



ปัญหาพิเศษ

การประเมินศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระเจียบแดง
(*Hibiscus sabdariffa* L.)

ASSESSMENT OF THE POTENTIAL OF BIOACTIVE COMPOUNDS
FROM ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.)

โดย

นางสาวกัลยารัตน์ โพกะโทก

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2564



ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

สาขา

วิทยาศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง การประเมินศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระเจียบแดง
(*Hibiscus sabdariffa* L.)

ASSESSMENT OF THE POTENTIAL OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ROSELLE
(*Hibiscus sabdariffa* L.)

นามผู้วิจัย.....นางสาวกัลยารัตน์ โปกะโทก.....

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ.....

(.....อ.พุทธพร ส่องศรี D.Eng.....)

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(.....รองศาสตราจารย์แดงอ่อน พรหมมี.ปร.ด.....)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์

วันที่ 22 เดือน เมษายน พ.ศ. 2564

การประเมินศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระเจี๊ยบแดง

(*Hibiscus sabdariffa* L.)

กัลยารัตน์ โพกะโทก และ พุทธพร ส่องศรี

บทคัดย่อ

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่ามีสารประกอบตามธรรมชาติที่สำคัญ สามารถเพิ่มมูลค่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้สูงขึ้น โดยการสกัดด้วยวิธี MAE (microwave assisted extraction) และ NADESs (Natural deep eutectic solvents) ซึ่งเป็นที่สนใจอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหาร เตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงโดยใช้ 95 % EtOH เป็นตัวทำละลาย พบว่าให้สีแดงสด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าการสกัดโดยใช้ EtOAc อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เทคนิคการสกัดโดยใช้ไมโครเวฟ (MAE) และการใช้ NADES ในการทดลองพบว่าคลอรีนคลอไรด์ (ChCl-Ox) เป็นตัวทำละลายที่ดีของแอนโทไซยานิน การศึกษาครั้งนี้พบว่า การใช้ประโยชน์จากผลผลิตเหลือทิ้งทางการเกษตรอย่างคุ้มค่า สามารถช่วยเพิ่มมูลค่าให้กระเจี๊ยบแดงได้ ช่วยลดปริมาณเศษเหลือทิ้งทางการเกษตร และสามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ต่อไป

คำสำคัญ: กระเจี๊ยบ, 95% เอทานอล, การสกัดสารโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ, วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

กัลยารัตน์ โพกะโทก

พุทธพร ส่องศรี

22/04/2564

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

ASSESSMENT OF THE POTENTIAL OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Kanyarat Phokathok And Puttaporn Songsri

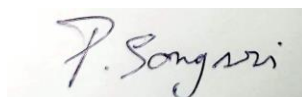
ABSTRACT

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) is widely acknowledged as an important natural compound. Can value-added bioactive compounds whose isolation. By extracting with MAE (microwave assisted extraction) and NADESs (Natural deep eutectic solvents), is of great interest in food industry. Extraction of Roselle discarded using 95% EtOH. Found to be bright red, has more antioxidant activity than extraction using EtOAC with statistical significance. An extraction techniques based on microwave assisted extraction (MAE) and the use of NADES in experiments, was found to be Choline Chloride (ChCl-Ox) a good solvent of anthocyanin. This study is considered a cost-effective use of agricultural waste. Can add value to the roselle. Helps to reduce the amount of agricultural waste, and can continue to be used in cosmetic products.

Keywords: Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), 95 % EtOH, Microwave-assisted extraction (MAE), Agricultural waste



Student's signature



Advisor's signature

22/04/2021

บทนำ

ในปัจจุบันผลผลิตทางการเกษตรเหลือทิ้ง มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยไม่ได้นำไปเพิ่มมูลค่าให้มีราคาสูงขึ้น ผู้วิจัยจึงเห็นว่าถ้าได้นำผลผลิตที่เหลือทิ้งทางการเกษตร มาแปรรูปให้เป็นสินค้าที่มีมูลค่าเพิ่ม คงจะเป็นประโยชน์ไม่มากนักน้อย มีโรงงานอุตสาหกรรมที่ผลิตน้ำผลไม้ และน้ำกระเจี๊ยบเป็นน้ำผลไม้ที่มีการผลิตมากอีกหนึ่งชนิด โดยจะใช้ส่วนดอกสีแดง ในการคั้นเอาน้ำ ทำให้มีกากเหลือทิ้งปริมาณมาก และยังสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ จึงเห็นว่าเศษเหลือทิ้งนี้น่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี เหมือนในน้ำกระเจี๊ยบเนื่องจากผ่านกระบวนการผลิต ในระยะเวลาสั้นๆ ในการคั้นเอาน้ำ เพื่อเพิ่มมูลค่ากระเจี๊ยบแดง โดยจะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความคงตัวของสีของกระเจี๊ยบแดง เพื่อพัฒนาสีจากธรรมชาติ สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบทางเครื่องสำอาง ที่สีสันสวยงามดึงดูดใจ และแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆทางเครื่องสำอาง

กระเจี๊ยบแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hibiscus sabdariffa* L. เป็นผลไม้ที่มีความนิยมของผู้บริโภค จากการศึกษาข้อมูล พบว่ากระเจี๊ยบแดงมีสารแอนโทไซยานิน และสารโพลีฟีนอล ซึ่งได้แก่ Protocatechuic Acid ที่มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคมะเร็ง ช่วยชะลอความแก่ ดังนั้นงานวิจัยนี้ศึกษาถึงการประเมินศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระเจี๊ยบแดง และใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง ทำให้กระบวนการชีวภาพมีศักยภาพในการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรให้เป็นสินค้าที่มีราคาสูง เพราะเป็นคุณสมบัติที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในปัจจุบัน นอกจากนี้ ยังเป็นการพัฒนาวัตถุดิบภายในประเทศ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันกับต่างประเทศอีกด้วย

การศึกษารั้วนี้เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารจากกระเจี๊ยบแดง เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay) การประเมินปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential การประเมินปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด: ไซวิธี Folin-Ciocalteu ขั้นตอนการสกัดด้วยไมโครเวฟ (microwave assisted extraction) จากสารสกัดกระเจี๊ยบแดง และเพื่อประยุกต์ใช้ประโยชน์จากกระเจี๊ยบแดง โดยการนำไปสู่การสร้างผลิตภัณฑ์

ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้มีอุปสรรคเรื่องการระบาดของโรคโควิด-19 ทำให้ต้องเปลี่ยนรูปแบบเป็นการศึกษาบทความในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 16 ฉบับ ทดแทนการปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบแดง

หั่นกากกระเจี๊ยบแดง เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและนำมาบดเป็นผง แล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 95 % EtOH โดยมีอัตราส่วนระหว่างกระเจี๊ยบแดง และตัวทำละลายเป็น 1 : 4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพร้อมเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ 150 rpm กรองและทำให้แห้งโดยการกลั่นภายใต้สภาวะสุญญากาศ

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay (Lourith et al. 2009)

เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 6×10^{-5} M เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้นต่างๆ และเตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่มีความเข้มข้นต่างๆ ผสมตัวอย่างกับสารละลาย DPPH radical (0.1 ml, each) แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วย microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างมาพล็อตกราฟและหาค่า IC_{50} เปรียบเทียบกับวิตามินซีโดยสมการ % inhibition = $(A-B) / A \times 100$ โดย A = ค่าการดูดกลืนที่ไม่มีสารตัวอย่าง B = ค่าการดูดกลืนที่มีสารตัวอย่าง ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

3. การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Analysis of Total phenolic content : TPC) (kanlayavattanakul and Lourith, 2011)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic Acid ความเข้มข้นต่างๆ และเตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่มีความเข้มข้นต่างๆ ผสมสารสกัดตัวอย่างและ folin-ciocalteu reagent และ 2 % Na_2CO_3 แล้ว incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างมาคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวม เทียบกับสารตัวอย่างและแสดงค่าเป็น mg gallic acid equivalent ต่อน้ำหนักสารสกัด (mg GAE/100 g crude) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

4. การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด (Analysis of Total Anthocyanin content : TAC) (Lee, Dust, & Wrolstad, 2005)

ใช้วิธี pH differential เตรียมสารละลายกระเจี๊ยบแดงที่เจือจางโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 1 และ 4.5 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm และ 700 nm โดยเครื่องอ่านไมโครเพลทสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

5. การสกัดสารโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (Anton Paar GmbH, Graz, Austria)

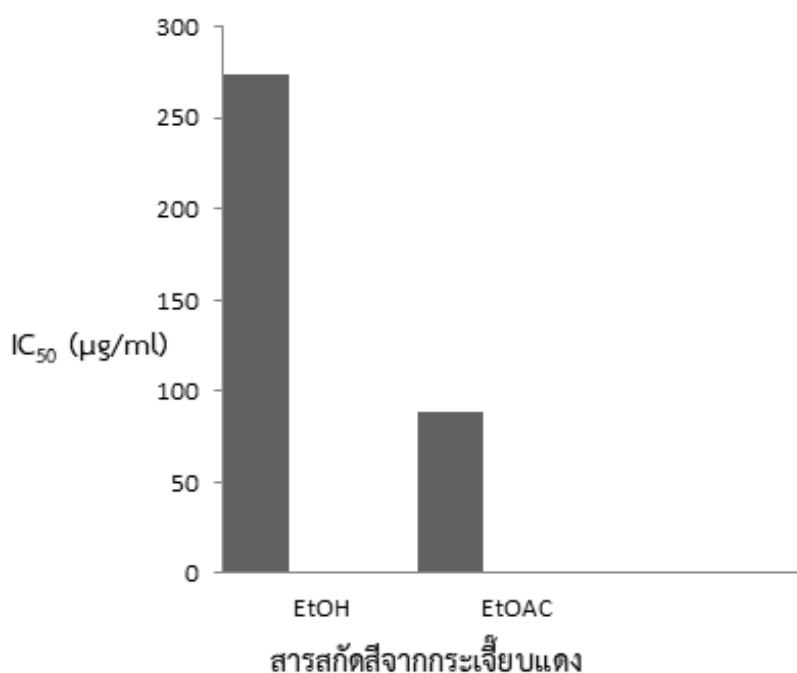
ตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิและปรับพารามิเตอร์เครื่อง MAE (microwave assisted extraction) ให้เหมาะสม เติมน้ำสารละลายตัวอย่างที่สกัดด้วย NADESs 2 ml (ประกอบไปด้วยน้ำ 25%) เพื่อให้อัตราส่วนของเหลวต่อของแข็งเท่ากับ 1:10 ml g⁻¹ เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปฉายรังสีไมโครเวฟที่ 65° C ความดันคงที่ 700 w และ 18 บาร์ เป็นเวลา 20 นาที เติมน้ำทำละลายอินทรีย์ (เมทานอล:น้ำ, 80:20, v/v) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13.000 รอบ/นาที 20° C เป็นเวลา 15 นาที นำสารที่ลอยอยู่ด้านบนมากรอง ผ่านตัวกรองเซลลูโลส 0.2 µm ย้ายไปใส่ขวด DURAN ที่เจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์ 10 ml และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° C ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

6. การเตรียม NADESs (Natural deep eutectic solvents)

เตรียม NADESs (Natural deep eutectic solvents) โดยใช้โคลีนคลอไรด์ตามวิธีการของ (Dai et al., 2013) ในอัตราส่วนโมลาร์ที่เหมาะสม แล้วทำให้ร้อนโดยใช้อุณหภูมิ 80° C คนอย่างต่อเนื่องในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) จนเป็นของเหลวใส เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ผลการศึกษา

จากภาพที่ 1 พบว่าสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบแดงส่วน 95% EtOH ซึ่งให้สีแดงสด แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($IC_{50} = 274.06 \pm 1.37 \mu\text{g/ml}$) ดีกว่าสารสกัด EtOAc ($IC_{50} = 88.51 \pm 2.47 \mu\text{g/ml}$) อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยมีค่า IC_{50} น้อยกว่าถึง 3 เท่า แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี



ภาพที่ 1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay ของสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบแดง

EtOAc : Ethyl acetate; EtOH : Ethyl Alcohol

จากตารางที่ 1 พบว่าแอนโธไซยานินเป็นหนึ่งในกลุ่มของสารประกอบที่พบในกระเจี๊ยบแดง ซึ่งได้รับความสนใจมากขึ้นในช่วงหลายปีที่ผ่านมา พบว่า NADESs (Natural deep eutectic solvents) สามารถสกัด delphinidin-3-sambubioside (hibiscin) และ cyanidin-3-sambubioside (gossypicyanin) ซึ่งเป็นแอนโธไซยานินที่โดดเด่นใน *H. sabdariffa calyces* และ leaves (Da-Costa-Rocha et al., 2014) สารในกลุ่ม NADESs (Natural deep eutectic solvents) ที่ผ่านการทดสอบ ประกอบด้วยกรดอินทรีย์ (กรดแลกติกและกรดออกซาลิก) พบว่าการสกัดแอนโธไซยานินเพิ่มสูงขึ้น เป็นทางเลือกของ NADESs (Natural deep eutectic solvents) ที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแอนโธไซยานินจากพืชที่หลากหลาย (Bubalo, Curko, Tomasevic,

Ganic, & Redovnikovic, 2016; Dai, Rozema, Verpoorte, & Choi, 2016; Guo & Ping-Kou, 2019; Jeong et al., 2015) การสกัดกระเจียบแดงโดยวิธี NADESs (Natural deep eutectic solvents) ขึ้นอยู่กับโคลิโนคลอไรด์และกรดออกซาลิก พบว่าแอนโธไซยานินที่สกัดได้มีค่าสูงสุดคือ delphinidin-3-sambubioside มีค่าเท่ากับ $3.76 \pm 0.03 \text{ mL g}^{-1}$ และ cyanidin-3-sambubioside มีค่าเท่ากับ $3.60 \pm 0.03 \text{ mL g}^{-1}$ ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันค่าสูงสุดที่ได้จากการทดสอบปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด ที่ประเมินโดยวิธีมาตรฐานสเปกโตรโฟโตเมตริก เท่ากับ $3.64 \pm 0.01 \text{ mg cyan-3-gluc g}^{-1}$ กรดออกซาลิกและกรดไดคาร์บอกซิลิก มีความเป็นกรดสูง ในขณะที่กรดแลคติกมีความเป็นกรดอ่อนกว่า กรดออกซาลิกกับกรดแลคติกมีคุณสมบัติความเป็นกรดแตกต่างกัน ผลการสกัดกรดออกซาลิกของแอนโธไซยานินที่ทำให้ค่าเพิ่มขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับ pH (Panic, Gunjevic, Cravotto and Radojeic Redovnikovic, 2019)

นอกจากนี้พบว่า การสกัดแอนโธไซยานินจากกระเจียบแดงด้วยตัวทำละลาย $\text{CHCl}_3\text{-Ox}$ ทำให้ delphinidin-3-sambubioside มีค่าเท่ากับ $3.32 \pm 0.09 \text{ mL g}^{-1}$ และ Cyanidin-3-sambubioside มีค่าเท่ากับ $1.73 \pm 0.04 \text{ mL g}^{-1}$ ตามลำดับ มีค่าสูงกว่าการใช้ตัวทำละลายเมทานอล (Jabeur et al., 2017; Salazar-Gonzalez et al., 2012; Sindi et al., 2014) การสกัดสารโดยใช้คลื่นไมโครเวฟและใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย พบว่าน้ำที่มีค่า pH น้อยกว่า 6.5 ณ จุดเดือดสามารถสกัดแอนโธไซยานินจาก delphinidin-3-sambubioside มีค่าอยู่ระหว่าง 1.20 ถึง 0.59 mL g^{-1} และ Cyanidin-3-sambubioside มีค่าอยู่ระหว่าง 0.36 ถึง 0.16 mL g^{-1} ได้สูงสุด (Cassol, Rodrigues, & Zapata Norena, 2019) ค่าที่คาดเคลื่อนเหล่านี้เกิดจากวิธีการต่างๆที่ใช้จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางเคมีในกระเจียบแดง (สายพันธุ์แตกต่างกัน สถานที่เพาะปลูกแตกต่างกัน สภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน) ดังนั้นจึงเป็นเรื่องยากที่จะเปรียบเทียบผลการศึกษากับผลงานตีพิมพ์อื่นๆในปัจจุบัน

นอกจากนี้ยังพบกรดฟีนอลิกในสารสกัดกระเจียบแดง มีกรดคลอโรจีนิคเป็นตัวเด่น มีช่วงความเข้มข้นอยู่ที่ $4.64 \pm 0.10 \text{ mL g}^{-1}$ ถึง $5.73 \pm 0.00 \text{ mL g}^{-1}$ กรดฟีนอลิกทำงานร่วมกับไอโซเมอร์ 2 ตัว คือ Cryptochlorogenic acid และ กรดนีโอคลอโรจีนิค (Borras-Linares, Fernandez-Arroyo et al, Borras-Linares, Herranz-Lopez, et al., 2015; Pimentel-Mora et al., 2018; Pimentel-Moral et al., 2019) แม้ว่า NADESs ทั้งหมดที่ทดสอบสามารถสกัดฟีนอลิกได้ แต่ยังพบกรดฟีนอลิกอื่นๆที่ได้รับการยืนยันเช่น Coumaroylquinic acid และ 5-O-caffeoylshikimic acid ด้วย ผลรวมการสกัดกรดฟีนอลิกมีค่าต่ำสุดอยู่ระหว่าง 14.57 ± 0.20 ถึง $16.34 \pm 0.07 \text{ mL g}^{-1}$ การสกัดโดยใช้ยูเรียและโพลีออล เช่น ethylene glycol และ 1,2-propanediol ให้ผลสูงขึ้น ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสารละลายเมทานอลมีผลคล้ายกันกับ NADESs (Natural deep eutectic solvents) ของยูเรียและโพลีออล (Alahon et al., 2018) นอกจากนี้การสกัด

สารประกอบฟีนอลิกจากกระเจี๊ยบแดงยังพบส่วนผสมของเมทอล โดยเฉพาะกรดแลคติก และกรดออกซาลิก พบว่าสกัดกรดฟีนอลิกทั้งหมดกลับมาใช้อีกครั้งได้สูงสุด 19.12 ± 0.05 และ $19.94 \pm 0.60 \text{ mL g}^{-1}$ ตามลำดับ

Proposed compound	MeOH	ChCl-La	ChCl-Ox	ChCl-Eg	ChCl-1,2 Pro	ChCl-Mal	ChCl-Glu
Anthocyanins							
Delphinidin-3-sambubioside	3.32 ± 0.09^c	3.35 ± 0.07^c	3.76 ± 0.03^d	2.70 ± 0.05^b	3.13 ± 0.11^c	2.63 ± 0.07^b	2.85 ± 0.11^b
Cyanidin-3-sambubioside	1.73 ± 0.04^f	2.30 ± 0.03^g	3.60 ± 0.03^h	1.43 ± 0.01^c	1.65 ± 0.01^e	1.35 ± 0.04^b	1.51 ± 0.02^d
*TAC (spectrophotometry)	$3.29 \pm 0.16^{d,e}$	$3.10 \pm 0.04^{b,c,d,e}$	3.44 ± 0.01^e	$2.94 \pm 0.00^{b,c,d}$	$3.15 \pm 0.12^{c,d,e}$	$2.52 \pm 0.08^{b,c}$	1.92 ± 0.30^a
phenolic acids							
Chlorogenic acid	6.08 ± 0.33^c	5.72 ± 0.00^c	5.73 ± 0.03^c	5.93 ± 0.06^c	5.81 ± 0.12^c	4.64 ± 0.10^a	5.13 ± 0.06^b
Coumaroylquinic acid	2.25 ± 0.04^c	2.23 ± 0.01^c	2.31 ± 0.12^c	2.17 ± 0.05^c	2.14 ± 0.05^c	1.66 ± 0.02^a	1.86 ± 0.04^b
5-O-Caffeoylshikimic acid	0.74 ± 0.01^a	1.35 ± 0.02^f	0.94 ± 0.02^b	1.10 ± 0.02^d	1.14 ± 0.01^d	0.92 ± 0.03^b	1.02 ± 0.01^c
Σ phenolic acids	18.40 ± 0.64^c	$19.12 \pm 0.05^{c,d}$	19.94 ± 0.60^d	18.78 ± 0.07^c	18.09 ± 0.12^c	14.57 ± 0.20^a	16.34 ± 0.07^b
Flavonoids							
Σ flavonoids	3.93 ± 0.06^d	3.69 ± 0.02^c	4.57 ± 0.12^e	3.74 ± 0.02^c	3.91 ± 0.03^d	3.09 ± 0.06^a	3.32 ± 0.07^b
†TPC (spectrophotometry)	20.35 ± 1.19^b	28.07 ± 1.02^c	28.56 ± 1.55^c	27.57 ± 1.83^c	24.67 ± 1.33^c	11.50 ± 0.72^a	14.06 ± 0.96^a
Other polar compounds							
Hydroxycitric acid	2.93 ± 0.07^f	1.94 ± 0.00^d	2.21 ± 0.06^e	0.62 ± 0.07^b	0.24 ± 0.03^a	0.51 ± 0.09^b	0.74 ± 0.09^b
Hibiscus acid	31.70 ± 1.65^d	27.48 ± 2.04^c	$23.44 \pm 0.48^{a,b}$	$25.70 \pm 0.47^{b,c}$	28.87 ± 0.36^c	19.87 ± 0.60^a	$22.29 \pm 0.50^{a,b}$

ตารางที่ 1 ผลการสกัด (mg g^{-1}) ของสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *H. Sabdariffa* แยกโดย NADEs (Natural deep eutectic solvents) แตกต่างกัน (น้ำ 25% w / w) เมื่อเปรียบเทียบกับ MeOH (80:20) ทำการสกัดโดย MAE (microwave assisted extraction) ที่ 65°C เป็นเวลา 20 นาทีและด้วยอัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง 10 mL g^{-1}

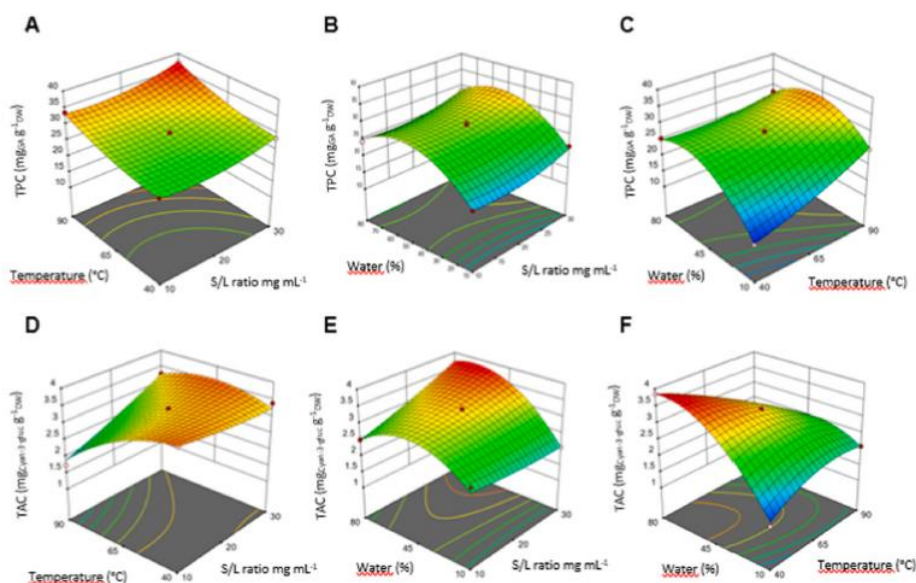
จากตารางที่ 2 พบว่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.994 และ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดเท่ากับ 0.985 ตามลำดับ ในขณะที่แผนการทดลองสถิติทั้งสองไม่สัมพันธ์กับพารามิเตอร์ ค่า $F_{9,2}$ ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดคือ 91.23 และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดคือ 36.87 ตามลำดับ F-test ของทั้งปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด มีความสัมพันธ์กับ F-listed ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 19.385 ดังนั้นการ

ออกแบบทางคณิตศาสตร์จึงเหมาะสมกับข้อมูลการทดลองโดยการสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด มีผลต่ออัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง เพอร์เซ็นต์น้ำของ NADESs (Natural deep eutectic solvents) สูง และอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กับเพอร์เซ็นต์ของน้ำ ($p < 0.001$) ในขณะที่ความสัมพัธ์ของเส้นโค้งไม่มีนัยสำคัญกับอัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง และอุณหภูมิ ($p > 0.05$)

	Analysis of variance (ANOVA)	
	TPC	TAC
R^2	0.994	0.985
Adj. R^2	0.983	0.958
Pred. R^2	0.932	0.77

ตารางที่ 2 แบบจำลองการถดถอยและการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

จากภาพที่ 2 พบว่าอัตราส่วนของเหลวต่อของแข็งเมื่อระดับความเข้มข้นที่มากขึ้น สามารถสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดได้มากขึ้น การสกัดสารประกอบฟีนอลิก และแอนโทไซยานินจากกระเจี๊ยบแดง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิทำให้การสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ลดความหนืดของกรดออกซาลิก NADESs (Natural deep eutectic solvents) ลดแรงตึงผิวและประสิทธิภาพของการแพร่กระจายของสารประกอบ อย่างไรก็ตามการใช้ อุณหภูมิสูงกับ NADESs (Natural deep eutectic solvents) ทำให้ลดประสิทธิภาพทางความร้อนลง (Craveiro et al., 2016; Haz, Strizincova, Majova, Skulcova, & Jablonsky, 2016) นอกจากนี้การเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 80 ° C ส่งผลให้การย่อยสลายของแอนโทไซยานินของกระเจี๊ยบแดงเพิ่มสูงขึ้น (Galvao Maciel & Vieira, 2018) การใช้กรดออกซาลิกมีเพอร์เซ็นต์น้ำของ NADESs (Natural deep eutectic solvents) เป็นปัจจัยสำคัญ



ภาพที่ 2 การแสดงพื้นผิวตอบสนองแบบ 3 มิติสำหรับปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรการสกัดที่ผ่านการทดสอบสามตัวแปรต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด TPC (A–C) และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด TAC (D–F)

จากตารางที่ 3 พบว่าปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่สกัดด้วย delphinidin-3-sambubioside เท่ากับ 4.70 mg g^{-1} และ cyanidin-3-sambubioside เท่ากับ 5.73 mg g^{-1} สูงกว่าที่รายงานไว้ในบรรณานุกรม โดยน้ำเป็นตัวทำละลายในขั้นตอนการสกัดพบว่า delphinidin-3-sambubioside มีค่าเท่ากับ $1.20\text{--}0.59 \text{ mg g}^{-1}$ และ cyanidin-3-sambubioside เท่ากับ $0.36\text{--}0.16 \text{ mg g}^{-1}$ ตามลำดับ (Cassol et al., 2019) หรือแม้กระทั่งการใช้น้ำเดือดที่เป็นกรดพบว่า delphinidin-3-sambubioside มีค่าเท่ากับ 4.11 mg g^{-1} และ cyanidin-3-sambubioside มีค่าเท่ากับ 3.81 mg g^{-1} (Sindi et al., 2014)

Proposed compound	Yield
Delphinidin-3-sambubioside	4.70 ± 0.40
Cyanidin-3-sambubioside	5.73 ± 0.50
Neochlorogenic acid	5.15 ± 0.35
chlorogenic acid	6.96 ± 0.62

ตารางที่ 3 ผลการสกัด (mg g^{-1}) แยกสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *H. Sabdariffa* อยู่ในเงื่อนไขการทดลองที่เหมาะสมที่สุดจัดทำโดยโปรแกรมทางสถิติ

วิจารณ์ผลการศึกษา

กระเจี๊ยบแดงซึ่งเป็นเศษเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ ให้สารสกัดสีแดงสด เมื่อทำการสกัดด้วย 95% EtOH โดยสารสกัดสีนี้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay ($IC_{50}=88.51 \pm 2.47 \mu\text{g/ml}$) วิธีการ MAE (microwave assisted extraction) -NADESs (Natural deep eutectic solvents) เป็นเครื่องมือที่เหมาะสมสำหรับการสกัดปริมาณกรดฟีนอลิกจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดง Cassol et al. พบว่าคลอโรจีนิกในดอกกระเจี๊ยบแดงมีค่าสูงสุดคือ 2.58 mL g^{-1} และกรดนิโอคลอโรจีนิก 1.71 mL g^{-1} ตามลำดับ สกัดโดยใช้เมทานอล : น้ำ (80:20 v/v) เป็นตัวทำละลาย (Cassol et al., 2019) ในขณะที่วิธีการสกัดแบบซูเปอร์คริติคอลฟลูอิด Super Critical fluid textraction (SFE) พบว่ากระเจี๊ยบแดงมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 10 mL g^{-1} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (pimento oral et al., 2019) การสกัดฟลาโวนอยด์จากกระเจี๊ยบแดงเกือบทั้งหมดที่ทดสอบมีค่าต่ำกว่าตัวทำละลายไฮโดรเมทานอลิก ยกเว้นกรดออกซาลิก myricetin มีปริมาณมากที่สุด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดโดยการใช้อกรดอกซาลิกมีปริมาณ $4.57 \pm 0.12 \text{ mL g}^{-1}$ ซึ่งมีค่าสูงกว่าสารละลายเมทานอลิกอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบผลของการสกัดปริมาณฟลาโวนอยด์จาก *H. sabdariffa* ด้วยวิธี MAE (microwave assisted extraction) -NADESs (Natural deep eutectic solvents) มีค่าสูงกว่าสารอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ (Pinmentel-Moral et al., 2019)

NADESs (Natural deep eutectic solvents) ที่ผ่านการคัดเลือกพบว่าการสกัดเมทานอลมีปริมาณ hibiscus acid สูงสุด ($31.70 \pm 1.65 \text{ mL g}^{-1}$) และกรดไฮดรอกซีซิตริก ($2.93 \pm 0.07 \text{ mL g}^{-1}$) NADESs (Natural deep eutectic solvents) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลและยูเรีย มีประสิทธิภาพต่ำกว่าการสกัดสารประกอบที่มีขี้้ว ตรงกันข้ามกับ NADESs (Natural deep eutectic solvents) ที่ประกอบด้วยกรดโพลิออล มีความสามารถในการดึงกรดอินทรีย์ได้ดีกว่า ดังนั้นจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการใช้โคลิโนคลอไรด์ และกรดออกซาลิกมีประสิทธิภาพในขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระเจี๊ยบแดง การแยกแอนโทไซยานิน ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ โดยใช้ไฮโดรเมทานอลิกเป็นตัวทำละลายสามารถสกัดสารออกมาในปริมาณมากกว่าปกติ กระเจี๊ยบแดงมีคุณสมบัติทางชีววิทยาที่สำคัญ คือ สกัดโพลิออลเป็นไซลิกอลและ 1,2-propanediol ด้วย NADESs (Natural deep eutectic solvents) พบว่ามีปริมาณมากขึ้น (Garcia, Rodriguez-Juan, Rodriguez Gutierrez, Rios and Fernandez-Bolanos, 2016) ในขณะเดียวกันการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบกระเจี๊ยบแดงได้ดีที่สุดคือ โพลิออลอื่นๆ เช่น เอทิลีนไกลคอล (Alanon et al., 2018)

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) การทดสอบ F-test ของทั้งปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมดมีความสัมพันธ์กันมีค่าอยู่ที่ 19.385 การสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด มีผลต่ออัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง เปอร์เซ็นต์น้ำของ NADESs (Natural

deep eutectic solvents) สูง และอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์ของน้ำ ($p < 0.001$) ในขณะที่ความสัมพันธ์ของเส้นโค้งไม่มีความสำคัญกับอัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง และอุณหภูมิ ($p > 0.05$) การสกัดด้วยวิธี NADESs (Natural deep eutectic solvents) โดยใช้ยูเรียเป็นตัวทำละลาย เหมาะสำหรับการแยกสกัดออกจาก *Sophora japonica* (Zhao et al., 2015) ในขณะที่การสกัดด้วยวิธี NADESs (Natural deep eutectic solvents) โดยใช้กรดแลคติกเป็นตัวทำละลายดีที่สุดในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Lippia citriodora* (Ivanovic et al., 2018) แม้ว่าการผสมโคลิโนคลอไรด์กับน้ำตาล จะมีประสิทธิภาพในการสกัดต่ำกว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของกระเจี๊ยบแดง (vanovic et al., 2018) แต่ Choline chloride และ Maltose เป็นตัวทำละลายที่ดีในขั้นตอนการสกัดฟีนอลิกที่มีขี้และขี้ว่อนๆ ในใบ *Cajanus cajan* (wei et al., 2015) ดังนั้นกรดออกซาลิก และโคลิโนคลอไรด์ เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *H. sabdariffa calyces*

จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ แสดงถึงระดับความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของตัวแปรอิสระทั้งหมดในสมการกับตัวแปรตาม ค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่ากลุ่มของตัวแปรอิสระมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามมาก จากการทดลองพบว่า มีผลต่อตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัว (อัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง อุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์ของน้ำ) มีค่าสูงสุดโดยใช้สมการแบบแผนการทดลองที่จัดเตรียมด้วยโปรแกรมทางสถิติ เพื่อเพิ่มการสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากกระเจี๊ยบแดงในชุดการทดลองอัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง 1:30 mL mg⁻¹, 75° C และ 55 เปอร์เซ็นต์น้ำใน NADESs (Natural deep eutectic solvents) ให้ได้ปริมาณสูงสุด อย่างไรก็ตามถ้ามีปริมาณน้ำมากเกินไป อาจทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างส่วนประกอบ NADESs (Natural deep eutectic solvents) กับตัวทำละลายแตกได้ (Dai et al., 2013) สิ่งที่ต้องคำนึงของหลักการ NADESs (Natural deep eutectic solvents) คือ ความหนืด ส่วนใหญ่ใน NADESs (Natural deep eutectic solvents) ขึ้นอยู่กับกรดอินทรีย์ ซึ่งความหนืดยังคงสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เช่น ChCl-Ox แม้ว่าจะตรวจพบปริมาณที่มากกว่า แต่ควรใช้อย่างระมัดระวังเนื่องจากความแตกต่างทางเคมีอาจเกิดจากตัวแปรภายในของกระเจี๊ยบแดง นอกจากนี้วิธี MAE (microwave assisted extraction) -NADESs (Natural deep eutectic solvents) พบว่าปริมาณกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เพิ่มสูงขึ้น (Cassol et al., 2019; Pimentel-Moral et al., 2019) ดังนั้นการใช้ NADESs (Natural deep eutectic solvents) ในการสกัดสารประกอบเพื่อเพิ่มมูลค่าจาก กระเจี๊ยบแดงแสดงให้เห็นว่าสามารถต้านการเกิดเม็ดสีหรือใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางได้ ข้อดีการใช้ NADESs (Natural deep eutectic solvents) เมื่อใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีค่าเพิ่มขึ้น (Benvenuti, Ferreira Zielinski and Salvador Ferreira, 2019)

สรุปผลการศึกษา

จากผลการทดลองขั้นตอนการสกัดของ NADESs (Natural deep eutectic solvents) เพื่อเพิ่มมูลค่าการสกัดสารประกอบจากกระเจี๊ยบแดง มีคุณสมบัติการสกัดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับส่วนประกอบทางเคมี ในกลุ่มที่มีกรดออกซาลิกเป็นตัวทำละลาย มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการสกัดแอนโทไซยานิน ทำให้ผลการสกัดของสารประกอบที่มีมูลค่าเพิ่มจากกระเจี๊ยบแดง สูงขึ้นมากกว่าการใช้ตัวทำละลายเมทานอลทั่วไป สารสกัดสีจากกระเจี๊ยบแดงโดยใช้ 95% EtOH เป็นตัวทำละลายซึ่งให้สีแดงสด แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การเลือกใช้กรดออกซาลิกที่ความเข้มข้นสูงขึ้นในการสกัดแอนโทไซยานินเหมาะสมกับขั้นตอนการสกัด NADESs (Natural deep eutectic solvents) มีความเสถียร และสามารถต้านการเกิดเมดสีได้ดี ดังนั้นวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพของ MAE (microwave assisted extraction) โดยใช้กรดออกซาลิกและโคลีนคลอไรด์ตัวทำละลาย มีคุณสมบัติในการออกแบบและปรับปรุงการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระเจี๊ยบแดง ซึ่งน่าสนใจสำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ และ ฝ่ายกิจการนิสิต คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความสนับสนุนทุนการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- บัณฑิตวรวัฒน ชูระพระ, จันทนา บุญยรัตน์, เยาวเรศ ชูลิขิต และ สุภาวดี ดาวดี. 2559. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส้มโอ. **วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน** 11(ฉบับพิเศษ): 80-91
- Alañón M.E., L. Milena, P.M. Sandra, B.L. Isabel, A.R. David, S.C. Antonio. 2020. A novel sustainable approach for the extraction of value-added compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by natural deep eutectic solvents. **Food Research International** 137: 1-10.
- Pinela J., M. A. Prieto, E. Pereira, I. Jabeur, M.F. Barreiro, L. Barros, & I. C. F. R. Ferreira. 2019. Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. **Food Chemistry** 275: 309–321.
- Becker L.C., W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, Jr. Shank, R.C. Slaga, T.J. Snyder, P.W. Gill, L.J. Heldreth. 2019. Safety Assessment of Avena sativa (Oat)-Derived Ingredients As Used in Cosmetic. **International Journal of Toxicology** 38 (3): 23s-47s.
- Verzeaux L., S. Richer, J. Viguier, S. Gofflo, D. Boudier, E. Aymard, B. Closs. 2019. Structure-function relationship between a natural cosmetic active ingredient and the olfactory receptor OR2AT4. **International Journal of Cosmetic Science** 41 (2): 194-199.
- Randive D.S., S.D. Bhinge, M.A. Bhatkar, K.P. Shejawal, A.S. Mulla, M.S. Thorat, P.D. Patil. 2020. Formulation and evaluation of lipstick, rouge and eye shadow using Colored pigment from the extract of piper betel and Acacia catechu. **Indian Drug Manufacturers' Association** 57(7).
- Mekala V., H. Magalon, L. Dufosse, M. Fouillaud. 2018. Production of pigments from the tropical marine-derived fungi Talaromyces Albobiverticillius : New resources for natural red-colored metabolites. **Journal of Food Composition and Analysis** 70 : 35-48.
- Joao P.M., S.G.Rafaela and C.A.B. Lara. 2018. Enzymatic synthesis optimization

Of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical Adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica.

Chemical Engineering Research and design 139 : 296-308.

Tanguy T., K.B. Lee, Y. Lee. 2020. Chemical recognition based on high-Accuracy matching factors as per time-of-flight-secondary-ion mass spectrometry : Application to trace cosmetic residues in human forensics. **Microchemical Journal** 159 : 105-446.

Panumart R., Y. Jirakiattikul, N. Bunborrivankul. 2018. Changes in Secondary Metabolites of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) During Calyx Development. **Thai Science and Technology Journal** 27 (1): 89-100.

Oluwaseun R.A. and N.H. Abdurahman. 2019. Microwave-assisted extraction of phenolics from *Hibiscus sabdariffa* calyces: Kinetic modelling and process intensification. **Industrial Crops & Products** 137 : 528-535.

Inès J., E. Pereira^{a,b}, L. Barrosa, R.C. Calhelha^a, M. Soković^c, M.B. P.P. Oliveirab, Isabel C.F.R. Ferreira. 2017. *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. **Food Research International** 100 : 717-723.

José P., M.A. Prieto^a, B.E. Pereira^a, I. Jabeura, M.F. Barreiro^a, C.L. Barrosa, I..F.R. Ferreira^a. 2019. Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. **Food Chemistry** 275 : 309-321.

Diana A.C., I.F. Pérez-Ramírez, J. Pérez-Jiménez, G.M. Nava, R. Reynoso-Camacho. 2019. Comparison of the bioactive potential of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyx and its by-product: Phenolic characterization by UPLC-QTOF MSE and their anti-obesity effect in vivo. **Food Research International** 126 : 1-10.

André S., N. Rawat, C. Mertz, N. Achir, H. Fulcrand, M. Dornier. 2017. Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products. **Food Chemistry** 214 : 234-241.

Chi-Chou H., C.H. Hung, C.C. Chen, S.H. Kao, C.J. Wang. 2018. *Hibiscus sabdariffa* polyphenol-enriched extract inhibits colon carcinoma metastasis associating

with FAK and CD44/c-MET signaling. **Journal of Functional Foods** 48 : 542-550.

Flora-Glad C., D.W. Sun, Jun.H. Cheng. 2017. Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments. **Trends in Food Science & Technology** 67 : 160-172.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สารเคมีและวิธีการเตรียมสาร

สารเคมี

1. Folin Ciocalteu's phenol reagent : Merck
2. gallic acid : Merck
3. sodium carbonate : Merck
4. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) : Sigma-Aldrich
5. Choline chloride : Sigma-Aldrich
6. lactic acid : Sigma-Aldrich
7. oxalic acid : Sigma-Aldrich
8. ethylene glycol : Sigma-Aldrich
9. 1,2-propanediol : Sigma-Aldrich
10. fructose : Sigma-Aldrich
11. Maltose : Sigma-Aldrich
12. Glucose : Sigma-Aldrich
13. Urea : Sigma-Aldrich
14. Chlorogenic acid : Sigma-Aldrich
15. citric acid : Sigma-Aldrich
16. p-coumaric acid : Sigma-Aldrich
17. Quercetin : Sigma-Aldrich
18. quercetin-3-glucoside : Sigma-Aldrich
19. Rutin : Sigma-Aldrich
20. myricetin : Sigma-Aldrich
21. Myricitrin : Sigma-Aldrich
22. HPLC-grade MeOH : Fisher Scientific
23. Acetic acid : Fluka

ตารางผนวกที่ ก 1 ส่วนประกอบของระบบยูเทกติกที่ใช้เป็นตัวทำละลาย

Solvent abbreviation	NADESs composition			Molar ratio
	Component 1	Component 2	Component 3	
ChCl-La	Choline chloride	Lactic acid		1:2
ChCl-Ox	Choline chloride	Oxalic acid		1:1
ChCl-Eg	Choline chloride	Ethylene glycol		1:2
ChCl-1,2 Pro	Choline chloride	1,2-Propanediol		1:2
ChCl-Fru	Choline chloride	Fructose	Water	2:1:1
ChCl-Mal	Choline chloride	Maltose		3:1
ChCl-Glu	Choline chloride	Glucose	Water	2:1:1
ChCl-U	Choline chloride	Urea		1:2

ภาคผนวก ข
วิธีการทดลองและผลการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบแดง

- เก็บกระเจี๊ยบแดงที่เหลือทิ้งจากการผลิตน้ำผลไม้ (ส่วนของกลีบรองดอก)
- หั่นกากกระเจี๊ยบแดงเป็นชิ้นเล็กๆแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- นำมาบดเป็นผง แล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 95 % EtOH โดยมีอัตราส่วนระหว่างกระเจี๊ยบแดง และตัวทำละลายเป็น 1 : 4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพร้อมเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ 150 rpm
- กรองและทำให้แห้งโดยการกลั่นภายใต้สภาวะสุญญากาศ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay

- เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 6×10^{-5} M
- เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้นต่างๆ
- เตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ
- ผสมตัวอย่างกับสารละลาย DPPH radical (0.1 ml, each) แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วย microplate reader
- นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างมาพล็อตกราฟและหาค่า IC_{50} เปรียบเทียบกับวิตามินซีโดยสมการ

$$\% \text{ inhibition} = (A-B) / A \times 100$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนที่ไม่มีสารตัวอย่าง

B = ค่าการดูดกลืนที่มีสารตัวอย่าง

- ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content : TPC)

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic Acid ความเข้มข้นต่างๆ
- เตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ
- ผสมสารสกัดตัวอย่างและ folin-ciocalteu reagent และ 2 % Na_2CO_3 แล้ว incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร
- นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่าง มาคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวม เทียบกับสารตัวอย่างและแสดงค่าเป็น mg gallic acid equivalent ต่อน้ำหนักสารสกัด (mg GAE / 100 g crude)
- ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

ความสัมพันธ์ในรูปแบบของสมการการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \dots + \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

โดย X_i, X_j คือ ค่าของตัวแปรอิสระแต่ละตัว

Y คือ ค่าของตัวแปรตาม

k คือ จำนวนตัวแปรอิสระในสมการถดถอย ($k=3$)

β_0 คือ ค่าคงที่ (Constant) ของสมการถดถอย

โดยที่ β_0 จะเป็นจุดตัด (Intercept) แกน y ของสมการ

คำนวณร้อยละในการยับยั้งสูงสุดครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ตามสูตรดังนี้

$$\text{สูตร \% xo inhibition} = (1 - \beta/\alpha) \times 100$$

XO คือ เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

α คือ กิจกรรมการยับยั้งที่ไม่มีการเติมสารทดสอบ

β คือ กิจกรรมการยับยั้งที่มีการเติมสารทดสอบ

Proposed compound	MeOH	ChCl-La	ChCl-Ox	ChCl-Eg	ChCl-1,2 Pro	ChCl-Fru	ChCl-Mal	ChCl-Glu	ChCl-U
Anthocyanins									
Delphinidin-3-sambubioside	3.32 ± 0.09 ^c	3.35 ± 0.07 ^c	3.76 ± 0.03 ^d	2.70 ± 0.05 ^b	3.13 ± 0.11 ^c	2.75 ± 0.11 ^b	2.63 ± 0.07 ^b	2.85 ± 0.11 ^b	1.26 ± 0.06 ^a
Cyanidin-3-sambubioside	1.73 ± 0.04 ^d	2.30 ± 0.03 ^d	3.60 ± 0.03 ^b	1.43 ± 0.01 ^c	1.65 ± 0.01 ^c	1.42 ± 0.02 ^c	1.35 ± 0.04 ^b	1.51 ± 0.02 ^d	0.49 ± 0.02 ^d
Σ anthocyanins	5.05 ± 0.13 ^e	5.65 ± 0.04 ^f	7.36 ± 0.06 ^f	4.12 ± 0.04 ^{b,c,d}	4.79 ± 0.12 ^d	4.17 ± 0.13 ^{b,c}	3.98 ± 0.11 ^b	4.36 ± 0.13 ^c	1.74 ± 0.08 ^a
*TAC (spectrophotometry)	3.29 ± 0.16 ^{d,e}	3.10 ± 0.04 ^{b,c,d,e}	3.44 ± 0.01 ^e	2.94 ± 0.00 ^{b,c,d,e}	3.15 ± 0.12 ^{c,d,e}	2.66 ± 0.20 ^{b,c,d}	2.52 ± 0.08 ^{b,c}	1.92 ± 0.30 ^a	2.76 ± 0.11 ^{b,c,d}
phenolic acids									
Chlorogenic acid quinone	1.57 ± 0.13 ^{a,b}	1.64 ± 0.04 ^{a,b}	1.45 ± 0.09 ^a	1.84 ± 0.04 ^b	1.67 ± 0.08 ^{a,b}	1.53 ± 0.05 ^a	1.46 ± 0.13 ^a	1.67 ± 0.05 ^{a,b}	1.53 ± 0.06 ^a
Neochlorogenic acid	3.73 ± 0.09 ^c	3.52 ± 0.00 ^c	4.21 ± 0.02 ^d	3.72 ± 0.00 ^c	3.47 ± 0.02 ^c	3.11 ± 0.06 ^b	2.75 ± 0.05 ^a	3.14 ± 0.02 ^b	3.84 ± 0.33 ^c
Chlorogenic acid	6.08 ± 0.33 ^c	5.72 ± 0.00 ^c	5.73 ± 0.03 ^c	5.93 ± 0.06 ^c	5.81 ± 0.12 ^c	5.22 ± 0.13 ^b	4.64 ± 0.10 ^a	5.13 ± 0.06 ^b	5.70 ± 0.08 ^c
Cryptochlorogenic acid	4.03 ± 0.04 ^{b,c}	4.65 ± 0.01 ^c	4.75 ± 1.67 ^d	4.02 ± 0.01 ^{b,c}	3.87 ± 0.02 ^{a,b,c}	3.51 ± 0.07 ^{a,b}	3.14 ± 0.01 ^a	3.52 ± 0.00 ^{a,b}	4.14 ± 0.38 ^{b,c}
Coumaroylquinic acid	2.25 ± 0.04 ^c	2.23 ± 0.01 ^c	2.31 ± 0.12 ^c	2.17 ± 0.05 ^c	2.14 ± 0.05 ^c	1.92 ± 0.03 ^b	1.66 ± 0.02 ^a	1.86 ± 0.04 ^b	2.12 ± 0.11 ^c
5-O-Caffeoylshikimic acid	0.74 ± 0.01 ^a	1.35 ± 0.02 ^d	0.94 ± 0.02 ^d	1.10 ± 0.02 ^d	1.14 ± 0.01 ^d	1.01 ± 0.02 ^d	0.92 ± 0.03 ^b	1.02 ± 0.01 ^c	1.20 ± 0.05 ^c
Σ phenolic acids	18.40 ± 0.64 ^c	19.12 ± 0.05 ^{c,d}	19.94 ± 0.60 ^d	18.78 ± 0.07 ^c	18.09 ± 0.12 ^c	16.30 ± 0.37 ^b	14.57 ± 0.20 ^a	16.34 ± 0.07 ^b	18.53 ± 0.75 ^c
Flavonoids									
Myricetin-3-arabinogalactoside	0.42 ± 0.01 ^a	0.36 ± 0.00 ^a	1.10 ± 0.06 ^c	0.41 ± 0.00 ^a	0.44 ± 0.03 ^a	0.38 ± 0.01 ^a	0.39 ± 0.03 ^a	0.40 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.04 ^b
Quercetin-3-sambubioside	0.72 ± 0.03 ^f	0.51 ± 0.00 ^c	0.27 ± 0.01 ^a	0.61 ± 0.05 ^d	0.61 ± 0.01 ^d	0.51 ± 0.02 ^c	0.46 ± 0.01 ^b	0.50 ± 0.00 ^c	0.65 ± 0.02 ^e
Quercetin-3-rutinoside	0.70 ± 0.00 ^d	0.64 ± 0.00 ^d	0.16 ± 0.02 ^a	0.66 ± 0.02 ^{d,f}	0.69 ± 0.00 ^d	0.54 ± 0.02 ^c	0.50 ± 0.01 ^b	0.56 ± 0.04 ^{c,d}	0.58 ± 0.01 ^d
Kaempferol-3-O-sambubioside	0.05 ± 0.00 ^b	0.03 ± 0.00 ^{a,b}	0.11 ± 0.01 ^d	0.04 ± 0.00 ^{a,b}	0.02 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	0.04 ± 0.00 ^{a,b}	0.06 ± 0.00 ^c
Quercetin-3-glucoside	0.47 ± 0.01 ^e	0.47 ± 0.00 ^e	0.26 ± 0.01 ^a	0.47 ± 0.01 ^e	0.45 ± 0.01 ^d	0.40 ± 0.00 ^c	0.38 ± 0.00 ^b	0.42 ± 0.00 ^c	0.41 ± 0.00 ^c
Methylepigallocatechin	0.11 ± 0.01 ^{b,c}	0.11 ± 0.01 ^{c,d}	0.08 ± 0.00 ^a	0.11 ± 0.00 ^{c,d}	0.13 ± 0.00 ^c	0.11 ± 0.00 ^{c,d}	0.10 ± 0.00 ^b	0.10 ± 0.00 ^{b,c}	0.12 ± 0.01 ^d
Myricetin	0.61 ± 0.01 ^{c,d}	0.67 ± 0.01 ^e	0.89 ± 0.03 ^f	0.61 ± 0.01 ^{c,d}	0.63 ± 0.00 ^d	0.54 ± 0.01 ^b	0.52 ± 0.00 ^b	0.57 ± 0.01 ^c	0.41 ± 0.02 ^a
Quercetin	0.75 ± 0.01 ^d	0.77 ± 0.01 ^d	1.42 ± 0.09 ^e	0.72 ± 0.01 ^{c,d}	0.82 ± 0.01 ^d	0.64 ± 0.00 ^{b,c}	0.61 ± 0.01 ^b	0.62 ± 0.01 ^b	0.45 ± 0.04 ^a
Kaempferol	0.11 ± 0.00 ^{a,b}	0.12 ± 0.00 ^b	0.27 ± 0.03 ^c	0.12 ± 0.00 ^{a,b}	0.13 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.00 ^{a,b}	0.10 ± 0.00 ^{a,b}	0.10 ± 0.00 ^{a,b}	0.08 ± 0.00 ^a
Σ flavonoids	3.93 ± 0.06 ^d	3.69 ± 0.02 ^c	4.57 ± 0.12 ^e	3.74 ± 0.02 ^c	3.91 ± 0.03 ^d	3.25 ± 0.06 ^b	3.09 ± 0.06 ^a	3.32 ± 0.07 ^b	3.37 ± 0.01 ^b
†TPC (spectrophotometry)	20.35 ± 1.19 ^b	28.07 ± 1.02 ^c	28.56 ± 1.55 ^c	27.57 ± 1.83 ^c	24.67 ± 1.33 ^c	18.64 ± 1.17 ^b	11.50 ± 0.72 ^a	14.06 ± 0.96 ^a	17.50 ± 0.68 ^b
Other polar compounds									
Hydroxycitric acid	2.93 ± 0.07 ^f	1.94 ± 0.00 ^d	2.21 ± 0.06 ^e	0.62 ± 0.07 ^b	0.24 ± 0.03 ^a	1.10 ± 0.15 ^c	0.51 ± 0.09 ^b	0.74 ± 0.09 ^b	0.58 ± 0.02 ^b
Hibiscus acid	31.70 ± 1.65 ^d	27.48 ± 2.04 ^c	23.44 ± 0.48 ^{a,b}	25.70 ± 0.47 ^{b,c}	28.87 ± 0.36 ^c	22.33 ± 0.93 ^{a,b}	19.87 ± 0.60 ^a	22.29 ± 0.50 ^{a,b}	23.38 ± 2.00 ^{a,b}
Methyl digallate	8.82 ± 0.05 ^{c,d}	8.31 ± 0.46 ^{c,d}	13.94 ± 1.25 ^e	7.36 ± 0.04 ^{b,c}	9.19 ± 0.16 ^c	8.77 ± 0.17 ^{c,d}	7.78 ± 0.18 ^{c,d}	6.42 ± 0.47 ^b	1.99 ± 0.11 ^a
N-Feruloyltyramine	0.87 ± 0.00 ^c	0.83 ± 0.02 ^c	0.92 ± 0.02 ^d	0.83 ± 0.01 ^c	0.82 ± 0.02 ^c	0.68 ± 0.02 ^b	0.60 ± 0.04 ^a	0.67 ± 0.00 ^b	0.82 ± 0.03 ^c
Σ other polar compounds	44.32 ± 1.77 ^e	38.56 ± 2.52 ^d	40.51 ± 0.73 ^d	34.52 ± 0.37 ^d	39.11 ± 0.57 ^d	32.88 ± 1.27 ^{b,c}	28.76 ± 0.72 ^a	30.12 ± 0.88 ^{a,b}	26.76 ± 2.06 ^a

ตารางผนวกที่ ข 1 ผลการสกัด (mg g⁻¹) ของสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *H. Sabdariffa* แยกโดย NADEs (Natural deep eutectic solvents) แตกต่างกัน (น้ำ 25% w / w) เมื่อเปรียบเทียบกับ MeOH (80:20) ทำการสกัดโดย MAE (microwave assisted extraction) ที่ 65 ° C เป็นเวลา 20 นาทีและด้วยอัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง 10 mL g⁻¹

ChCl-La (โคลิ้นคลอไรด์:กรดแลคติก; 1:2); ChCl-Ox (โคลิ้นคลอไรด์:กรดออกซาลิก; 1:1); ChCl-Eg (โคลิ้นคลอไรด์:เอทิลีนไกลคอล; 1:2); ChCl-1,2 Pro (โคลิ้นคลอไรด์:1,2โพรเพนไดออล; 1:2); ChCl-Fru (โคลิ้นคลอไรด์:ฟรักโทส:น้ำ; 2:1:1); ChCl-Mal (โคลิ้นคลอไรด์:มอลโตส; 3:1); ChCl-Glu (โคลิ้นคลอไรด์:กลูโคส:น้ำ; 2:1:1); ChCl-U (โคลิ้นคลอไรด์:ยูเรีย; 1:2) ด้วยกำลังที่แตกต่างกันแต่ละสารประกอบในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวทำละลายที่ทดสอบตามการทดสอบ Student–Newman–Keuls ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p <0.05).

* การประมาณปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดที่กำหนดโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก มาตรฐานแสดงเป็นมิลลิกรัมของ cyanindin-3-glucoside ต่อกรัม ของ *H. Sabdariffa calyces*แห้ง (mg_{cyan-3-glu} g⁻¹).

[†] การประมาณค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่กำหนดโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกมาตรฐาน แสดงค่าเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อกรัมของ *H. Sabdariffa calyces*แห้ง ($\text{mg}_{\text{ga}} \text{g}^{-1}$).

Run	Experimental variables			Responses			
	A	B	C	TPC*		TAC [†]	
	Liquid-solid ratio (mL mg^{-1})	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Water in NADES (%)	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted
1	1:30 (+1)	90 (+1)	45 (0)	37.25 $\pm$ 0.05	37.55	3.27 $\pm$ 0.02	3.26
2	1:30 (+1)	40 (-1)	45 (0)	28.46 $\pm$ 2.10	28.84	3.39 $\pm$ 0.02	3.24
3	1:20 (0)	40 (-1)	80 (+1)	25.30 $\pm$ 0.21	24.88	3.85 $\pm$ 0.04	3.85
4	1:20 (0)	90 (+1)	80 (+1)	27.92 $\pm$ 0.81	27.58	1.70 $\pm$ 0.01	1.56
5	1:10 (-1)	65 (0)	10 (-1)	17.50 $\pm$ 2.79	17.46	2.43 $\pm$ 0.08	2.28
6	1:30 (+1)	66 (0)	80 (+1)	28.58 $\pm$ 0.72	28.63	3.57 $\pm$ 0.02	3.72
7	1:20 (0)	67 (0)	45 (0)	28.57 $\pm$ 0.85	28.34	3.33 $\pm$ 0.02	3.28
8	1:20 (0)	40 (-1)	10 (-1)	11.71 $\pm$ 0.28	12.05	1.32 $\pm$ 0.01	1.46
9	1:20 (0)	90 (+1)	10 (-1)	24.77 $\pm$ 1.25	25.19	2.09 $\pm$ 0.19	2.09
10	1:20 (0)	65 (0)	45 (0)	27.52 $\pm$ 0.39	28.34	3.23 $\pm$ 0.08	3.28
11	1:20 (0)	65 (0)	45 (0)	28.92 $\pm$ 0.72	28.34	3.28 $\pm$ 0.04	3.28
12	1:10 (-1)	40 (-1)	45 (0)	26.36 $\pm$ 0.73	26.07	3.56 $\pm$ 0.09	3.57
13	1:30 (+1)	65 (0)	10 (-1)	21.62 $\pm$ 2.58	20.91	2.06 $\pm$ 0.20	2.08
14	1:10 (-1)	90 (+1)	45 (0)	33.58 $\pm$ 0.51	33.2	1.74 $\pm$ 0.14	1.89
15	1:10 (-1)	65 (0)	80 (+1)	24.25 $\pm$ 0.96	24.96	2.51 $\pm$ 0.01	2.5

ตารางผนวกที่ ข 2 การออกแบบ Box-Behnken พร้อมตัวแปรอิสระที่เข้ารหัสและไม่ได้เข้ารหัส และข้อมูลการทดลองเพื่อคาดการณ์สำหรับตัวแปรตอบสนอง

* ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดแสดงเป็น มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัม ($\text{mg}_{\text{ga}} \text{g}^{-1}$)

[†] ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดแสดงเป็นมิลลิกรัมของ cyanindin-3-glucoside ต่อกรัม ($\text{mg}_{\text{cyan-3-glu}} \text{g}^{-1}$).

	Regression Data							
	TPC				TAC			
	SS	DF	F-value	P-value	SS	DF	F-value	P-value
A	25.29	1	40.30	<0.001***	0.53	1	19.02	0.007**
B	125.58	1	200.10	0.001**	1.38	1	49.88	<0.001***
C	115.91	1	184.69	<0.001***	1.74	1	62.95	<0.001***
AA	0.62	1	0.98	0.366 ns	0.72	1	26.15	0.003**
BB	0.01	1	0.02	0.896 ns	0.51	1	18.51	0.008**
CC	27.23	1	43.39	0.001**	2.13	1	77.16	<0.001***
AB	12.20	1	19.44	0.007*	0.01	1	0.42	0.544 ns
AC	5.80	1	9.24	0.029*	0.44	1	16.02	0.010*
BC	189.81	1	302.44	<0.001***	1.78	1	64.33	<0.001***
Lack of fit	2.06	3	1.28	0.4673 ns	0.13	3	17.75	0.0538 ns
Pure error	1.08	2			0.005	2		

			Analysis of variance (ANOVA)	
			TPC	TAC
R ²			0.994	0.985
Adj. R ²			0.983	0.958
Pred. R ²			0.932	0.77

ตารางผนวกที่ ข 3 แบบจำลองการถดถอยและการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA).

A: อัตราส่วนของเหลว-ของแข็ง (mL mg⁻¹); B: อุณหภูมิ (° C); C: น้ำใน NADES (%).

SS: ผลรวมของกำลังสอง; DF: จำนวนค่าอิสระ R²: สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์กำลังสอง;

Adj. R²: ปรับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์กำลังสอง; Pred. R²: ทำนายสมการกำลังสอง

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระดับนัยสำคัญ: * p <0.05; **p <0.01 และ ***; p <0.001; ns: ไม่มีนัยสำคัญ.

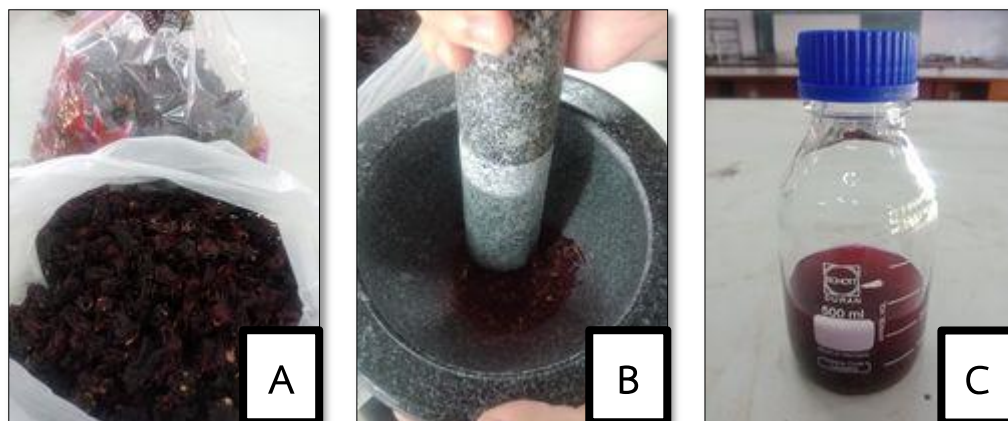
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	ประโยชน์	วิธีการสกัด	การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม	เอกสารอ้างอิง
ฟีนอลิก	ต้านมะเร็ง, ป้องกันโรคเบาหวาน, ต้านการอักเสบ, ป้องกันการเกิดริ้วรอย, ต้านอนุมูลอิสระ, ป้องกันผิวคล้ำ	วิธี MAE-NADESs	เครื่องสำอางและความงาม,ยา	(Slinkard and Singleton, 1977)
แอนโทไซยานิน	ต้านการเกิดเม็ดสี, ต้านอนุมูลอิสระ, หลอดเลือดหัวใจอุดตัน,ต้านมะเร็ง, ป้องกันโรคเบาหวาน	วิธีมาตรฐานสเปกโตรโฟโตเมตริก	อาหาร,ยา,เครื่องสำอาง	(Lee, Dust, Wrolstad, 2005)
ฟลาโวนอยด์	ต้านอนุมูลอิสระ, ลดไข้, ต้านการอักเสบ, ป้องกันมะเร็ง, คลายกล้ามเนื้อ, ปกป้องตับ และไต, ชะลอความเสื่อมของเซลล์	วิธี Super critical fluid t extraction (SFE)	อาหาร,ยา,เครื่องดื่ม,เครื่องสำอาง	(Pimente oral et al, 2019)

ตารางผนวกที่ ข 4 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในกระเจี๊ยบแดงและการนำไปใช้ประโยชน์

ภาคผนวก ค
ภาพการทดลอง



ภาพ ส่วนประกอบของกระเจี๊ยบแดง



ภาพผนวกที่ ค 2 ขั้นตอนการสกัดสาร (A) กระเจี๊ยบแดงอบแห้ง, (B) ตำกระเจี๊ยบแดงให้ละเอียด, (C) ผงกระเจี๊ยบแดง 36.52 g กับ 95 % เอทานอล 200 ml