



ความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต

โดย

นางสาวจิราพร เพลินจิตต์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต

โดย

นางสาวจิราพร เพลินจิตต์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

STABILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN SUBCRITICAL WATER

By

Jiraporn Plernjit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Food Technology

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2011

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต ” เสนอโดย นางสาวจิราพร เพลินจิตต์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ คุ้มจิตรจารุ
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเชษฐ์ สมุหเสนีโต
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสงค์ ศิริวงศ์ไผ่ชาติ

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสภาค สอนไว)

...../...../.....

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.จินตนา วิบูลย์ศิริกุล)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ คุ้มจิตรจารุ)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเชษฐ์ สมุหเสนีโต) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสงค์ ศิริวงศ์ไผ่ชาติ)

...../...../.....

..... กรรมการ

...../...../.....

51403203 : สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

คำสำคัญ : สารประกอบฟีนอลิก/การสลายตัว/ความร้อน

จิราพร เพลินจิตต์ : ความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต. อาจารย์ที่  
ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ , ผศ.ดร.สุเชษฐ์ สมุหเสนีโต และ ผศ.ดร.  
ประสงค์ ศิริวงศ์วิไลชาติ. 62 หน้า.

การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (subcritical water extraction) คือการใช้ น้ำที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดภายใต้ความดันสูงเพียงพอที่ให้น้ำอยู่ในสถานะของเหลวเป็นตัวสกัดนั้น ได้รับ ความสนใจในการใช้สกัดสารประกอบฟีนอลิกจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ แต่ข้อมูลความคงตัวของ สารประกอบฟีนอลิกเหล่านั้นในน้ำกึ่งวิกฤตยังไม่ได้มีการศึกษาอย่างเพียงพอ งานวิจัยนี้จึงศึกษา ความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิก 10 ชนิด ได้แก่ gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid และ catechin ในน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิ 100, 150, 200 และ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที ใน batch-type reactor (ปริมาตร 3 mL) โดย วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เหลืด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวความดันสูง (HPLC) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดย folin-ciocalteu assay และวิเคราะห์ ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) จากการศึกษา พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อน ทำให้สารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ เกิดการ สลายตัวมากขึ้น โดยการสลายตัวสามารถอธิบายได้ด้วยจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (first-order kinetics) สารประกอบฟีนอลิกทุกชนิดที่ศึกษาสลายตัวอย่างสมบูรณ์หลังจากให้ความร้อน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าพลังงานก่อกัมมันต์จากสมการ Arrhenius พบว่า catechin อาจมีกลไกการสลายตัวแตกต่างจากสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น และพบว่าการ สลายตัวทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ลดลง โดยความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการจับ อนุมูลอิสระ DPPH ของสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความสัมพันธ์กันในลักษณะที่เป็นเส้นตรง เป็นที่น่าสนใจว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ protocatechuic acid, syringic acid, caffeic acid, chlorogenic acid และ catechin แสดงความสามารถในการ ต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร      บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร      ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. .... 2. .... 3. ....

51403203 : MAJOR : FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD : PHENOLIC COMPOUNDS/DEGRADATION/HEAT

JIRAPORN PLERNJIT : STABILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN  
SUBCRITICAL WATER. THESIS ADVISORS : ASST.PROF.PRAMOTE KHUWIJITJARU, Ph.D.,  
ASST.PROF.SUCHED SAMUHASENEETOO, Ph.D., AND ASST.PROF.PRASONG  
SIRIWONGWILAICHAT, Ph.D. 62 pp.

Subcritical water extraction, an extraction using water at temperature higher than 100°C under pressurized condition as solvent, has received much interest from researchers for extraction of phenolic compounds from various materials. However, stability of phenolic compounds in subcritical water is still not extensively reported in literature. Therefore, this study investigated stability of 10 phenolic compounds, i.e. gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid and catechin in subcritical water using a batch-type reactor (net volume 3 mL) at 100, 150, 200 and 250°C for 30, 60, 90 and 120 min. The amount of phenolic compounds was determined by HPLC, total phenolic content was determined by folin-ciocalteu assay and free radical scavenging activity was measured using DPPH assay. The results showed that as the heating temperature and time increased, phenolic compounds was more decomposed and the degradation process can be described by first-order kinetics model. All tested compounds degraded completely after heating for 30 min at 250°C. Activation energy from Arrhenius plot indicated that catechin may degrade with different mechanism from other phenolic compounds. Degradation of phenolic compounds resulted in reduction of DPPH free radical scavenging activity and total phenolic content of the heated solution. The relationship between total phenolic content and DPPH radical scavenging activity for each phenolic compound was linear. Interestingly, degradation products from protocatechuic acid, syringic acid, caffeic acid, chlorogenic acid and catechin at high temperature exhibited considerable free radical scavenging activity.

---

Department of Food Technology      Graduate School, Silpakorn University      Academic Year 2011

Student's signature .....

Thesis Advisors' signature 1. .... 2. .... 3. ....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จัดทำขึ้น ณ ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ซึ่งความสำเร็จในครั้งนี้ต้องขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ คูวิจิตรจากรู เป็นอย่างยิ่งที่กรุณาให้คำแนะนำ และเป็นทีปรีक्षा ทั้งแนวทางการวิจัย และดูแลการวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเชษฐ์ สมุทเสนีโต ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประสงค์ ศิริวงศ์ไธชาติ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสภาค สอนไฉ และอาจารย์ ดร.จินตนา วิบูลย์ศิริกุล สำหรับคำแนะนำ และความกรุณาในการตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีอาหารทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้ ให้โอกาสให้คำแนะนำ ให้แก่งคิดและทัศนคติที่ดีและเป็นประโยชน์ต่อข้าพเจ้า

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สำนักงาน และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกคนที่อำนวยความสะดวก เพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปอย่างราบรื่น และประสบความสำเร็จได้ในวันนี้

และที่สำคัญที่สุด ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ ช่วยส่งเสริม สนับสนุนการศึกษาและทุกสิ่งทุกอย่างมาโดยตลอด รวมถึงเพื่อนๆ ที่คอยให้กำลังใจ คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือแก่ข้าพเจ้าเป็นอย่างดีเสมอ

สุดท้ายขอขอบคุณทุกท่านอีกครั้งที่ทำให้ข้าพเจ้ามีวันนี้

## สารบัญ

|                                                              | หน้า |
|--------------------------------------------------------------|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย .....                                        | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....                                      | จ    |
| กิตติกรรมประกาศ.....                                         | ฉ    |
| สารบัญตาราง.....                                             | ณ    |
| สารบัญภาพ.....                                               | ญ    |
| บทที่                                                        |      |
| 1    บทนำ.....                                               | 1    |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....                         | 1    |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....                                 | 1    |
| สมมติฐานของการวิจัย.....                                     | 2    |
| ขอบเขตของการวิจัย .....                                      | 2    |
| 2    เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....                     | 3    |
| สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) .....                  | 3    |
| กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) .....                            | 5    |
| ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids).....                                 | 9    |
| แทนนิน (Tannins) .....                                       | 10   |
| น้ำกึ่งวิกฤต (Subcritical water) .....                       | 11   |
| คุณสมบัติของน้ำกึ่งวิกฤต.....                                | 12   |
| การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (Subcritical water extraction) ..... | 14   |
| ความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต .....             | 15   |
| 3    วิธีดำเนินงานวิจัย.....                                 | 19   |
| สารเคมี .....                                                | 19   |
| อุปกรณ์.....                                                 | 19   |
| วิธีการทดลอง.....                                            | 21   |
| การให้ความร้อนกับสารละลายสารประกอบฟีนอลิกด้วยน้ำกึ่งวิกฤต .. | 21   |
| การวิเคราะห์ .....                                           | 21   |

| บทที่                                                   | หน้า |
|---------------------------------------------------------|------|
| 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง .....                  | 22   |
| ผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อ |      |
| การสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก .....                     | 22   |
| ผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อ |      |
| ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....                      | 30   |
| ผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อ |      |
| ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ.....                     | 38   |
| 5 สรุปผลการทดลอง .....                                  | 44   |
| บรรณานุกรม .....                                        | 45   |
| ภาคผนวก.....                                            | 51   |
| ภาคผนวก ก .....                                         | 52   |
| ภาคผนวก ข .....                                         | 54   |
| ประวัติผู้วิจัย .....                                   | 62   |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                                                 | หน้า |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | กลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกในพืช .....                                                                                                             | 4    |
| 2        | ตัวอย่างสารประกอบกรดฟีนอลิกในแต่ละกลุ่มและแหล่งที่พบ.....                                                                                       | 5    |
| 3        | ตัวอย่างการศึกษาการใช้น้ำกึ่งวิกฤตในการสกัดสารต่างๆ จากพืช .....                                                                                | 14   |
| 4        | การสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกภายใต้การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต.....                                                                                 | 17   |
| 5        | ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก (k) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) และค่าครึ่งชีวิต ( $t_{1/2}$ ) จากการวิเคราะห์รีเกรสชัน..... | 26   |
| 6        | ค่าพลังงานก่อกัมมันต์ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด .....                                                                                         | 30   |
| 7        | จำนวนหมู่ไฮดรอกซิลกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ยังไม่ผ่านการให้ความร้อน.....                            | 39   |
| 8        | ความดันที่แต่ละอุณหภูมิ .....                                                                                                                   | 53   |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | หน้า |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | โครงสร้างของฟีนอล .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 3    |
| 2      | โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 10   |
| 3      | โครงสร้างของฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่ม .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 10   |
| 4      | แผนภูมิวิภาคของน้ำ .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 12   |
| 5      | การเปลี่ยนแปลงของค่าไดอิเล็กทริกสัมพัทธ์และค่าคงที่การแตกตัวของน้ำ<br>ตามอุณหภูมิที่ความดัน 15 MPa .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 13   |
| 6      | ปฏิกิริยาการสลายตัวของ benzoic acid และอนุพันธ์ของ benzoic acid :<br>benzoic acid (a), anthranilic acid (b), salicylic acid (c) และ<br>syringic acid (d) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 18   |
| 7      | กลไกการเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของ anthranilic acid .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 18   |
| 8      | อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง : batch-type reactor สำหรับบรรจุตัวอย่าง (a)<br>และชุดอุปกรณ์ในการให้ความร้อน (b) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 20   |
| 9      | การลดลงของสาร gallic acid (a), protocatechuic acid (b), gentisic acid (c),<br>vanillic acid (d), <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f),<br>caffeic acid (g), <i>p</i> -coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ<br>catechin (j) ที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิ<br>100°C ( ◊ ), 150°C ( ◻ ), 200°C ( ◴ ) และ 250°C ( ◯ ) ที่เวลาต่างๆ<br>โดย C คือความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่คงเหลือ<br>ที่เวลาใดๆ และ C <sub>0</sub> คือ ความเข้มข้นที่เวลาเริ่มต้น ..... | 23   |
| 10     | ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln C/C_0$ กับเวลาของสาร gallic acid (a),<br>protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d),<br><i>p</i> -hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g),<br><i>p</i> -coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j)<br>ที่อุณหภูมิ 100°C ( ◊ ), 150°C ( ◻ ) และ 200°C ( ◴ ) .....                                                                                                                                                              | 25   |

- 11 Arrhenius plot สำหรับการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่ม  
กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (A) : gallic acid (  $\diamond$  ), protocatechuic acid  
(  $\square$  ), gentisic acid (  $\Delta$  ), vanillic acid (  $\times$  ), *p*-hydroxybenzoic acid  
(  $+$  ), syringic acid (  $\circ$  ) กลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก (B) :  
caffeic acid (  $\blacklozenge$  ), *p*-coumaric acid (  $\blacksquare$  ), chlorogenic acid (  $\blacktriangle$  )  
และกลุ่มฟลาโวนอยด์ (C) : catechin (  $\bullet$  ) ..... 29
- 12 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนที่สลายตัวของสาร gallic acid (a),  
protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d),  
*p*-hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g),  
*p*-coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j)  
กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ที่อุณหภูมิ 100°C (  $\diamond$  ),  
150°C (  $\square$  ), 200°C (  $\Delta$  ) และ 250°C (  $\circ$  ) ..... 32
- 13 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย protocatechuic acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน  
(a) และที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส  
30 นาที (b) ..... 33
- 14 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย vanillic acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a)  
และที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส  
30 นาที (b) ..... 34
- 15 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย caffeic acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a)  
และที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b) ..... 35
- 16 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย *p*-coumaric acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน  
(a) และที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส  
30 นาที (b) ..... 36
- 17 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย catechin ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a)  
และที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b) ..... 37

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 18 | ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนที่สลายตัวของสาร gallic acid (a),<br>protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d),<br><i>p</i> -hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g),<br><i>p</i> -coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j)<br>กับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ที่อุณหภูมิ 100°C<br>( ◊ ), 150°C ( □ ), 200°C ( △ ) และ 250°C ( ○ )..... | 40 |
| 19 | ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับ<br>ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร gallic acid ( ◆ )<br>protocatechuic acid ( □ ), gentisic acid ( ▲ ), vanillic acid ( × ),<br><i>p</i> -hydroxybenzoic acid ( + ), syringic acid ( ● ), caffeic acid ( ◊ ),<br><i>p</i> -coumaric acid ( ■ ), chlorogenic acid ( △ ) และ<br>catechin ( ○ ).....                                   | 43 |
| 20 | การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิภายใน batch-type reactor เมื่อตั้งค่าที่<br>อุณหภูมิต่าง ๆ.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 53 |
| 21 | กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิด.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 56 |
| 22 | สเปกตรัมของสารมาตรฐาน gallic acid (a), protocatechuic acid (b),<br>gentisic acid (c), vanillic acid (d), <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (e),<br>syringic acid (f), caffeic acid (g), <i>p</i> -coumaric acid (h),<br>chlorogenic acid (i) และ catechin (j) .....                                                                                                                                   | 58 |
| 23 | กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก<br>ทั้งหมด .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 59 |
| 24 | กราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิกสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถใน<br>การต้านอนุมูลอิสระ DPPH.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 61 |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (subcritical water, superheated water หรือ pressurized hot water extraction) หมายถึงการสกัดโดยใช้น้ำที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดแต่ไม่เกินอุณหภูมิวิกฤต คือ 374 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันสูงเพียงพอที่ให้น้ำอยู่ในสถานะของเหลว (Smith, 2002) นั้นได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างแพร่หลายในหลายสาขารวมถึงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการเป็นตัวทำละลายสกัดสารหลากหลายกลุ่มจากวัตถุดิบหลากหลายประเภท และเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสูง ใช้เวลาในการสกัดสั้น และไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษ (Herrero และคณะ, 2006) โดยเฉพาะการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ เช่น มะระขี้นก สมอไทย ใบออริกาโน และเมล็ดองุ่น เป็นต้น ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกนั้นเป็นสารประกอบหนึ่งในกลุ่มของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่พบมากที่สุด สังเคราะห์ได้จากกระบวนการต่างๆ ของพืชในระหว่างการเจริญเติบโต มีการศึกษาพบว่ามียประโยชน์หลากหลาย เช่น เป็นสารป้องกันการเกิดออกซิเดชัน เป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ เป็นต้น (Balasundram และคณะ, 2006 และ Naczek และ Shahidi, 2004) แต่ข้อมูลที่สำคัญประการหนึ่งคือความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกเหล่านั้นในน้ำกึ่งวิกฤตยังไม่ได้ได้รับการศึกษาอย่างเพียงพอ โดยงานวิจัยบางส่วนมีการรายงานว่า การเพิ่มอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้มีค่าลดลงซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเหล่านี้มีความคงตัวในน้ำกึ่งวิกฤตไม่มากนัก ดังนั้นการศึกษาถึงความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มต่างๆ เป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อให้สามารถกำหนดสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารเหล่านี้ต่อไปได้ และจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาระบบการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อไป

#### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารละลายสารประกอบฟีนอลิก

### 1.3 สมมติฐานของการวิจัย

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนมีผลต่อการสลายตัวและความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต

### 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

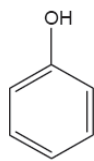
ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ในช่วง 100-250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-120 นาที โดยทำการศึกษาแบบ batch ซึ่งระบบ batch นั้น ความดันจะขึ้นกับความดันไอสมดุลของน้ำที่อุณหภูมินั้นๆ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกคือ กลุ่มของสารประกอบที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 1 หมู่หรือมากกว่า ต่อกับวงแหวนอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน มีความหลากหลายเชิงโครงสร้างมาก ซึ่งฟีนอลเป็นโครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิก แสดงดังภาพที่ 1 แม้ว่าฟีนอลจะมีความคล้ายกับแอลกอฮอล์มากซึ่งมีโครงสร้างเป็นอะลิฟาติก มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่กับสายของคาร์บอน แต่ฟีนอลมีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่กับวงแหวนอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ออกซิเจนจับอยู่กับวงแหวนอะโรมาติกอย่างแน่นหนาและออกซิเจนเกาะอยู่กับไฮโดรเจนด้วยพันธะอย่างหลวมๆ ไฮโดรเจนที่หมู่ไฮดรอกซิลจึงสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ง่าย ทำให้ฟีนอลมีความเป็นกรดอ่อน (Vermeris และ Nicholson, 2006)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของฟีนอล

ที่มา: Vermeris และ Nicholson (2006)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่ได้จากกระบวนการต่างๆ ของพืชในระหว่างการเจริญเติบโต และในสภาวะที่มีความเครียด เช่น สภาวะที่มีการติดเชื้อ สภาวะที่เกิดบาดแผล สภาวะที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต และอื่นๆ พบอยู่ในทุกๆ ส่วนของพืช มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโต การแพร่พันธุ์ การป้องกันและต่อต้านเชื้อโรค ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลตและเป็นสารให้สีในพืช ส่วนในอาหารสารประกอบฟีนอลิกจะให้ลักษณะทางประสาทสัมผัสเฉพาะตัว เช่น อาจจะทำให้รสขม รสฝาด เป็นสารให้สี กลิ่นรส และเป็นสารป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์ สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบหนึ่งในกลุ่มของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่พบมากที่สุดและมีคุณสมบัติต่างๆ มากมาย เช่น แก้แพ้, แก้อักเสบ, ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์, รักษาระบบหัวใจ, ต่อต้านการเกิดออกซิเดชัน เป็นต้น โดยประโยชน์หลักที่ได้รับจากสารประกอบฟีนอลิกก็คือการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดยสารประกอบฟีนอลิกนั้น

จะทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระ (free radical) ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ และจับไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจะกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อและเซลล์ของพืชแตกต่างกัน โดยที่สารประกอบฟีนอลิกที่ไม่ละลายน้ำจะเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ขณะที่สารประกอบฟีนอลิกที่ละลายน้ำจะพบอยู่ในแวคิวโอล และที่เนื้อเยื่อด้านนอกของพืชจะพบสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณที่สูงกว่าเนื้อเยื่อด้านในของพืช (Balasundram และคณะ, 2006; Naczk และ Shahidi, 2004 และ Rice-Evans และคณะ, 1997) โดยเราสามารถแบ่งกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกออกได้เป็นกลุ่มดังตารางที่ 1 โดย กรดฟีนอลิก (phenolic acids), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และแทนนิน (tannins) เป็นกลุ่มที่สำคัญที่สุดของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งปริมาณที่มีอยู่ในอาหารมีตั้งแต่เล็กน้อยกว่า 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ถึง 3,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้คือ พื้นที่เพาะปลูก อายุ สภาพะวะในการเจริญเติบโต เช่น ปุ๋ย, อุณหภูมิ, ศัตรูพืช, แสงและน้ำ เป็นต้น แต่ละส่วนของพืช กระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษา (King และ Young, 1999)

ตารางที่ 1 กลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกในพืช

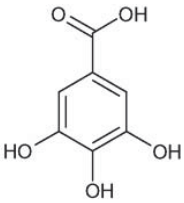
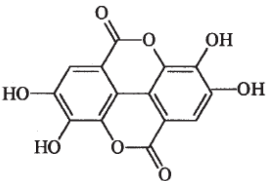
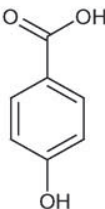
| Class                                              | Structure         |
|----------------------------------------------------|-------------------|
| Simple phenolics, benzoquinones                    | $C_6$             |
| Hydroxybenzoic acids                               | $C_6-C_1$         |
| Acetophenones, phenylacetic acids                  | $C_6-C_2$         |
| Hydroxycinnamic acids, phenylpropanoids            | $C_6-C_3$         |
| (coumarins, isocoumarins, chromones, chromenes)    |                   |
| Napthoquinones                                     | $C_6-C_4$         |
| Xanthones                                          | $C_6-C_1-C_6$     |
| Stilbenes, anthraquinones                          | $C_6-C_2-C_6$     |
| Flavonoids, isoflavonoids                          | $C_6-C_3-C_6$     |
| Lignans, neolignans                                | $(C_6-C_3)_2$     |
| Biflavonoids                                       | $(C_6-C_3-C_6)_2$ |
| Lignins                                            | $(C_6-C_3)_n$     |
| Condensed tannins (proanthocyanidins or flavolans) | $(C_6-C_3-C_6)_n$ |

ที่มา: Balasundram และคณะ (2006)

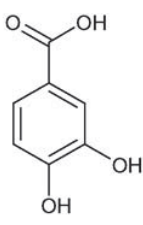
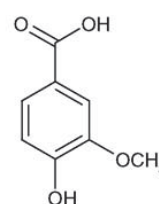
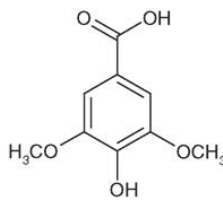
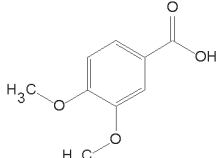
### 2.1.1 กรดฟีนอลิก (Phenolic acids)

แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acids) และกรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic acids) กลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก มีโครงสร้างเป็น C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> พบอยู่ทั่วไปในอาหารและพบว่าเป็นองค์ประกอบของสารประกอบเชิงซ้อน เช่น ลิกนิน และ hydrolyzable tannins (Shahidi และ Naczk, 2004) ส่วนกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิกนั้นมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกต่อกับสายคาร์บอน 3 ตัว C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (Balasundram และคณะ, 2006) ตัวอย่างสารประกอบที่อยู่ในแต่ละกลุ่มและแหล่งที่พบแสดงดังตารางที่ 2

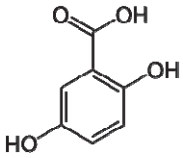
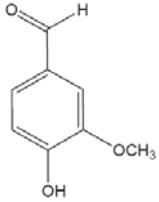
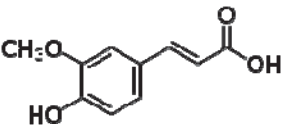
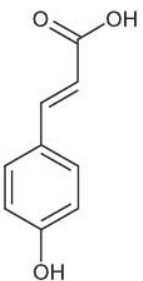
ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารประกอบกรดฟีนอลิกในแต่ละกลุ่มและแหล่งที่พบ

| Phenolic acids                                                                                                       | แหล่งที่พบ                       | อ้างอิง                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------|
| <u>Hydroxybenzoic acids</u>                                                                                          |                                  |                                           |
| <br>gallic acid                   | เบอรรี่และถั่ว                   | King และ Young (1999)                     |
|                                                                                                                      | เปลือกของงุ่น เมล็ดของงุ่น       | Ju และ Howard (2005), Palma และคณะ (2001) |
|                                                                                                                      | มะระขี้นก                        | Budrat และ Shotipruk (2009)               |
|                                                                                                                      | สตรอปเบอรี่                      | Herrera และ Luque de Castro (2005)        |
|                                                                                                                      | กานพลู                           | Shan และคณะ (2005)                        |
| <br>ellagic acid                  | เบอรรี่และถั่ว                   | King และ Young (1999)                     |
|                                                                                                                      | สมอไทย                           | Rangsriwong และคณะ (2009)                 |
| <br><i>p</i> -hydroxybenzoic acid | เครื่องเทศ, แครอท และสตรอปเบอรี่ | Amiot และคณะ (1997)                       |
|                                                                                                                      | ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี            | Shahidi และ Naczk (2004)                  |
|                                                                                                                      | อัลมอนต์ เฮเซลนัท                |                                           |
|                                                                                                                      | ถั่วพีแคน วอลนัท เมล็ด           |                                           |
|                                                                                                                      | ทานตะวัน แครนเบอร์รี่            |                                           |
|                                                                                                                      | แครอท หัวหอม                     |                                           |

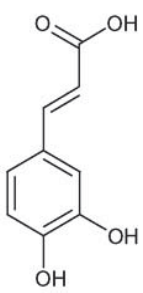
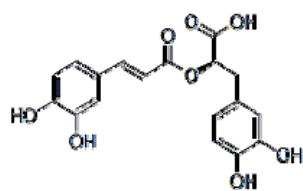
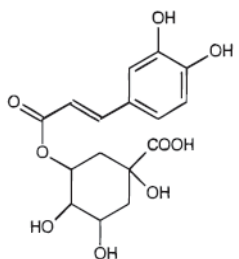
ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารประกอบกรดฟีนอลิกในแต่ละกลุ่มและแหล่งที่พบ (ต่อ)

| Phenolic acids                                                                                               | แหล่งที่พบ                                                                                                                                                                                             | อ้างอิง                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>protocatechuic acid</p>  | <p>สตรอเบอรี่</p> <p>องุ่น</p> <p>ผักกาดหอม</p> <p>โหระพา พืชตระกูลผักชี</p> <p>อบเชย</p> <p>ข้าวบาร์เลย์ ถั่วพีแคน</p> <p>วอลนัท หัวหอม</p>                                                           | <p>Herrera และ Luque de Castro (2005)</p> <p>Palma และ Taylor (1999)</p> <p>Altunkaya และ Gokmen (2009)</p> <p>Shan และคณะ (2005)</p> <p>Anderson และคณะ (2004)</p> <p>Shahidi และ Nacz (2004)</p> |
| <p>vanillic acid</p>       | <p>สตรอเบอรี่</p> <p>พริกไทย</p> <p>ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี</p> <p>อัลมอนด์ เฮเซลนัท ถั่วลิสง</p> <p>ถั่วพีแคน วอลนัท ถั่วเหลือง</p> <p>เมล็ดทานตะวัน น้ำมัน</p> <p>มะกอก แครนเบอร์รี่</p> <p>หัวหอม</p> | <p>Herrera และ Luque de Castro (2005)</p> <p>Liaid และคณะ (2007)</p> <p>Shahidi และ Nacz (2004)</p>                                                                                                |
| <p>syringic acid</p>      | <p>สตรอเบอรี่</p> <p>ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี</p> <p>ถั่วพีแคน วอลนัท ถั่วเหลือง</p> <p>เมล็ดทานตะวัน แครอท</p>                                                                                           | <p>Herrera และ Luque de Castro (2005)</p> <p>Shahidi และ Nacz (2004)</p>                                                                                                                           |
| <p>veratric acid</p>      | <p>สตรอเบอรี่</p> <p>พริกไทย</p>                                                                                                                                                                       | <p>Herrera และ Luque de Castro (2005)</p> <p>Liaid และคณะ (2007)</p>                                                                                                                               |

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารประกอบกรดฟีนอลิกในแต่ละกลุ่มและแหล่งที่พบ (ต่อ)

| Phenolic acids                                                                                                 | แหล่งที่พบ                                                                                                         | อ้างอิง                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| gentisic acid<br>             | สตรอเบอรี่<br>พริกไทย<br>มะระขี้นก<br>เปลือกข้าวสาลี ถั่วพีแคน<br>วอลนัท ถั่วเหลือง                                | Herrera และ Luque de Castro (2005)<br>Liazid และคณะ (2007)<br>Budrat และ Shotipruk (2009)<br>Shahidi และ Naczk (2004)                                                                                                     |
| Vanillin<br>                 | สตรอเบอรี่<br>พริกไทย<br>ไวน์ น้ำองุ่น องุ่น                                                                       | Herrera และ Luque de Castro (2005)<br>Liazid และคณะ (2007)<br>Palma และ Taylor (1999)                                                                                                                                     |
| <u>Hydroxycinnamic acids</u>                                                                                   |                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                           |
| ferulic acid<br>            | มะระขี้นก<br>ไวน์ น้ำองุ่น องุ่น<br>กาแฟ<br>บลูเบอร์รี เชอร์รี่ น้ำเชอร์รี่<br>แอปเปิ้ล น้ำแอปเปิ้ล<br>ลูกแพร์ ส้ม | Kubola และ Siriamornpun (2008)<br>Palma และ Taylor (1999)<br>Balasundram และคณะ (2006)<br>King และ Young (1999)                                                                                                           |
| <i>p</i> -coumaric acid<br> | มะระขี้นก<br>แอปเปิ้ล<br>พริกไทย<br>กาแฟ<br>ผักกาดหอม<br>โหระพา ออริกาโน<br>เบอร์รี่ทั่วไป<br>กากแอปเปิ้ล พีช      | Kubola และ Siriamornpun (2008)<br>Alonso-Salces และคณะ (2001)<br>Liazid และคณะ (2007)<br>Balasundram และคณะ (2006)<br>Altunkaya และ Gokmen (2009)<br>Shan และคณะ (2005)<br>King และ Grabiell (2007)<br>Adil และคณะ (2007) |

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารประกอบกรดฟีนอลิกในแต่ละกลุ่มและแหล่งที่พบ (ต่อ)

| Phenolic acids                                                                                              | แหล่งที่พบ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | อ้างอิง                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>caffeic acid</p>        | <p>สตรอเบอรี่</p> <p>พริกไทย</p> <p>โรสแมรี่</p> <p>ไวน์ น้ำองุ่น องุ่น</p> <p>กาแฟ</p> <p>ผักกาดหอม</p> <p>มินท์ โหระพา ออริกาโน</p> <p>โรสแมรี่ พืชตระกูลผักชี</p> <p>เมล็ดยี่ห่วย กระวานเขียว</p> <p>ลูกจันทร์เทศ ขิง</p> <p>บลูเบอร์รี่ เชอร์รี่ น้ำเชอร์รี่</p> <p>แอปเปิ้ล น้ำแอปเปิ้ล ลูก</p> <p>แพร์ ส้ม มันฝรั่ง เกรฟฟรุต</p> | <p>Herrera และ Luque de Castro (2005)</p> <p>Liazid และคณะ (2007)</p> <p>Terpinc และคณะ (2009)</p> <p>Palma และ Taylor (1999)</p> <p>Balasundram และคณะ (2006)</p> <p>Altunkaya และ Gokmen (2009)</p> <p>Shan และคณะ (2005)</p> <p>King และ Young (1999)</p> |
| <p>rosmarinic acid</p>   | <p>โรสแมรี่</p> <p>มินท์ โหระพา ออริกาโน</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <p>Terpinc และคณะ (2009)</p> <p>Shan และคณะ (2005)</p>                                                                                                                                                                                                       |
| <p>chlorogenic acid</p>  | <p>แอปเปิ้ล</p> <p>สตรอเบอรี่</p> <p>กาแฟ อัลมอนต์</p> <p>ผักกาดหอม</p> <p>ธัญพืช เมล็ดทานตะวัน</p> <p>บลูเบอร์รี่ เชอร์รี่ ลูกแพร์</p> <p>แอปเปิ้ล น้ำแอปเปิ้ล ส้ม</p> <p>มันฝรั่ง เกรฟฟรุต</p>                                                                                                                                       | <p>Alonso-Salces และคณะ (2001)</p> <p>Herrera และ Luque de Castro (2005)</p> <p>Balasundram และคณะ (2006)</p> <p>Altunkaya และ Gokmen (2009)</p> <p>King และ Young (1999)</p>                                                                                |

### 2.1.2 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

เป็นกลุ่มของรงควัตถุที่พบในพืช มีสีเหลือง เป็นสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่สุดของพืช ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน 15 อะตอม มีโครงสร้างเป็น  $C_6-C_3-C_6$  แสดงดังภาพที่ 2 และมักจะอยู่ร่วมกับโมเลกุลน้ำตาล ฟลาโวนอยด์แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้ คือ ฟลาโวนอล (flavonols), ฟลาโวน (flavones), ฟลาวานอน (flavanones), ฟลาวานอล (flavanols หรือ catechin), ไอโซฟลาโวน (isoflavones) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) (Balasundram และคณะ, 2006) โดยโครงสร้างของฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่มแสดงดังภาพที่ 3

2.1.2.1 ฟลาโวนอล (Flavonols) เป็นฟลาโวนอยด์ที่มีมากที่สุด ประกอบด้วย เควอซีติน (quercetin), เคมพ์เฟอรอล (kaempferol) และไมริซีติน (myricetin) และรูติน (rutin) ซึ่งเป็นตัวหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มนี้ โดยที่ เควอซีติน เป็นฟลาโวนอยด์ที่สำคัญที่สุดของพืช อาหารที่พบฟลาโวนอลในปริมาณสูง ได้แก่ หัวหอม, แอปเปิ้ล, ผักกาด, ใบผักกาดหอม, ชา, แครนเบอร์รี่ และบร็อคโคลี่ เป็นต้น

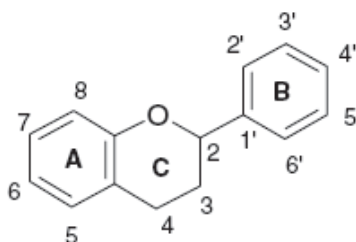
2.1.2.2 ฟลาโวน (Flavones) ประกอบด้วย ลูเตโอลิน (luteolin), อะพิจินิน (apigenin) เป็นต้น พบมากในขึ้นฉ่าย, ผักชีฝรั่ง (parsley) และมะกอก

2.1.2.3 ฟลาวานอล (Flavanols) ประกอบด้วย คาเทชิน (catechin) และ อีพิกาทะชิน (epicatechin) พบในลูกแพร์, แอปเปิ้ล, ใบชาเขียว, ไวน์แดง, ไวน์ขาว เป็นต้น และมักจะอยู่ร่วมกับกรดแกลลิก (gallic acid) เป็น epigallocatechin gallate และ epicatechin gallate ในชา หรือเป็น condensed tannin ในผลไม้, พืชตระกูลถั่ว และธัญพืช ผลไม้ดิบมีฟลาวานอลในปริมาณสูง

2.1.2.4 ไอโซฟลาโวน (Isoflavones) ส่วนใหญ่พบในพืชตระกูลถั่วเกือบทั้งหมด โดยเฉพาะในถั่วเหลืองพบในปริมาณที่สูงประมาณ 1,600-2,400 mg/kg ไอโซฟลาโวนทนความร้อน และละลายในน้ำได้เล็กน้อย แต่ละลายได้มากในแอลกอฮอล์ (King และ Young, 1999)

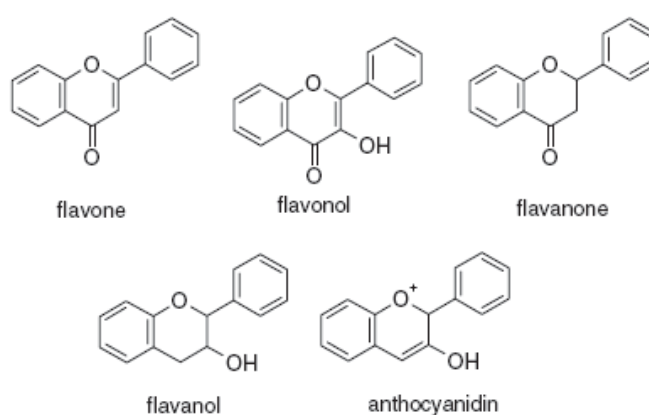
2.1.2.5 ฟลาวานอน (Flavanones) มักพบในผลไม้ตระกูลส้ม (Naczek และ Shahidi, 2004)

2.1.2.6 แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) โครงสร้างพื้นฐานในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนโซไพแรน (benzopyran) 2 วงต่อกับวงแหวนฟีนิล (phenyl ring) สารประกอบแอนโทไซยานิดินที่พบมากจะอยู่ในรูปของออกซิเนียมไอออน (oxonium ion) คือ ที่อะตอมของออกซิเจนมีประจุบวก ได้แก่ ไซยานิดิน (cyanidin), พีลาร์โกนิน (pelargonidin), เดลฟินิดิน (delphinidin), พีโอนิน (peonidin), เพทูนิดิน (Petunidin) และมัลวิดิน (malvidin) พบในบลูเบอร์รี่, องุ่น และสตรอเบอร์รี่ เป็นต้น (นิธิยา, 2549)



ภาพที่ 2 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์

ที่มา: Balasundram และคณะ (2006)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่ม

ที่มา: Balasundram และคณะ (2006)

### 2.1.3 แทนนิน (Tannins)

เป็นกลุ่มของสารประกอบเชิงซ้อนที่มีมวลโมเลกุลสูงที่ได้จากธรรมชาติ เป็นสารที่ทำให้เกิดรสฝาด และมีสีเหลืองจนถึงน้ำตาล นอกจากนั้นยังทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เร่งด้วยเอนไซม์ด้วย พบอยู่ในเปลือกของไม้ยืนต้นและยังพบได้ในส่วนอื่นๆ ของพืชด้วย เช่นพบมากในใบชา โกโก้ และผลไม้ดิบที่มีรสฝาด ได้แก่ พลับ ละมุด กัลฉ่ำ องุ่น ท้อ แอปเปิ้ล และสาลี่ แทนนินยังมีประโยชน์ในการทำไวน์ แต่ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้ไวน์มีรสชาติไม่ดี เช่นมีรสฝาด แทนนินแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ hydrolyzable tannins (แทนนินที่ไฮโดรไลซ์ได้) และ condensed tannins

2.1.3.1 Condensed tannins เป็นกลุ่มของสารประกอบแทนนินที่เป็นโพลีเมอร์ของ catechin หรือ epicatechin พบมากในผลไม้ ธัญพืช และพืชตระกูลถั่ว โดยมักสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อชั้นนอกของพืช

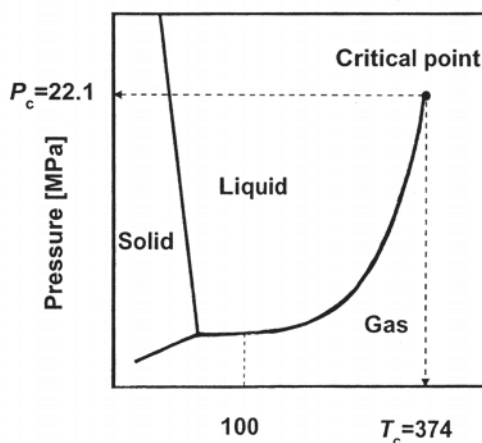
2.1.3.2 Hydrolyzable tannins เป็นกลุ่มของสารประกอบแทนนินที่เป็นโพลีเมอร์ของกรดแกลลิก (gallic acid) หรือ กรดเอลลาจิก (ellagic acid) เรียกว่า แกลโลแทนนิน

(gallotannins) และเอลลาจิทแทนนิน (ellagitannin) ตามลำดับ และมีน้ำตาลกลูโคสอยู่ในโมเลกุลด้วย 1 โมเลกุล พบในเบอร์รี่และถั่ว ตัวอย่างสารประกอบในกลุ่มนี้คือ กรดแทนนิก (tannic acid) เป็นแกัลโลแทนนิน (นิธิยา, 2549 และ King และ Young, 1999)

การสกัดสารประกอบฟีนอลิกในพืชขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีของสารนั้น วิธีที่ใช้การสกัด ขนาดของอนุภาคของตัวอย่าง ระยะเวลาการเก็บ สภาพที่ใช้ในการสกัด และสารรบกวน โดยความสามารถในการละลายของสารประกอบฟีนอลิกขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ (ความมีขั้ว) degree of polymerization ของสารประกอบฟีนอลิก และการเกิดปฏิกิริยากันระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับองค์ประกอบอื่นในอาหาร ตัวทำละลายที่มักใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน น้ำ เอธิลอะซีเตต โพรพานอล ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และสารผสมของตัวทำละลายเหล่านี้ (Naczek และ Shahidi, 2004) แต่การสกัดด้วยตัวทำละลายมีข้อเสียหลายประการ คือ ใช้ระยะเวลาในการสกัดมาก ยุ่งยาก มีประสิทธิภาพในการสกัดต่ำ และยังก่อให้เกิดสารพิษจากตัวทำละลายจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีการนำเทคโนโลยีใหม่ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมาใช้ในการสกัดสารจากพืชได้แก่ การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (subcritical water extraction) ซึ่งสามารถสกัดสารได้หลากหลายกลุ่มจากวัตถุดิบหลายประเภท และเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสูง ใช้เวลาในการสกัดสั้น และไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษ (Herrero และคณะ, 2006)

## 2.2 น้ำกึ่งวิกฤต (Subcritical water)

จากแผนภูมิวัฏภาคของน้ำ (ภาพที่ 4) เมื่อควบคุมความดันและอุณหภูมิของน้ำให้สูงเกินจุดวิกฤต (374 องศาเซลเซียส, 220 atm) ก็จะได้น้ำในสถานะที่เรียกว่าน้ำวิกฤตยิ่งยวด (supercritical water) แต่เนื่องจากสถานะที่รุนแรงของน้ำวิกฤตยิ่งยวดทำให้มีการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารโดยตรงค่อนข้างน้อย แต่หากมีน้ำอุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดแต่ยังคงต่ำกว่าจุดวิกฤต (นั่นคือน้ำที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 100-374 องศาเซลเซียส) ภายใต้ความดันที่สูงเพียงพอที่จะรักษาสถานะของเหลวไว้ได้ จะได้สารที่เรียกว่า น้ำกึ่งวิกฤต (subcritical water, superheated water, pressurized hot water) ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษหลายประการที่น่าสนใจ สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้เป็นอย่างดี และได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์หลายแขนงในการนำมาประยุกต์ใช้ในหลากหลายสาขา เช่น การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต, การย่อยสลายวัสดุชีวภาพด้วยน้ำกึ่งวิกฤต, โครมาโตกราฟีแบบน้ำกึ่งวิกฤต เป็นต้น แต่การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตนับว่าเป็นการประยุกต์ใช้ที่ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการสกัดสารหลากหลายกลุ่มจากวัตถุดิบหลากหลายประเภท (Herrero และคณะ, 2006 และ Smith, 2002)



ภาพที่ 4 แผนภูมิวิภาคของน้ำ

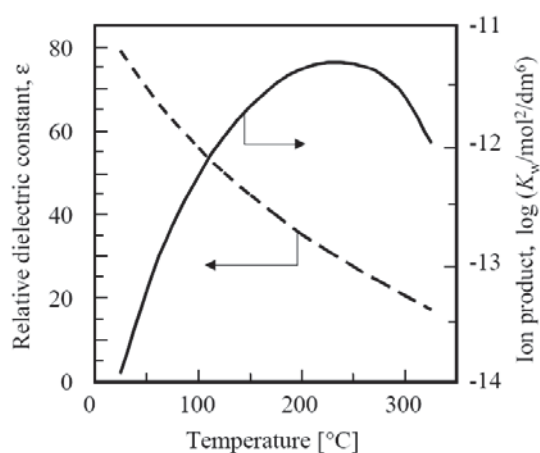
ที่มา : ปราโมทย์ (2549)

### 2.2.1 คุณสมบัติของน้ำกึ่งวิกฤต

น้ำเป็นตัวทำละลายที่มีลักษณะเฉพาะ คือ มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจนจำนวนมาก ที่อุณหภูมิห้องน้ำมีค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) และความเป็นขั้วสูง อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของน้ำจะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นพันธะไฮโดรเจนจะถูกทำลาย ค่าคงที่ไดอิเล็กทริกมีค่าลดลง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความเป็นขั้วของน้ำ ความหนืดและแรงตึงผิว (surface tension) ลดลงและอัตราการแพร่เพิ่มขึ้น (Smith, 2002)

คุณสมบัติสำคัญของน้ำกึ่งวิกฤตที่แตกต่างไปจากน้ำที่สภาวะปกติ ได้แก่ ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) และค่าคงที่การแตกตัว (ion product) พิจารณาภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่าค่าคงที่ไดอิเล็กทริกสัมพัทธ์ (relative dielectric constant,  $\epsilon$  ของน้ำ ซึ่งสะท้อนถึงความเป็นขั้วของโมเลกุลนั้นมีค่าประมาณ 79.0 ที่ 25 องศาเซลเซียส นั่นคือน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง ค่านี้จะลดลงจนเหลือเพียง 35.5 ที่ 200 องศาเซลเซียส และ 20.7 ที่ 300 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่าในระดับเดียวกันกับตัวทำละลายอย่างเมทานอล ( $\epsilon = 32$  ที่ 25 องศาเซลเซียส) และอะซิโตน ( $\epsilon = 21$  ที่ 25 องศาเซลเซียส) จากคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปนี้ทำให้น้ำกึ่งวิกฤตมีพฤติกรรมคล้ายกับตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว และสามารถทำละลายสารประกอบที่ไม่มีขั้วได้ดีกว่าน้ำที่สภาวะปกติมาก ทำให้สามารถสกัดและเข้าทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มนี้ได้ดี ดังเช่น Miller และ Hawthorne (1998) รายงานว่าสารกำจัดแมลง chlorothalonil ซึ่งปกติละลายในน้ำได้น้อยมากนั้น มีความสามารถในการละลายน้ำมากขึ้นถึง 130,000 เท่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 25 องศาเซลเซียส ไปเป็น 200 องศาเซลเซียส และจากภาพที่ 5 จะสังเกตได้อีกว่าหากทำการปรับ

อุณหภูมิที่เหมาะสมจะได้น้ำกึ่งวิกฤติที่มีความเป็นขั้วแตกต่างกันไปทำให้สามารถเลือกสกัดหรือละลายสารแต่ละกลุ่มได้ คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการของน้ำกึ่งวิกฤติคือมีค่าคงที่การแตกตัว ( $K_w$ ) สูง โดยที่ความดัน 15 MPa ค่า  $\log K_w$  เพิ่มขึ้นจาก -14 ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็น -11.3 ที่ อุณหภูมิในช่วง 200-250 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของไฮโดรเนียมไอออน ( $H_3O^+$ ) และไฮดรอกซีไอออน ( $OH^-$ ) เพิ่มขึ้นจาก  $1 \times 10^{-7}$  mol/L ไปเป็น  $2.2 \times 10^{-6}$  mol/L หรือมากกว่า 20 เท่า การเพิ่มขึ้นของค่า  $K_w$  นั้นจะเป็นปัจจัยที่เร่งปฏิกิริยาที่เร่งด้วยกรดและเบส (acid-base catalyst) เช่น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (ปราโมทย์, 2549)



**ภาพที่ 5** การเปลี่ยนแปลงของค่าไดอิเล็กทริกสัมพัทธ์และค่าคงที่การแตกตัวของน้ำตามอุณหภูมิที่ความดัน 15 MPa

ที่มา : Khuwijitjaru (2004)

เมื่อเทียบกับการสกัดที่สภาวะปกติแล้วการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตินั้นมีประสิทธิภาพสูงกว่าทั้งนี้เนื่องมาจากความสามารถในการละลายและการถ่ายเทมวลของสารที่ทำให้การสกัดเพิ่มขึ้นและเพิ่มการทำลายสมดุลระหว่างผิวสัมผัส (surface equilibria) โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ความสามารถในการละลายของตัวทำละลายต่างๆ สูงขึ้น ความหนืดของน้ำลดลง การแพร่เพิ่มขึ้นส่งผลให้น้ำสามารถแทรกผ่านเข้าไปในอนุภาคได้ดีขึ้น นอกจากนี้ถ้ามีการไหลต่อเนื่องในระหว่างการสกัดแบบไดนามิกแล้วจะเพิ่มการถ่ายเทมวล ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด ทั้งอุณหภูมิสูงและความดันสามารถทำลายสมดุลระหว่างผิวสัมผัสได้ การเพิ่มอุณหภูมิสามารถทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างตัวถูกละลายกับตัววัสดุ ได้แก่ แรงแวนเดอร์วาลส์ และพันธะไฮโดรเจน ทำให้การปลดปล่อยของสารออกจากวัสดุเกิดได้ง่ายขึ้น ส่วนความดันจะช่วยเพิ่มการสัมผัสระหว่างตัวถูกละลายกับน้ำ (Teo และคณะ, 20010)

### 2.2.2 การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (Subcritical water extraction)

การใช้ประโยชน์จากน้ำกึ่งวิกฤตที่สำคัญคือ การใช้แทนตัวทำละลายอินทรีย์ หรือแม้แต่การแทนที่คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดยิ่งในการสกัดสารที่มีมูลค่าจากวัสดุทางการเกษตรโดยมีการศึกษาในวัตถุดิบหลายชนิด (Smith, 2002) ตัวอย่างการศึกษาการสกัดสารต่างๆ จากพืชโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่มีรายงานแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการศึกษาการใช้ น้ำกึ่งวิกฤตในการสกัดสารต่างๆ จากพืช

| วัตถุดิบ                  | สารประกอบ                              | อ้างอิง                         |
|---------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|
| สารออกฤทธิ์ทางยา          |                                        |                                 |
| บัวบก                     | asiatic acid และ asiaticoside          | Kim และคณะ (2009)               |
| รากยอ                     | anthraquinones                         | Anekpankul และคณะ (2007)        |
| รากกวาว                   | kava lactone                           | Kubátová และคณะ (2001)          |
| รากชะเอม                  | nutraceutical compound                 | Baek และคณะ (2008)              |
| สารกลุ่มฟีนอลและโพลีฟีนอล |                                        |                                 |
| มะระขี้นก                 | สารประกอบฟีนอลิก                       | Budrat และ Shotipruk (2009)     |
| ผิวมะกรูด                 | สารประกอบฟีนอลิก                       | Khuwijitjaru และคณะ (2008)      |
| สมอไทย                    | สารประกอบฟีนอลิก                       | Rangsriwong และคณะ (2009)       |
| ใบออริกาโน                | สารประกอบฟีนอลิก                       | Rodríguez-Meizoso และคณะ (2006) |
| รำข้าว                    | สารประกอบฟีนอลิก                       | Pourali และคณะ (2010)           |
| ป่าน                      | สารประกอบฟีนอลิก                       | Kim และ Mazza (2006)            |
| เมล็ดองุ่น                | สารประกอบฟีนอลิก                       | García-Marino และคณะ (2006)     |
| เบลคเคอเรนท์              | แอนโทไซยานินส์และสารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ | Cacace และ Mazza (2002)         |

**ตารางที่ 3** ตัวอย่างการศึกษาการใช้น้ำกึ่งวิกฤตในการสกัดสารต่างๆ จากพืช (ต่อ)

| วัตถุดิบ       | สารประกอบ                                  | อ้างอิง                                    |
|----------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| เปลือกองุ่นแดง | แอนโทไซยานินส์และ<br>สารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ | Ju และ Howard (2005)                       |
| แครอทม่วง      | แอนโทไซยานินส์                             | Gizir และคณะ (2008)                        |
| เมล็ดองุ่น     | สารกลุ่มคาเทชินและ<br>อีพิกาทะชิน          | Piñeiro และคณะ (2004)                      |
| โรสแมรี่       | สารแอนติออกซิแดนท์                         | Ibañez และคณะ (2003)                       |
| ถั่วเหลือง     | ไอโซฟลาโวนส์                               | Li-Hsun และคณะ (2004)                      |
| น้ำมันหอมระเหย |                                            |                                            |
| เมล็ดผักชี     | น้ำมันหอมระเหย                             | Eikani และคณะ (2007)                       |
| มินท์          | น้ำมันหอมระเหย                             | Ozel และ Kaymaz (2004)                     |
| ออริกาน        | น้ำมันหอมระเหย                             | Ayala และ Luque de Castro<br>(2001)        |
| เมล็ดยี่ห่วย   | น้ำมันหอมระเหย                             | Gámiz-Gracia และ Luque<br>de Castro (2000) |

### 2.2.3 ความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต

การใช้ประโยชน์จากน้ำกึ่งวิกฤตในการสกัดสารที่มีมูลค่าจากวัตถุดิบทางการเกษตรนั้นได้รับความสนใจจากนักวิจัยจำนวนมาก โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีการศึกษาการประยุกต์ใช้น้ำกึ่งวิกฤตมาสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากพืชชนิดต่างๆ กันอย่างกว้างขวาง แต่ในการสกัดสารประกอบที่ไม่เสถียรต่อความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤต จะมีการสลายตัวเกิดขึ้นในบางครั้ง ซึ่งการศึกษาด้านความคงตัวของสารประกอบเหล่านี้ในน้ำกึ่งวิกฤตยังไม่ได้มีการศึกษาอย่างเพียงพอ โดยงานวิจัยบางส่วนมีการรายงานว่าการเพิ่มอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้มีค่าลดลงหรือสูญเสียความสามารถในการเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเหล่านี้มีความคงทนต่อสภาวะในการสกัดได้ไม่ดีนัก เช่น Ju และ Howard (2005) พบว่าการใช้อุณหภูมิสูงกว่า 110 องศาเซลเซียส ในการ

สกัดสารฟีนอลิกจากเปลือกองุ่นด้วยน้ำกึ่งวิกฤตจะทำให้เกิดการลดลงของทั้งปริมาณแอนโทไซยานินส์และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม ส่วน Rangsiwong และคณะ (2009) ศึกษาการสกัดสารโพลีฟีนอลิกจากผลสมอไทยด้วยน้ำกึ่งวิกฤต พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 220 องศาเซลเซียส ปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ในสารสกัดลดลงซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาจเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิสูง และเมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดให้นานขึ้น ความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดต่ำลง เช่นเดียวกับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากมะระขี้นกด้วยน้ำกึ่งวิกฤต คือ ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณของ catechin, gentisic acid และ chlorogenic acid ที่สกัดได้และความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 200 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณ gallic acid ที่สกัดได้ลดลงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 230 องศาเซลเซียส ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้ลดลง ซึ่งอาจเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิสูงเช่นเดียวกัน (Budrat และ Shotipruk, 2009)

Herrera และ Luque de Castro (2005) รายงานความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกเมื่อผ่านการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่มีการเติมกรด HCl 1.2 M ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4) พบว่าสารประกอบฟีนอลิก 7 ชนิดสลายตัวหมด 100 % ภายในเวลา 10 นาที และมีเพียง 3 ชนิดเท่านั้นที่มีการสลายตัวอยู่ในช่วง 50 % แต่งานวิจัยจำนวนมากยังพบว่าสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้แม้ใช้อุณหภูมิสูงแสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดอาจจะมี ความคงตัวต่อความร้อนในน้ำกึ่งวิกฤตได้ดี

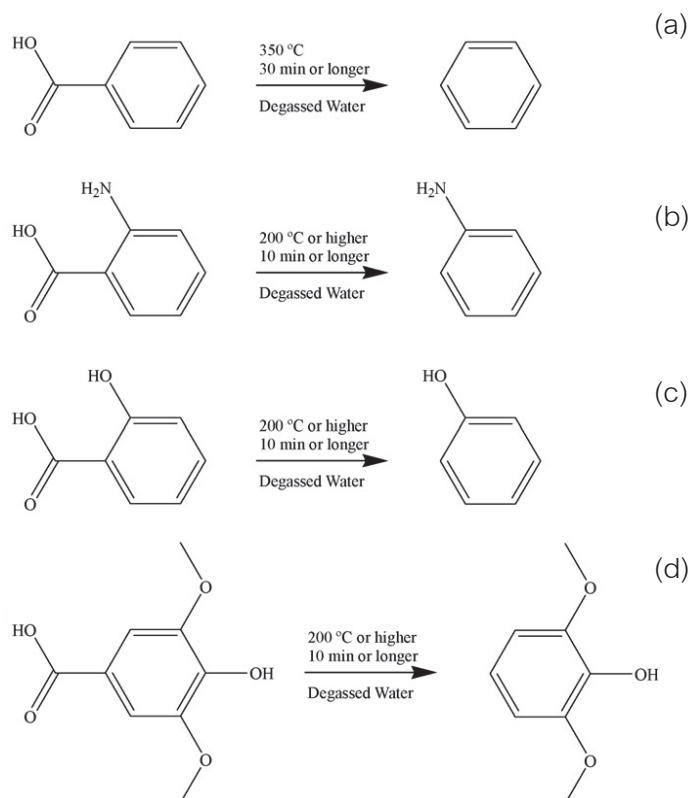
Lindquist และ Yang (2011) ศึกษาความคงตัวของ benzoic acid และอนุพันธ์ของ benzoic acid 3 ชนิด ได้แก่ anthranilic acid, salicylic acid และ syringic acid ภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤต โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 50-350 องศาเซลเซียส พบว่าการสลายตัวของอนุพันธ์ของ benzoic acid เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และมีความเสถียรน้อยลงเมื่อเพิ่มเวลาในการให้ความร้อน สารทั้ง 4 ชนิด ยังคงเสถียรจนถึงอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส อนุพันธ์ของ benzoic ทั้ง 3 ชนิด เกิดการสลายตัวเพียงเล็กน้อยหลังจากให้ความร้อน 30 นาที แต่สลายตัวมาก และสลายตัวอย่างสมบูรณ์ที่ 250 องศาเซลเซียส แต่ benzoic acid ยังคงเสถียรอยู่ที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส หลังจากให้ความร้อน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 200 และ 250 องศาเซลเซียส สารประกอบ anthranilic acid, salicylic acid, syringic acid และ benzoic acid เกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชันไปเป็นสารประกอบตัวอื่นได้แก่ ได้แก่ aniline, phenol, syringol และ benzene ตามลำดับ (ภาพที่ 6) ซึ่งกลไกการเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชันของ

anthranilic acid แสดงดังภาพที่ 7

**ตารางที่ 4** การสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกภายใต้การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต

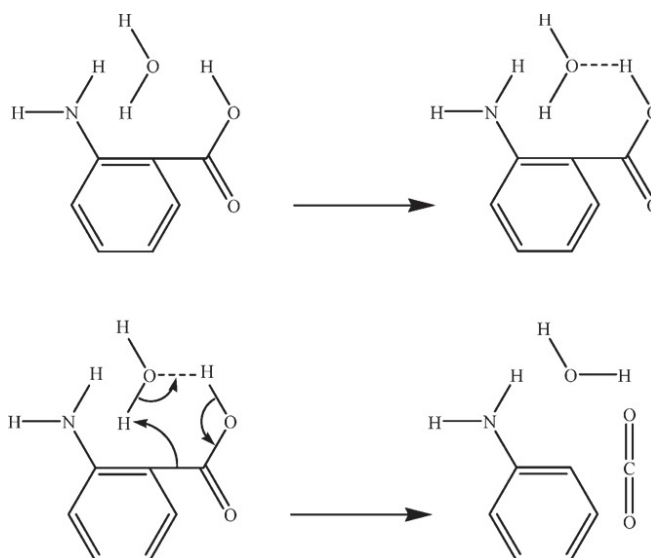
| Analyte                       | Degradation (%)                                                                   |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
|                               | Subcritical water extraction ที่เดิมกรด<br>HCl 1.2 M ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส |
| gallic acid                   | 100                                                                               |
| protocatechuic acid           | 100                                                                               |
| gentisic acid                 | 100                                                                               |
| <i>p</i> -hydroxybenzoic acid | 100                                                                               |
| vanillic acid                 | 100                                                                               |
| chlorogenic acid              | 100                                                                               |
| caffeic acid                  | 100                                                                               |
| syritic acid                  | 96                                                                                |
| vanillin                      | 58                                                                                |
| syringic acid                 | 99                                                                                |
| syringaldehyde                | 55                                                                                |
| salicylic acid                | 49                                                                                |
| <i>p</i> -coumaric acid       | 76                                                                                |
| veratric acid                 | 82                                                                                |
| ferulic acid                  | 68                                                                                |

ที่มา : Herrera และ Luque de Castro (2005)



ภาพที่ 6 ปฏิกริยาการสลายตัวของ benzoic acid และอนุพันธ์ของ benzoic acid : benzoic acid (a), anthranilic acid (b), salicylic acid (c) และ syringic acid (d)

ที่มา: Lindquist และ Yang (2011)



ภาพที่ 7 กลไกการเกิดปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชันของ anthranilic acid

ที่มา: Lindquist และ Yang (2011)

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 สารเคมี

- 3.1.1 gallic acid monohydrate ( $\geq 98\%$ , M.W.=188.14, Sigma, U.S.A.)
- 3.1.2 protocatechuic acid ( $\geq 97\%$ , M.W.=154.12), *p*-hydroxybenzoic acid ( $\geq 99\%$ , M.W.=138.12, Aldrich, Germany)
- 3.1.3 caffeic acid ( $\geq 95\%$ , M.W.=180.16), vanillic acid ( $\geq 97\%$ , M.W.=168.15, Fluka, China )
- 3.1.4 gentisic acid sodium salt hydrate ( $\geq 98\%$ , M.W.=176.10, Aldrich,U.S.A. )
- 3.1.5 *p*-coumaric acid ( $\geq 98\%$ , M.W.=164.16, Fluka, UK)
- 3.1.6 syringic acid ( $\geq 95\%$ , M.W.=198.17, Sigma, UK)
- 3.1.7 chlorogenic acid ( $\geq 95\%$ , M.W.=354.31, Aldrich, India)
- 3.1.8 catechin hydrate ( $\geq 96\%$ , M.W.=290.27, Fluka, Indonesia)
- 3.1.9 DPPH<sup>°</sup> (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) (Sigma-Aldrich, Germany)
- 3.1.10 Folin-ciocalteu (Merck, Germany)
- 3.1.11 Sodium carbonate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.12 เมทานอล (Merck, Germany)
- 3.1.13 กรดอะซิติก (J.T. Baker, Thailand)
- 3.1.14 L-ascorbic acid (Riedel-de Haën, China)
- 3.1.15 น้ำกลั่น

#### 3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ชุดอุปกรณ์ให้ความร้อนและความคุมอุณหภูมิด้วยอ่างซิลิโคน (ภาพที่ 8 (b)) ซึ่งประกอบด้วย

- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller) (AS ONE, Japan)
- อ่างซิลิโคน (Silicone oil bath)

- เทอร์โมคัปเปิล

- เทอร์โมมิเตอร์ (Fluk รุ่น 52 II, China)

3.2.2 Batch type high pressure reactor (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน×ความสูงภายนอก: 0.6×10.6 เซนติเมตร, ปริมาตร 3.3 มิลลิลิตร, บริษัทนานาสยามอินเตอร์เทรดจำกัด)

3.2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ประกอบด้วยปั๊ม HPLC (Dionex รุ่น P680A LPG-4, Germany), Photodiode array detector (Dionex รุ่น PDA-100, USA) คอลัมน์แบบ Inertsil ODS-3 (ขนาด 4.6×250 มิลลิเมตร ยี่ห้อ GL Science, Japan) และ Luna 5u C18 (ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Phenomenex, USA)

3.2.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Thermo Spectronic, รุ่น Genesys 10uv, USA)

3.2.5 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius AG รุ่น ED224S, Germany)

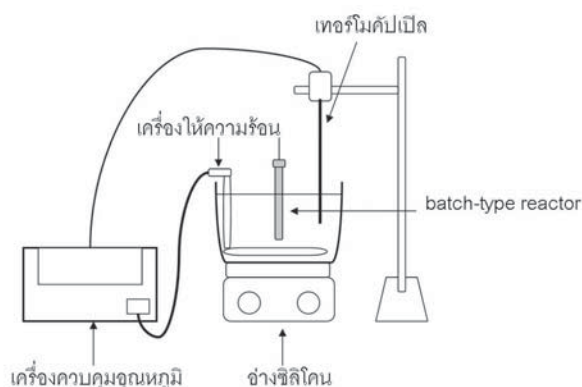
3.2.6 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

3.2.7 ตู้แช่เยือกแข็ง ตู้เย็น

3.2.8 นาฬิกาจับเวลา



(a)



(b)

**ภาพที่ 8** อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง: batch-type reactor สำหรับบรรจุตัวอย่าง (a) และ ชุดอุปกรณ์ในการให้ความร้อน (b)

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การให้ความร้อนกับสารละลายสารประกอบฟีนอลิกด้วยน้ำกึ่งวิกฤต

3.3.1.1 เตรียมสารละลายสารประกอบฟีนอลิกในน้ำ ได้แก่ gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid และ catechin ความเข้มข้น 100 ppm

3.3.1.2 กำจัดอากาศออกโดยการแทนที่ด้วยก๊าซไนโตรเจน

3.3.1.3 บรรจุสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดใน batch-type reactor 2.6 มิลลิลิตร (80% ของปริมาตร reactor) (ภาพที่ 8 (a))

3.3.1.4 วางลงในอ่างชิลิโคนที่ตั้งอุณหภูมิที่ต้องการไว้ (ภาพที่ 8 (b)) เพื่อให้ความร้อนแก่สารละลายสารประกอบฟีนอลิกจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ (โดยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 3 – 5 นาที อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 5 – 7 นาที อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 5 – 7 นาที และอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 6 – 8 นาที) จึงเริ่มจับเวลาเป็นเวลา 30, 60, 90, 120 นาที โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.1.5 เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดไว้จึงนำ reactor ออกจากอ่างชิลิโคน ทำให้เย็นทันทีโดยการจุ่มลงในน้ำผสมน้ำแข็ง

3.3.1.6 เก็บสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนในขวดใส่ตัวอย่างสีชา แล้วเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า -18 องศาเซลเซียส เพื่อบริการวิเคราะห์ต่อไป

#### 3.3.2 การวิเคราะห์

3.3.2.1 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เหลือหลังจากการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตใช้วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Subba Roa และ Muralikrishna, 2002) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ วิธีการวิเคราะห์แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข

3.3.2.2 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method (Maisuthisakul และคณะ, 2007) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซึ่งผลการทดลองแสดงในหน่วยของมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่าง (mg GAE/g sample) วิธีการวิเคราะห์แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข

3.3.2.3 วิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Brand-Williams และคณะ, 1995) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซึ่งผลการทดลองแสดงในหน่วยของกรัมของวิตามินซีต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่าง (g VCEAC/g sample) วิธีการวิเคราะห์แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข

## บทที่ 4

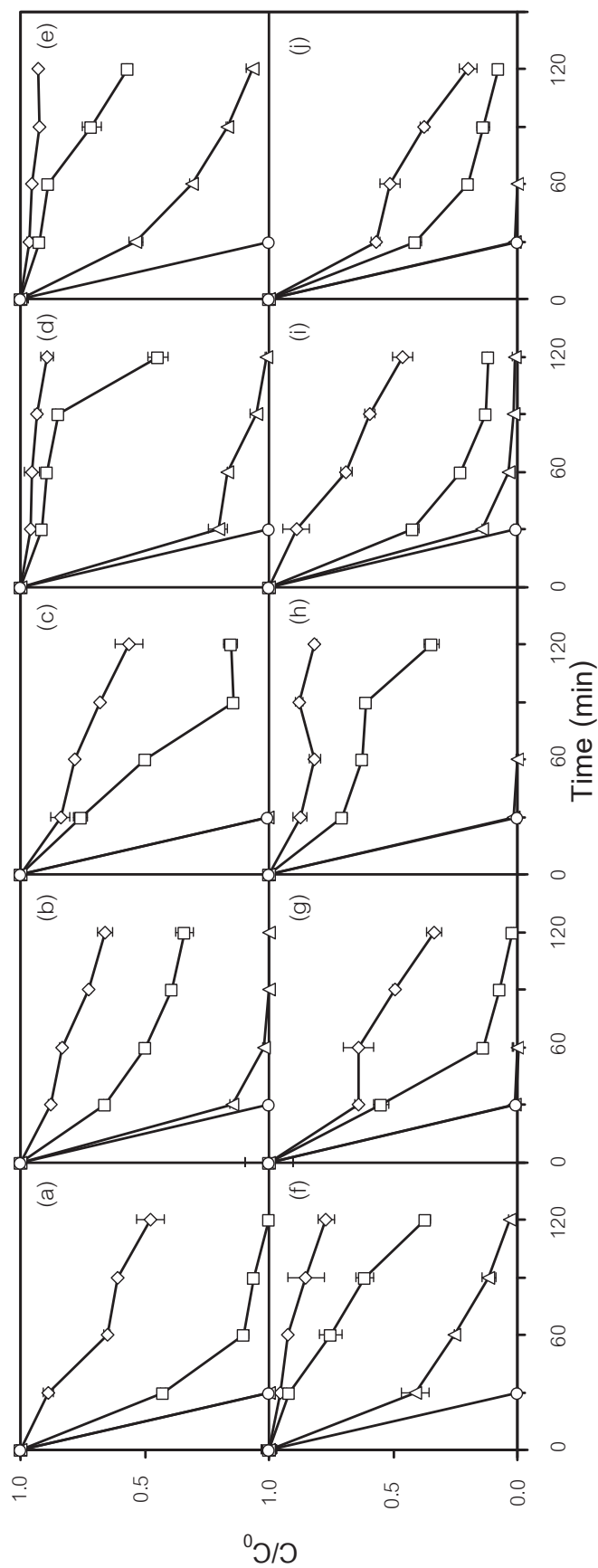
### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก

การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนต่อการสลายตัวในน้ำกึ่งวิกฤตของสารประกอบฟีนอลิก 10 ชนิด ที่มีความเข้มข้น 100 ppm โดยแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้ คือ กลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acids) ประกอบด้วย gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid และ syringic acid กลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic acids) ประกอบด้วย caffeic acid, *p*-coumaric acid และ chlorogenic acid และกลุ่มฟลาโวนอยด์ ประกอบด้วย catechin โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 100, 150, 200 และ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที แสดงดังภาพที่ 9 ซึ่งแสดงสัดส่วนความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่คงเหลือแต่ละชนิดต่อความเข้มข้นที่เวลาเริ่มต้น ( $C/C_0$ ) พบว่าเมื่อเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตเพิ่มขึ้นจาก 30 นาที ถึง 120 นาที ส่งผลให้สารประกอบฟีนอลิกทั้ง 10 ชนิด มีปริมาณลดลง เช่นเดียวกับเมื่ออุณหภูมิในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตเพิ่มขึ้น จาก 100 ถึง 250 องศาเซลเซียส ส่งผลให้สารประกอบฟีนอลิกทั้ง 10 ชนิด มีปริมาณลดลงด้วยเช่นกัน โดยที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ขึ้นไปนั้นสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 10 ชนิด สลายตัวไปในปริมาณมาก

สารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่สลายตัวไม่หมดที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส หลังจากให้ความร้อนเป็นเวลา 30 นาที ได้แก่ protocatechuic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid และ catechin มีสารประกอบฟีนอลิกเพียง 2 ชนิด เท่านั้นที่ไม่พบหลังจากให้ความร้อนด้วยสภาวะนี้ คือ gallic acid และ gentisic acid แต่เมื่อสารประกอบเหล่านี้ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 60 นาที พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่ทนอยู่ในสภาวะนี้ได้เหลือเพียง 5 ชนิด ได้แก่ protocatechuic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid และ chlorogenic acid แต่ในปริมาณที่ต่ำ (น้อยกว่าร้อยละ 35)

ในขณะที่การให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส นั้น พบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 10 ชนิด สลายตัวหมด หลังจากให้ความร้อนเป็นเวลาเพียง 30 นาที



**ภาพที่ 9** การลดลงของสาร gallic acid (a), protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d), *p*-hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g), *p*-coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j) ที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิ 100°C (◇), 150°C (□), 200°C (△) และ 250°C (○) ที่เวลาต่างๆ โดย C คือความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่คงเหลือที่เวลาใดๆ และ  $C_0$  คือ ความเข้มข้นที่เวลาเริ่มต้น

ในการเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ส่งผลให้สารประกอบฟีนอลิกทั้ง 10 ชนิด มีปริมาณลดลง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเกิดการสลายตัวขึ้นที่อุณหภูมิสูง ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวนี้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lindquist และ Yang (2011) ที่พบว่า การสลายตัวของอนุพันธ์ของ benzoic acid ได้แก่ anthranilic acid, salicylic acid และ syringic acid ในน้ำกึ่งวิกฤต เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 50 องศาเซลเซียส ถึง 350 องศาเซลเซียส ซึ่ง Lindquist และ Yang (2011) ได้วิเคราะห์พบว่าปฏิกิริยาการสลายตัวของสารฟีนอลิกทั้ง 3 ชนิด คือ ปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน โดยสลายตัวอย่างสมบูรณ์ที่ 250 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Yang และคณะ (2007) ที่พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อความคงตัวของ carvacrol ในน้ำกึ่งวิกฤต ซึ่ง carvacrol นั้นเป็นสารประกอบฟีนอลิกโมโนเทอร์ปีนส์ โดยการสลายตัวของ carvacrol ในน้ำกึ่งวิกฤต เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 100 องศาเซลเซียส ถึง 250 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส carvacrol มีการสลายตัวต่ำกว่าร้อยละ 10 และที่อุณหภูมิ 200 และ 250 องศาเซลเซียส เกิดการสลายตัวมาก และเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานานขึ้นจาก 30-300 นาที ทำให้ปริมาณของ carvacrol ลดลงด้วย แต่ผลการศึกษาของ Herrera และ Luque de Castro (2005) ที่ศึกษาความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกเมื่อผ่านการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่มีการเติมกรด HCl 1.2 M ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส พบว่าสารประกอบฟีนอลิก 7 ชนิด ได้แก่ gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, chlorogenic acid และ caffeic acid สลายตัวหมด 100 % ภายในเวลา 10 นาที และมีเพียง 3 ชนิดเท่านั้นที่มีการสลายตัวอยู่ในช่วง 50 % ได้แก่ vanillin, syringaldehyde, salicylic acid

การลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤต เมื่อพิจารณาในทางจลนพลศาสตร์ โดยการพล็อตค่าลอการิทึม  $C/C_0$  กับเวลานั้นจะเห็นได้ว่าได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (ภาพที่ 10) แสดงให้เห็นว่าการสลายตัวสามารถอธิบายได้ด้วยจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (first-order kinetics) ดังสมการ

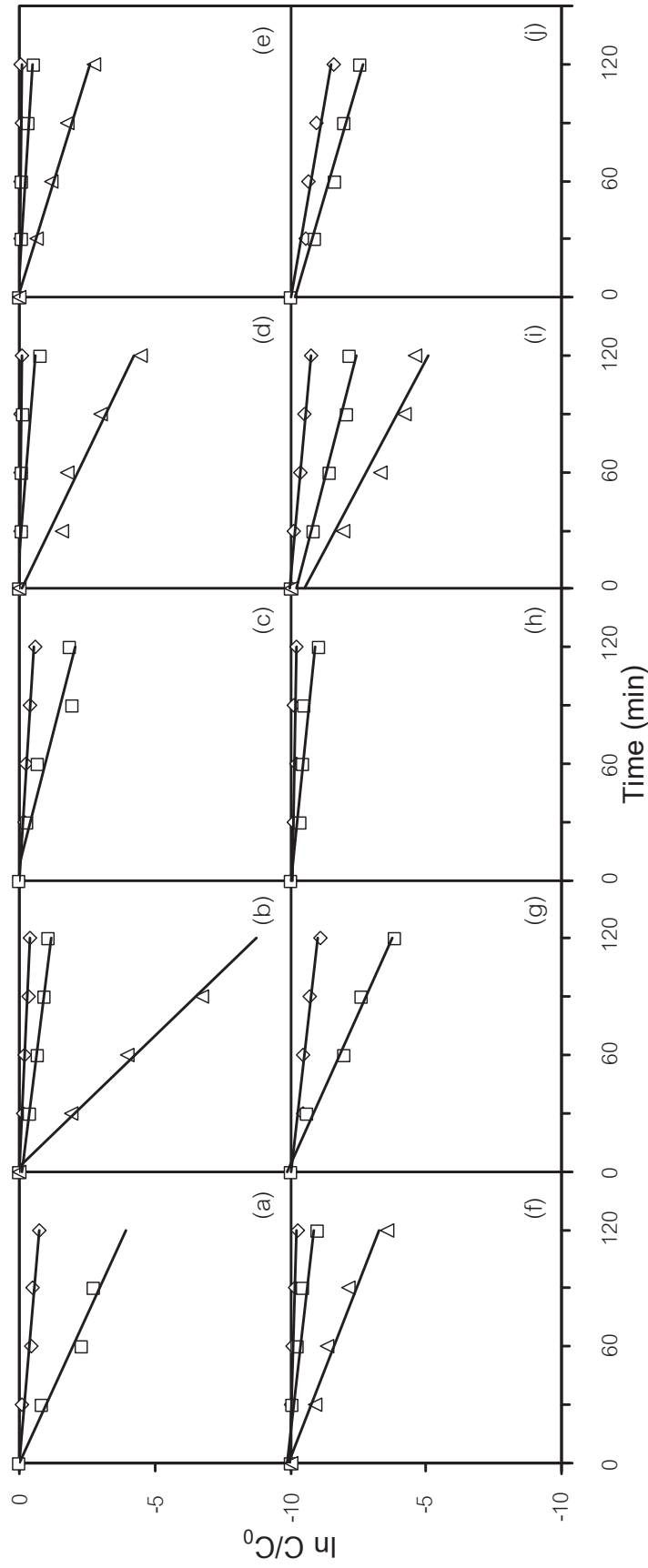
$$\ln C/C_0 = -kt \quad (1)$$

เมื่อ  $C$  คือ ความเข้มข้นที่คงเหลือที่เวลาใดๆ

$C_0$  คือ ความเข้มข้นที่เวลาเริ่มต้น

$k$  คือ ค่าคงที่อัตรา

$t$  คือ เวลา (นาที)



**ภาพที่ 10** ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\ln C/C_0$  กับเวลาของสาร gallic acid (a), protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d), *p*-hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g), *p*-coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j) ที่อุณหภูมิ 100°C (  $\diamond$  ), 150°C (  $\square$  ) และ 200°C (  $\Delta$  )

**ตารางที่ 5** ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก (k) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) และค่าครึ่งชีวิต ( $t_{1/2}$ ) จากการวิเคราะห์เกรสซัน

| สารประกอบฟีนอลิก      | อุณหภูมิ (°C)          |                |                         |                        |                |                         |
|-----------------------|------------------------|----------------|-------------------------|------------------------|----------------|-------------------------|
|                       | 100                    |                |                         | 150                    |                |                         |
|                       | k (min <sup>-1</sup> ) | R <sup>2</sup> | t <sub>1/2</sub> (นาที) | k (min <sup>-1</sup> ) | R <sup>2</sup> | t <sub>1/2</sub> (นาที) |
| gallic acid           | 0.0062                 | 0.9720         | 112                     | 0.0326                 | 0.9658         | 21                      |
| protocatechuic acid   | 0.0034                 | 0.9865         | 203                     | 0.0089                 | 0.9637         | 78                      |
| gentisic acid         | 0.0045                 | 0.9828         | 152                     | 0.0180                 | 0.8959         | 38                      |
| vanillic acid         | 0.0009                 | 0.9450         | 812                     | 0.0056                 | 0.6750         | 123                     |
| p-hydroxybenzoic acid | 0.0006                 | 0.8862         | 1082                    | 0.0046                 | 0.9127         | 151                     |
| syringic acid         | 0.0021                 | 0.9527         | 326                     | 0.0080                 | 0.9108         | 87                      |
| caffeic acid          | 0.0082                 | 0.9316         | 85                      | 0.0324                 | 0.9854         | 21                      |
| p-coumaric acid       | 0.0014                 | 0.5930         | 512                     | 0.0076                 | 0.8806         | 92                      |
| chlorogenic acid      | 0.0065                 | 0.9873         | 107                     | 0.0185                 | 0.9428         | 37                      |
| catechin              | 0.0122                 | 0.9466         | 57                      | 0.0209                 | 0.9771         | 33                      |

หมายเหตุ : nd หมายถึง ไม่สามารถคำนวณค่าได้เนื่องจากข้อมูลไม่เพียงพอ

ซึ่งจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่งพบได้บ่อยสำหรับการสลายตัวของสารประกอบที่มีอยู่ในอาหารที่อุณหภูมิคงที่ (Taoukis และคณะ, 1997) และพบในการไฮโดรไลซิส มอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ การสลายตัวของน้ำตาลมอลโตสในน้ำกึ่งวิกฤต (Khajavi และคณะ, 2006 และ Khajavi และคณะ, 2004) การไฮโดรไลซิสสตาร์ช เซลลูโลสและโปรตีนในน้ำกึ่งวิกฤต (Rogalinski และคณะ, 2008) และการไฮโดรไลซิสเอสเตอ์ของกรดไขมันในน้ำกึ่งวิกฤต (Khuwijitjaru, 2004)

โดยการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดในรูปของกราฟจลนพลศาสตร์แสดงดังภาพที่ 10 และค่าคงที่อัตราการสลายตัว ( $k$ ) และค่าครึ่งชีวิต (half-life,  $t_{1/2}$ ) แสดงดังตารางที่ 5 ซึ่งเมื่ออุณหภูมิในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นจาก 100 องศาเซลเซียส ถึง 200 องศาเซลเซียส มีผลให้ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของของสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 10 ชนิด มีค่าเพิ่มขึ้น และค่าครึ่งชีวิตมีค่าลดลง ซึ่งค่าครึ่งชีวิตหมายถึงเวลาที่ใช้ในการทำให้ความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่ง แต่สำหรับที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส มีข้อมูลไม่เพียงพอสำหรับพล็อตกราฟ โดยค่าคงที่อัตราการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่าค่าคงที่อัตราการสลายตัวที่อุณหภูมิ 100 และ 150 องศาเซลเซียส มากอย่างเห็นได้ชัด และค่าครึ่งชีวิตก็มีค่าลดลงมากอย่างเห็นได้ชัดเช่นกัน ดังนั้นการให้ความร้อนกับสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้ ด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิสูงทำให้สารประกอบเหล่านี้มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำ

จากผลการศึกษาที่สนับสนุนผลการทดลองของ Rangsiwong และคณะ (2009) ที่ศึกษาการสกัดสารฟีนอลิกจากผลสมอไทยด้วยน้ำกึ่งวิกฤต พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดสารถึง 220 องศาเซลเซียส ปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ในสารสกัดลดลง ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิสูง เช่นเดียวกับการทดลองของ Budrat และ Shotipruk (2009) ที่พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดเป็น 200-230 องศาเซลเซียส ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากมะระขี้นกด้วยน้ำกึ่งวิกฤตนั้น ทำให้สาร gallic acid ที่สกัดได้และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีปริมาณลดลง ซึ่งเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิสูงเช่นเดียวกัน

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่อัตราการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด กับอุณหภูมิแสดงด้วยสมการ Arrhenius

$$\ln k = \ln k_0 - E_a/RT \quad (2)$$

โดยที่  $k$  คือ ค่าคงที่อัตรา

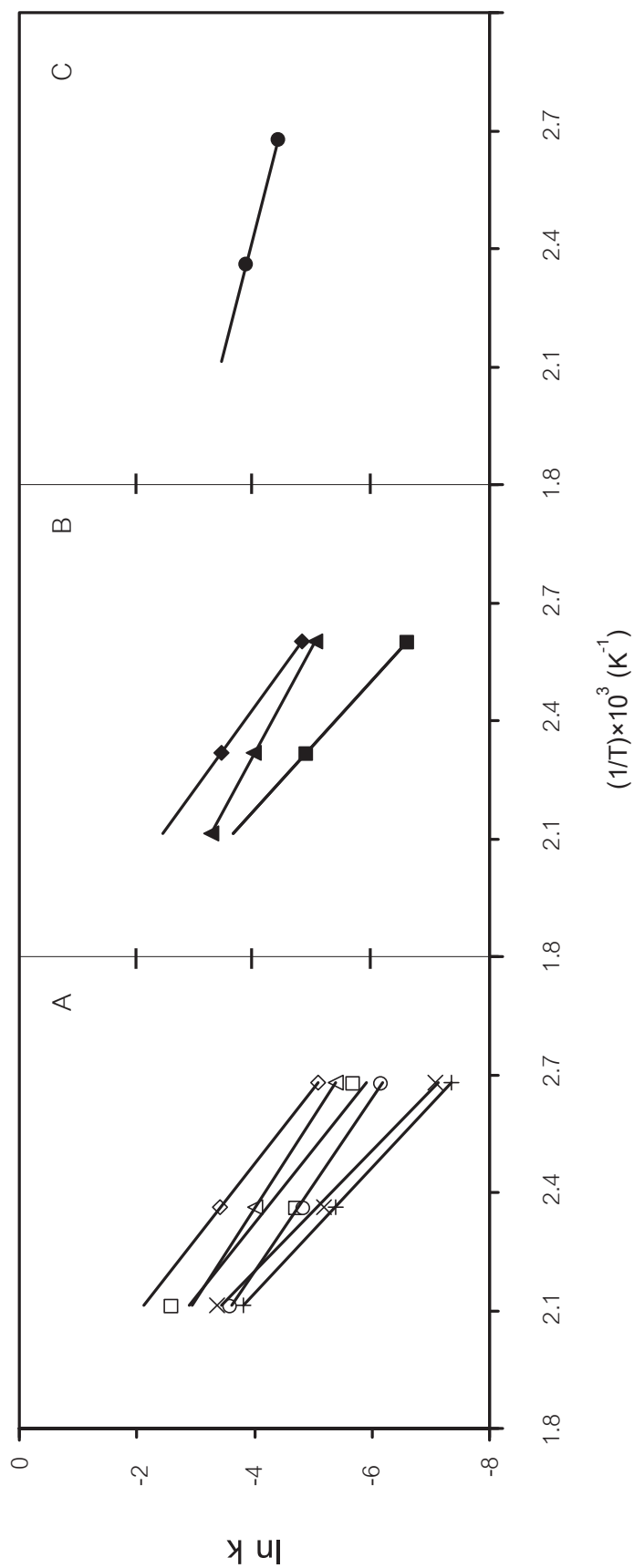
$k_0$  คือ ค่า Pre-exponential factor

$E_a$  คือ ค่าพลังงานกระตุ้น หรือพลังงานก่อกัมมันต์ (Activation energy) (cal/mol)

$R$  คือ ค่าคงที่ของก๊าซในอุดมคติ มีค่าเท่ากับ  $1.986 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$

$T$  คือ อุณหภูมิสัมบูรณ์ (เคลวิน)

เมื่อพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของค่าคงที่อัตราของปฏิกิริยาการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด ( $\ln k$ ) กับส่วนกลับของอุณหภูมิสัมบูรณ์ ( $1/T$ ) (ภาพที่ 11) พบว่าได้ลักษณะความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง จากสมการความสัมพันธ์ Arrhenius ซึ่งเป็นสมการที่แสดงการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเกิดปฏิกิริยากับอุณหภูมิ เมื่อคำนวณค่าพลังงานก่อกัมมันต์ จากค่าความชันของกราฟของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด (ตารางที่ 6) พบว่าสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดในกลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกและกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิกมีค่าพลังงานก่อกัมมันต์ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งน่าจะบ่งชี้ให้เห็นว่าการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีกลไกไม่แตกต่างกัน แต่สำหรับ catechin มีค่าพลังงานก่อกัมมันต์น้อยที่สุดในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่า catechin อาจมีกลไกการสลายตัวไม่เหมือนกับสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกและกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก โดย catechin นั้นเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีโครงสร้างต่างกับสารในกลุ่มกรดฟีนอลิกทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวอย่างมาก ซึ่งในการศึกษาของ Lindquist และ Yang (2011) พบว่าการสลายตัวของกรดฟีนอลิกในน้ำก็งักเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่หมู่คาร์บอกซิลของกรดคาร์บอกซิลิกถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไฮโดรเจน



ภาพที่ 11 Arrhenius plot สำหรับการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (A) : gallic acid ( ◇ ), protocatechuic acid ( □ ), gentisic acid ( Δ ), vanillic acid ( × ), *p*-hydroxybenzoic acid ( + ), syringic acid ( ○ ) กลุ่มกรดไฮดรอกซีฟีนอลิก (B) : caffeic acid ( ◆ ), *p*-coumaric acid ( ■ ), chlorogenic acid ( ▲ ) และกลุ่มฟลาโวนอยด์ (C) : catechin ( ● )

ตารางที่ 6 ค่าพลังงานก่อกัมมันต์ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด

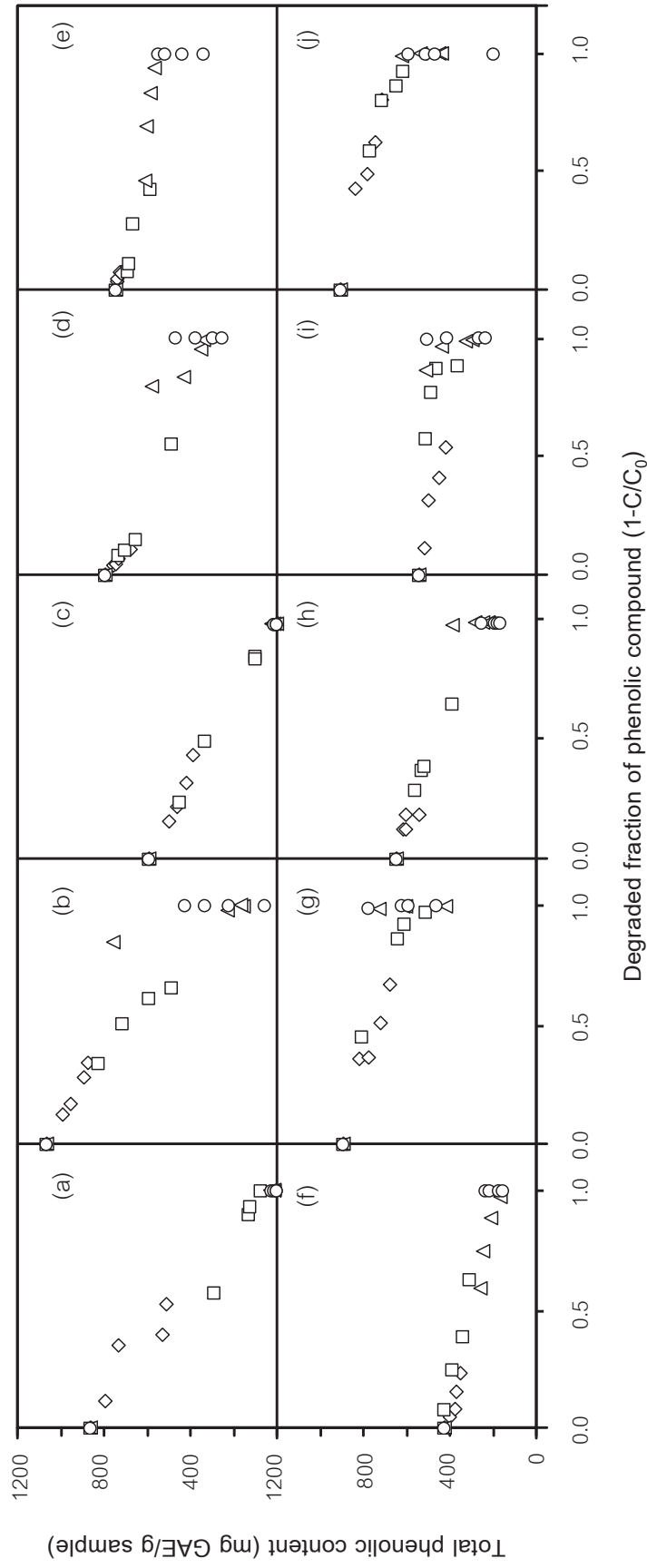
| สารประกอบฟีนอลิก              | $E_a$ (kcal/mol) |
|-------------------------------|------------------|
| <b>Hydroxybenzoic acids</b>   |                  |
| vanillic acid                 | 12.93            |
| <i>p</i> -hydroxybenzoic acid | 12.41            |
| protocatechuic acid           | 10.59            |
| gallic acid*                  | 10.43            |
| syringic acid                 | 9.00             |
| gentisic acid*                | 8.64             |
| <b>Hydroxycinnamic acids</b>  |                  |
| <i>p</i> -coumaric acid*      | 10.79            |
| caffeic acid*                 | 8.61             |
| chlorogenic acid              | 6.22             |
| <b>Flavonoids</b>             |                  |
| catechin*                     | 3.38             |

หมายเหตุ : \* หมายถึง ค่าพลังงานก่อกัมมันต์ที่คำนวณได้จากอุณหภูมิในช่วง 100-150 องศาเซลเซียสเท่านั้น

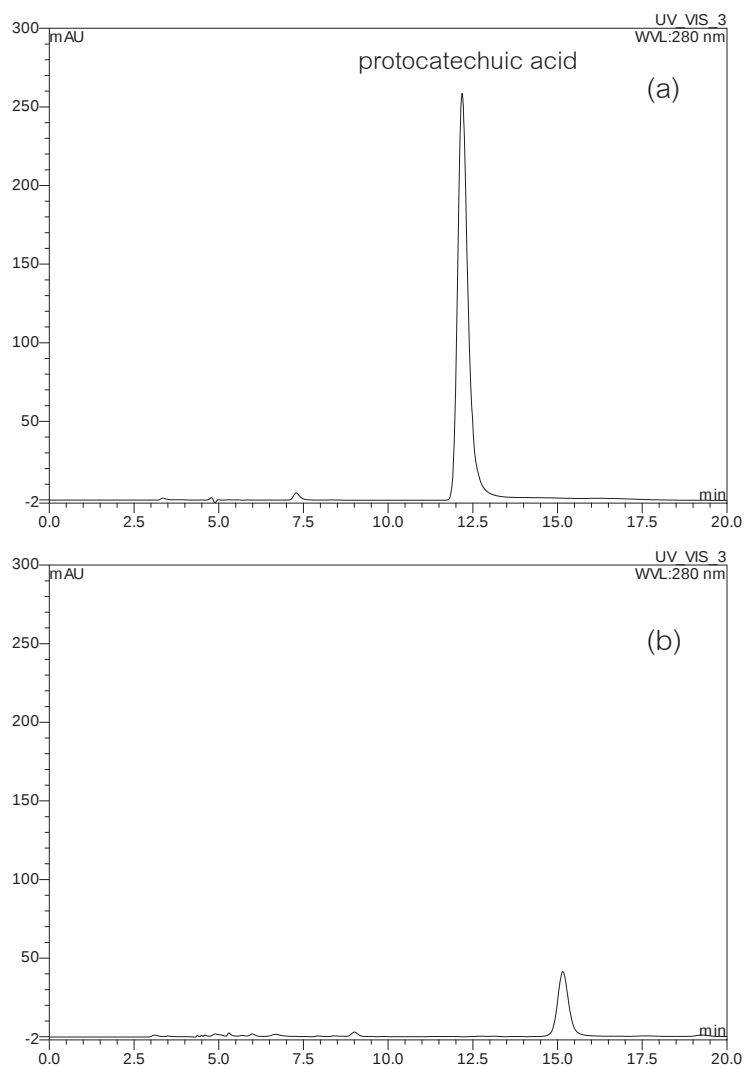
#### 4.2 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการนำสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร folin-ciocalteu กับสารประกอบฟีนอลิกทุกชนิดในสารละลายเพื่อให้เกิดสีที่สามารถติดตามด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารละลายที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อน จากภาพที่ 12 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนที่สลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยสารประกอบฟีนอลิกทุกชนิดมีแนวโน้มเดียวกัน คือ เมื่อสัดส่วนที่สลายตัวของสารประกอบเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารละลายลดลงด้วยเช่นกัน

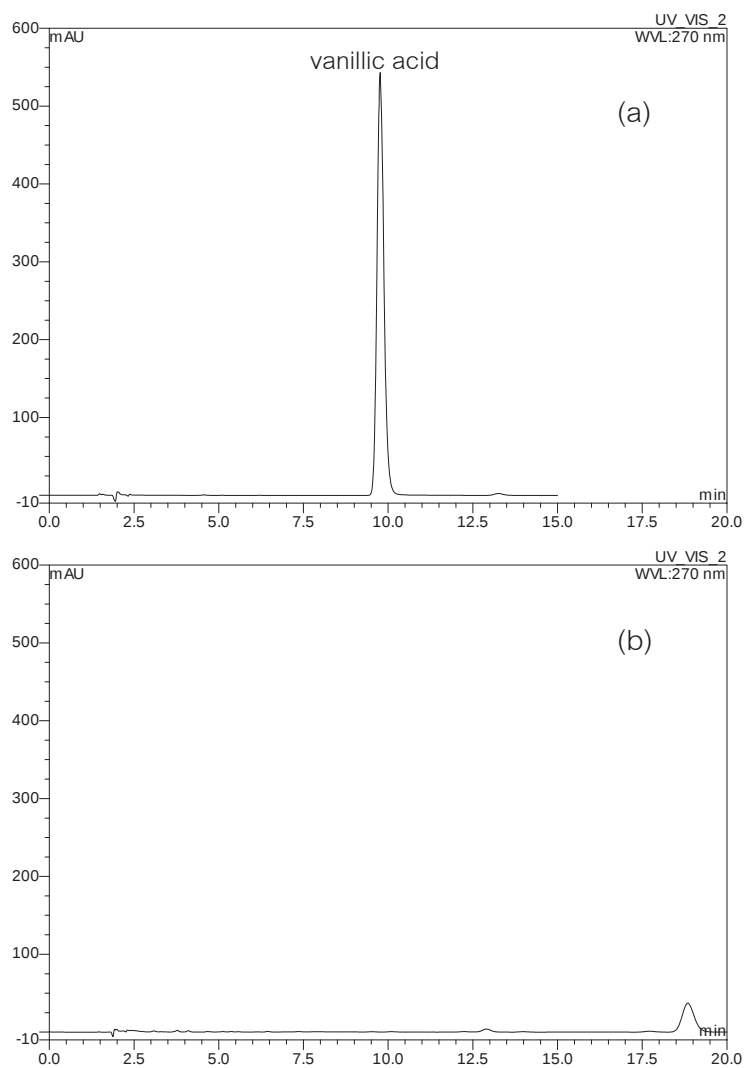
ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส สารละลายของ gallic acid และ gentisic acid ไม่พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการสลายตัว ที่ไม่พบสาร gallic acid และ gentisic acid ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ( $1-C/C_0=1$ ) แต่สารละลายของ protocatechuic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid และ catechin ยังคงพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในทุกอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อน แม้ว่าที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ไม่สามารถตรวจพบสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้ด้วย HPLC แล้วก็ตาม ( $1-C/C_0=1$ ) ซึ่งอาจเกิดจากมีสารประกอบอื่นที่เกิดจากการสลายตัวของสารประกอบเหล่านี้เกิดขึ้น ซึ่งอาจอยู่ในรูปของสารประกอบฟีนอลิกหรืออยู่ในรูปของสารอื่นที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ folin-ciocalteu ได้ ดังจะเห็นได้จากโครมาโตแกรมของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด ได้แก่ protocatechuic acid (ภาพที่ 13) vanillic acid (ภาพที่ 14) caffeic acid (ภาพที่ 15) *p*-coumaric acid (ภาพที่ 16) catechin (ภาพที่ 17) ที่พบว่ามีพีคของสารประกอบอื่นเกิดขึ้นบนโครมาโตแกรมของสารละลายสารประกอบฟีนอลิกหลังจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ซึ่งในการศึกษาของ Lindquist และ Yang (2011) พบว่าการสลายตัวของอนุพันธ์ของ benzoic acid 3 ชนิด ได้แก่ anthranilic acid, salicylic acid และ syringic acid ภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤต ที่อุณหภูมิ 200 และ 250 องศาเซลเซียส โดยเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซีเลชันขึ้น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่หมู่คาร์บอกซิลของกรดคาร์บอกซิลิกถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไฮโดรเจน โดยขจัดหมู่คาร์บอกซิลออกไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ โดยสารประกอบ anthranilic acid, salicylic acid และ syringic acid เกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซีเลชันไปเป็นสารประกอบ aniline, phenol และ syringol ตามลำดับ (โครงสร้างของสารทั้ง 3 ชนิดแสดงดังภาพที่ 6) ซึ่งกลไกการเกิดเริ่มจากโมเลกุลของน้ำมาสร้างพันธะกับไฮโดรเจนในหมู่คาร์บอกซิล ตามด้วยการเคลื่อนที่ของไฮโดรเจนในหมู่คาร์บอกซิลไปสู่ น้ำ และสุดท้ายไฮโดรเจนของโมเลกุลน้ำมาเชื่อมต่อกับวงแหวนเบนซีน ซึ่งเป็นผลให้เกิดการสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์ โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ phenol และ syringol นั้นจัดเป็นสารประกอบในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก



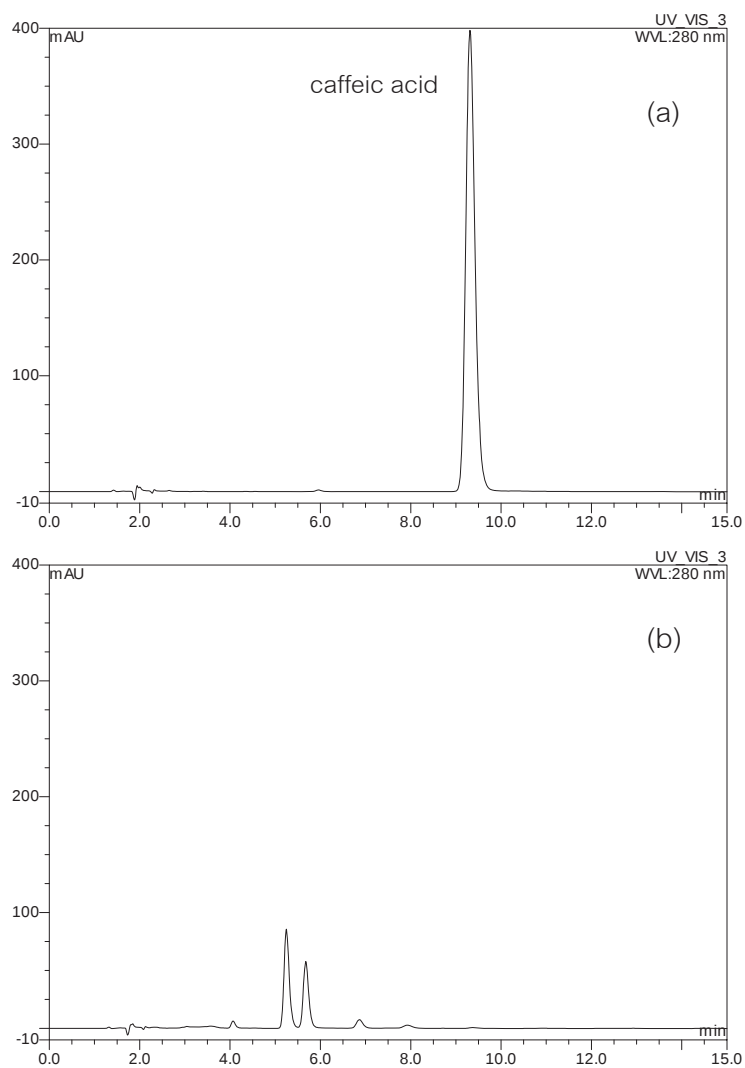
**ภาพที่ 12** ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนที่สลายตัวของสาร gallic acid (a), protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d), *p*-hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g), *p*-coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j) กับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ที่อุณหภูมิ 100°C (◇), 150°C (□), 200°C (△) และ 250°C (○)



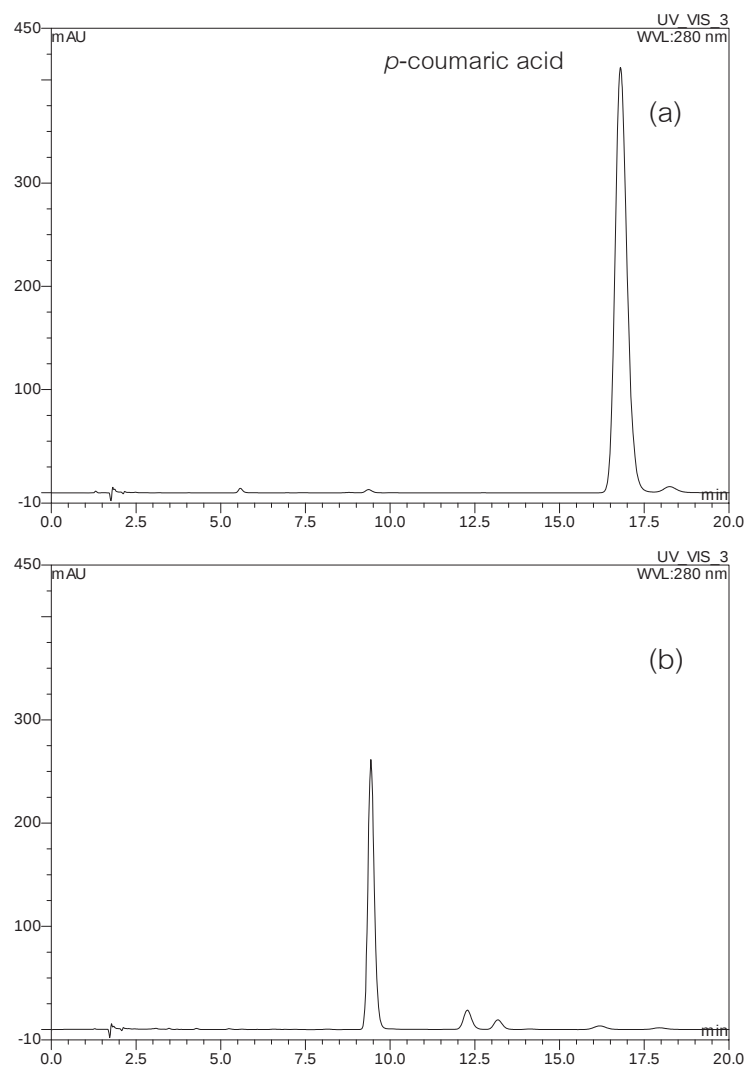
ภาพที่ 13 โครมาโตแกรมของสารละลาย protocathechuic acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b)



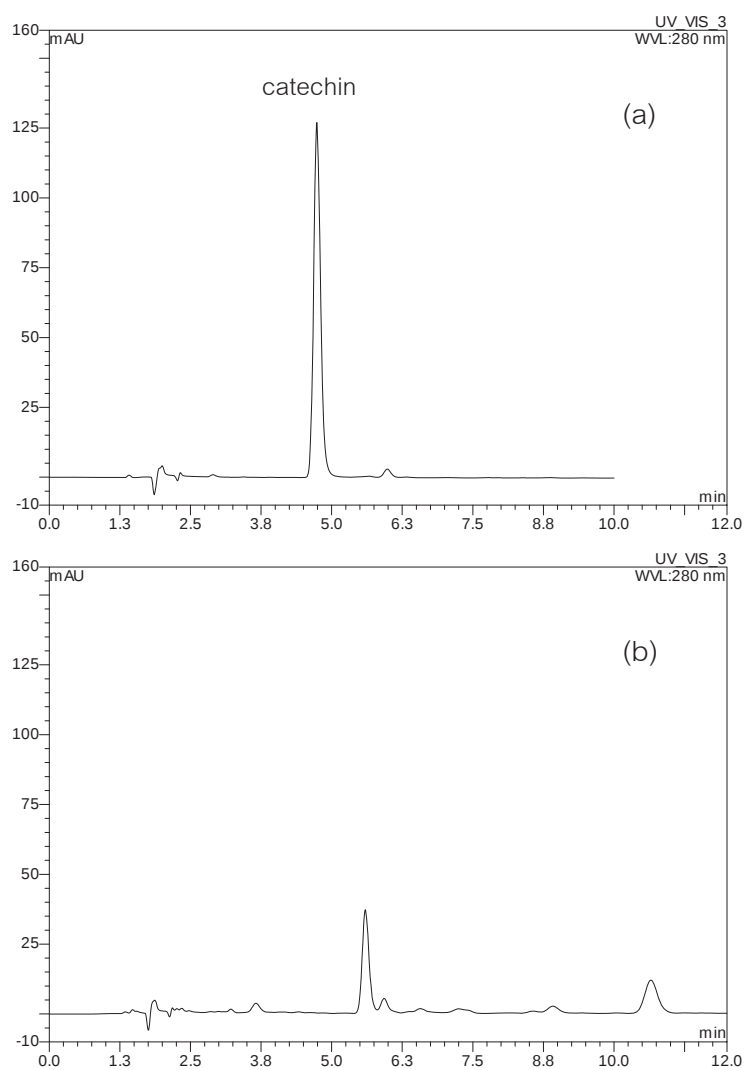
ภาพที่ 14 โครมาโตแกรมของสารละลาย vanillic acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และ ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b)



ภาพที่ 15 โครมาโตแกรมของสารละลาย caffeic acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และ ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b)



ภาพที่ 16 โครมาโตแกรมของสารละลาย *p*-coumaric acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b)



ภาพที่ 17 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย catechin ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และ ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b)

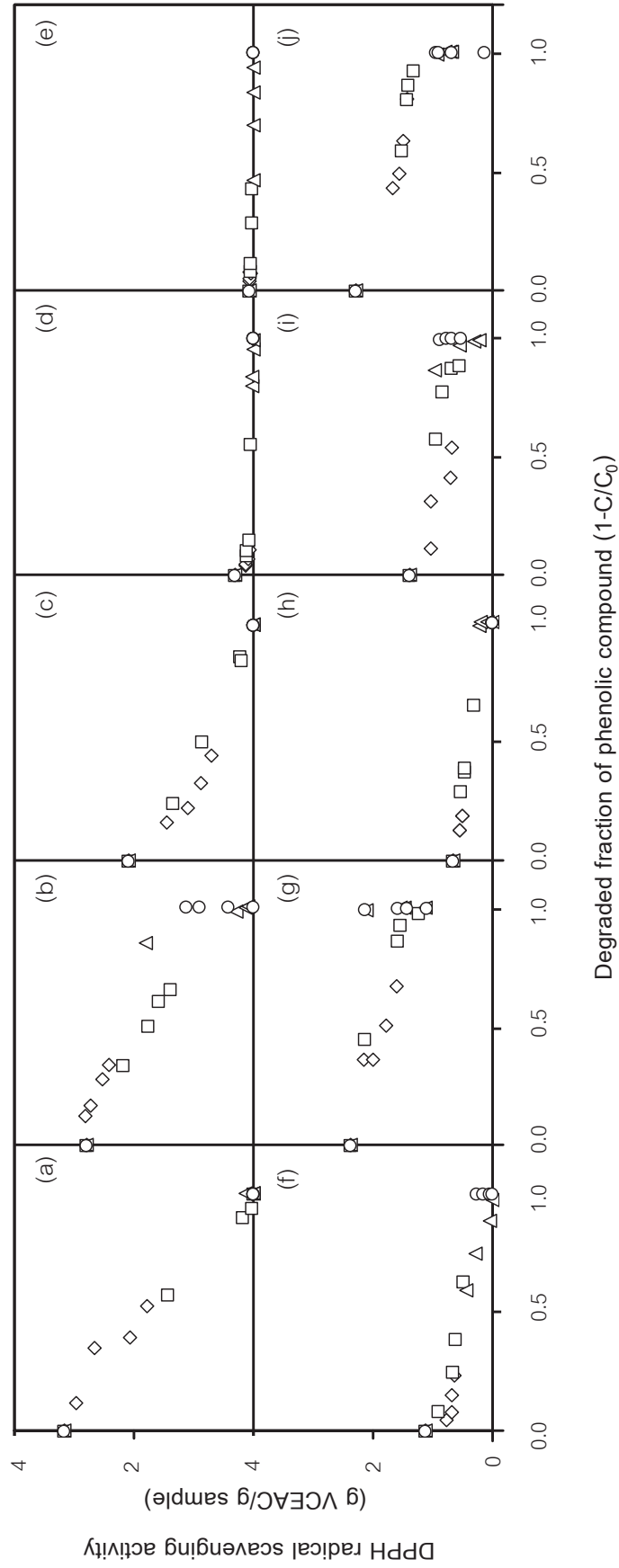
#### 4.3 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการจับอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) พบว่าสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเริ่มต้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 7) โดยที่สาร gallic acid มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ protocatechuic acid, caffeic acid, catechin, gentisic acid, chlorogenic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, vanillic acid ตามลำดับ ในขณะที่ *p*-hydroxybenzoic acid มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Brand-Williams และคณะ (1995) ที่ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารแอนตี้ออกซิแดนท์ 20 ชนิด พบว่า gallic acid, caffeic acid และ gentisic acid มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ protocatechuic acid และมีค่าสูงกว่ากรดแอสคอบิก ส่วน *p*-coumaric acid และ vanillic acid มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่ากรดแอสคอบิก โดย vanillic acid มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำมาก ทั้งนี้เป็นเพราะว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก ในกรณีของสารประกอบกรดฟีนอลิก ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลที่มีความสัมพันธ์หมู่คาร์บอกซิล ดังนั้นคือ สารประกอบ monohydroxy benzoic acids ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่ตำแหน่ง ortho- หรือ para- กับหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) จะไม่แสดงคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกรดฟีนอลิกจะเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่ม เช่นในกรณีของ gallic acid เป็น triphenol แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (Rice-Evans และคณะ, 1996) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่า *p*-hydroxybenzoic acid มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำมาก เนื่องจาก *p*-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบ monohydroxy benzoic acids ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่ตำแหน่ง para- กับหมู่คาร์บอกซิล และพบว่า gallic acid มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งความสัมพันธ์ของจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลและความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จำนวนหมู่ไฮดรอกซิลกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ยังไม่ผ่านการให้ความร้อน

| สารประกอบฟีนอลิก              | ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH (g VCEAC/g sample) | จำนวนหมู่-OH ที่แทนที่บนวงแหวนอะโรมาติก | ตำแหน่งของ -OH กับ -COOH |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| <b>Hydroxybenzoic acids</b>   |                                                       |                                         |                          |
| gallic acid                   | 3.16                                                  | 3                                       | meta+para                |
| protocatechuic acid           | 2.79                                                  | 2                                       | meta+para                |
| gentisic acid                 | 2.09                                                  | 2                                       | ortho+meta               |
| vanillic acid                 | 0.30                                                  | 1                                       | para                     |
| <i>p</i> -hydroxybenzoic acid | 0.07                                                  | 1                                       | para                     |
| syringic acid                 | 1.12                                                  | 1                                       | para                     |
| <b>Hydroxycinnamic acids</b>  |                                                       |                                         |                          |
| caffeic acid                  | 2.37                                                  | 2                                       | meta+para                |
| <i>p</i> -coumaric acid       | 0.66                                                  | 1                                       | para                     |
| chlorogenic acid              | 1.39                                                  | 2                                       | meta+para                |
| <b>Flavonoids</b>             |                                                       |                                         |                          |
| catechin                      | 2.29                                                  | 5                                       | 3,5,7,3',4'              |

หมายเหตุ : VCEAC ย่อมาจาก vitamin C equivalent antioxidant capacity



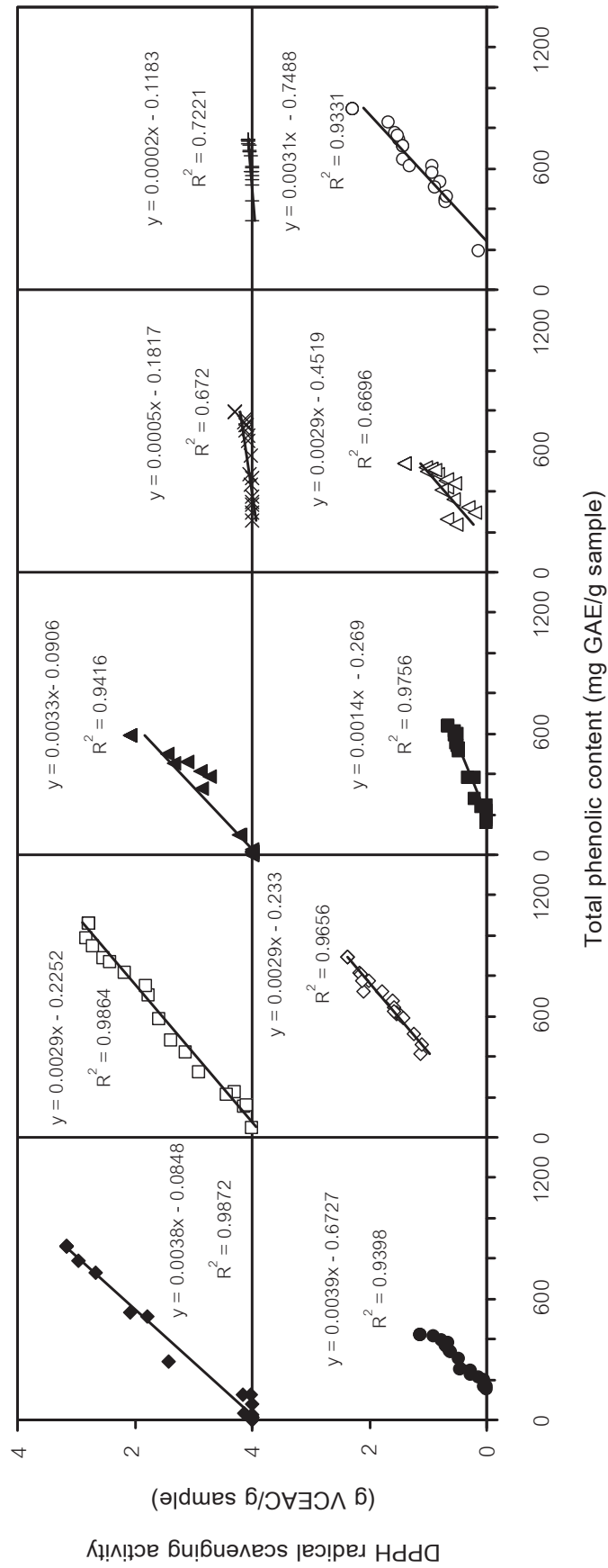
**ภาพที่ 18** ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนที่สลายตัวของสาร gallic acid (a), protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d), p-hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g), p-coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j) กับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ที่อุณหภูมิ 100°C (  $\diamond$  ), 150°C (  $\square$  ), 200°C (  $\triangle$  ) และ 250°C (  $\circ$  )

จากภาพที่ 18 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนที่สลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก ชนิดต่างๆ กับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารละลายที่ผ่านการให้ความร้อนพบว่าเมื่ออุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้น ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดลดลง ซึ่งที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส สารละลาย gallic acid, gentisic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid และ *p*-coumaric acid ไม่พบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด ที่ไม่สามารถตรวจพบสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC แต่มีสารละลายสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดที่ยังคงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในทุกอุณหภูมิที่ศึกษา แม้ไม่สามารถตรวจพบสารประกอบฟีนอลิกแล้ว ( $1-C/C_0=1$ ) ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ได้แก่ สารละลายของสาร protocatechuic acid, syringic acid, caffeic acid, chlorogenic acid และ catechin ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีสารประกอบอื่นที่เกิดจากการสลายตัวของสารประกอบเหล่านี้เกิดขึ้น และยังคงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยดังจะเห็นได้จากโครมาโตแกรมของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด ได้แก่ protocatechuic acid (ภาพที่ 13) caffeic acid (ภาพที่ 15) และ catechin (ภาพที่ 17) ที่พบว่ามีการเกิดสารประกอบอื่นเกิดขึ้นบนโครมาแกรม ซึ่งในการศึกษาของ Lindquist และ Yang (2011) ที่ศึกษาการสลายตัวของอนุพันธ์ของ benzoic acid 3 ชนิด ได้แก่ anthranilic acid, salicylic acid และ syringic acid ภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤต ที่อุณหภูมิ 200 และ 250 องศาเซลเซียส พบว่าเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ไปเป็นสารประกอบตัวอื่นได้แก่ aniline, phenol และ syringol ตามลำดับ โดย phenol และ syringol นั้นยังเป็นสารประกอบในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ซึ่ง syringol นั้นเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Loo และคณะ, 2008)

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ ได้แก่ สาร caffeic acid ซึ่งเมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สารประกอบนี้สลายตัวหมด ไม่สามารถวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้ว แต่พบว่าสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนั้นมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระสูงมาก และยังคงทนต่ออนุมูลสูง นอกจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ caffeic acid แล้ว ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ protocatechuic acid, syringic acid, chlorogenic acid และ catechin ก็ยังคงมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน ดังนั้นถ้ามีการให้ความร้อนที่

อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลาน้อยกว่า 30 นาที อาจจะทำให้ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระที่สูงกว่านี้ได้ จึงควรมีการศึกษาต่อไป

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดหลังจากผ่านการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ แสดงดังภาพที่ 19 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความสัมพันธ์กันในลักษณะที่เป็นเส้นตรง โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง เมื่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลง แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตนั้นมีการสลายตัวไปเป็นสารประกอบในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ที่มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ แต่มีสารละลายสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดที่ไม่สามารถวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ แต่สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ ได้แก่ vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid และ *p*-coumaric acid เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกสลายตัวไปเป็นสารประกอบชนิดอื่นซึ่งอาจยังเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกอยู่แต่ไม่มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ซึ่งความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกนั้นขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสาร สารประกอบแต่ละชนิดแสดงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระแตกต่างกัน และสาร folin-ciocalteu reagent นั้นไม่จำเพาะเจาะจง และสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดที่พบได้ นอกจากนี้ ความหลากหลายของสารประกอบฟีนอลิก มีการตอบสนองที่แตกต่างกันใน Folin-Ciocalteu assay (Naczki และ Shahidi, 2004)



ภาพที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร gallic acid ( ◆ ), protocatechuic acid ( □ ), gentisic acid ( ▲ ), vanillic acid ( X ), p-hydroxybenzoic acid ( + ), syringic acid ( ● ), caffeic acid ( ◇ ), p-coumaric acid ( ■ ), chlorogenic acid ( Δ ) และ catechin ( ○ )

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิก 10 ชนิด ได้แก่ gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid และ catechin ที่อุณหภูมิ 100, 150, 200 และ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที พบว่าการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก สามารถอธิบายได้ด้วยสมการจลนพลศาสตร์อันดับที่ 1 โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อน ทำให้สารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ เกิดการสลายตัวมากขึ้น และที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส สารประกอบฟีนอลิกสลายตัวอย่างสมบูรณ์ หลังจากให้ความร้อน 30 นาที ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าพลังงานก่อกัมมันต์จากสมการ Arrhenius สาร catechin น่าจะมีกลไกการสลายตัวต่างจากสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มกรดฟีนอลิกชนิดอื่น ดังนั้นการนำน้ำกึ่งวิกฤตไปใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากพืช ไม่ควรใช้อุณหภูมิในการสกัดสูงและใช้เวลานาน

เมื่ออุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารละลายลดลง ซึ่งก็สอดคล้องกับการสลายตัวที่มากขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น แต่สารละลายสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด ยังพบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ แม้ไม่พบสารชนิดนั้นแล้ว ได้แก่ สารละลายของ protocatechuic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid และ catechin และยังพบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารละลายของ protocatechuic acid, syringic acid, caffeic acid, chlorogenic acid และ catechin

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ caffeic acid, protocatechuic acid, syringic acid, chlorogenic acid และ catechin ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ ดังนั้นถ้ามีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานานๆ อาจจะทำให้เกิดสารประกอบที่มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระสูง จึงควรมีการศึกษาต่อไป

### บรรณานุกรม

- นิธิยา รัตนปนนท์. 2549. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 487 หน้า.
- ปราโมทย์ คูวิจิตรจากร. 2549. น้ำกึ่งวิกฤติ (subcritical water) และการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร. วารสารจารย์พา Food & Health 14: 51-53.
- Adil, I. H., Cetin, H. I., Yener, M. E. and Bayindirli, A. 2007. Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. Journal of Supercritical Fluids, 43: 55–63.
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B. and Vicente, F. 2001. Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. Journal of Chromatography A, 933: 37–43.
- Altunkaya, A. and Gokmen, V. 2009. Effect of various anti-browning agents on phenolic compounds profile of fresh lettuce (*L. sativa*). Food Chemistry, 117: 122–126.
- Amiot, M. J., Fleuriet, A., Cheynier, V. and Nicolas, J. 1997. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables, pp. 51-85. In Tomas-Barberan, F. A. and Robins, R. J. eds. Phytochemistry of Fruit and Vegetables. Clarendon Press, Oxford.
- Anderson, R. A., Broadhurst, C. L., Polansky, M. M., Schmidt, W. F., Khan, A., Flanagan, V. P., Schoene, N. W. and Graves, D. J. 2004. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 65-70.
- Anekpankul, T., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P. and Shotipruk, A. 2007. Extraction of anti-cancer damnacanthol from roots of *Morinda citrifolia* by subcritical water. Separation and Purification Technology, 55: 343-349.
- Anttonen, M. J. and Karjalainen, R. O. 2005. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. Journal of Food Composition and Analysis, 18: 759–769.
- Ayala, R. S. and Luque de Castro, M. D. 2001. Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. Food Chemistry, 75:

109-113.

- Baek, J., Lee, J. and Lee, S. 2008. Extraction of nutraceutical compounds from licorice roots with subcritical water. *Separation and Purification Technology*, 63: 661–664.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28: 25–30.
- Budrat, P. and Shotipruk, A. 2009 . Enhanced recovery of phenolic compounds from bitter melon (*Momordica charantia*) by subcritical water extraction. *Separation and Purification Technology*, 66: 125–129.
- Cacace, J. E. and Mazza, G. 2002. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5939-5946.
- Eikani, M. H., Golmohammad, F. and Rowshanzamir, S. 2007. Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Food Engineering*, 80: 735-740.
- Gámiz-Gracia, L. and Luque de castro, M. D. 2000. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: Comparison with conventional techniques. *Talanta*, 51: 1179-1185.
- García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Ibáñez, E. and García-moreno, C. 2006. Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, 563: 44–50.
- Gizir, A. M.,Turker, N. and Artuvan, E. 2008. Pressurized acidified water extraction of black carrot [*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.] anthocyanins. *European Food Research and Technology*, 226: 363–370.
- Herrera, M. C. and Luque de Castro, M. D. 2005. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic

- separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography, A* 1100: 1–7.
- Herrero, M., Cifuentes, A. and Ibañez, E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources : Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry*, 98: 136-148.
- Ibañez, E., Kubátová, A., Señoráns, F. J., Cavero, S., Reglero, G. and Hawthorne, S. B. 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 375-382.
- Ju, Z. Y, and Howard, L. R. 2005. Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. *Journal of Food Science*, 70: S270-276.
- Khajavi, S. H., Kimura, Y., Oomori, T., Matsuno, R. and Adachi, S. 2004. Decomposition kinetics of maltose in subcritical water. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68: 91-95.
- Khajavi, S. H., Ota, S., Kimura, Y. and Adachi, S. 2006. Kinetics of maltooligosaccharide hydrolysis in subcritical water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3663-3667.
- Khuwijtjaru, P. 2004. Solubility of fatty acids and hydrolysis of their esters in subcritical water. Dissertation. Kyoto: Kyoto University. 44 p.
- Khuwijtjaru, P., Chalooddong, K. and Adachi, S. 2008. Phenolic content and radical scavenging capacity of kaffir lime fruit peel extract obtained by pressurized hot water extraction. *Food Science and Technology Research*, 14: 1-4.
- Kim, J. W. and Mazza, G. 2006. Optimization of extraction of phenolic compounds from flax shives by pressurized low-polarity water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7575-7584.
- Kim, W. J., Kim, J., Veriansyah, B., Kim, J. D., Lee, Y. W., Oh, S. G. and Tjandrawinata, R. R. 2009. Extractions of bioactive components from *Centella asiatica* using subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 48: 211–216.

- King, A. and Young, G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99: 213-218.
- King, J. W. and Grabiell, R. D. 2007. Isolation of polyphenolic compounds from fruits or vegetables utilizing sub-critical water extraction. U.S. Patent No. 7208181B1.
- Kubátová, A. Miller, D. J. and Hawthorne, S. B. 2001. Comparison of subcritical water and organic solvents for extracting kava lactones from kava root. *Journal of Chromatography A*, 923: 187-194.
- Kubola, J. and Siriamornpun, S. 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in *vitro*. *Food Chemistry*, 110: 881–890.
- Liazi, A., Palma, M., Brighi, J., and Barroso, C. G. 2007. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1140: 29–34.
- Li-Hsun, C., Ya-Chuan, C. and Chieh-Ming, C. 2004. Extracting and purifying isoflavones from defatted soybean flakes using superheated water at elevated pressures. *Food Chemistry*, 84: 279–285.
- Lindquist, E. and Yang, Y. 2011. Degradation of benzoic acid and its derivatives in subcritical water. *Journal of Chromatography A*, 1218: 2146–2152.
- Loo, A. Y., Jain, K. and Darah, I. 2008. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food Chemistry*, 107: 1151–1160.
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M. and Pongsawatmanit, R. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100: 1409-1418.
- Miller, D. J. and Hawthorne, S. B. 1998. Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water. *Analytical Chemistry*, 70: 1618-1621.
- Naczki, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95–111.

- Ozel, M. Z. and Kaymaz, H. 2004. Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 379: 1127-1133.
- Palma, M., Piñeiro, Z. and Barroso, C. G. 2001. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents Journal of Chromatography A, 921: 169–174.
- Palma, M., and Taylor, L. T. 1999. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. Journal of Chromatography A, 849: 117–124.
- Paul Singh, R. and Heldman, D. R. 2001. Introduction to Food Engineering. 3rd ed. Academic Press. California.
- Piñeiro, Z., Palma, M. and Barroso, C. G. 2004. Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. Journal of Chromatography A, 1026: 19-23.
- Pourali, O., Asghari, F. S. and Yoshida, H. 2010. Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. Chemical Engineering Journal, 160: 259–266.
- Rangsriwong, P., Rangkadilok, N., Satayavivad, J., Goto, M. and Shotipruk, A. 2009. Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. fruits. Separation and Purification Technology, 66: 51–56.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science, 2: 152-159.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical biology and medicine, 20: 933-956.
- Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F. R., Herrero, M., Señorans, F. J., Reglero, G., Cifuentes, A. and Ibáñez, E. 2006. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41: 1560–1565.

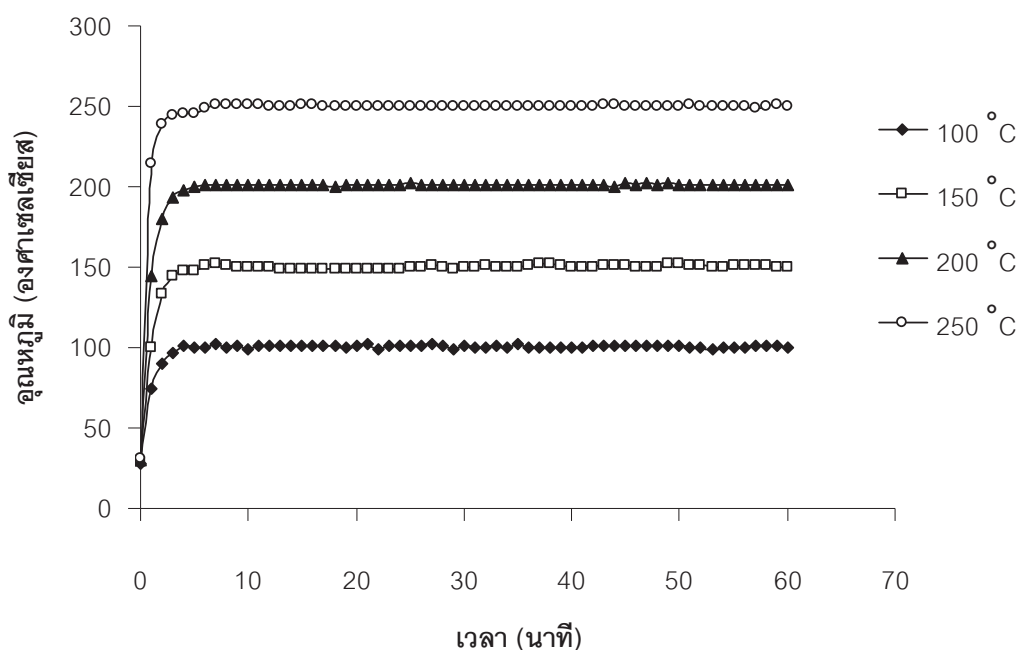
- Rogalinski, T., Tobias Albrecht, K. L. and Brunner, G. 2008. Hydrolysis kinetics of biopolymers in subcritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 46: 335-341.
- Shahidi, F. and Naczk, M. 2004. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press LLC. New York.
- Shan, B., Cal, Y. Z., Sun, M. and Corke, H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7749-7759.
- Smith, R. M. 2002. Extractions with superheated water. *Journal of Chromatography A*, 975: 31-46.
- Subba Roa, M. V. S. S. T. and Muralikrishna, G. 2002. Evaluation of the antioxidant properties of free and bound phenolic acids from native and malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana* Indaf-15). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 889-892.
- Taoukis, P. S., Labuza, T. P. and Saguy, I. S. 1997. Kinetics of food deterioration and shelf-life prediction , pp. 361-403. In Valentas, K. J., Rotstein, E. And Singh, R. P. eds. *Handbook of Food Engineering Practice*. CRC Press, Boca Raton.
- Teo, C. C., Tan, S. N., Hong Yong, J. W., Hew, C. S. and Ong, E. S. 2010. Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217: 2484-2494.
- Terpinc, P., Bezjak, M. and Abramovic, H. 2009. A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, 115: 740–744.
- Vermerris, W. and Nicholson, R. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer. Netherlands.
- Yang, Y., Kayan, B., Bozer, N., Pate, B., Baker, C. and Gizir, A. M. 2007. Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water. *Journal of Chromatography A*, 1152: 262–267.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

**ภาคผนวก ก**  
**การให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤต**

การให้ความร้อนกับสารละลายสารประกอบฟีนอลิกด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิ 100, 150, 200 และ 250 องศาเซลเซียส สามารถแสดงการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิภายใน batch-type reactor เมื่อตั้งค่าที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้ดังภาพที่ 20



**ภาพที่ 20** การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิภายใน batch-type reactor เมื่อตั้งค่าที่อุณหภูมิต่าง ๆ

**ตารางที่ 8** ความดันที่แต่ละอุณหภูมิ

| อุณหภูมิ (°C) | ความดัน (kPa) |
|---------------|---------------|
| 100           | 101.35        |
| 150           | 475.8         |
| 200           | 1553.8        |
| 250           | 3973          |

ที่มา: Paul Singh และ Heldman (2001)

ภาคผนวก ข

## ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เหลือหลังจากการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Subba Roa และ Muralikrishna, 2002)

### 1.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1.1 คอลัมน์ที่ใช้ คือ Inertsil ODS-3 C18 (GL Sciences, Japan) ขนาด 4.6×250 มิลลิเมตร สำหรับ gallic acid และ protocatechuic acid และ Luna 5u C18 (Phenomenex, USA) ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร สำหรับ gentisic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid และ catechin

1.1.2 mobile phase คือ น้ำ/กรดอะซิติก/เมทานอล อัตราส่วน 80/5/15 (v/v) กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และกำจัดฟองก๊าซออกด้วยอ่างดูดก๊าซไนโตรเจน เป็นเวลา 30 นาที

1.1.3 อัตราการไหลของ mobile phase คือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

1.1.4 วิเคราะห์ปริมาณ *p*-hydroxybenzoic acid ที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร ปริมาณ vanillic acid ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร ปริมาณ protocatechuic acid, gallic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, syringic acid, catechin ที่ความยาวคลื่น คือ 280 นาโนเมตร และปริมาณ gentisic acid และ chlorogenic acid ที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร

### 1.2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1.2.1 เตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน คือ protocatechuic acid, gallic acid, gentisic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid และ catechin ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

1.2.2 กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC

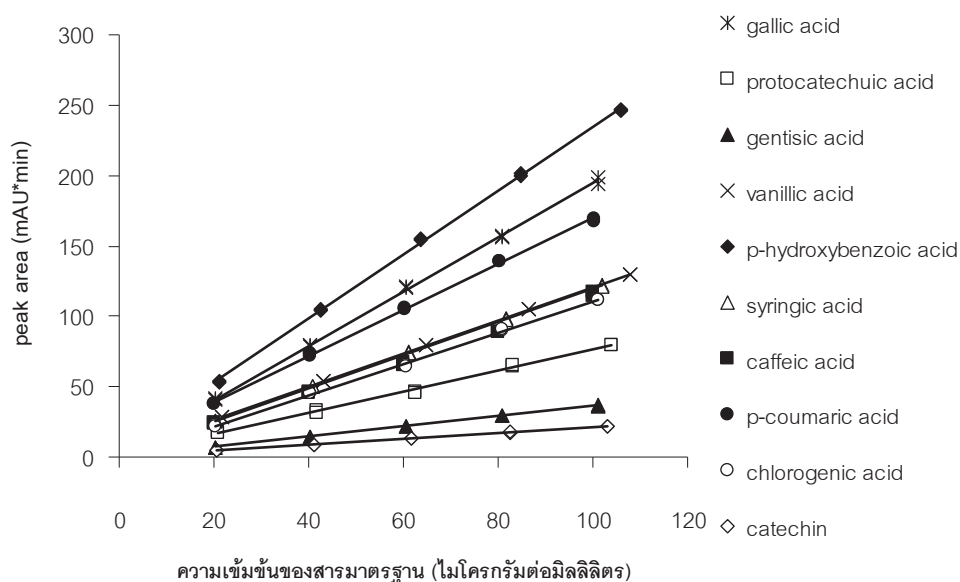
1.2.3 นำค่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดหาความสัมพันธ์ในรูปของสมการเส้นตรง

สมการเส้นตรงของสารมาตรฐานที่ได้เป็นดังนี้

|                               |                                      |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| gallic acid                   | $y = 1.9242x + 2.1786, R^2 = 0.9991$ |
| protocatechuic acid           | $y = 0.7615x + 0.4666, R^2 = 0.9985$ |
| gentisic acid                 | $y = 0.3644x - 0.2415, R^2 = 0.9999$ |
| vanillic acid                 | $y = 1.1764x + 3.04, R^2 = 0.9999$   |
| <i>p</i> -hydroxybenzoic acid | $y = 2.2709x + 7.627, R^2 = 0.9993$  |
| syringic acid                 | $y = 1.181x + 1.7213, R^2 = 0.9997$  |
| caffeic acid                  | $y = 1.1325x + 0.2723, R^2 = 0.9963$ |
| <i>p</i> -coumaric acid       | $y = 1.63x + 6.5099, R^2 = 0.9989$   |
| chlorogenic acid              | $y = 1.1103x - 0.5288, R^2 = 0.9988$ |
| catechin                      | $y = 0.2106x + 0.0786, R^2 = 0.9991$ |

เมื่อ  $y$  = พื้นที่ใต้กราฟ (mAU\*min)

$x$  = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)

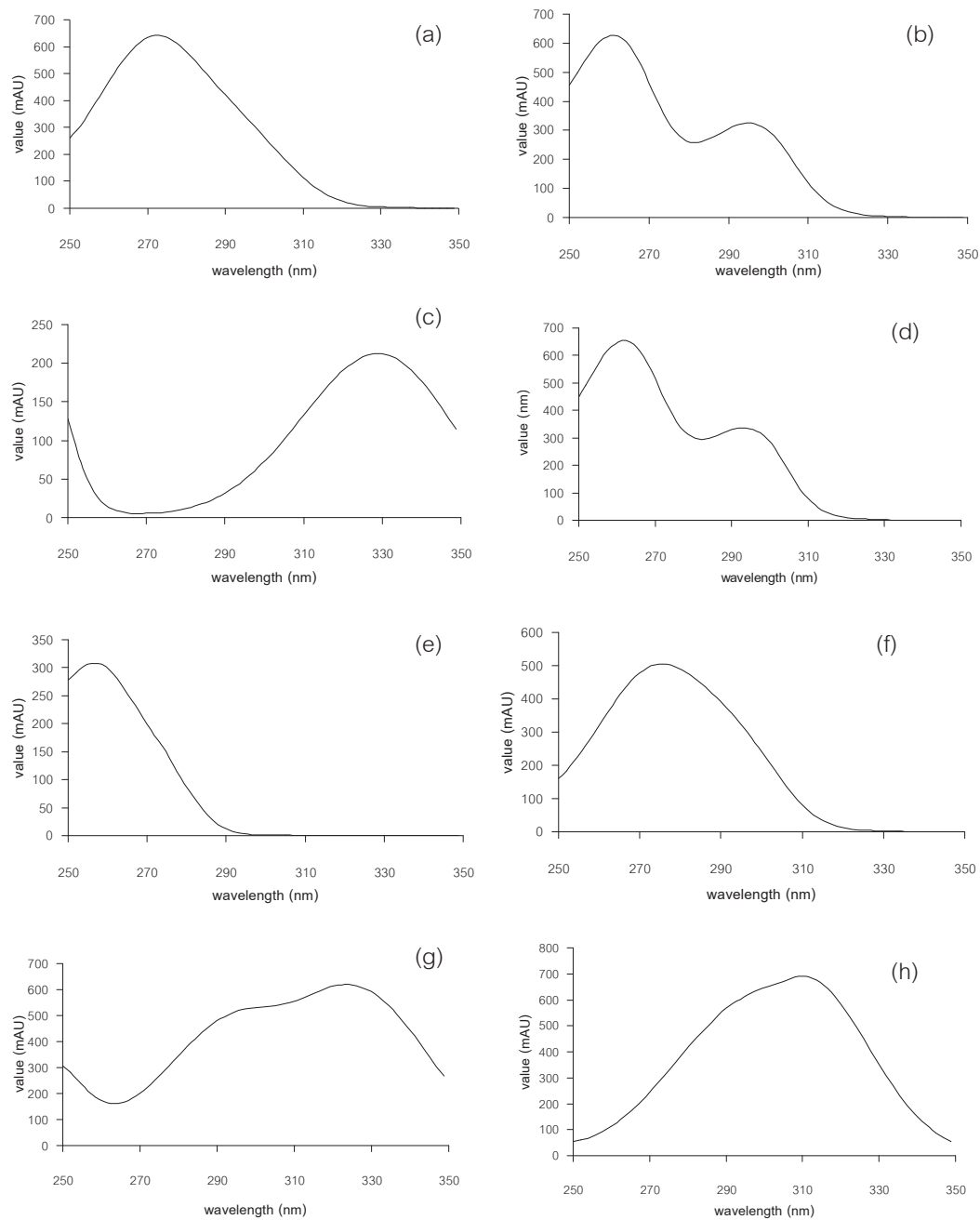


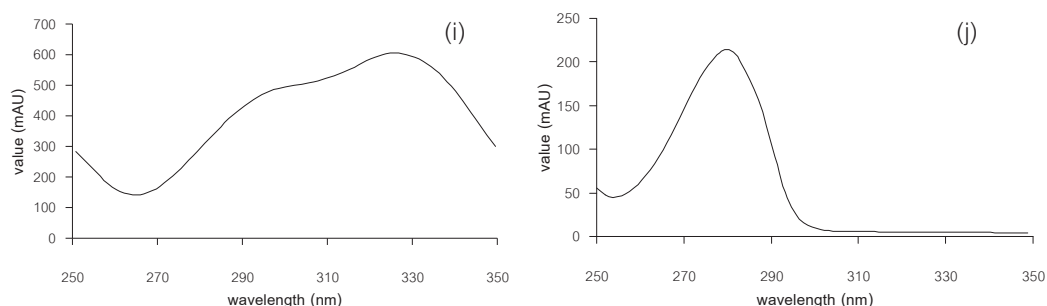
ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

### 1.3 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

กรองตัวอย่างผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับค่า retention time และเส้นสเปกตรัม (ภาพที่ 22)

กับสารมาตรฐาน และคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานแต่ละชนิด





ภาพที่ 22 สเปกตรัมของสารมาตรฐาน gallic acid (a), protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d), *p*-hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g), *p*-coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j)

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method (Maisuthisakul และคณะ, 2007)

### 2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10

2.1.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 7.5

### 2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

2.2.1 ชั่งสารกรดแกลลิกมาตรฐาน 0.0100 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตรจนได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดแกลลิกมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.2 นำสารละลายกรดแกลลิกมาตรฐาน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 80, 60, 40, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2.2.4 เติมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 3 นาที

2.2.5 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม

2.2.6 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

2.2.7 blank คือน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร สารละลาย Folin-ciocalteu ความเข้มข้น

ร้อยละ 10 ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร

2.2.8 นำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ไปเขียนกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก หาความสัมพันธ์ในรูปของสมการเส้นตรง

## 2.3 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

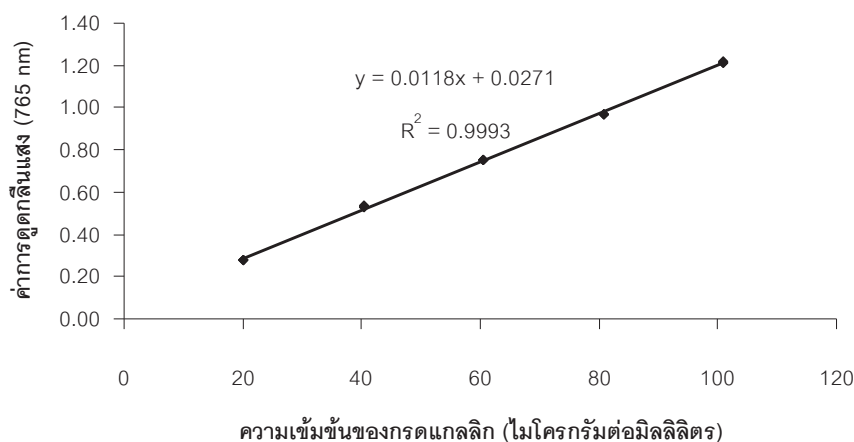
2.3.2 เติมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 3 นาที

2.3.3 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม

2.3.4 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

2.3.5 blank คือน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร สารละลาย Folin-ciocalteu ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร และสารละลาย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร

2.3.6 คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก โดยรายงานผลในหน่วยของมิลลิกรัมเมื่อเทียบกับกรดแกลลิก (mg gallic acid equivalent; mg GAE) ต่อน้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม



ภาพที่ 23 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

### 3. วิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Brand-Williams และคณะ, 1995)

#### 3.1 สารเคมี

##### 3.1.1 เมทานอล

3.1.2 สารละลาย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) ความเข้มข้น 0.1 mM

#### 3.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิก

3.2.1 ชั่งสารกรดแอสคอบิก 0.0250 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนได้ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดแอสคอบิกมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.2 นำสารละลายกรดแอสคอบิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.3 ปิเปตสารละลายสารมาตรฐานที่เตรียมไว้ 50 ไมโครลิตร ใส่ในขวดสีชา

3.2.4 เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

3.2.5 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 120 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ methanol เป็น Blank

3.2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณค่า % Radical scavenging activity จากสมการ

$$\% \text{ Radical scavenging activity} = [( \text{control OD} - \text{sample OD} ) / \text{control OD}] \times 100$$

โดยที่ Control OD = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

Sample OD = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ผสมกับตัวอย่าง

3.2.7 นำค่า % Radical scavenging activity และความเข้มข้นของกรดแอสคอบิก ไปเขียนกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอบิก หาความสัมพันธ์ในรูปของสมการเส้นตรง

#### 3.3 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

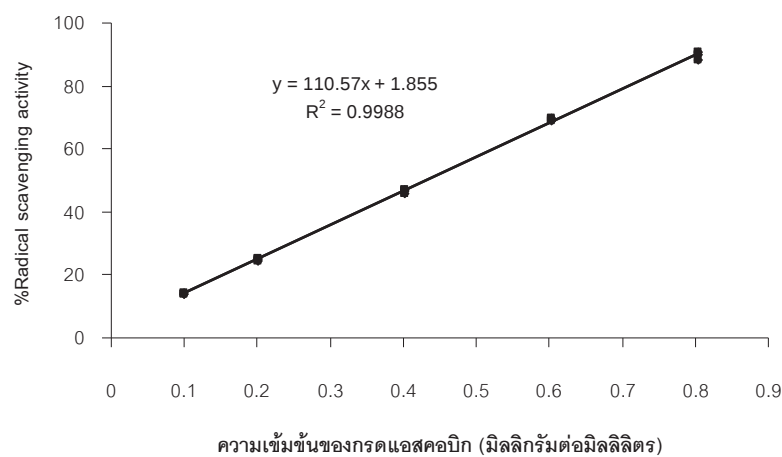
3.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ในขวดสีชา

3.3.2 เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

3.3.3 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 120 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ methanol เป็น Blank

3.3.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณค่า % Radical scavenging activity

3.3.5 หาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารละลายจากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิก (vitamin C) ได้เป็น vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) กรัมของ vitamin C equivalents ต่อกรัมตัวอย่าง



ภาพที่ 24 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิกสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

## ประวัติผู้วิจัย

**ชื่อ-สกุล** (ภาษาไทย) นางสาวจิราพร เพลินจิตต์  
(ภาษาอังกฤษ) MISS JIRAPORN PLERNJIT

**ที่อยู่** 60/2 หมู่ 8 ตำบลดอนยายหอม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

### ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2550 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และ  
เทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

พ.ศ. 2551 ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบริหารธุรกิจ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

### การเสนอผลงาน

พฤษภาคม 2554 เสนอผลงานวิจัยภาคบรรยายเรื่อง “ความคงตัวของกรดฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต”  
ในการประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาศิลปากรระดับชาติ/นานาชาติ ครั้งที่ 1  
“การศึกษาเชิงสร้างสรรค์” มหาวิทยาลัยศิลปากร