งจากการทดลองจะเห็นถึงประสิทธิภาพในการสกัดสารหทัยผมนางด้วยวิธีการออกแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน ที่สามารถระบุปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถลดระยะเวลาในการทดลองได้ นอกจากนี้ยังมีความแม่นยำของค่าการทำนายที่มีข้อผิดพลาดต่ำ เสริมความน่าเชื่อถือของวิธีการทดลอง เมื่อนำสาร

สกัดที่ได้จากทั้ง 3 วิธี มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* ด้วยวิธี agar well diffusion method ผลการทดลองจากเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้งที่เกิดขึ้น พบว่า สารสกัดที่ได้จากการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* ดังนั้นสารสกัดสาหร่ายผสมนาง มีศักยภาพสำหรับการประยุกต์ใช้ในด้านสุขภาพ ในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาและพัฒนาสารสกัดหยาบให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อให้ทราบโครงสร้างของสารสำคัญที่พบในสาหร่ายผสมนาง ที่ใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียต่อไป

5.2.2 ควรศึกษาและควบคุมปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิในกระบวนการสกัดอย่างถี่ถ้วน โดยการทดลองและวิเคราะห์ผลในระดับอุณหภูมิต่าง ๆ เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัด การควบคุมอุณหภูมิในกระบวนการสกัดอาจจำเป็นเนื่องจากอุณหภูมิสามารถมีผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารสกัดที่ได้ การศึกษาและควบคุมปัจจัยนี้จะช่วยให้ได้ผลลัพธ์ที่มีความสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพที่สูงขึ้นในกระบวนการสกัด

5.2.3 ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เพื่อดูแลสุขภาพ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียต่อไป

บรรณานุกรม

- กาญจนภรณ์ ลีวมโนมนต์. (2536). สาหร่ายวุ้นสกุล *Gracilaria* ในประเทศไทย. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31 สาขาสัตวประมง คณะสัตวแพทยศาสตร์ 3-6 กุมภาพันธ์ 2536 (น. 303-312). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เจมาภรณ์ บุญบำรุง. (2556). ผลกระทบของสารสกัดจากสมุนไพรไทยและผลร่วมกับยาปฏิชีวนะต่อโครงสร้างของไบโอฟิล์มของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*: รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. ปทุมธานี: สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม.
- ณรงค์ชัย สถาวรวิจิตร. (2549). การศึกษาวิธีพื้นผิวผลตอบสนองโดยแผนการทดลองแบบบล็อกซ์-เป็นแกน (Master's thesis). สืบค้นจาก <https://cmudc.library.cmu.ac.th/>
- ณัดกิจ ศรีโชค. (2563). วิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับวิวัฒนาการ โดยใช้ผลต่างแบบดัดแปลงเพื่อหาค่าการใช้พลังงานที่ดีที่สุดในการเตรียมดินของรถแทรกเตอร์ (Doctoral dissertation). สืบค้นจาก www.esanpedia.oar.ubu.ac.th/e-research
- ธีระ ลีภักทรกิจ, และวิชชุดา กมลวิทย์. (2564). Medical Microiology volume 1 (จุลชีววิทยาทางการแพทย์). ใน รวงผึ้ง สุทเธนทร์, พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์, ไอยฤทธิ์ ไทยพิสุทธิกุล และวรรณิ์ กันธุกมาลากุล (บ.ก.), Introduction (น. 1-5). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ ฟรินเอเบิล จำกัด.
- นพรัตน์ มะเห, ปิยรัตน์ ศิริวงษ์ไพศาล, และอุไรวรรณ วัฒนกุล. (2553). รายงานการวิจัยเรื่อง การสกัดและคุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จาก สาหร่ายผสมนาง สาหร่ายผักกาดทะเล และสาหร่ายขนนก. นครศรีธรรมราช: มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.
- ปาริฉัตร สังข์ทอง. (2563). ชีววิทยาการสืบพันธุ์และองค์ประกอบทางเคมีบางประการของสายพันธุ์สาหร่ายผสมนางสกุล *Gracilaria* จากบ่อเลี้ยง จังหวัดปัตตานี และจังหวัดสงขลา (Master's thesis). สืบค้นจาก <https://kb.psu.ac.th/psukb/handle/2016/17698>
- พิชญุตม์ ศรีใส. (2563). ประสิทธิภาพของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Arthrospira platensis* และสาหร่ายสีเขียวขนาดใหญ่บางชนิดในการยับยั้งเชื้อ ไวรัสก่อโรคริมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Master's thesis). สืบค้นจาก <https://cmudc.library.cmu.ac.th/frontend>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- ภูวมินทร์ สุริยาอัมพร, วรรณัทธ์ รังสิมาวงศ์, และธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์. (2565). การใช้วิธีการ
ออกแบบและวิเคราะห์การทดลองในผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม. ใน *บทความฟื้นฟู
วิชาการสำหรับการศึกษาด้านเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ศิลปากร* (น.1-16). สืบค้นจาก <https://ccpe.pharmacycouncil.org/index.php>
- รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร*. กรุงเทพฯ:
สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สถาพร หมั่นสิน. (2557). *การเพิ่มประสิทธิภาพการออกแบบแผ่นความร้อนเครื่องอบชิ้นงานพรม
ในรถยนต์* (Master's thesis). สืบค้นจาก <http://www.thapra.lib.su.ac.th/objects/thesis>
- อภิษฎา ประสพรัตนชัย. (2552). *ความสามารถในการเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ของสารสกัดจาก
ผักอินทรีย์* (Master's thesis). สืบค้นจาก <http://webpac.library.mju.ac.th>
- อารีรัตน์ ชื่อดิ. (2560). การใช้คลื่นไมโครเวฟสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร. *วารสารวิชาการ
มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 11(1), 1-14.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An
overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12),
Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Baluchamy, P., & Subramanian, A. (2023). Phytochemical screenings and evaluations of
antibacterial and antioxidant activities of methanolic leaf extract of *Senna auriculata*
(L) . Roxb. *Journal of Current Science and Technology*, 13(2), 162-181.
<https://doi.org/10.59796/jcst.V13N2.2023.1734>
- Belokurov, S. S., Narkevich, I. A., Flisyuk, E. V., Kaukhova, I. E., & Aroyan, M. V. (2019).
Modern extraction methods for medicinal plant raw material (review). *Pharmaceutical
Chemistry Journal*, 53(6), 559-563.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The
versatility of antioxidant assays in food science and safety-chemistry, applications,
strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Chauhan, P. S., & Saxena, A. (2016). Bacterial carrageenases: An overview of production and biotechnological applications. *3 Biotech*, 6(2), 146. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0461-3>
- Costa, L., Fidelis, G., Cordeiro, S., Oliveira, R., Sabry, D., Camara, R., . . . Rocha, H. (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(1), 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.03.005>
- Charoensiddhi, S., Conlon, M., Methacanon, P., Thayanukul, P., Hongsprabhas, P., & Zhang, W. (2022). Gut microbiome modulation and gastrointestinal digestibility *in vitro* of polysaccharide-enriched extracts and seaweeds from *Ulva rigida* and *Gracilaria fisheri*. *Journal of Functional Foods*, 96, 105204. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105204>
- Chumsook, K., Praiboon, J., & Fu, X. (2023). Sulfated Galactans from Agarophytes: Review of Extraction Methods, Structural Features, and Biological Activities. *Biomolecules*, 13(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/biom13121745>
- Devi, K .P., Suganthi, N., Kesika, P., & Pandian, S .K. (2008). Bioprotective properties of seaweed *In vitro* evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8(38), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-8-38>
- Duangjit, S., Mehr, L. M., Kumpugdee-Vollrath, M., & Ngawhirunpat, T. (2014). Role of simplex lattice statistical design in the formulation and optimization of microemulsions for transdermal delivery. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(12), 1948-1957.
- Duangjit, S., Obata, Y., Sano, H., Kikuchi, S., Onuki, Y., Opanasopit, P., . . . Takayama, K. (2012). Menthosomes, novel ultradeformable vesicles for transdermal drug delivery: optimization and characterization. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(10), 1720-1728.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Merillon, M.-J. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- Flora, S. J. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(4), 191-206.
- Ghosh, P., Adhikari, U., Ghosal, P. K., Pujol, C. A., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., & Ray, B. (2004). In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry*, 65(23), 3151-3157.
- Hibbert, S., Welham, K., & Zein, S. H. (2019). An innovative method of extraction of coffee oil using an advanced microwave system: in comparison with conventional Soxhlet extraction method. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1467.
- Huang, L., Shen, M., Morris, G. A., & Xie, J. (2019). Sulfated polysaccharides: Immunomodulation and signaling mechanisms. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 1-11.
- Huang, M., Mao, Y., Li, H., & Yang, H. (2021). Kappa-carrageenan enhances the gelation and structural changes of egg yolk via electrostatic interactions with yolk protein. *Food Chemistry*, 360, 129972.
- Imjongjairak, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Tachaapaikoon, C., Pason, P., & Waeonukul, R. (2015). Biochemical characteristics and antioxidant activity of crude and purified sulfated polysaccharides from *Gracilaria fisheri*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(3), 524-532.
- Imjongjairak, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Tachaapaikoon, C., Pason, P., & Waeonukul, R. (2016). Biochemical characteristics and antioxidant activity of crude and purified sulfated polysaccharides from *Gracilaria fisheri*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(3), 524-532.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- JMP Statistical Discovery LLC. (2022). *Design of experiments*. Retrieved from https://www.jmp.com/en_ph/statistics-knowledge-portal/what-is-design-of-experiments.html
- Jun, J.-Y., Jung, M.-J., Jeong, I.-H., Yamazaki, K., Kawai, Y., & Kim, B.-M. (2018). Antimicrobial and antibiofilm activities of sulfated polysaccharides from marine algae against dental plaque bacteria. *Marine Drugs*, 16(301), 1-13. <https://doi.org/10.3390/md16090301>
- Karnjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B., & Wongprasert, K. (2011). Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 389-396. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.016>
- Karnjana, K., Soowannayan, C., & Wongprasert, K. (2019). Ethanolic extract of red seaweed *Gracilaria fisheri* and furanone eradicate *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* biofilms and ameliorate the bacterial infection in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 88, 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.058>
- Khongthong, S., Theapparut, Y., Roekgam, N., Tantisuwanno, C., Otto, M., & Piewngam, P. (2021). Characterization and immunomodulatory activity of sulfated galactan from the red seaweed *Gracilaria fisheri*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 705-714.
- Kim, I. H., Lee, D.-G., Lee, S. H., Ha, J.-M., Ha, B.-J., Kim, S.-K., & Lee, J.-H. (2007). Antibacterial activity of *Ulva lactuca* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12, 579-582.
- Kuda, T., & Ikemori, T. (2009). Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. *Food Chemistry*, 112(3), 575-581. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.008>
- Mohammad Azmin, S. N. H., Abdul Manan, Z., Wan Alwi, S. R., Chua, L. S., Mustaffa, A. A., & Yunus, N. A. (2016). Herbal processing and extraction technologies. *Separation & Purification Reviews*, 45(4), 305-320. <https://doi.org/10.1080/15422119.2016.1145395>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Monton, C., Keawchay, P., Pokkrong, C., Kamnoedthapaya, P., Navabhatra, A., Suksaeree, J., . . . Songsak, T. (2023). Fabrication of direct compressible tablets containing Chatuphalathika extract obtained through microwave-assisted extraction: An optimization approach. *Scientia Pharmaceutica*, 91(2), 17. <https://doi.org/10.3390/scipharm91020017>
- Monton, C., Sampaopan, Y., Pichayakorn, W., Panrat, K., & Suksaeree, J. (2022). Herbal transdermal patches made from optimized polyvinyl alcohol blended film: Herbal extraction process, film properties, and *in vitro* study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 69, 103170. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103170>
- Muthukumar, J., Chidambaram, R., & Sukumaran, S. (2021). Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries-A review. *Journal of Food Science and Technology*, 58(7), 2453-2466.
- Nagahawatta, D. P., Liyanage, N. M., Jayawardena, T. U., Yang, F., Jayawardena, H. H., Kurera, M. J., . . . Jeon, Y.-J. (2023). Functions and values of sulfated polysaccharides from seaweed. *Algae*, 38(4), 217-240. <https://doi.org/10.4490/algae.2023.38.12.1>
- Nabil-Adam, A., Shreadah, M. A., Abd El-Moneam, N. M., & El-Assar, S. A. (2020). Marine algae of the genus *Gracilaria* as multi products source for different biotechnological and medical applications. *Recent Patents on Biotechnology*, 14(3), 203-228.
- Olasehinde, T. A., Olaniran, A. O., & Okoh, A. I. (2020). Sulfated polysaccharides of some seaweeds exhibit neuroprotection via mitigation of oxidative stress, cholinergic dysfunction and inhibition of Zn – induced neuronal damage in HT-22 cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03047-7>
- Pattarach, K., Phetcharat, S., & Mayakun, J. (2019). Some species of (*Gracilariaceae*, *Rhodophyta*) from Southern Thailand. In Phang, Song, & Lim (Eds.), *Taxonomy of Southeast Asian Seaweeds III* (pp.47-57). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/333949622_Some_species_of_Gracilariaceae_Rhodophyta_from_Southern_Thailand

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). Chapter Six-*Escherichia coli*. In S. L. Percival, M. V. Yates, D. W. Williams, R. M. Chalmers, & N. F. Gray (Eds.), *Microbiology of waterborne diseases (second edition)* (pp. 89-117). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8>
- Praiboon, J., Chirapart, A., Akakabe, Y., Bhumibhamond, O., & Kajiwara, T. (2006). Physical and chemical characterization of agar polysaccharides extracted from the Thai and Japanese species of *Gracilaria*. *Science Asia*, 32(Supplement 1), 11-17.
- Qiu, S.-M., Aweya, J. J., Liu, X., Liu, Y., Tang, S., Zhang, W., & Cheong, K.-L. (2022). Bioactive polysaccharides from red seaweed as potent food supplements :a systematic review of their extraction, purification, and biological activities. *Carbohydrate Polymers*, 275, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118696>
- Rasul, M.G. (2018). Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages. *International Journal of Basic Sciences and Applied Computing (IJBSAC)*, 2(6), 10-14.
- Rudtanatip, T., Withyachumnarnkul, B., & Wongprasert, K. (2015). Sulfated galactans from *Gracilaria fisheri* bind to shrimp haemocyte membrane proteins and stimulate the expression of immune genes. *Fish & Shellfish Immunology*, 47(1), 231-238.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.006>
- Rodríguez, M. C., Matulewicz, M. C., Nosedá, M. D., Ducatti, D. R. B., & Leonardi, P. I. (2009). Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the patagonic coast of argentina – Content, structure and physical properties. *Bioresource Technology*, 100(3), 1435–1441. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.025>
- Rormwong, T., Sakpetch, P., Choojit, S., & Kanjan, P. (2023). Extraction of sulfated polysaccharide from red seaweed (*Gracilaria fisheri*) and growth promotion of probiotic bacteria *Burapha Science Journal*, 28(2), 751-771.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Rudtanatip, T., Somintara, S., Sakaew, W., El-Abid, J., Cano, M. E., Jongsomchai, K., . . . Kovensky, J. (2022). Sulfated galactans from *Gracilaria fisheri* with supplementation of octanoyl promote wound healing activity *in vitro* and *in vivo*. *Macromolecular Bioscience*, 22(12), 2200172.
- Sabeena Farvin, K. H., & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138(2), 1670–1681. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.078>
- Sae-Lao, T., Luplertlop, N., Janvilisri, T., Tohtong, R., Bates, D. O., & Wongprasert, K. (2017). Sulfated galactans from the red seaweed *Gracilaria fisheri* exerts anti-migration effect on cholangiocarcinoma cells. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 36, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.014>
- Sae-Lao, T., Tohtong, R., Bates, D. O., & Wongprasert, K. (2017). Sulfated galactans from red seaweed *Gracilaria fisheri* target EGFR and inhibit cholangiocarcinoma cell proliferation. *The American Journal of Chinese Medicine*, 45(03), 615–633.
- Sakaew, W., Phanphak, J., Somintara, S., Hipkaeo, W., Wongprasert, K., Kovensky, J., . . . Rudtanatip, T. (2022). Increased sulfation in *Gracilaria fisheri* sulfated galactans enhances antioxidant and antiurolithiatic activities and protects HK-2 cell death induced by sodium oxalate. *Marine Drugs*, 20(6), 382.
- Siriwardhana, N., Kim, K.-N., Lee, K.-W., Kim, S.-H., Ha, J.-H., Song, C. B., . . . Jeon, Y.-J. (2008). Optimization of hydrophilic antioxidant extraction from *Hizikia fusiformis* by integrating treatments of enzymes, heat and pH control. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(4), 587–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01485.x>
- Taqi, A., Farcot, E., Robinson, J. P., & Binner, E. R. (2020). Understanding microwave heating in biomass-solvent systems. *Chemical Engineering Journal*, 393, 124741.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Thanigaivel, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., & Thomas, J. (2016). Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture*, 464, 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.001>
- Torres, P., Santos, J., Chow, F., & Santos, D. (2019). A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus *Gracilaria* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*). *Algal Research*, 37, 288–306. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.12.009>
- Verep, D., Ateş, S., & Karaoğul, E. (2023). A review of extraction methods for obtaining bioactive compounds in plant-based raw materials. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 25(3), Article 3. <https://doi.org/10.24011/barofd.1303285>
- Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159–178.
- Wang, J., Guo, H., Zhang, J., Wang, X., Zhao, B., Yao, J., & Wang, Y. (2010). Sulfated modification, characterization and structure–antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 81(4), 897–905. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.002>
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Zhang, J., & Li, P. (2009). Synthesized phosphorylated and aminated derivatives of fucoidan and their potential antioxidant activity *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(2), 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.11.010>
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940–949.
- Woraprayote, W., Janyaphisan, T., Adunphatcharaphon, S., Sonhom, N., Showpanish, K., Rumjuankiat, K., . . . Petchkongkaew, A. (2023). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria from Thai fermented foods: Potential food applications. *Food Bioscience*, 52, 102385. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102385>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Wongprasert, K., Rudtanatip, T., & Praiboon, J. (2014). Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(1), 52-60.
- You, K. Y. (2018). *Emerging Microwave Technologies in Industrial, Agricultural, Medical and Food Processing*. United Kingdom: BoD – Books on Demand.
- Yu, L. X., Amidon, G., Khan, M. A., Hoag, S. W., Polli, J., Raju, G. K., & Woodcock, J. (2014). Understanding pharmaceutical quality by design. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 16(4), 771–783. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9598-3>
- Zhang, L., & Mao, S. (2017). Application of quality by design in the current drug development. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 1–8.
- Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296-1302.
- Zhou, J., Wang, M., Saraiva, J. A., Martins, A. P., Pinto, C. A., Prieto, M. A., . . . Barba, F. J. (2022). Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches. *Food Chemistry*, 384, 132236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132236>

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	รัชกฤษ ปัทมโสภาสกุล
วัน เดือน ปี เกิด	10 กรกฎาคม 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี, 2549 มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง, 2554 มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชา เภสัชศาสตร์, 2566
ที่อยู่ปัจจุบัน	198/193 หมู่ 3 หมู่บ้านสุภาลัย-เบลล่า ตำบลบางเคื่อ อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000
สถานที่ทำงาน	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
ตำแหน่งปัจจุบัน	อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต