



**สภาวะการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกลีบดอกบัวสาย
(*Nymphaea lotus* L.) ด้วยอัลตราโซนิกที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง**
**Optimization of Ultrasound-assisted Extraction Conditions for Bioactive Compounds
and Antioxidant Activities from Lotus Petal (*Nymphaea lotus* L.)
Using Response Surface Methodology**

พิมพ์ชนก พริกบุญจันทร์ และ คัมรบ สมะวรรธนะ^{*}

Pimchanok Prikboonchan and Khamrop Samavardhana^{*}

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

Division of Food Science and Technology, Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

Received : 16 June 2020

Revised : 31 July 2020

Accepted : 15 August 2020

บทคัดย่อ

สภาวะการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกลีบดอกบัวสาย (*Nymphaea lotus* L.) ที่เหมาะสมด้วยเทคนิคอัลตราโซนิกใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) วางแผนการทดลองแบบประสมกลาง (Central Composite Design; CCD) กับผลกระทบต่อบีโอดีในการสกัด ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล (50-80 เปอร์เซ็นต์) ระยะเวลาในการสกัด (10-30 นาที) และอัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายต่อสารละลายเอทานอล (1:15-1:40 g/ml) ที่มีต่อปริมาณค่าตอบสนองที่ศึกษา พบว่าสภาวะการสกัดที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของเอทานอล ระยะเวลาในการสกัด และอัตราส่วนของกลีบบัวสายต่อสารละลายที่ 59.00 เปอร์เซ็นต์, 22.00 นาที และ 1:28.00 กรัม/มล.ตามลำดับ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 51.01±1.50 mg GAE/g, 27.32±1.81 mg CE/g, 29.69±1.41 m mol TE/g และ 21.42±0.58 m mol TE/g ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สำหรับสมการโพลีโนเมียลลำดับ 2 และมีค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยระหว่าง 0.965 ถึง 0.979 จากการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองและค่าจากการทำนายมีเปอร์เซ็นต์ของความคลาดเคลื่อนอยู่ระหว่าง 0.16-2.94 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : กลีบดอกบัวสาย ; อัลตราโซนิก ; ฟีนอลิก ; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ; วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง



Abstract

Response surface methodology (RSM) was used to optimize Ultrasound-assisted Extraction (UAE) of bioactive compounds and antioxidant activities from lotus petal (*Nymphaea lotus* L.) and central composite design (CCD) was applied to investigate the effects of independent variables as ethanol concentration (50-80%), extraction time (10-30 min) and solid to solvent ratio (1:15-1:40 g/ml) on responses. The optimum ethanol concentration, extraction time and solid to solvent ratio were 59.00%, 22.00 min and 1:28.00 g/ml, respectively and the values of total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activities as DPPH and FRAP were 51.01 ± 1.50 mg GAE/g, 27.32 ± 1.81 mg CE/g, 29.69 ± 1.41 m mol TE/g and 21.42 ± 0.58 m mol TE/g, respectively. The second-order polynomial equations were significant ($p \leq 0.05$) and high regression coefficient ranged between 0.965 and 0.979. Comparison of the experimental values with those predicted values was almost identical with percentage error between 0.16 and 2.94 %.

Keywords : *Nymphaea lotus* L. Petal ; ultrasonic-assisted extraction ; phenolic ; antioxidant activity ; response surface methodology



บทนำ

บัวเป็นพืชในวงศ์ *Nymphaeaceae* พบได้ทั่วไปทั้งในเขตร้อนและเขตหนาว สามารถแบ่งออกได้ 2 วงศ์ คือ *Nelumbonaceae* ได้แก่ ปทุมชาติหรือบัวหลวง (lotus) และ *Nymphaeaceae* กลุ่มบัวอุบลชาติ (waterlily) การปลูกบัวในประเทศสหรัฐอเมริกา จีน ญี่ปุ่น อินเดีย เกาหลีใต้ และไทย นิยมปลูกเป็นพืชประดับ และเป็นแหล่งอาหาร นอกจากนี้บัวสามารถใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค โดยเฉพาะประเทศจีนมีการนำทุกส่วนของบัวหลวงมาใช้เป็นส่วนผสมของยาในทางการแพทย์ (Kredy, 2010; Hu & Skibsted, 2002) สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาข้อมูลทางเภสัชวิทยาของบัวหลวง ได้แก่ เกสรและดอกบัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงโดยมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ รากบัวสามารถลดการดูดซึมกลูโคส สารอัลคาลอยด์ จากดีบัวมีฤทธิ์ช่วยในการนอนหลับ (Steinrut *et al.*, 2017) จากการศึกษาของ Wongklang *et al.* (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนต่างๆ ของบัวหลวง พบว่ากลีบดอกบัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาได้แก่ เกสร เมล็ด ดีบัว รังไข่ ใบอ่อน ใบแก่ ก้านดอก ไหล รากบัว ตามลำดับ จากงานวิจัยและการศึกษาเน้นการใช้ประโยชน์จากบัวหลวงเป็นส่วนใหญ่ แต่งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับบัวสายยังมีน้อย ปกติบัวสายเป็นบัวที่นิยมบริโภคโดยเฉพาะส่วนของก้านดอกที่เรียกว่าสายบัว เมื่อปอกหรือลอกเอาเปลือกออกแล้วใช้เป็นผักได้ นับเป็นผักพื้นบ้านดั้งเดิมอย่างหนึ่งของชาวไทย สำหรับดอกบัวสายไม่นิยมนำมาบริโภคส่วนใหญ่จะทิ้งหรือไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ ในกระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีกระบวนการและวิธีการสกัดหลายวิธี กระบวนการสกัดด้วยอัลตราซาวนด์ (Ultrasound-assisted Extraction; UAE) เป็นวิธีการสกัดอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากมีขั้นตอนการสกัดที่ง่าย ราคาไม่สูง ใช้สารละลายในปริมาณต่ำ อุณหภูมิในการสกัดต่ำและใช้เวลาในการสกัดที่สั้น เป็นการสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงและใช้พลังงานต่ำ โดยอัลตราซาวนด์ปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงไปยังสารละลายทำให้เกิดการระเบิดของฟองอากาศซึ่งฟองอากาศนี้ทำให้ผนังเซลล์ของพืชแตกเกิดการถ่ายเทมวลจากพืชไปสู่สารละลายมากขึ้น (Vinatoru, 2001) มีการศึกษานำอัลตราซาวนด์มาใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับวัตถุดิบหลายชนิด ได้แก่ ของเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปมันฝรั่ง (Riciputi *et al.*, 2018) ใบหนานเขาเหว่ย (Ngoc *et al.*, 2019) เปลือกต้นสน (Chmelova *et al.*, 2020) และมะระขี้นก (Chakraborty *et al.*, 2020) เป็นต้น

การออกแบบแบบพินที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology; RSM) เป็นการนำคณิตศาสตร์และเทคนิคทางสถิติที่มีประสิทธิภาพมาใช้ในการหาค่าที่เหมาะสม ทำให้ทราบค่าของปัจจัยและปฏิสัมพันธ์ที่มีต่อค่าตอบสนอง (Hammi *et al.*, 2016) มีการนำ RSM มาใช้ในการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กำลังสอง (Quadratic equation) ของผลตอบสนองด้วยการออกแบบแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD) โดยมีงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้ CCD ในการศึกษาสภาวะการสกัดที่เหมาะสม เช่น การศึกษาสภาวะการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของมะระขี้นก (Chakraborty *et al.*, 2020) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากถั่วแดง (Yang *et al.*, 2019) ปริมาณฟีนอลิกจากเปลือกทับทิม (Živković *et al.*, 2018) เป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการศึกษปัจจัยในการสกัดกลีบดอกบัวสาย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล ระยะเวลาในการสกัด และอัตราส่วนของกลีบบัวสายต่อสารละลายเอทานอล ที่เหมาะสมด้วยการใช้อัลตราซาวนด์ร่วมกับการประยุกต์ใช้ RSM และออกแบบการทดลองแบบ



CCD ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาสภาวะการสกัดที่เหมาะสมและเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการต่อยอดและประยุกต์ใช้สารสกัดจากกลีบดอกบัวสายในผลิตภัณฑ์อื่นเพื่อเพิ่มมูลค่าได้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมกลีบดอกบัวสาย

ดอกบัวสายสีแดง (*Nymphaea pubescens* Willd) จากพื้นที่ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อำเภอเมืองจังหวัดพิษณุโลก เก็บดอกบัวตูมใต้น้ำในตอนเช้านำมาแยกส่วนที่เป็นกลีบดอกและเกสรออกจากกันทันที จากนั้นนำกลีบดอกบัวสายสีแดงมาทำความสะอาดและแช่ในน้ำประปา 5 นาที นำไปผึ่งลมประมาณ 1 ชั่วโมง หั่นเป็นชิ้นแล้วนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (blender) เป็นเวลา 30 วินาที โดยมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงที่ 83-87 เปอร์เซ็นต์ นำไปศึกษาสภาวะการสกัดที่เหมาะสมต่อไป ประยุกต์ตามวิธีของ Dangnoi (2016)

2. ศึกษาสภาวะของการสกัดกลีบดอกบัวสายที่เหมาะสมด้วยการใช้วิธี RSM

ศึกษาปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อสภาวะการสกัด 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล (X_1) ระยะเวลาในการสกัด (X_2) และอัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายต่อสารละลายเอทานอล (X_3) โดยการออกแบบการทดลองแบบ central composite design (CCD) กำหนดระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ศึกษา 5 ระดับ คือ ที่ระดับลบแอลฟา ($-\alpha$) ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) ระดับสูง (+1) และระดับบวกแอลฟา ($+\alpha$) มีจำนวนสิ่งทดลองทั้งหมด 18 สิ่งทดลอง ประยุกต์จากการศึกษาของ Ngoc *et al.*, (2019) และ Živković *et al.*, (2018) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยและระดับของการศึกษาสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายที่เหมาะสมด้วย RSM แบบการทดลอง CCD

Independent variables	Unit	Range and levels (coded)				
		$-\alpha(-1.682)$	-1	0	1	$\alpha(1.682)$
Ethanol concentration (X_1)	% (v/v)	40.00	50.00	65.00	80.00	90.00
Extraction time (X_2)	min	4.00	10.00	20.00	30.00	37.00
Solid to liquid ratio (X_3)	g/ml	7.00	15.00	27.50	40.00	49.00

ซึ่งกลีบดอกบัวสายที่ผ่านการปั่นละเอียด 10 กรัม มาสกัดตามสภาวะในแต่ละสิ่งทดลองที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic; UL-20LDT, ความถี่ 40 KHz, 320W, Scilution, ประเทศไทย) มีขนาด กว้างxยาวxลึก 320 x 530 x 120 มิลลิเมตร นำสารที่สกัดได้ในแต่ละสิ่งทดลองมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 3 เก็บตัวอย่างใส่ขวดสีชาและนำไปเก็บที่ -18 องศาเซลเซียส จากนั้นนำกลีบดอกบัวสายมาที่ผ่านการสกัดในครั้งที่ 1 มาสกัดในครั้งที่ 2 ด้วยสภาวะการสกัดเดิมอีกครั้ง รวมสารสกัดที่ได้ทั้งสองครั้งใส่ขวดสีชา นำไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator; Hei-VAP Value, Heidolph ประเทศเยอรมนี) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 50 rpm จะได้สารสกัดหยาบ เก็บตัวอย่างใส่ขวดสีชาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก



ทั้งหมด (Total phenolic content; TP) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content; TF) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP สมบัติสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายถูกคำนวณในรูปของน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology; RSM) ด้วยโปรแกรม Design Expert 6.0 เพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โพลีโนเมียลลำดับที่ 2 (Second order polynomial model) ดังสมการที่ 1 เลือกแบบจำลองที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.80 (Sai-Ut *et al.*, 2015) และค่าความสมบูรณ์ (lack of fit) ของแบบจำลองที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$) มาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ (3D) เพื่อหาสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายจากปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาที่เหมาะสมที่มีต่อค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP สูงสุด ที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Design expert

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

โดยที่ Y คือ ค่าการตอบสนอง, X_i, X_j คือ ตัวแปรอิสระ, β_0 คือ ค่าคงที่, β_i คือ สัมประสิทธิ์ของสมการเส้นตรง, β_{ii} คือ สัมประสิทธิ์ของสมการเส้นโค้ง, β_{ij} คือ สัมประสิทธิ์ของสมการปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร

3. การทดสอบสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสาย

นำค่าสภาวะของการสกัดที่เหมาะสมที่มีต่อค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP กำหนด criteria ที่เป้าหมายปริมาณสูงสุด (maximum) จากการทำนายด้วยโปรแกรม และสภาวะของการสกัดที่ใช้ระดับของแต่ละปัจจัยที่ระดับต่ำ (worse ; -1, -1, -1) ระดับสูง (high ; 1, 1, 1) และระดับกลาง (center ; 0, 0, 0) มาทำการทดลองซ้ำ (Sreela-or *et al.*, 2011) ทำการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทำนายดังสมการที่ 2 (Hossain *et al.*, 2012)

$$E (\%) = \frac{1}{n_e} \sum_{i=1}^n \left| \frac{V_E - V_P}{V_E} \right| \times 100 \quad (2)$$

โดยที่ n_e คือจำนวนข้อมูลของการทดลอง V_E คือ ค่าที่ได้จากการทดลอง และ V_P คือค่าที่ได้จากการทำนาย ค่าที่ได้ควรมีค่าที่น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ถือได้ว่าเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่มีความน่าเชื่อถือ (Chodok & Khumkhom, 2020)

4. การวิเคราะห์สมบัติของสารสกัดกลีบดอกบัวสาย

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content; TP) ประยุกต์ตามวิธีวิเคราะห์ของ Samavardhana *et al.* (2015)



นำสารสกัดกลีบดอกบัวสายปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 0.25 N Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติม 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วย spectrophotometer (Evolution 201 UV, Thermo Scientific, USA) คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่าง (mg GAE/g)

4.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content, TF) ด้วยวิธี ประยุกต์ตามวิธีวิเคราะห์ของ Samavardhana *et al.* (2015)

นำสารสกัดกลีบดอกบัวสายปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน (DI water) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม 5 % NaNO_2 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 10% AlCl_3 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที เมื่อครบเวลา เติม 1 M NaOH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 775 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์กับกราฟมาตรฐานแคทีชิน (catechin) รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์ของแคทีชินต่อน้ำหนักตัวอย่าง (mg CE/g)

4.3 สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical) ประยุกต์ตามวิธีวิเคราะห์ของ Samavardhana *et al.* (2015)

นำสารละลาย DPPH เข้มข้น 10 mM ปริมาตร 3.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารสกัดกลีบดอกบัวสาย ปริมาตร 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณการต้านออกซิเดชันโดยคำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐานของโทลอกซ์ (Trolox) รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิโมลสมมูลย์ของโทลอกซ์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง (m mol TE/g)

4.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidation Power (FRAP) ประยุกต์ตามวิธีวิเคราะห์ของ Samavardhana *et al.* (2015)

เติมสารละลาย FRAP reagent จำนวน 3 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติมสารสกัดกลีบดอกบัวสายปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณการต้านออกซิเดชันโดยคำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐานของโทลอกซ์ (Trolox) รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิโมลสมมูลย์ของโทลอกซ์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง (m mol TE/g)

ผลการวิจัย

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดกลีบดอกบัวสาย

ผลการศึกษาสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายที่เหมาะสมด้วยวิธี RSM ใช้การออกแบบการทดลอง CCD โดยศึกษา ปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล (X_1) ระยะเวลาในการสกัด (X_2) และอัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายต่อ สารละลายเอทานอล (X_3) ที่ออกแบบการทดลองได้ 18 สิ่งทดลอง ประกอบด้วยตำแหน่งแฟคทอเรียล 8 ตำแหน่ง ตำแหน่ง



แกน 6 ตำแหน่ง และการทำซ้ำระดับกลาง 4 ตำแหน่ง ดังตารางที่ 2 จากการศึกษาพบว่า สารสกัดกลีบดอกบัวสายมีค่า TP และ TF อยู่ในช่วง 35.03-51.68 mg GAE/g และ 16.22-27.99 mg CE/g ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ 22.59-28.90 m mol TE/g และวิธี FRAP ที่ 15.02-22.34 m mol TE/g

ตารางที่ 2 สภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายและสมบัติของสารสกัดต่อค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP

Run no.	Independent variables			Responses			
	X ₁ ^a	X ₂ ^b	X ₃ ^c	TP (mg GAE/ g)	TF (mg CE/ g)	DPPH (m mol TE/g)	FRAP (m mol TE/g)
1	50.00	10.00	15.00	45.17	23.94	25.15	18.63
2	80.00	10.00	15.00	40.84	18.79	23.35	15.24
3	50.00	30.00	15.00	45.52	22.31	24.77	18.23
4	80.00	30.00	15.00	41.94	17.17	24.35	15.31
5	50.00	10.00	40.00	42.71	21.35	25.20	18.44
6	80.00	10.00	40.00	35.03	16.22	22.59	15.02
7	50.00	30.00	40.00	43.85	21.05	27.06	19.91
8	80.00	30.00	40.00	42.62	20.81	25.68	18.64
9	40.00	20.00	27.50	48.57	23.80	26.13	18.85
10	90.00	20.00	27.50	41.77	19.02	24.69	15.47
11	65.00	4.00	27.50	39.66	19.83	23.02	15.30
12	65.00	37.00	27.50	43.06	20.24	25.23	18.58
13	65.00	20.00	7.00	41.24	22.12	24.22	17.84
14	65.00	20.00	49.00	37.14	17.54	25.99	18.13
15	65.00	20.00	27.50	50.66	27.33	28.90	21.87
16	65.00	20.00	27.50	51.68	26.73	27.39	21.43
17	65.00	20.00	27.50	51.08	27.99	28.36	21.67
18	65.00	20.00	27.50	50.64	27.41	27.96	22.34

^a X₁ : Ethanol concentration (%) : - α (40.00), -1(50.00), 0(65.00), 1(80.00), + α (90.00)

^b X₂ : Extraction time (min) : - α (4.00), -1(10.00), 0(20.00), 1(30.00), + α (37.00)

^c X₃ : Solid to liquid ratio (g/ml) : - α (7.00), -1(15.00), 0(27.50), 1(40.00), + α (49.00)



2. ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนและความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

ผลการวิเคราะห์ค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดกลีบดอกบัวสาย (ตารางที่ 2) นำมาเขียนแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โพลีโนเมียลลำดับที่ 2 แบบค่ารหัส(code) ของตัวแปรปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรในการศึกษา ดังสมการที่ 3-6

$$TP = 50.94 - 2.08X_1 + 1.30X_2 - 1.06X_3 - 1.87X_1^2 - 3.32X_2^2 - 3.94X_3^2 + 0.90X_1X_2 - 0.12X_1X_3 + 0.91X_2X_3 \quad (3)$$

$$TF = 27.35 - 1.74X_1 + 0.23X_2 - 0.68X_3 - 2.07X_1^2 - 2.61X_2^2 - 2.60X_3^2 + 0.62X_1X_2 + 0.61X_1X_3 + 0.94X_2X_3 \quad (4)$$

$$DPPH = 28.13 - 0.63X_1 + 0.74X_2 + 0.47X_3 - 0.95X_1^2 - 1.45X_2^2 - 1.04X_3^2 + 0.33X_1X_2 - 0.22X_1X_3 + 0.54X_2X_3 \quad (5)$$

$$FRAP = 21.79 - 1.23X_1 + 0.82X_2 + 0.41X_3 - 1.58X_1^2 - 1.69X_2^2 - 1.27X_3^2 + 0.33X_1X_2 + 0.20X_1X_3 + 0.68X_2X_3 \quad (6)$$

การตรวจสอบความสัมพันธ์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์และความเหมาะสมด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสมการค่าโมเดล (model) และค่าความสมบูรณ์ (lack of fit) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับแก้ (adjusted R^2) ดังตารางที่ 3 พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีความสัมพันธ์และเหมาะสม โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F-value) ของแบบจำลองทั้ง 4 ทางคณิตศาสตร์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p \leq 0.05$) จะเห็นได้ว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ทั้ง 4 แบบจำลองที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยแบบจำลองทั้ง 4 มีค่า p-value (< 0.0001) ทำให้ทราบว่าปัจจัยที่ใช้ในการศึกษามีผลต่อค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP โดยการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้ง 3 มีผลต่อค่าการตอบสนองและบ่งบอกว่ามีส่วนโค้งขึ้นที่พื้นผิวตอบสนอง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เมื่อพิจารณาค่าความสมบูรณ์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ต้องมีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงถึงความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบโพลีโนเมียล ซึ่งแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ทั้ง 4 แบบ มีความเหมาะสมของค่าสมบูรณ์ของแบบจำลองโดยมีค่า $p > 0.05$

สำหรับค่า R^2 และ ค่า adjusted R^2 เป็นค่าที่ใช้ในการบอกถึงความสัมพันธ์และความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่าค่า R^2 ของแบบจำลอง TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีค่า R^2 เท่ากับ 0.979, 0.968, 0.965 และ 0.966 ตามลำดับ จากค่าดังกล่าวอธิบายได้ว่าข้อมูลจากการทดลองและข้อมูลที่ได้จากการทำนายที่มาจากอิทธิพลของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยสามารถเข้ากันได้ที่ 97.90, 96.80, 96.50 และ 96.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่เหลืออีก 2.10, 3.20, 3.50 และ 3.40 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลมาจากปัจจัยอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ สำหรับค่า adjusted R^2 มีค่า 0.955,



0.932, 0.926 และ 0.927 ตามลำดับ ซึ่งแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่มีค่า R^2 และค่า adjusted R^2 ใกล้เคียงค่า 1.00 จะมีความแม่นยำสูงในการทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกลีบดอกบัวสาย

ตารางที่ 3 สมการโพลีโนเมียล ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของ TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP

Coefficient	Responses							
	TP	P-value	TF	P-value	DPPH	P-value	FRAP	P-value
b_0	50.94	<0.0001	27.35	<0.0001	28.13	<0.0001	21.79	<0.0001
X_1	-2.08	<0.0001	-1.74	0.0002	-0.63	0.0015	-1.23	0.0001
X_2	1.30	0.0016	0.23	0.4027	0.74	0.0006	0.82	0.0017
X_3	-1.06	0.0052	-0.68	0.0307	0.47	0.0083	0.41	0.0477
X_1^2	-1.87	0.0002	-2.07	<0.0001	-0.95	0.0001	-1.58	<0.0001
X_2^2	-3.32	<0.0001	-2.61	<0.0001	-1.45	<0.0001	-1.69	<0.0001
X_3^2	-3.94	<0.0001	-2.60	<0.0001	-1.04	<0.0001	-1.27	0.0001
X_{12}	0.90	0.0378	0.62	0.1076	0.33	0.0976	0.33	0.1941
X_{13}	-0.12	0.7417	0.61	0.1085	-0.22	0.2392	0.20	0.4063
X_{23}	0.91	0.0360	0.94	0.0242	0.54	0.0146	0.68	0.0189
Regression model								
F-value	41.50	<0.0001	26.67	<0.0001	24.72	<0.0001	25.04	<0.0001
Lack of fit								
F-value	6.48	0.0774	4.95	0.1092	0.36	0.8482	3.98	0.1424
R^2	0.979		0.968		0.965		0.966	
R^2 -adj	0.955		0.932		0.926		0.927	

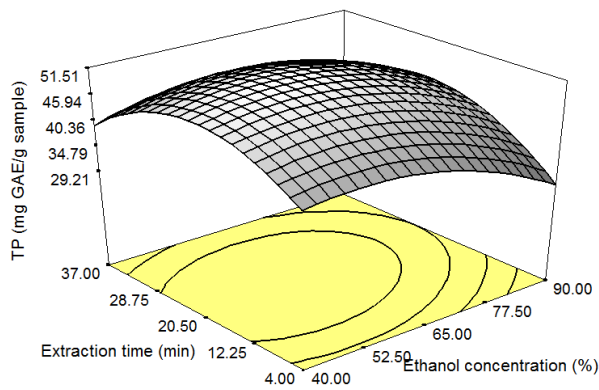
จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกลีบดอกบัวสาย สามารถสรุปได้ว่าสมการที่ 3-6 นำมาใช้ในการทำนายค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของการสกัดกลีบดอกบัวสายได้อย่างถูกต้อง โดยพิจารณาพจน์ต่างๆ ของสมการในรูปของพจน์เชิงเส้น (linear term) พจน์กำลังสอง (quadratic term) และพจน์ปฏิสัมพันธ์ (interaction term) ดังตารางที่ 3

3. การสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

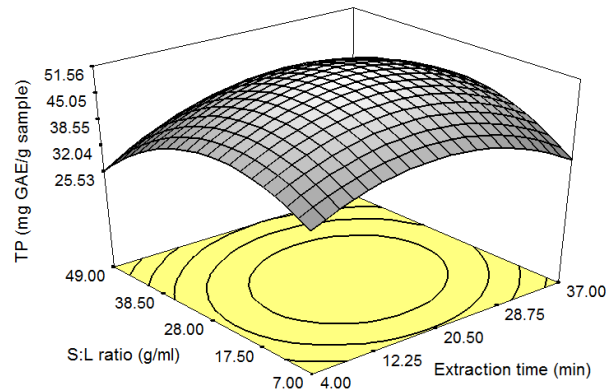
การสร้างกราฟพื้นผิวที่ผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ (3D) จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ 3-6 เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษาที่มีต่อค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP โดยกราฟแสดงถึง



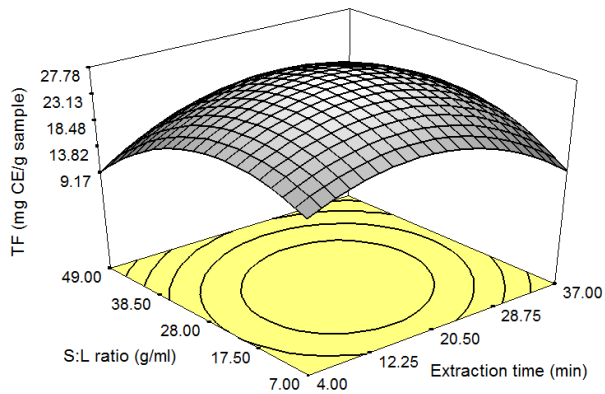
อิทธิพลร่วมของตัวแปรที่ใช้ศึกษาซึ่งตัวแปรที่เหลือจะอยู่ในระดับกลาง จากภาพที่ 1a แสดงถึงการใช้ปัจจัยร่วมกันระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและระยะเวลาในการสกัดที่มีต่อปริมาณ TP โดยปัจจัยอัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายต่อสารละลายเอทานอลอยู่ในระดับกลาง พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลร่วมกับระยะเวลาในการสกัดที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่า TP เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลและระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นมากกว่า 57.12 เปอร์เซ็นต์ และ 22.11 นาที ตามลำดับ มีผลต่อค่า TP ที่มีแนวโน้มที่ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยระหว่างระยะเวลาในการสกัดและอัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายต่อสารละลายเอทานอลก็มีผลต่อปริมาณ TP ดังภาพที่ 1b เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสกัดมากกว่า 22.11 นาที และอัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายที่ 1:26.08 (g/ml) ส่งผลให้ค่า TP มีแนวโน้มลดลงเช่นกัน สำหรับอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยระหว่างระยะเวลาในการสกัดและอัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายต่อสารละลายเอทานอล และปัจจัยความเข้มข้นของเอทานอลอยู่ในระดับกลางมีผลต่อค่า TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ดังภาพที่ 1c-1e พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสกัดส่งผลให้ค่า TF, DPPH และ FRAP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเมื่อระยะเวลาในการสกัดมากกว่า 19.57, 22.83 และ 22.49 นาที และอัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายต่อสารละลายเอทานอลที่มากกว่า 1:25.10, 1:31.63 และ 1:30.00 (g/ml) มีผลต่อปริมาณของค่าทั้ง 3 ที่มีแนวโน้มลดลง



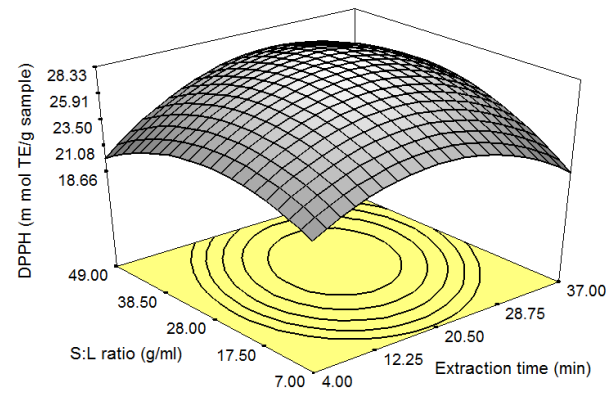
(a)



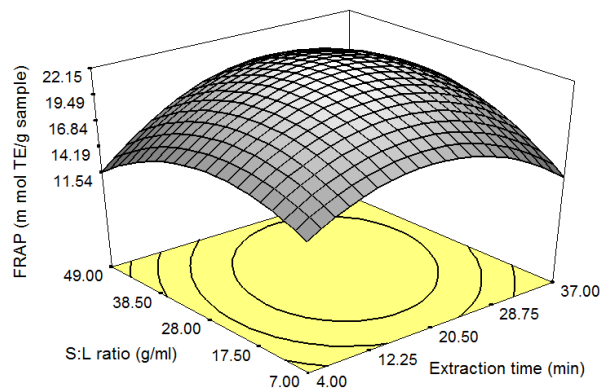
(b)



(c)



(d)



(e)

ภาพที่ 1 กราฟพื้นที่ผิวตอบสนองของสภาวะในการสกัดกลีบดอกบัวสายของอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยที่ใช้ศึกษาต่อค่า TP

(a-b), TF (c), DPPH (d) และ FRAP (e)

จากการศึกษาปัจจัยที่มีต่อสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายที่เหมาะสมต่อค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP สูงสุด ที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Design expert พบว่าปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยด้วยการใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 59.17 เปอร์เซ็นต์ (X_1) ระยะเวลาในการสกัดที่ 21.48 นาที (X_2) และใช้อัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายต่อสารละลายเอทานอลที่ 1:27.87 (g/ml) (X_3) มีผลต่อค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP สูงสุด โดยมีค่า TP, TF เท่ากับ 51.50 mg GAE/g และ 27.63 mg CE/g ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีค่าเท่ากับ 28.32 m mol TE/g และ 22.11 m mol TE/g ตามลำดับ นำสภาวะการสกัดที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้ในการทดสอบการทวนสอบสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายที่เหมาะสมจากการทำนายต่อไป

4. การทวนสอบสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายที่เหมาะสม

นำสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายที่เหมาะสมจากการทำนายด้วยโปรแกรมมาใช้ในการทวนสอบสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายอีกครั้ง ในการทดลองซ้ำจะทำการปรับค่าที่ได้จากการทำนายของทั้ง 3 ปัจจัยให้เป็นจำนวนเต็มหรือใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนายมากที่สุด ดังนั้นในการทวนสอบสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดกลีบดอกบัวสายด้วยการใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 59.00 เปอร์เซ็นต์ (X_1) ระยะเวลาในการสกัดที่ 22.00 นาที (X_2) และใช้อัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายต่อสารละลายเอทานอลที่ 1:28.00 (g/ml) (X_3) โดยใช้สภาวะของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยในการสกัดที่ระดับ worse (50.00, 10.00, 15.00) ระดับ high (80.00, 30.00, 40.00) และระดับ center (65.00, 20.00, 27.50) ดังตารางที่ 4 มาทำการทดลองซ้ำและทดสอบเพื่อยืนยันผลของการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ภายใต้สภาวะเดียวกัน พบว่ามีปริมาณ TP และ TF เท่ากับ 51.01 ± 1.50 mg GAE/g และ 27.32 ± 1.81 mg CE/g และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีค่าเท่ากับ 29.69 ± 1.41 และ 21.42 ± 0.58 m mol TE/g ตามลำดับ นำค่าจากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มาเปรียบเทียบกับค่าจริงที่ได้จากการทดลองจริงอีกครั้งเพื่อยืนยันผลของการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่าค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์และค่าจากการทำนายของสภาวะของการสกัดที่ระดับต่ำ ระดับสูง ระดับกลาง และสภาวะที่เหมาะสมมีค่าใกล้เคียงกัน โดยพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์ของความคลาดเคลื่อน (%E) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.27 ถึง 1.54, 0.38 ถึง 2.94, 0.16 ถึง 2.79 และ 0.81 ถึง 1.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ตารางที่ 4 การทวนสอบค่าที่ได้จากการทำนายและค่าที่ได้จากการทดลองซ้ำของสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายที่แตกต่างกันต่อค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP

Responses	Extraction conditions			
	Worse ^a	High ^b	Center ^c	Optimum ^d
Predicted value				
TP	45.32	41.67	50.94	51.50
TF	24.43	20.05	27.35	27.63
DPPH	24.77	25.92	28.13	28.32
FRAP	18.45	18.47	21.79	22.11
Experimental value				
TP	45.69±0.95	41.32±1.61	48.69±1.86	51.01±1.50
TF	22.83±2.73	21.19±1.21	25.13±1.66	27.32±1.81
DPPH	26.02±2.56	25.80±1.70	30.70±1.98	29.69±1.41
FRAP	18.91±0.52	17.46±1.04	20.97±1.42	21.42±0.58
% E				
TP	0.27	0.28	1.54	0.32
TF	2.34	1.79	2.94	0.38
DPPH	1.60	0.16	2.79	1.54
FRAP	0.81	1.93	1.30	1.07

^a Worse (run 1): $X_1 : X_2 : X_3$ as 50.00 : 10.00 : 15.00

^b High (run 8) : $X_1 : X_2 : X_3$ as 80.00 : 30.00 : 40.00

^c Center (run 15) : $X_1 : X_2 : X_3$ as 65.00 : 20.00 : 27.50

^d Optimum : $X_1 : X_2 : X_3$ as 59.00 : 22.00 : 28.00

วิจารณ์ผลการวิจัย

การนำวิธี RSM ด้วยการวางแผนการทดลองแบบ CCD มาใช้ในการศึกษาสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายที่เหมาะสมร่วมกับการใช้อัลตราโซนิก โดยศึกษาปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล (X_1) ระยะเวลาในการสกัด (X_2) และอัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายต่อสารละลายเอทานอล (X_3) ที่มีต่อค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ในปริมาณสูงสุด พบว่าค่า TP จากสิ่งทดลองที่ 16 มีค่า 51.68 mg GAE/g ค่า TF จากสิ่งทดลองที่ 17 มีค่า 27.99 mg CE/g และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากสิ่งทดลองที่ 15 มีค่า 28.90 m mol TE/g และ FRAP จากสิ่งทดลองที่ 18 มีค่า 22.34 m mol TE/g ด้วยการใส่สภาวะการสกัดในระดับกลาง (center point) ในขณะที่สภาวะการสกัด

ของสิ่งทดลองที่ 6 มีผลต่อสมบัติของสารสกัดในปริมาณที่น้อยที่สุดเท่ากับ 35.03 mg GAE/g, 16.22 mg CE/g, 22.59 m mol TE/g และ 15.02 m mol TE/g ตามลำดับ นำผลจากการทดลองนี้เปรียบเทียบกับผลการศึกษานักวิจัยท่านอื่นได้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน โดย Nakprasom *et al.* (2017) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากดอกบัวหลวง โดยเทคนิคสกัดด้วยไมโครเวฟ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 134.58±0.20 mg GAE/g DW และมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 24.02 เปอร์เซ็นต์ และ Wongklang *et al.* (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของบัวหลวงด้วยการหมักด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่ากลีบบัวหลวงมีค่า EC_{50} เท่ากับ 16.32 µg/ml เป็นปริมาณที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนประกอบต่างๆ ของบัวหลวง ซึ่งผลการทดลองที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์บัว ชนิดและความเข้มข้นของสารละลาย วิธีและเครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการสกัด

จากการศึกษาสภาวะการสกัดด้วย RSM ร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบ CCD โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอย (regression coefficient) ที่แตกต่างกันในแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาสอดคล้องกับค่า p ในตารางที่ 3 พบว่าแบบจำลองทั้ง 4 มีความเหมาะสมกับการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โพลีโนเมียลลำดับที่ 2 เนื่องจากค่า p มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในแต่ละค่าสัมประสิทธิ์และปฏิสัมพันธ์ที่สูงในแต่ละปัจจัย แต่ถ้าค่า p มีค่าน้อยกว่า 0.05 จะแสดงถึงตัวแปรที่มีความสำคัญที่มากกว่า จากค่า R^2 ของแบบจำลองของ TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ที่ได้จากการทดลองมีความเหมาะสมที่สามารถนำมาใช้อธิบายความสัมพันธ์ของค่าปัจจัยที่ใช้ในการศึกษากับค่าสมบัติของสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.965 - 0.979 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sai-Ut *et al.* (2015) พบว่าค่า R^2 ที่ได้ควรมีค่ามากกว่า 0.80 เป็นการชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่สูงระหว่างคำตอบสนองกับปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาของแบบจำลองนั้นๆ นอกจากค่า R^2 ที่ต้องมีค่ามากกว่า 0.80 แล้ว Chodok & Khumkhom (2020) กล่าวว่าค่า R^2 ที่มีค่าเข้าใกล้ 1.00 มากแสดงถึงแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มีความเหมาะสมมาก นอกจากนี้ความสมบูรณ์ (lack of fit) ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ต้องมีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งแสดงถึงความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบโพลีโนเมียลมีความเหมาะสมกับข้อมูลการทดลอง จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีค่าที่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.0774, 0.1092, 0.8482 และ 0.1424 ตามลำดับ จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองที่ได้มีความสมบูรณ์ที่เพียงพอกับข้อมูลจากการทดลอง มีความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบโพลีโนเมียล ซึ่งแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ทั้ง 4 ในสมการที่ 3-6 สามารถใช้ทำนายค่า TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ได้อย่างถูกต้อง

จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ดังสมการที่ 3-6 พบว่าสมการที่ได้มีความเหมาะสม เนื่องจากผลจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการทั้ง 4 มีค่า $p < 0.0001$ ซึ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าความสมบูรณ์ของทุกสมการมีค่า $p > 0.05$ สำหรับค่า R^2 และค่า $R^2\text{-adj}$ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.965 - 0.979 และ 0.926-0.955 สามารถสรุปได้ว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองและจากการทำนายมีความเข้ากันได้ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ 3-6 มีความแม่นยำสามารถนำมาใช้ในการทำนายหาสภาวะที่เหมาะสมได้

อิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาทั้ง 3 ปัจจัย ที่มีต่อกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ มีผลต่อปริมาณ TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลเพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นขั้ว (polarity) ของสารละลาย โดยปกติสารประเภทฟีนอลิกสามารถละลายออกมาจากเซลล์ของวัตถุได้ในกระบวนการสกัด สอดคล้องกับ Şahin & Samil (2013) พบว่าน้ำที่อยู่ในสารละลายทำให้โครงสร้างของพืชเกิดการรวมส่งผลให้แอลกอฮอล์สามารถเข้าไปในพืชเพิ่มการละลายของฟีนอลิกสู่สารละลาย ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกในพืชจะอยู่ในรูปของ aglycone อิสระ หรือ glycoside ดังนั้นปริมาณของฟีนอลิกที่สกัดได้จะถูกกำหนดตามความเป็นขั้วของสารประกอบที่ตรงกับประเภทของฟีนอลิก (Feng *et al.*, 2015) เนื่องจากเอทานอลมีสมบัติความเป็นขั้วต่ำกว่าน้ำ (Chew *et al.*, 2011) ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลมีผลต่อความเป็นขั้วของสารละลาย ทำให้ค่าความเป็นขั้วยิ่งลดลงส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิกที่สกัดได้ลดลง ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ถูกสกัดมาจะมีความเป็นขั้วที่เหมือนกับความเป็นขั้วของสารละลาย จากการศึกษาพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 58.15 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อสมบัติความเป็นขั้วของเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงส่งผลต่อการละลายของ TP และ TF ทำให้มีปริมาณแนวโน้มที่ลดลง ส่วนอิทธิพลของอัตราส่วนระหว่างกลีบดอกบัวสายต่อปริมาณสารละลายเอทานอลมีผลต่อปริมาณ TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณอัตราส่วนดังกล่าวเพิ่มขึ้น โดยอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นจะช่วยให้การกระจายพลังงานของคลื่นอัลตราโซนิกในระหว่างกระบวนการสกัด โดยคลื่นจะเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลายและทำให้เกิดฟอง (bubble) จากคลื่นในช่วงอัดทำให้ฟองนั้นแตกออกและเกิด micro jet ที่มีความแรงมากสามารถทำลายผนังเซลล์ของพืชทำให้เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลได้ดียิ่งขึ้น (Vilkhu *et al.*, 2008) ถึงแม้ว่าการใช้อัตราส่วนของกลีบดอกบัวสายต่อปริมาณสารละลายเอทานอลเพิ่มขึ้นจะมีผลให้ปริมาณ TP และ TF มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณที่อัตราส่วนที่สูงสุดที่ใช้ในการสกัดไม่ได้มีประโยชน์ในการสกัดสารให้มีปริมาณมากขึ้น แต่จะไปทำให้ต้นทุนในการสกัดเพิ่มขึ้นแทน (Cissé *et al.* 2011) นอกจากนี้อัตราส่วนระหว่างกลีบดอกบัวสายต่อปริมาณสารละลายเอทานอลที่เพิ่มขึ้นจะไปเจือจางสารละลายในการสกัดจึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีปริมาณที่ลดลง (Ngoc *et al.*, 2019) เมื่ออัตราส่วนระหว่างกลีบดอกบัวสายต่อปริมาณสารละลายเอทานอลที่ลดลงมีผลต่อพื้นที่ผิวของตัวอย่างที่สัมผัสกับสารละลายลดลง มีผลต่อการเกิดการสร้างฟองอากาศแบบควิวเทชัน ซึ่งลดการถ่ายเทมวลระหว่างตัวทำละลายและตัวอย่าง Pandey *et al.* (2018) ส่งผลให้ค่า TP มีแนวโน้มลดลง เมื่อพิจารณาค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดกลีบดอกบัวสาย พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกับฟีนอลิก จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Pandey *et al.* (2018) และ Nakprasom *et al.* (2017) พบว่าผลตอบสนองของค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะมีแนวโน้มไปในทางเดียวกับค่าตอบสนองของฟีนอลิก ส่วนปัจจัยด้านเวลาของการสกัดกลีบดอกบัวสาย พบว่าเมื่อระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นปริมาณ TP, TF และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP มีค่าเพิ่มขึ้นเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Chodok & Khumkhom (2020) ในการเพิ่มระยะเวลาการสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ทำให้เกิดการแพร่และถ่ายเทมวลสาร ส่งผลให้ TP และ TF ถูกสกัดออกมามากและสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

แต่เมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดนานเกินความเหมาะสม ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกลดลงเนื่องจากพันธะเอสเทอร์ของสารประกอบฟีนอลิกเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารชนิดอื่น (Dahmoune *et al.*, 2014)

จากการนำข้อมูลการทำนายเทียบกับข้อมูลการทดลองซ้ำเพื่อทดสอบสมภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายที่เหมาะสมภายใต้สภาวะเดียวกัน พบว่าข้อมูลจากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกับข้อมูลการทดลองซ้ำ เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์ของความคลาดเคลื่อน (%E) ด้วยการนำค่าที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลองจริงอีกครั้ง เพื่อยืนยันการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์มีค่าอยู่ระหว่าง 0.16-2.94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือได้ว่าเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่มีความน่าเชื่อถือเนื่องจากเป็นค่าความคลาดเคลื่อนน้อยซึ่งสอดคล้องกับ Chodok & Khumkhom (2020) ที่กล่าวว่าเปอร์เซ็นต์ของความคลาดเคลื่อนจากการศึกษาที่ยอมรับได้ไม่ควรเกิน 10 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายที่เหมาะสมด้วยอัลตราโซนิกควบคู่กับการประยุกต์ใช้ RSM และออกแบบการทดลองแบบ CCD พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้มีความเหมาะสม เนื่องจากผลจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการทั้ง 4 มีค่า $p < 0.0001$ มีความเหมาะสมกับการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กำลังสอง มีค่าความสมบูรณ์ของทุกสมการที่ $p > 0.05$ มีค่า R^2 อยู่ระหว่าง 0.965-0.979 โดยมีสภาวะการสกัดกลีบดอกบัวสายที่เหมาะสมด้วยการใช้สารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้น 59.00 เปอร์เซ็นต์ (X_1) ระยะเวลาในการสกัดที่ 22.00 นาที (X_2) และใช้อัตราส่วนของกลีบบัวสายต่อสารละลายเอทานอลที่ 1:28.00 (g/ml) (X_3) โดยค่าที่ได้จากการทดลองและค่าจากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกันซึ่งแสดงถึงแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สามารถนำมาใช้ในการทำนายหาสภาวะที่เหมาะสมได้ โดยสภาวะของการสกัดสามารถใช้เป็นแนวทางในการนำกลีบของดอกบัวสายที่เหลือจากการแยกขายสายบัวมาใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่สนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Chakraborty, S., Uppaluri, R., & Das, C. (2020). Optimization of ultrasound-assisted extraction(UAE) process for the recovery of bioactive compounds from bitter melon using response surface methodology (RSM).

Food and Bioproducts Processing, 120, 114-122.

Chew, K.K., Khoo, M.Z., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Wan Aida, W.M., & Ho, C.W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18, 1427-1435.



- Chmelová, D., Škulcová, D., Legerská, B., Horník, M., & Ondrejovič, M. (2020). Ultrasonic-assisted extraction of polyphenols and antioxidants from *Picea abies* bark. *Journal of Biotechnology*, 314, 25-33.
- Chodok, P., & Khumkhom. S. (2020). Optimization of extraction conditions for improving bioactive compounds and antioxidant activities from karonda (*Carissa carandas* Linn.) fruits using response surface methodology. *Burapha Science Journal*, 25, 617-635. (in Thai)
- Cissé, M., Bohuon, P., Sambe, C., Kane, C., Sakho, M., & Dornier, M. (2011). Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*, 109, 16-21.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. (2014). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, 166, 585-595.
- Dangnoi, T. (2016). Phytochemical screening and biological activities of *Nelumbo nucifera* Gaerth. Master thesis, Burapha university, Chonburi. (in Thai)
- Feng, S., Luo, Z., Tao, B., & Chen, C. (2015). Ultrasonic-assisted extraction and purification of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rinds. *LWT- Food Science and Technology*, 60, 970-976.
- Hammi, K.M., Hammami, M., Rihouey, C., Cerf, D.L., Ksouri, R., & Majdoub, H. (2016). Optimization extraction of polysaccharide from Tunisian *Zizyphus lotus* fruit by response surface methodology: Composition and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 212, 476-484.
- Hossain, M.B., Brunton, N., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B., & Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 582-590.
- Hu, M., & Skibsted, L.H. (2002). Antioxidative capacity of Rhizome extract and Rhizome knot extract of edible Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Food Chemistry*, 76, 327-333.



- Kredy, H.M., Huang, D., Xie, B., He, H., Yang, E., Tian, B., & Xiao, D. (2010). Flavonols of lotus (*Nelumbo nucifera*, Gaertn.) seed epicarp and their antioxidant potential. *European Food Research and Technology*, 231, 387-394.
- Nakprasom, K., Warit, J., Auppara, A., Tanongkarkkit, Y., & Nakprasom, N. (2017). Optimized extraction of total phenolic compounds from *Nelumbo nucifera* Gaertn using microwave assisted extraction (MAE). *KKU Science Journal*, 45(2), 328-342. (in Thai)
- Ngoc, Y.N.T., Tri, D.L., Khanh, Q.N.H., Nguyen, D.C., & Bach, L.G. (2019). Extraction conditions of polyphenol, flavonoid compounds with antioxidant activity from *Veronid amygdalina* del. Leaves: modeling and optimization of the process using the response surface methodology RSM. *Materials Today: Proceedings*, 18, 4004-4010.
- Pandey, A., Belwal, T., Sekar, K.C., Bhatt, I.D., & Rawal, R.S. (2018). Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of phenolics and antioxidant compounds from rhizomes of *Rheum moorcroftianum* using response surface methodology (RSM). *Industrial Crops & Products*, 119, 218-225.
- Riciputi, Y., Diaz-de-Cerio, E., Akyol, H., Capanoglu, E., Cerretani, L., Caboni, M.F., & Verardo, V. (2018). Establishment of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from industrial potato by-products using response surface methodology. *Food Chemistry*, 269, 259-263.
- Şahin, S., & Samli, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 595–602
- Sai-Ut, S., Benjakul, S., Kraithong, S., & Rawdkuen, S. (2015). Optimization of antioxidants and tyrosinase inhibitory activity in mango peels using response surface methodology. *Food Science and Technology*, 64, 742-749.



- Samavardhana, K., Supawitpattana, P., Jitrepotch, N., Rojsuntornkitti, K., & Kongbangkerd, T. (2015). Effects of extracting conditions on phenolic compounds and antioxidant activity from different grape processing byproducts. *International Food Research Journal*, 22, 1169-1179.
- Sreela-or, C., Plangklang, P., Imai, T., & Reungsang, A. (2011). Co-digestion of food waste and sludge for hydrogen production by anaerobic mixed cultures: Statistical key factors optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 14227-14237.
- Steinrut, L., Kamdaeng, O., & Srisawat, K. (2017). Antioxidant activity of *Nelumbonucifera* and Lotus Part fortified in kleep lumduan. ASTC2017:The5th Academic Science and Technology Conference 2017. 448-453. (in Thai)
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry- A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 161-169.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
- Wongklang, S., Steinrut, L., & Itharat, A. (2014). Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* Gaerth. extract. *Agricultural Science Journal (Suppl.)*, 45(2), 673-676. (in Thai).
- Yang, Q.Q., Gun, R.Y., Zhang, D., Ge, Y.Y., Cheng, L.Z., & Corke, H. (2019). Optimization of kidney bean antioxidants using RSM & ANN and characterization of antioxidant profile by UPLC-QTOF-MS. *LWT-Food Science and Technology*, 114, 1-9.
- Živković, J., Šavikin, K., Janković, T., Čujić, N., & Menković, Č.N. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 194, 40-47.