

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารลูทีน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรืองโดยใช้อัลตราโซนิก

Optimization for Lutein Extract and Antioxidant Activity from Marigold Flowers

(*Tagetes erecta* L.) Using Ultrasonic Assisted Extraction

นิภาธร วิลัยลักษณ์, นักรบ นาคประสม, หยาดฝน ทนงการกิจ, มุกกรีน หนูคง,

ชวกร ศรีเงินยวง และ กาญจนา นาคประสม*

Nipathon Wilailak, Nukrob Narkprasom, Yardfon Tanongkankit, Mookarin Nookong,

Chawakorn Sri-ngernyuang and Kanjana Narkprasom*

สาขาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประเทศไทย

Graduate Program in Food Engineering, Faculty of Engineering and Argo-Industry, Maejo University, Thailand

Received : 9 April 2025, Received in revised form : 12 June 2025, Accepted : 14 June 2025

Available online : 7 July 2025

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : ดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) เป็นพืชไม้ดอกเศรษฐกิจที่สามารถเพาะปลูกได้ตลอดทั้งปี และเป็นแหล่งสำคัญของสารลูทีน ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีบทบาทในการลดความเสี่ยงของโรคจอประสาทตาเสื่อม และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยปกป้องเซลล์จากความเสียหายที่อาจนำไปสู่โรคเรื้อรัง อย่างไรก็ตาม ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ลูทีนได้ จึงจำเป็นต้องได้รับจากการบริโภคอาหาร จากการศึกษาพบว่าการสกัดลูทีนโดยทั่วไปถูกสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และอะซิโตน ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการสกัดสารลูทีนและสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรือง โดยใช้กระบวนการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic-assisted extraction: UAE) ร่วมกับเอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ปลอดภัยและไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยมุ่งเน้นศึกษาผลของตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด ได้แก่ แอมพลิจูด, เวลาในการสกัด และความเข้มข้นของตัวทำละลาย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดและคงคุณสมบัติของสารสำคัญให้ได้สูงสุด

วิธีดำเนินการวิจัย : ดอกดาวเรืองถูกล้างด้วยน้ำที่ผ่านกระบวนการรีเวิร์สออสโมซิส (RO) จำนวน 3 ครั้ง เพื่อลดสิ่งสกปรกและการปนเปื้อน จากนั้นผึ่งแห้งในที่ร่มจนระดับความชื้นลดลงในเบื้องต้น ก่อนแยกกลีบดอกออกจากช่อดาวเรืองและนำไปอบแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 °C ที่ความดันไม่เกิน 10 Pa จนกระทั่งมีความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 10 หลังจากนั้น นำกลีบดอกดาวเรืองที่อบแห้งแล้วมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดแห้งจนกระทั่งความเร็วยรอบ 25,000 รอบต่อนาที ผงดอกดาวเรืองที่ได้จะถูกนำไปผสมกับตัวทำละลายเอทานอล และทำการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรือง ในการศึกษาใช้การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design: BBD) โดยศึกษาปัจจัยทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ แอมพลิจูด (ร้อยละ 20, 40 และ 60), เวลาในการสกัด (5, 15 และ 25 นาที) และความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล (ร้อยละ 40, 60 และ 80) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณ

สารลูทีนด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และวิเคราะห์ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ผลการทดลองถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ และความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่มีต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการวิจัย : จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรืองด้วยคลื่นอัลตราโซนิก พบว่า ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล และเวลาในการสกัด เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากเอทานอลมีสมบัติเป็นตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว จึงสามารถสกัดสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชได้ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว โดยเฉพาะสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งมักพบร่วมกับลูทีนในดอกดาวเรือง และมีบทบาทร่วมในการต้านอนุมูลอิสระ สำหรับเวลาในการสกัด พบว่าการเพิ่มระยะเวลาในระดับที่เหมาะสมสามารถส่งเสริมการแพร่และถ่ายเทมวลของสารออกฤทธิ์จากเนื้อเยื่อพืชเข้าสู่ตัวทำละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม หากเวลาในการสกัดยาวนานเกินไป อุณหภูมิภายในระบบจะเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการสลายตัวของสารลูทีนเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและแสง และในส่วนของแอมพลิจูด พบว่าการเพิ่มแอมพลิจูดมีแนวโน้มช่วยเพิ่มปริมาณสารลูทีนที่สกัดได้ โดยผ่านกลไกของฟองอากาศที่เกิดจากคลื่นอัลตราโซนิก ซึ่งจะยุบตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้โครงสร้างผนังเซลล์พืชแตกตัวและสารสำคัญสามารถแพร่ออกมาได้มากขึ้น หากแอมพลิจูดสูงเกินไปอาจก่อให้เกิดความดันและอุณหภูมิสะสมในระบบ ส่งผลให้สารสำคัญสลายตัว และแม้ว่าค่าดังกล่าวจะส่งผลต่อปริมาณลูทีนที่สกัดได้ แต่กลับไม่แสดงนัยสำคัญทางสถิติเมื่อพิจารณาร่วมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สรุปผลการวิจัย : ดอกดาวเรืองมีองค์ประกอบของสารลูทีนและสารต้านอนุมูลอิสระในระดับสูง ซึ่งสามารถสกัดได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ แอมพลิจูดร้อยละ 42 เวลาในการสกัด 16 นาที และความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 80 ภายใต้สภาวะนี้สามารถสกัดลูทีนได้สูงสุด 7.06 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดร้อยละ 79.82 ผลการวิเคราะห์ ANOVA แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีความแม่นยำและเชื่อถือได้ในการทำนาย โดยมีค่า R^2 ของปริมาณสารลูทีน (Y_1) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Y_2) เท่ากับ 0.9691 และ 0.9943 ตามลำดับ และมีค่า Significance F ต่ำกว่า 0.001 แสดงถึงความเหมาะสมของแบบจำลองในการใช้งานเพื่อการทำนายผลการสกัดอย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : ดอกดาวเรือง ; สารลูทีน ; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ; การหาสภาวะที่เหมาะสม ; การสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก

Abstract

Background and Objectives : Marigold (*Tagetes erecta* L.) is an economically valuable flowering plant that can be cultivated year-round. It is recognized as a rich natural source of lutein, a carotenoid compound that plays a significant role in reducing the risk of age-related macular degeneration. Moreover, lutein exhibits antioxidant properties that help protect cells from oxidative damage, potentially reducing the risk of chronic diseases. However, since the human body cannot synthesize lutein, it must be obtained through dietary intake. Conventional methods of lutein extraction typically rely on organic solvents such as hexane and acetone. Although effective, these solvents

are hazardous to both human health and the environment. Therefore, this study aims to develop a safer and more sustainable method for extracting lutein and antioxidant compounds from marigold petals. The proposed method utilizes ultrasound-assisted extraction (UAE) combined with ethanol, a food-grade solvent known for its environmental friendliness and low toxicity. The research specifically focuses on identifying optimal extraction conditions by evaluating three critical parameters: ultrasonic amplitude, extraction time, and ethanol concentration. The goal is to maximize extraction efficiency while preserving the bioactive properties of the target compounds.

Methodology : Fresh marigold flowers were first washed three times with reverse osmosis (RO) water to remove impurities and potential contaminants. The flowers were then air-dried in the shade to reduce initial moisture levels. Once adequately dried, the petals were separated from the calyx and subjected to freeze-drying at -40 °C under vacuum pressure not exceeding 10 Pa until the moisture content dropped below 10%. The dried marigold petals were ground into a fine powder using a high-speed multifunctional dry grinder operating at 25,000 rpm. The powder was then mixed with ethanol in varying concentrations and subjected to ultrasound-assisted extraction using a specialized ultrasonic device. The experimental design was based on the Box-Behnken Design (BBD), a response surface methodology that allows for the assessment of multiple variables and their interactions. The study investigated three independent variables: ultrasonic amplitude (20%, 40%, and 60%), extraction time (5, 15, and 25 minutes), and ethanol concentration (40%, 60%, and 80%). The extracted samples were analyzed for lutein content using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and for antioxidant activity using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay. Data from the experiments were subjected to Analysis of Variance (ANOVA) using the SPSS software to identify statistically significant factors and interactions affecting the extraction efficiency.

Main Results : The study revealed that both ethanol concentration and extraction time significantly influenced the efficiency of lutein and antioxidant extraction. Ethanol, being a semi-polar solvent, has the ability to solubilize both polar and non-polar bioactive compounds. This characteristic enables it to co-extract phenolic compounds and flavonoids, which are known to be present alongside lutein in marigold petals. These compounds collectively contribute to the overall antioxidant capacity of the extract. Increasing the extraction time up to an optimal level facilitated better mass transfer and diffusion of bioactive compounds from plant tissues into the solvent. However, prolonged extraction times beyond the optimal range led to increased internal system temperatures, which may promote oxidative degradation, especially in heat-sensitive compounds like lutein. This degradation ultimately results in lower yields. Regarding ultrasonic amplitude, the study found that higher amplitudes generally enhanced the release of lutein from plant tissues. This is attributed to the cavitation effect generated by ultrasonic waves, where microbubbles collapse violently, causing the rupture of plant cell walls and facilitating the release of

intracellular compounds. Nevertheless, excessive amplitude may lead to elevated pressures and temperatures within the extraction medium, which could again result in the degradation of sensitive compounds. Interestingly, while amplitude had a noticeable effect on lutein yield, it did not significantly influence the antioxidant activity of the extracts. This could be due to the insufficient intensity of the ultrasonic treatment to disrupt cellular structures enough to release additional antioxidant compounds beyond those already extracted by ethanol.

Conclusions : Marigold flowers are a valuable botanical source of lutein and antioxidant compounds, both of which can be effectively extracted using ultrasound-assisted extraction techniques. Based on response surface methodology analysis, the optimal extraction conditions were determined to be 42% amplitude, 16 minutes of extraction time, and 80% ethanol concentration. Under these optimized conditions, the maximum lutein yield was 7.06 mg per gram of sample, and the highest antioxidant activity observed was 79.82%. The ANOVA results demonstrated a high degree of model fit and prediction reliability, with R^2 values of 0.9691 for lutein content (Y_1) and 0.9943 for antioxidant activity (Y_2). Furthermore, the Significance F values were found to be less than 0.001, indicating the statistical significance and robustness of the predictive models developed through the Box-Behnken Design. This study underscores the potential of ultrasound-assisted extraction using ethanol as a green, efficient, and scalable technique for extracting valuable bioactive compounds from marigold flowers. Not only does it offer a safer alternative to traditional organic solvents, but it also supports sustainability goals by minimizing environmental impact and reducing extraction time and energy consumption.

Keywords : marigold, lutein, antioxidant activity, optimization, ultrasonic extraction

*Corresponding author. E-mail : kanjana_n@mju.ac.th

Introduction

ดอกดาวเรือง (ชื่อสามัญ: Marigold; ชื่อวิทยาศาสตร์: *Tagetes erecta* L.) พันธุ์ไม้พื้นเมืองของประเทศเม็กซิโกและประเทศแถบทวีปอเมริกาใต้ จัดเป็นไม้ล้มลุก ที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วประเทศไทย เนื่องจากแข็งแรง ปลูกง่าย และสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี ดอกดาวเรืองสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ เช่น การสกัดเพื่อทำสีธรรมชาติสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและอาหาร หรือใช้กลีบดอกแห้งผสมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มสีของไข่แดงและเนื้อไก่ นอกจากนี้ยังสามารถนำกลีบดอกดาวเรืองมาสกัดสารสำคัญที่ใช้ในการผลิตอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ เนื่องจากมีลูทีน (Lutein) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) เป็นองค์ประกอบสูงถึงร้อยละ 90 (Kurniawan *et al.*, 2019)

ลูทีน (Lutein) เป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง และโรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการชะลอความเสื่อมของจอประสาทตา โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ (Age-related Macular Degeneration:

AMD) (Nguyen *et al.*, 2023) ในร่างกายมนุษย์ ลูทีนพบได้ในปริมาณสูงบริเวณเลนส์ตาและจุดรับภาพของจอประสาทตา หรือบริเวณมาคูลา (Macula) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเรตินา (Retina) โดยทำหน้าที่สำคัญในการกรองแสงสีฟ้าที่มีพลังงานสูงไม่ให้ทะลุเข้าสู่จอประสาทตา ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์รับแสงได้ อย่างไรก็ตาม ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์สารลูทีนได้เอง จำเป็นต้องได้รับจากอาหารหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเท่านั้น แม้ลูทีนจะมีประโยชน์ทางสุขภาพหลากหลายประการ แต่อย่างไรก็ตาม ลูทีนมีข้อจำกัดด้านคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น การละลายน้ำได้ไม่ดี และมีความไวต่อปัจจัยแวดล้อม ส่งผลต่อความคงตัวในระหว่างกระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษา จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมจากแหล่งธรรมชาติที่อุดมไปด้วยสารลูทีน เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้อย่างเหมาะสม

ในปัจจุบัน ประเด็นด้านสิ่งแวดล้อมได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย ทั้งในระดับบุคคลและระดับสังคม โดยมีการส่งเสริมและรณรงค์ให้เกิดการตระหนักรู้และมีส่วนร่วมในการอนุรักษ์และปกป้องสิ่งแวดล้อมของโลกมากยิ่งขึ้น เช่น การประหยัดพลังงาน การลดปริมาณของเสีย (Waste minimization) การใช้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Environmental friendly products) เป็นต้น ดังนั้นการผลิตสินค้าในเชิงพาณิชย์ (Commercialization) ต้องคำนึงถึงปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมเป็นสำคัญ จากการศึกษาพบว่า การสกัดสารลูทีนโดยทั่วไปถูกสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และอะซิโตน ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม การสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรืองด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasound-assisted extraction: UAE) โดยมีตัวทำละลายเป็นเอทานอล ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ใช้ความร้อน สามารถควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ได้ เช่น เวลา อุณหภูมิ คลื่นอัลตราโซนิก เป็นต้น สามารถลดการเสื่อมสลายของสารสำคัญจะเสื่อมสลาย กระบวนการที่มีความรวดเร็วสามารถลดเวลาในการสกัดและลดการใช้พลังงานลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความปลอดภัยและเป็นทางเลือกที่เหมาะสมต่อการลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ข้อดีของการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย คือ เอทานอลมีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลแบบมีขั้ว (Dipole Interactions) และลูทีนเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สามารถละลายได้ดีกับตัวทำละลายที่มีขั้ว จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้แสดงการนำคลื่นอัลตราโซนิกใช้ร่วมกับตัวทำละลายที่เป็นเอทานอลเพื่อสกัดสารลูทีน เช่น Jaeschke *et al.* (2017) รายงานว่าการสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย *Heterochlorella luteoviridis* โดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก โดยมีตัวทำละลายเป็นเอทานอล ผลจากการสกัดพบว่าที่ ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 75 และความเข้มข้นของคลื่นอัลตราโซนิกร้อยละ 50 สามารถสกัดสารแคโรทีนอยด์ได้มากถึงร้อยละ 80 นอกจากนี้ Derrien *et al.* (2017) รายงานว่าการสกัดสารลูทีนจากผักโขมโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก โดยมีตัวทำละลายเป็นเอทานอลและน้ำ พบว่าเอทานอลมีผลต่อการสกัดลูทีน ปริมาณสารลูทีนเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรืองด้วยคลื่นอัลตราโซนิก โดยศึกษาผลของปัจจัยที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ แอมพลิจูด, เวลาในการสกัด และความเข้มข้นของเอทานอล

Methodology

1. วัตถุดิบ และการเตรียมตัวอย่าง

ดอกดาวเรืองถูกล้างด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ผ่านกระบวนการรีเวิร์สออสโมซิส (RO) จำนวน 3 ครั้ง เพื่อลดสิ่งสกปรกและการปนเปื้อน จากนั้นผึ่งแห้งในที่ร่มจนระดับความชื้นลดลงในเบื้องต้น ตัดแยกส่วนกลีบดอกและช่อดอกออกจากกัน นำส่วนกลีบดอกไปอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-Drying Machine) ยี่ห้อ SCIENTZ รุ่น DW-50F ประเทศจีน อุณหภูมิในการระเหิด -40 องศาเซลเซียส ที่ความดันไม่เกิน 10 Pa จนมีปริมาณความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 10 หลังจากนั้นนำกลีบดอกดาวเรืองที่อบแห้งแล้วไปบดด้วยเครื่องบดแห้งอเนกประสงค์ ยี่ห้อ NANOTECH รุ่น NT-500D ประเทศไทย ที่ความเร็วรอบ 25,000 ต่อนาทีให้ละเอียด ผงดอกดาวเรืองถูกกรองผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช เพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคที่สม่ำเสมอ และเก็บใส่ถุงที่ปิดผนึกด้วยสุญญากาศเพื่อใช้ในขั้นตอนถัดไป

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารลูทีนจากดอกดาวเรืองด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

นำผงดอกดาวเรืองผสมกับตัวทำละลาย ทำการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (Probe sonicator) ยี่ห้อ Sonics รุ่น VCX750A ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่แอมพลิจูด ร้อยละ 20-60, เวลาในการสกัด 15-35 นาที และความเข้มข้นของเอทานอล ร้อยละ 40-80 โดยเครื่องอัลตราโซนิกทำงานที่กำลังขับสูงสุด 400 W, ความถี่ 20 kHz และการทำงานแบบพัลซิงโหมด (เปิด 2 วินาที/ปิด 1 วินาที) ขนาดหัวโพรบเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ความลึก 2 เซนติเมตรจากตัวอย่าง จากนั้นกรองสารสกัดที่ได้โดยการนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Universal centrifuge) ยี่ห้อ Dynamic รุ่น VELOCITY 18R ประเทศออสเตรเลีย ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที โดยมีค่าแรงเหวี่ยง (Relative Centrifugal Force) เท่ากับ 4,105 เท่าของแรง g เป็นเวลา 15 นาที (Narkprasom *et al.*, 2015) เพื่อแยกตะกอนออกจากสารสกัด กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) ยี่ห้อ Quantum รุ่น EVAP-5L ประเทศไทย ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาตรสุดท้ายและเก็บสารสกัดส่วนใสไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3. การออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง แบบ Box-Behnken Design

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรืองซึ่งออกแบบการทดลองโดยใช้การทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design: BBD) ด้วยโปรแกรม STATISTICA 64 V.12 ปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ แอมพลิจูด (%), เวลาในการสกัด (นาที) และความเข้มข้นของตัวทำละลาย (%) โดยแปรผันค่า X_1 , X_2 , และ X_3 การทดลองจะตั้งค่ารหัสของระดับปัจจัยที่ใช้ในการทดลองเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) ดังแสดงใน Table 1 หลังการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 3 การทดลอง รวมทั้งหมด 15 การทดลอง ทำการวิเคราะห์ผลที่เกิดจากความสัมพันธ์ของตัวแปรหลายตัวแปร เพื่อหาค่าที่ดีที่สุดของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร การถดถอยและได้สมการพหุนาม ซึ่งอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองที่วัดได้และปัจจัยที่ต้องการศึกษา ซึ่งสมการพหุนามลำดับที่สองถูกพิจารณาเป็น

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (1)$$

เมื่อ Y คือ ค่าการตอบสนองที่วัดได้ (ปริมาณลูทีน (Y_1) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Y_2)), X_1, X_2, X_3 คือตัวแปรอิสระ, β_0 คือ ค่าคงที่ของสมการ, $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์สมการเส้นตรง, $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์สมการกำลังสอง

Table 1 Combination of the independent variables selected in the Box-Behnken Design (BBD)

Independent variables	symbols	Level		
		-1	0	1
Amplitude (%)	X_1	20	40	60
Extraction time (minutes)	X_2	5	15	25
Solvent concentration (%)	X_3	40	60	80

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารลูทีนด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

วิเคราะห์ปริมาณสารลูทีนโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography: HPLC) ด้วยเครื่องยี่ห้อ Agilent รุ่น CM 5260 ผลิตจากประเทศญี่ปุ่น ตามวิธีการของ Kashyap *et al.* (2022) ใช้ระบบ Agilent 1260 HPLC ร่วมกับคอลัมน์ C18 (4.6*150 มม., 4 ไมโครเมตร) โดยใช้ปริมาตรการฉีด 10 ไมโครลิตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 μL /นาที รักษาอุณหภูมิของหัวฉีดและคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C ตามลำดับ ตรวจวิเคราะห์ลูทีนที่มีความยาวคลื่น 447 นาโนเมตร ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารอยู่ในช่วง 200-700 nm เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือ solvent A (methanol: acetonitrile: water ที่อัตราส่วน 8:1:1 v/v) และ solvent B (methanol: acetonitrile, 4:6, v/v) สารมาตรฐานที่ใช้ในการทำ Standard curve คือ Lutein analysis standard (Lab Connection, Thailand)

5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay)

นำสารสกัดดอกดาวเรืองมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Shimada *et al.* (1992) ปีเปตสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl) 0.1 mM ในเมทานอล 2.9 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง นำตัวอย่างสารสกัดดอกดาวเรือง ใส่ในหลอดทดลองลงไป 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที พร้อมทั้งเตรียมตัวอย่างควบคุม (Control) หรือสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่าง สารสกัด โดยใช้เมทานอลแทนตัวอย่างสารสกัดดอกดาวเรือง ตามวิธีการเดียวกัน เมื่อครบเวลา 30 นาที นำตัวอย่างและตัวอย่างควบคุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าความสามารถฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละของการยับยั้ง (%inhibition) ตามสมการ

$$\text{ร้อยละของการยับยั้ง (\%inhibition)} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) \times 100}{A_{\text{control}}} \quad (2)$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

การเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เข้มข้น 0.1mM ในเมทานอล ทำได้โดยชั่ง 2,2 diphenyl-1- picrylhydrazyl 0.1972 กรัม ละลายด้วยเมทานอล จนสารละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิตร จะได้สารละลาย DPPH เข้มข้น 5 mM จากนั้นปิเปตสารละลายนี้มา 2 มิลลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 100 มิลลิตร

6. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS (Statistical Package for the Social Science) ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างที่ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาอัตราส่วนความแปรปรวนระหว่างกลุ่มของการทดลอง และ ความแปรปรวนภายในกลุ่มของการทดลองค่าที่คำนวณได้ เรียกว่าความคลาดเคลื่อนที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

Results

1. ผลการศึกษาของสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดปริมาณสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรือง โดยมีปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ แอมพลิจูด (X_1), เวลาในการสกัด (X_2) และความเข้มข้นของตัวทำละลาย (X_3)

ผลของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรือง โดยมีปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ แอมพลิจูด (X_1), เวลาในการสกัด (X_2) และความเข้มข้นของตัวทำละลาย (X_3) จากการทดลองพบว่าปริมาณสารลูทีน (Y_1) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มีค่าอยู่ในช่วง 3.58-7.06 mg/g และปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Y_2) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 52.90-79.82 โดยสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดจากดอกดาวเรือง คือ แอมพลิจูดร้อยละ 60, เวลาในการสกัด 15 นาที และความเข้มข้นของสารละลายร้อยละ 60 ซึ่งให้ปริมาณสารลูทีนและปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ 7.06 mg/g และร้อยละ 79.82 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 2

2. ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนาย เพื่อพิจารณาค่าความคลาดเคลื่อนของแบบจำลองและความน่าเชื่อถือของสมการที่ใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่าง ๆ ในการทดลอง แสดงดังใน Table 3 พบว่าค่าของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของปริมาณสารลูทีน (Y_1) และฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้ (Y_2) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-square, R^2) เท่ากับ 0.9691 และ 0.9943 ตามลำดับ ซึ่งค่า R^2 ใกล้เคียง 1 มาก แสดงถึงความแม่นยำในการทำนายสภาวะที่เหมาะสมได้อย่างแม่นยำ และค่า Significance F น้อยกว่า 0.001 แสดงว่าความแตกต่างจากการทดลองและค่าจากการทำนายมีความคลาดเคลื่อนน้อย โดยมีค่า Multiple R = 0.9844 และ Adjusted R^2 = 0.9136 ของ Y_1 และ, Multiple R = 0.9971 และ Adjusted R^2 = 0.9839 ของ Y_2 ดังนั้นสมการที่ 3 และ 4 สามารถใช้ทำนายสภาวะที่เหมาะสมได้อย่างแม่นยำ

Table 2 Experimentally obtained results of investigated responses

RUN	X_1	X_2	X_3	Y_1		Y_2	
				Exp	Pre	Exp	Pre
1	40 (0)	15 (0)	60 (0)	6.74	6.89	79.14	79.22
2	40 (0)	15 (0)	60 (0)	6.87	6.89	79.82	79.22
3	60 (1)	15 (0)	40 (-1)	5.68	5.78	67.45	66.36
4	40 (0)	5 (-1)	80 (1)	6.15	6.14	70.71	70.11
5	40 (0)	5 (-1)	40 (-1)	5.12	5.29	65.58	66.17
6	20 (-1)	25 (-1)	60 (0)	3.97	4.25	58.95	58.46
7	40 (0)	25 (-1)	80 (1)	6.59	6.42	75.69	75.10
8	40 (0)	15 (0)	60 (0)	7.06	6.89	78.71	79.22
9	20 (-1)	15 (0)	80 (1)	6.01	5.91	69.65	70.74
10	40 (0)	25 (1)	40 (-1)	5.88	5.89	67.56	68.16
11	20 (-1)	5 (-1)	60 (0)	3.58	3.69	55.90	55.41
12	60 (1)	15 (0)	80 (1)	6.21	6.50	73.44	73.54
13	20 (-1)	15 (0)	40 (-1)	5.53	5.24	67.14	67.04
14	60 (1)	25 (1)	60 (0)	4.81	4.70	59.48	59.97
15	60 (1)	5 (-1)	60 (0)	4.65	4.37	55.54	56.04

X_1 = Amplitude (%), X_2 = Extraction time (minutes), X_3 = Solvent concentration (%), Y_1 = Lutein content (mg/g) and Y_2 = Antioxidant activity (%)

$$Y_1 \text{ (mg/g)} = 6.890 + 0.283X_1 + 0.219X_2 + 0.344X_3 - 0.058X_1X_2 - 0.080X_1X_3 + 0.013X_2X_3 - 1.358X_1^2 - 1.280X_2^2 + 0.325X_3^2 \quad (3)$$

$$Y_2 \text{ (%) } = 79.223 + 0.534X_1 + 1.744X_2 + 2.720X_3 + 0.222X_1X_2 + 0.750X_1X_3 + 0.870X_2X_3 - 11.110X_1^2 - 10.645X_2^2 + 1.307X_3^2 \quad (4)$$

จากการวิเคราะห์ด้วยแบบจำลองการถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของสมการสามารถอธิบายอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาต่อตัวแปรตาม (Y_1 และ Y_2) ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยจากสมการที่ 3 และ 4 ค่าบวกในสมการแสดงถึงตัวแปรตามที่เพิ่มขึ้นเมื่อค่าของปัจจัยที่ศึกษาเพิ่มขึ้น และค่าลบในสมการแสดงถึงตัวแปรตามที่ลดลงเมื่อค่าปัจจัยที่ศึกษานั้นลดลง ดังนั้นเมื่อต้องการสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกจากดาวเรืองเพิ่มขึ้น ควรเพิ่มแอมพลิจูด เวลาในการสกัดและความเข้มข้นของตัวทำละลายสูงขึ้น เมื่อวิเคราะห์ความสำคัญทางสถิติที่มีผลต่อ Y_1 โดยพิจารณา ค่า P-value พบว่า X_1 , X_3 , X_1^2 และ X_2^2 มีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าระดับของปัจจัยที่กำหนดมีอิทธิพลต่อแอมพลิจูด ความเข้มข้นของตัวทำละลายในรูปแบบเชิงเส้น และมีอิทธิพลต่อแอมพลิจูด เวลาในการสกัดในรูปแบบ

กำลังสอง โดยมีความสำคัญต่อการสกัดปริมาณสารลูทีนจากดอกดาวเรือง แต่ค่าสัมประสิทธิ์ระหว่างตัวแปร X_2 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 และ X_3^2 มีค่า P-value มากกว่า 0.05 แสดงว่าในแต่ละปัจจัยไม่มีอิทธิพลต่อกัน

การวิเคราะห์ความสำคัญทางสถิติที่มีผลต่อ Y_2 โดยพิจารณา ค่า P-value พบว่า X_2 , X_3 , X_1^2 และ X_2^2 มีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าระดับของปัจจัยที่กำหนดมีอิทธิพลต่อเวลาในการสกัด ความเข้มข้นของตัวทำละลายในรูปแบบเชิงเส้น และมีอิทธิพลต่อแอมพลิจูด เวลาในการสกัดในรูปแบบกำลังสอง โดยมีความสำคัญต่อการสกัดปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรือง แต่ค่าสัมประสิทธิ์ระหว่างตัวแปร X_1 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 และ X_3^2 มีค่า P-value มากกว่า 0.05 แสดงว่าในแต่ละปัจจัยไม่มีอิทธิพลต่อกัน ซึ่งสามารถนำเฉพาะพจน์ที่มีความสำคัญต่อการสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาเขียนอยู่ในรูปสมการที่ 5 และ 6 ได้ ซึ่งสามารถทำนายปริมาณสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่ต่างจากสมการที่ 3 และ 4

$$Y_1 \text{ (mg/g)} = 6.890 + 0.283X_1 + 0.344X_3 - 1.358X_1^2 - 1.280X_2^2 \quad (5)$$

$$Y_2 \text{ (%) } = 79.223 + 1.744X_2 + 2.720X_3 - 11.110X_1^2 - 10.645X_2^2 \quad (6)$$

Table 3 Variance analysis of regression equations

Source	Y ₁ (mg/g)				Y ₂ (%)			
	C.E.	S.E.	t-stat	P-value	C.E.	S.E.	t-stat	P-value
Intercept	6.890	0.178	38.701	0.000	79.223	0.599	132.169	0.000
X ₁	0.283	0.109	2.591	0.049	0.534	0.367	1.454	0.206
X ₂	0.219	0.109	2.006	0.101	1.744	0.367	4.751	0.005
X ₃	0.344	0.109	3.153	0.025	2.720	0.367	7.410	0.001
X ₁ X ₂	-0.058	0.154	-0.373	0.724	0.222	0.519	0.429	0.686
X ₁ X ₃	-0.080	0.154	-0.519	0.626	0.750	0.519	1.445	0.208
X ₂ X ₃	0.013	0.154	0.081	0.939	0.870	0.519	1.676	0.155
X ₁ ²	-1.358	0.160	-8.459	0.000	-11.110	0.540	-20.563	0.000
X ₂ ²	-1.280	0.160	-7.976	0.000	-10.645	0.540	-19.703	0.000
X ₃ ²	0.325	0.160	2.025	0.099	1.307	0.540	2.419	0.060
R ² =0.9691, Multiple R = 0.9844					R ² =0.9943, Multiple R = 0.9971			
And Adjusted R ² = 0.9136					And Adjusted R ² = 0.9839			
C.E. = Coefficient Estimate and S.E. = Standard Error								

3. ผลการสร้างพื้นผิวตอบสนองแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ 1,3 และ 4 สามารถนำมาสร้างแผนภาพพื้นผิวตอบสนองสามมิติ (3D-surface plot) เพื่ออธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ แอมพลิจูด (X_1), เวลาในการสกัด (X_2) และความเข้มข้นของตัวทำละลาย (X_3) กับค่าตอบสนองที่วัดได้ คือ ปริมาณสารลูทีน (Y_1) แสดงดัง Figure 1-3 และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แสดงดัง Figure 4-6

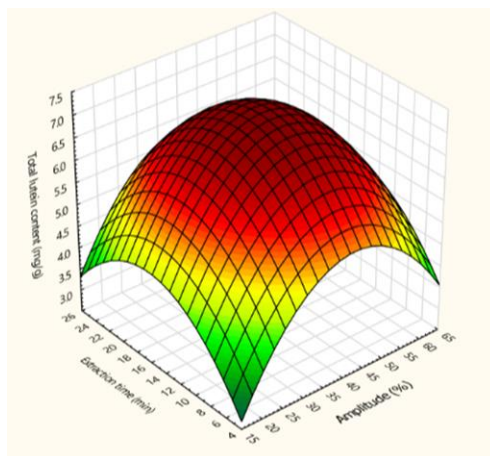


Figure 1 3D response surface plot showing the amplitude (%) and extraction time (minutes) affect lutein content (mg/g) when the solvent concentration is fixed at 60%.

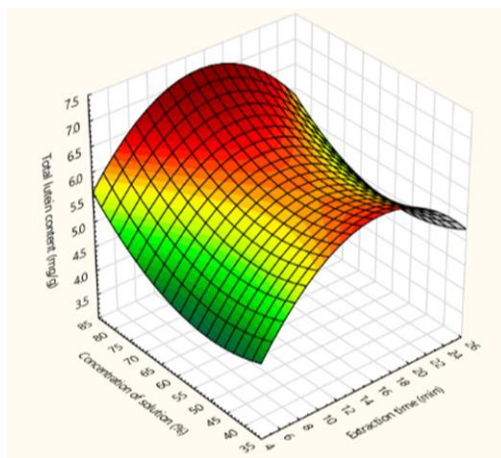


Figure 2 3D response surface plot showing the extraction time (minutes) and solvent concentration (%) affect lutein content (mg/g) when the amplitude is fixed at 40%.

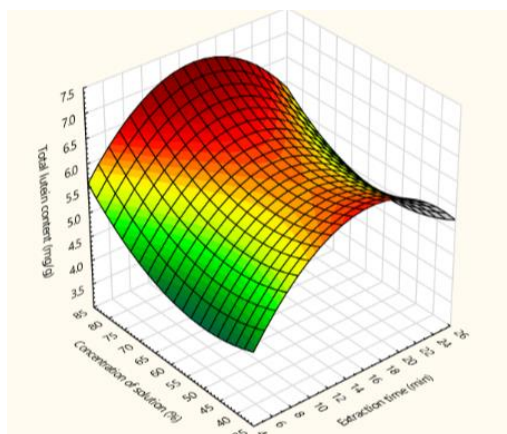


Figure 3 3D response surface plot showing the amplitude (%) and solvent concentration (%) affect lutein content (mg/g) when the extraction times fixed at 15 minutes.

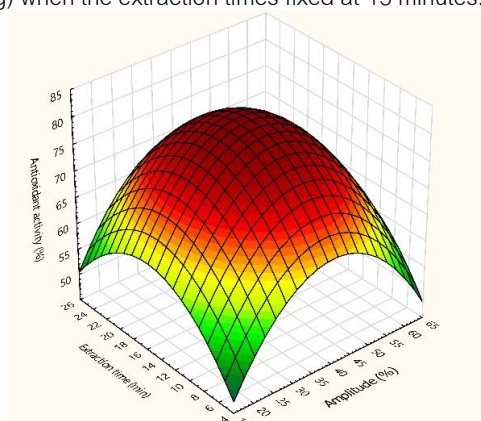


Figure 4 3D response surface plot showing the amplitude (%) and extraction time (minutes) affect antioxidant activity (%) when the solvent concentration is fixed at 60%.

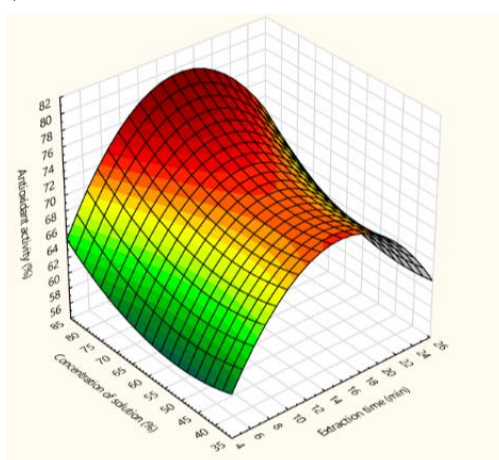


Figure 5 3D response surface plot showing the extraction time (minutes) and solvent concentration (%) affect antioxidant activity (%) when the amplitude is fixed at 40%.

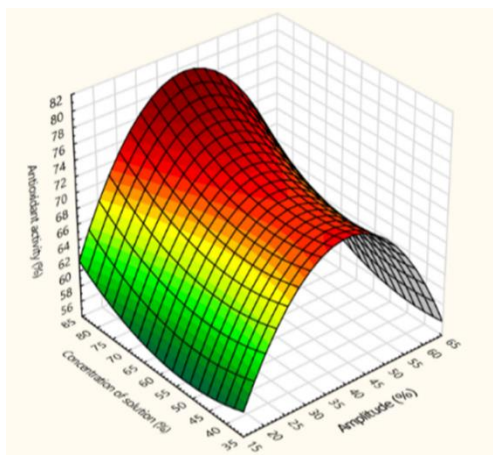


Figure 6 3D response surface plot showing the amplitude (%) and solvent concentration (%) affect antioxidant activity (%) when the extraction time is fixed at 15 minutes.

Table 4 Compare the experimentally obtained lutein and antioxidant content with the values predicted by the response surface methodology (RSM) equation.

	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
Optimum condition prediction equation	41.77	15.81	80	6.89	79.22
Actual experimental conditions (adapted from the equation).	42	16	80	6.89	79.22
Experimental results from the actual conditions.	42	16	80	6.74	79.82

X_1 = Amplitude (%), X_2 = Extraction time (minutes), X_3 = Solvent concentration (%), Y_1 = Lutein content (mg/g) and Y_2 = Antioxidant activity (%)

แผนภาพพื้นผิวตอบสนองสามมิติ Figure 1-6 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงค่าของ 2 ปัจจัย โดยปัจจัยที่ 3 ถูกกำหนดให้คงที่ที่จุดศูนย์หรือค่าจริงที่จุดกึ่งกลาง (แอมพลิจูดร้อยละ 40, เวลาในการสกัด 20 และ ความเข้มข้นของตัวทำละลายร้อยละ 60) ในการสกัดอัลตราโซนิกที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากสมการที่ 3-4 และ Figure 4-6 สามารถทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยอัลตราโซนิก โดยที่สภาวะที่ทำให้สามารถสกัดได้สูงสุด คำนวณจากวิธีกำหนดเชิงเส้น โดยกำหนดให้แอมพลิจูดร้อยละ 20-60, เวลาในการสกัด 5-25 นาที และความเข้มข้นของตัวทำละลายร้อยละ 40-80 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดปริมาณลูทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ แอมพลิจูดร้อยละ 41.77, เวลาในการสกัด 15.81 นาทีและความเข้มข้นของตัวทำละลายร้อยละ 80 แต่เนื่องจากการทดลองไม่สามารถทำตามค่าที่กำหนดได้ด้วยข้อจำกัดของเครื่องมือจึงปรับค่าที่ใช้ในการทดลองตามสภาวะการทดลอง ที่แสดงดัง Table 4 ที่แอมพลิจูดร้อยละ 42, เวลาในการสกัด 15 นาทีและความเข้มข้นของตัว

ทำลายร้อยละ 80 จากผลการทดลองพบว่าภายใต้สภาวะนี้มีสัณฐานรูทึน 6.98 มิลลิกรัมต่อกรัมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ร้อยละ 79.22 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าจากการทำนาย

Discussion

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารรูทึนจากดอกดาวเรือง ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดมากที่สุดคือ ความเข้มข้นของตัวทำละลายเมื่อใช้อัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นจะได้ปริมาณสารรูทึนที่เพิ่มสูงขึ้น ตัวทำละลายเอทานอลที่เป็นสารละลายชนิดกึ่งมีขั้วจึงสามารถจับได้ดีกับโมเลกุลของสารสำคัญที่เป็นโมเลกุลมีขั้วได้ง่าย เช่น แคโรทีนอยด์ กรดฟีนอลิก โดยปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับขั้วของสารสำคัญ (Abia *et al.*, 2022) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Jaeschke *et al.* (2017) ศึกษาการใช้คลื่นอัลตราโซนิกในการสกัดแคโรทีนอยด์และไขมันจาก *Heterochlorella luteoviridis* ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายส่งผลให้ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดที่ดีขึ้น

สารรูทึนมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อสกัดด้วยค่าแอมพลิจูดที่สูงขึ้น เนื่องจากแอมพลิจูดที่สูงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายเทมวลของสารออกฤทธิ์จากเนื้อเยื่อพืชเข้าสู่ตัวทำละลายได้มากยิ่งขึ้น ฟองอากาศขนาดเล็กจำนวนมากจะถูกสร้างขึ้นภายในของเหลว และเกิดคลื่นกระแทกอย่างรุนแรงส่งผลทำให้ฟองอากาศยุบตัวลงในเวลาอันสั้น ซึ่งส่งผลให้น้ำเซลล์เนื้อเยื่อถูกทำลายเร็วขึ้น (Hemwimol *et al.*, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Ye *et al.* (2011) พบว่าปริมาณสารรูทึนที่ได้จากการสกัดข้าวโพดสูงขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของแอมพลิจูด เนื่องจากโพรงอากาศที่เกิดจากกระบวนการคาวิเทชันที่รุนแรงช่วยเพิ่มอัตรา การแพร่ของโมเลกุลรูทึนจากโครงสร้างเซลล์เข้าสู่ตัวทำละลาย แต่อย่างไรก็ตามการใช้แอมพลิจูดที่มากเกินไปนำไปสู่การเกิด ความดัน และทำให้อุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้น ทำให้เร่งกระบวนการสลายตัวของสารสำคัญ (Pingret *et al.*, 2013)

สารรูทึนเป็นสารที่มีโมเลกุลที่ไวต่อความร้อน เวลาในการสกัดที่นานขึ้นส่งผลให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างการทำความร้อนในสภาวะที่มีออกซิเจนและแสง ส่งผลให้ปริมาณของสารรูทึนลดลงจากการสลายตัว (Altemimi *et al.*, 2015) ตามการศึกษาของ Manzoor *et al.* (2022) การใช้คลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลานานสามารถส่งผล กระทบต่อเสถียรภาพของสารออกฤทธิ์บางชนิด ความร้อนที่เกิดขึ้นส่งผลให้เกิดการสลายตัวหรือสูญเสียความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรือง พบว่า เวลาในการสกัด และความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล เป็นสองปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ แอมพลิจูด ไม่แสดงแนวโน้มอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยอื่น อาจเนื่องมาจากคลื่นอัลตราโซนิกที่เพิ่มขึ้นตามระดับแอมพลิจูดอยู่ในระดับไม่สูงที่จะส่งเสริมการทำลายโครงสร้างเซลล์พืชหรือเพิ่มประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ ได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลให้การเพิ่มแอมพลิจูดไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเชิงปริมาณของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้ โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลสูงขึ้น เนื่องจากเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีสมบัติเป็นสารกึ่งมีขั้ว จึงสามารถสกัดสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชได้ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว โดยเฉพาะสารในกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารที่พบร่วมกับรูทึนในดอกดาวเรือง และมีบทบาทในการต้าน

อนุมูลอิสระร่วมกัน ดังนั้น การใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดอาจทำให้สามารถดึงสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกลุ่มอื่นออกมาได้พร้อมกับลูทีน ส่งผลให้ค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยรวมที่วิเคราะห์ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (Pratumyam *et al.*, 2023) และการเพิ่มเวลาในการสกัดทำให้เกิดการแพร่และการถ่ายเทมวลของสารออกฤทธิ์จากเนื้อเยื่อพืชเข้าสู่ตัวทำละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกสกัดออกมามาก แต่เมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อุณหภูมิภายในระบบเพิ่มสูงขึ้นจากพลังงานที่เกิดจากคลื่นอัลตราโซนิก ส่งผลทำให้สารต้านอนุมูลอิสระเกิดการสลายตัว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ibrahim & Sriherfyna (2015) ที่รายงานว่าอุณหภูมิที่สูงเกินไปสามารถเร่งการเสื่อมสลายของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด นอกจากนั้นเวลาในการสกัดที่นานเกินไป ทำให้เอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายเกิดการระเหย ส่งผลให้ปริมาณตัวทำละลายลดลง ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับต่ำ จากผลการทดลองจะเห็นว่าการใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับตัวทำละลายเอทานอลแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการสกัดสารลูทีนและสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกดาวเรืองได้ในระดับสูง สามารถลดเวลาในการสกัดได้ โดยใช้เวลาประมาณ 25 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการสกัดแบบ Soxhlet ซึ่งเป็นวิธีการแบบดั้งเดิมที่ใช้เวลาประมาณ 138 นาทีในการสกัดสารแคโรทีนอยด์ ทั้งนี้ยังพบว่าปริมาณสารลูทีนที่ได้จากการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกมีค่าใกล้เคียงหรือสูงกว่าวิธีการแบบดั้งเดิม แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเทคนิคดังกล่าวในการเพิ่มประสิทธิผลของกระบวนการสกัด (Janepinich *et al.*, 2023)

Conclusions

จากผลการทดลองพบว่า ดอกดาวเรืองมีองค์ประกอบของสารลูทีนและสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับสูง ซึ่งสามารถสกัดได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโดยใช้วิธีวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง พบว่า สภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ แอมพลิจูดร้อยละ 42 เวลาในการสกัด 16 นาที และความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 80 โดยภายใต้สภาวะดังกล่าวสามารถสกัดลูทีนได้สูงสุด 7.06 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดร้อยละ 79.82 ผลการวิเคราะห์ ANOVA แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองมีความเหมาะสมสำหรับการทำนาย โดยมีค่า R^2 ของปริมาณสารลูทีน (Y_1) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Y_2) เท่ากับ 0.9691 และ 0.9943 ตามลำดับ และมีค่า Significance F ต่ำกว่า 0.001 สะท้อนถึงความแม่นยำและความน่าเชื่อถือของแบบจำลองในการทำนายสภาวะที่เหมาะสม

Acknowledgments

ขอขอบคุณคณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนอุปกรณ์ ครุภัณฑ์และเครื่องมือในงานวิจัยนี้

References

- Abia, S., Chanes, J., & Cano, M. (2022). Effect of Ultrasound-Assisted Extraction of Carotenoids from Papaya (*Carica papaya* L. cv. Sweet Mary) Using Vegetable Oils. *Molecules*, 27, 638

- Altemimi, A., Lightfoot, D., Kinsel, M., & Watson, D. (2015). Employing Response Surface Methodology for the Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Lutein and β -Carotene from Spinach. *Molecules*, 20, 6611-6625.
- Derrien, M., Badr, A., Gosselin, A., Desjardins, Y., & Angers, P. (2017). Optimization of a green process for the extraction of lutein and chlorophyll from spinach by-products using response surface methodology (RSM). *Food Science and Technology*, 79, 170-177.
- Hemwimol, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 543-548.
- Ibrahim, A., & Sriherfyna, F. (2015). Effect of Temperature and Extraction Time on Physicochemical Properties of Red Ginger (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) Extract with The Additional of Honey Combination as Sweetener for Functional Drink. Volume 3, 530-541.
- Jaeschke, D., Rech, R., Marczak, L., & Mercali, G. (2017). Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. *Bioresource Technology*, 224, 753-757.
- Janepinich, P., Satirapipathkul, C., Kasetsoomboon, N., & Yongphet, P. (2023). Enhancing lutein extraction from marigolds through ultrasound-assisted optimization using response surface methodology. *Maejo International Journal of Energy and Environmental Communication*, 5(1), 14-19.
- Kashyap, P., Singh, S., Singh, M., Gupta, A., Tandon, S., Shanker, K., Verma, R., & Verma, R. (2022). An efficient process for the extraction of lutein and chemical characterization of other organic volatiles from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower, *Food Chemistry*, 396, 133647.
- Kurniawan, J., Yusuf, M., Azmi, S., Salim, K., Prihastyanti, M., Indrawati, R., Heriyanto., Shioi, Y., Limantara, L., & Brotosudarmo, T. (2019). Effect of drying treatments on the contents of lutein and zeaxanthin in orange- and yellow-cultivars of marigold flower and its application for lutein ester encapsulation. *In Proceeding Conference Series: Materials Science and Engineering*. 509.
- Manzoor, S., Rashid, R., Panda, B., & Sharma, V. (2022). Green extraction of lutein from marigold flower petals, process optimization and its potential to improve the oxidative stability of sunflower oil, *Ultrasonics Sonochemistry*, 85, 105994

- Narkprasom, N., Narkprasom, K., & Upara, U. (2015). Optimization of Total Phenolic from *Cleistocalyx nervosum* by Microwave-Assisted Extraction. *American Journal of Engineering and Applied Sciences*, 8(3), 302-309.
- Nguyen, D., Thrimawithana, T., Piva, T., Grando, D., & Huynh, T., (2023). Benefits of plant carotenoids against age-related macular degeneration. *Journal of Functional Foods*, 106.
- Pingret, D., Tixier, A., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31, 593-606.
- Pratumyam, P., Lairungruang, K., Thimkorn, P., Obhasi, S., & Sangvichien, S. (2023). Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of Plook Fai Thatu Remedy. *Journal of Traditional Thai Medical Research*, 9 (1), 13-27. (in Thai)
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura T. (1992). Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion. *Agr. Food Chem*, 40, 945–948.
- Ye, J., Feng, L., Xiong, J., & Xiong, Y. (2011). Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol. *Food Science and Technology*, 46, 2131-2136.