



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ความคงตัวสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต

โดย นายปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ และคณะ

พฤษภาคม พ.ศ. 2556

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ความคงตัวสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต

คณะผู้วิจัย

- ผศ.ดร.ปราโมทย์ คูวิจิตรจากรู
- รศ.ดร. รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต

สังกัด

- มหาวิทยาลัยศิลปากร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
บทคัดย่อภาษาไทย	ช
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ช
บทสรุปผู้บริหาร	ณ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและที่มาของงานวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
สมมติฐานของการวิจัย.....	1
ขอบเขตของการวิจัย	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
สารประกอบพีนอลิก	3
น้ำกึ่งวิกฤต	11
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	19
สารเคมี	19
อุปกรณ์.....	19
วิธีการทดลอง.....	20
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	22
5 สรุปผลการทดลอง	44
บรรณานุกรม	45
ภาคผนวก.....	51
ภาคผนวก ก	52
ภาคผนวก ข	53
ต้นฉบับบทความวิจัย	60

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	จำนวนหมู่ไฮดรอกซิลกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระDPPH ของ สารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ยังไม่ผ่านการให้ความร้อน.....	39

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของฟีนอล.....	3
2	โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์.....	10
3	โครงสร้างของฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่ม.....	10
4	แผนภูมิวิภาคของน้ำ.....	12
5	การเปลี่ยนแปลงของค่าไดอิเล็กทริกสัมพัทธ์และค่าคงที่การแตกตัวของน้ำตาม อุณหภูมิที่ความดัน 15 MPa.....	13
6	ปฏิกิริยาการสลายตัวของ benzoic acid และ อนุพันธ์ของ benzoic acid : (a) benzoic acid (b) anthranilic acid (c) salicylic acid และ (d) syringic acid.....	18
7	กลไกการเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซีเลชันของ anthranilic acid.....	18
8	อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	20
9	การลดลงของสาร gallic acid (a), protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d), <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g), <i>p</i> -coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j) ที่ผ่านการให้ ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิ 100°C (◊), 150°C (◻), 200°C (◻), 250°C (◯) ที่เวลาต่างๆ โดย C คือความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละ ชนิดที่คงเหลือที่เวลาใดๆ และ C ₀ คือ ความเข้มข้นที่เวลาเริ่มต้น.....	23
10	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln C/C_0$ กับเวลาของสาร gallic acid (a), protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d), <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g), <i>p</i> -coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j) ที่อุณหภูมิ 100°C (◊), 150°C (◻) และ 200°C (◻).....	25
11	Arrhenius plot สำหรับการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มไฮดรอกซีเบนโซอิก แอซิด (A) : gallic acid (◊), protocatechuic acid (◻), gentisic acid (◻), vanillic acid (×), <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (+), syringic acid (◯) กลุ่มไฮดรอกซีซินนามิกแอซิด (B) : caffeic acid (◆), <i>p</i> -coumaric acid (■), chlorogenic acid (▲) และกลุ่มฟลาโวนอยด์ (C) : catechin (●).....	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 (◇), 150°C (□), 200°C (Δ), 250°C (○).....32
- 13 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย protocatechuic acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และสารละลาย protocatechuic acid ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b).....33
- 14 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย vanillic acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และสารละลาย vanillic acid ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250°C 30 นาที (b)..... 34
- 15 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย caffeic acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และสารละลาย caffeic acid ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b).....35
- 16 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย *p*-coumaric acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และสารละลาย *p*-coumaric acid ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250°C 30 นาที (b).....36
- 17 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย catechin ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และสารละลาย catechin ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b).....37
- 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 (◇), 150°C (□), 200°C (Δ), 250°C (○).....40
- 19 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร gallic acid (◆) protocatechuic acid (□), gentisic acid (▲), vanillic acid (×), *p*-hydroxybenzoic acid (+),

	syringic acid (●), caffeic acid (◇), <i>p</i> -coumaric acid (■), chlorogenic acid (Δ) และ catechin (○).....	43
20	การเพิ่มขึ้นของอนุมูลภายใน batch-type reactor เมื่อตั้งค่าที่อนุมูลต่าง ๆ....	52
21	กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิด.....	54
22	สเปกตรัมของสารมาตรฐาน (a) gallic acid, (b) protocatechuic acid, (c) gentisic acid, (d) vanillic acid, (e) <i>p</i> -hydroxybenzoic acid, (f) syringic acid, (g) caffeic acid, (h) <i>p</i> -coumaric acid, (i) chlorogenic acid, (j) catechin	55
23	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	57
24	กราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิกสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH.....	59

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยโดยทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของ อาจารย์รุ่นใหม่ ปี 2553 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โดยร่วมทุนกับ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยี อุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร (เลขที่โครงการ MRG5380123)

ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ซึ่งรับเป็นนักวิจัยพี่เลี้ยง (mentor) และให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาการวิจัย ขอขอบคุณ Professor Shuji Adachi มหาวิทยาลัยเกียวโต ซึ่งให้ความช่วยเหลือในวัสดุการวิจัย บางชิ้น และให้คำแนะนำในระหว่างการทำวิจัย และขอขอบคุณนางสาวจิราพร เพลินจิตต์ ผู้ช่วย ทำปฏิบัติการ

บทคัดย่อ

การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (subcritical water extraction) คือการใช้ที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดภายใต้ความดันสูงเพียงพอที่ทำให้น้ำอยู่ในสถานะของเหลวเป็นตัวสกัด ได้รับความสนใจในการใช้สกัดสารประกอบฟีนอลิกจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ แต่ข้อมูลความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกเหล่านั้นในน้ำกึ่งวิกฤตยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างเพียงพอ งานวิจัยนี้จึงศึกษาความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิก 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) โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เหลือนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวความดันสูง (HPLC) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดย folin-ciocalteu assay และวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อน ทำให้สารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ เกิดการสลายตัวมากขึ้น โดยการสลายตัวสามารถอธิบายได้ด้วยจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (first-order kinetics) สารประกอบฟีนอลิกทุกชนิดที่ศึกษาสลายตัวอย่างสมบูรณ์หลังจากให้ความร้อน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าพลังงานก่อกัมมันต์จากสมการ Arrhenius พบว่า catechin อาจมีกลไกการสลายตัวแตกต่างจากสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น และพบว่า การสลายตัวทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลง โดยความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความสัมพันธ์กันในลักษณะที่เป็นเส้นตรง เป็นที่น่าสนใจว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวที่อุณหภูมิสูงของ protocatechuic acid, syringic acid, caffeic acid, chlorogenic acid และ catechin แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน

คำสำคัญ น้ำกึ่งวิกฤต, ไฮโดรไลซิส, สารประกอบฟีนอลิก, ดีคาร์บอกซิเลชัน, การต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

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.

Keywords: Superheated water; Hydrolysis; Phenolic compounds; Decarboxylation; Radical scavenging

บทสรุปผู้บริหาร

การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (subcritical water extraction) ซึ่งเป็นการสกัดโดยใช้ น้ำที่อุณหภูมิสูง (100-374 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันเพื่อคงสถานะของเหลวของน้ำ) เป็นเทคนิคการสกัดที่ได้รับ ความสนใจในปัจจุบันเนื่องจากเป็นเทคนิคที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีประสิทธิภาพในการสกัดสาร ต่างๆ ได้ดีโดยเฉพาะในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากพืชชนิดต่างๆ แต่เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิก อาจจะสลายตัวได้ง่ายในสภาวะที่รุนแรงของการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับอัตราการ สลายตัวจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมของการสกัด

โครงการนี้ศึกษาอัตราการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกจำนวน 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 ในน้ำกึ่งวิกฤตที่ อุณหภูมิ 100, 150, 200 และ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที ใน batch-type reactor โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารประกอบเป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผล การศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียสสารประกอบทุกชนิดสลายตัวหมดภายใน 30 นาที และที่ 200 องศาเซลเซียส นั้นมีเพียง protocatechuic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid และ chlorogenic acid ที่ยังหลงเหลืออยู่หลังให้ความร้อนเป็นเวลา 60 นาที สำหรับในช่วงอุณหภูมิ 100 - 200 องศาเซลเซียสนั้นอัตราการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก สามารถอธิบายได้ด้วยสมการจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง โดยเวลาครึ่งชีวิตอยู่ในช่วง 57-1,082, 21 - 151 และ 9 -31 นาที สำหรับอุณหภูมิ 100 และ 150 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดย *p*-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบที่ทนสภาวะที่ใช้ในการทดลองได้มากที่สุด แต่อย่างไร ก็ตามผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด ได้แก่ protocatechuic acid, syringic acid, caffeic acid, chlorogenic acid และ catechin สลายตัวได้เป็นสารประกอบที่ ยังคงมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก และยังคงแสดงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระได้ จึงควรจะมีการศึกษาถึงชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์เหล่านั้น

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและที่มาของงานวิจัย

การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (subcritical water, superheated water หรือ pressurized hot water extraction) หมายถึงการสกัดโดยใช้น้ำที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดแต่ไม่เกินอุณหภูมิวิกฤตคือ 374 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันสูงเพียงพอที่ให้น้ำอยู่ในสถานะของเหลว (Smith, 2002) นั้นได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างแพร่หลายในหลายสาขารวมถึงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการเป็นตัวทำละลายสกัดสารหลากหลายกลุ่มจากวัตถุดิบหลากหลายประเภท และเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสูง ใช้เวลาในการสกัดสั้นและไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษ (Herrero และคณะ, 2006) โดยเฉพาะการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ เช่น มะระขี้นก สมอไทย ไบออร์จิน และเมล็ดองุ่น เป็นต้น ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกนั้นเป็นสารประกอบหนึ่งในกลุ่มของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่พบมากที่สุด สังเคราะห์ได้จากกระบวนการต่างๆ ของพืชในระหว่างการเจริญเติบโต มีการศึกษาพบว่ามีประโยชน์หลากหลาย เช่น เป็นสารป้องกันการเกิดออกซิเดชัน เป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ เป็นต้น (Balasundram และคณะ, 2006 และ Naczka และ Shahidi, 2004) แต่ข้อมูลที่สำคัญประการหนึ่งคือความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกเหล่านั้นในน้ำกึ่งวิกฤตยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างเพียงพอ โดยงานวิจัยบางส่วนมีการรายงานว่า การเพิ่มอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้มีค่าลดลงซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเหล่านี้มีความคงตัวในน้ำกึ่งวิกฤตไม่มากนัก ดังนั้นการศึกษาถึงความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มต่างๆ เป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อให้สามารถกำหนดสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารเหล่านี้ต่อไปได้ และจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาระบบการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตนี้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารละลายสารประกอบฟีนอลิก

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนมีผลต่อการสลายตัวและความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต

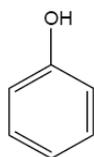
1.4 ขอบเขตของการวิจัย

- ศึกษาในระบบ batch reactor สำหรับการศึกษการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก 10 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid และ catechin ซึ่งระบบ batch นั้นความดันจะขึ้นกับความดันไอสมดุลของน้ำที่อุณหภูมินั้นๆ

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกคือ กลุ่มของสารประกอบที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 1 หมู่หรือมากกว่า ต่อกับวงแหวนอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน มีความหลากหลายเชิงโครงสร้างมาก ซึ่งฟีนอลเป็น โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิก แสดงดังภาพที่ 1 แม้ว่าฟีนอลจะมีความคล้ายกับ แอลกอฮอล์มากซึ่งมีโครงสร้างเป็นอะลิฟาติก มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่กับสายของคาร์บอน แต่ฟีนอล มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่กับวงแหวนอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ออกซิเจนจับอยู่กับวงแหวน อะโรมาติกอย่างแน่นอนและออกซิเจนเกาะอยู่กับไฮโดรเจนด้วยพันธะอย่างหลวมๆ ไฮโดรเจนที่ หมู่ไฮดรอกซิลจึงสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ง่าย ทำให้ฟีนอลมีความเป็นกรดอ่อน (Vermerris และ Nicholson, 2006)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของฟีนอล

ที่มา: Vermerris และ Nicholson (2006)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่ได้จากกระบวนการต่างๆ ของพืชในระหว่างการเจริญเติบโต และในสภาวะที่มีความเครียด พบอยู่ในทุกๆ ส่วนของพืช มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโต การแพร่พันธุ์ การป้องกันและต่อต้านเชื้อโรค ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตและเป็นสารให้สีในพืช ส่วนในอาหารสารประกอบฟีนอลิกจะให้ ลักษณะทางประสาทสัมผัสเฉพาะตัว เช่น อาจจะทำให้รสขม รสฝาด เป็นสารให้สี กลิ่นรส และเป็นสารป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์ สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบหนึ่งในกลุ่มของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่พบมากที่สุดและมีคุณสมบัติต่างๆ มากมาย เช่น แก้แพ้, แก้อักเสบ, ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์, รักษาระบบหัวใจ, ต่อต้านการเกิดออกซิเดชัน เป็นต้น โดยประโยชน์หลักที่ได้รับจากสารประกอบฟีนอลิกก็คือการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดยสารประกอบฟีนอลิกนั้นทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระ (free radical) ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่

อนุมูลอิสระ และจับไฮดรอกซิลของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจะกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อและเซลล์ของพืชแตกต่างกัน โดยที่สารประกอบฟีนอลิกที่ไม่ละลายน้ำจะเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ขณะที่สารประกอบฟีนอลิกที่ละลายน้ำจะพบอยู่ในแวคิวโอล และที่เนื้อเยื่อด้านนอกของพืชจะพบสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณที่สูงกว่าเนื้อเยื่อด้านในของพืช (Balasundram และคณะ, 2006; Naczka และ Shahidi, 2004 และ Rice-Evans และคณะ, 1997) โดยเราสามารถแบ่งกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกออกได้เป็นกลุ่มดังตารางที่ 1 โดย กรดฟีนอลิก (phenolic acids), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และแทนนิน (tannins) เป็นกลุ่มที่สำคัญที่สุดของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งปริมาณที่มีอยู่ในอาหารมีตั้งแต่ร้อยละ 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ถึง 3,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้คือ ฟีนที่เพาะปลูก อายุ สภาวะในการเจริญเติบโต เช่น ปุ๋ย, อุณหภูมิ, ศัตรูพืช, แสงและน้ำ เป็นต้น แต่ละส่วนของพืช กระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษา (King และ Young, 1999)

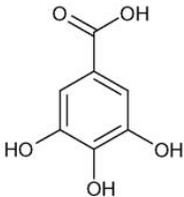
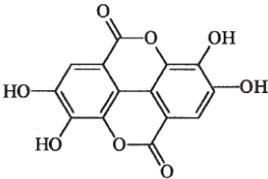
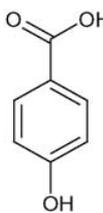
ตารางที่ 1 กลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกในพืช

Class	Structure
Simple phenolics, benzoquinones	C_6
Hydroxybenzoic acids	C_6-C_1
Acetophenones, phenylacetic acids	C_6-C_2
Hydroxycinnamic acids, phenylpropanoids (coumarins, isocoumarins, chromones, chromenes)	C_6-C_3
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)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

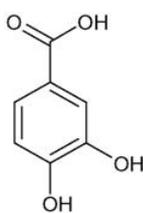
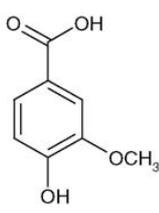
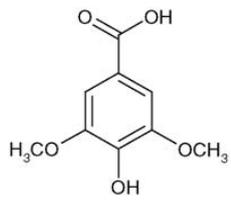
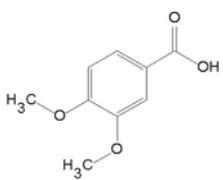
ที่มา: Balasundram และคณะ (2006)

2.1.1 กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดไฮดรอกซีซินนามิก กลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก มีโครงสร้างเป็น C₆-C₁ พบอยู่ทั่วไปในอาหารและพบว่าเป็นองค์ประกอบของสารประกอบเชิงซ้อน เช่น ลิกนิน และ hydrolyzable tannins (Shahidi และ Naczk, 2004) ส่วนกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิกนั้นมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกต่อกับสายคาร์บอน 3 ตัว C₆-C₃ (Balasundram และคณะ, 2006) ตัวอย่างสารประกอบที่อยู่ในแต่ละกลุ่มและแหล่งที่พบแสดงดังตารางที่ 2

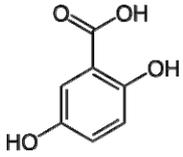
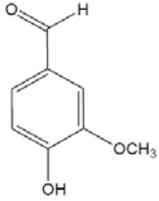
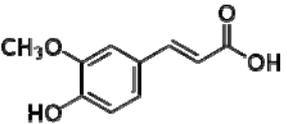
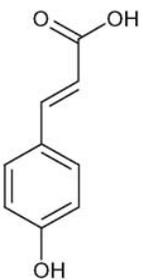
ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารประกอบกรดฟีนอลิกในแต่ละกลุ่มและแหล่งที่พบ

Phenolic acids	แหล่งที่พบ	อ้างอิง
<u>Hydroxybenzoic acids</u>		
gallic acid 	เบอรรี่และถั่ว	King และ Young (1999)
	เปลือกองุ่น เมล็ดองุ่น	Ju และ Howard (2005), Palma และคณะ (2001)
	มะระขี้้นก สตรอเบอรี่	Budrat และ Shotipruk (2009) Herrera และ Luque de Castro (2005)
ellagic acid 	กานพลู	Shan และคณะ (2005)
	เบอรรี่และถั่ว สมอไทย วาลเบอร์รี่แดง	King และ Young (1999) Rangsriwong และคณะ (2009) Anttonen และ Karjalainen (2005)
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid 	เครื่องเทศ, แครอท และสตรอเบอรี่	Amiot และคณะ (1997)
	ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี	Shahidi และ Naczk (2004)
	อัลมอนต์ เฮเซลนัท	
	ถั่วพีแคน วอลนัท เมล็ด ทานตะวัน แครนเบอร์รี่	
	แครอท หัวหอม	

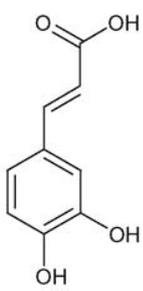
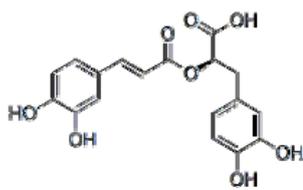
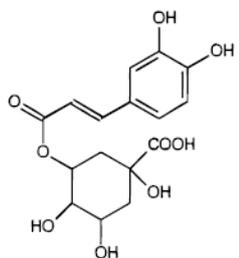
ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารประกอบกรดฟีนอลิกในแต่ละกลุ่มและแหล่งที่พบ (ต่อ)

Phenolic acids	แหล่งที่พบ	อ้างอิง
<p>protocatechuic acid</p> 	<p>สตรอเบอรี</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 Naczk (2004)</p>
<p>vanillic acid</p> 	<p>สตรอเบอรี</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>Liazid และคณะ (2007)</p> <p>Shahidi และ Naczk (2004)</p>
<p>syringic acid</p> 	<p>สตรอเบอรี</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 Naczk (2004)</p>
<p>veratric acid</p> 	<p>สตรอเบอรี</p> <p>พริกไทย</p>	<p>Herrera และ Luque de Castro (2005)</p> <p>Liazid และคณะ (2007)</p>

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารประกอบกรดฟีนอลิกในแต่ละกลุ่มและแหล่งที่พบ (ต่อ)

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

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารประกอบกรดฟีนอลิกในแต่ละกลุ่มและแหล่งที่พบ (ต่อ)

Phenolic acids	แหล่งที่พบ	อ้างอิง
<p>caffeic acid</p> 	<p>สตรวเบอรี</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 กระจ่างเขียว</p> <p>ลูกจันทร์เทศ ชิง</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>สตรวเบอรี</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 เป็นสารประกอบพีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่สุดของพืช ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน 15 อะตอม มีโครงสร้างเป็น $C_6-C_3-C_6$ แสดงดังภาพที่ 2 และมักจะอยู่ร่วมกับโมเลกุลน้ำตาล ฟลาโวนอยด์แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้ คือ ฟลาโวนอล (flavonols), ฟลาโวน (flavones), ฟลาวาโนน (flavanones), ฟลาวานอล (flavanols หรือ catechin), ไอโซฟลาโวน (isoflavones) และ แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) (Balasundram และคณะ, 2006) โดยโครงสร้างของฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่มแสดงดังภาพที่ 3

ฟลาโวนอล (Flavonols) เป็นฟลาโวนอยด์ที่มีมากที่สุด ประกอบด้วย เควอซิติน (quercetin), เคมพ์เฟอรอล (kaempferol) และ ไมริซีติน (myricetin) และรูติน (rutin) ซึ่งเป็นตัวหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มนี้ โดยที่ เควอซิติน เป็น ฟลาโวนอยด์ที่สำคัญที่สุดของพืช อาหารที่พบฟลาโวนอลในปริมาณสูง ได้แก่ หัวหอม, แอปเปิ้ล, ผักกาด, ใบผักกาดหอม, แครนเบอร์รี่, บร็อคโคลี่ และชา เป็นต้น

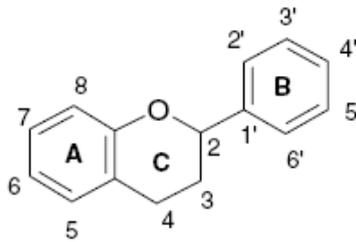
ฟลาโวน (Flavones) ประกอบด้วย ลูเตโอลิน (luteolin), อะพิจีนิน (apigenin) เป็นต้น พบมากใน ขึ้นฉ่าย, ผักชีฝรั่ง (parsley) และมะกอก

ฟลาวานอล (Flavanols) ประกอบด้วย คาเทชิน (catechin) และ อีพิคาเทชิน (epicatechin) พบในลูกแพร์, แอปเปิ้ล, ใบชาเขียว, ไวน์แดง, ไวน์ขาว เป็นต้น และมักจะอยู่รวมกับกรดแกลลิก (gallic acid) เป็น epigallocatechin gallate และ epicatechin gallate ในชาหรือเป็น condensed tannin ในผลไม้, พืชตระกูลถั่ว และธัญพืช ผลไม้ดิบมีฟลาวานอลในปริมาณสูง (King และ Young, 1999)

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

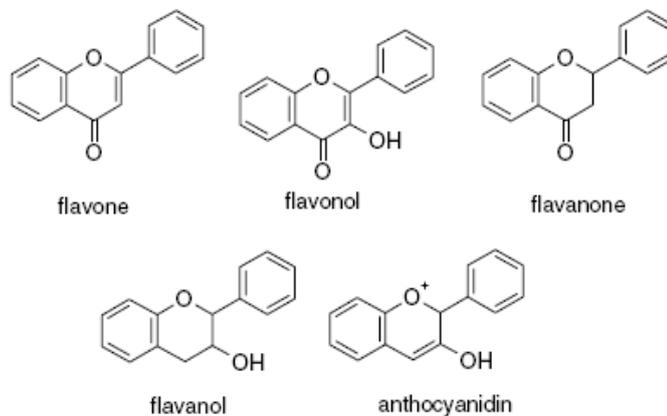
ฟลาวาโนน (Flavanones) มักพบในผลไม้ตระกูลส้ม (Naczka และ Shahidi, 2004)

แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) โครงสร้างพื้นฐานในโมเลกุลประกอบด้วย วงแหวนเบนโซไพแรน (benzopyran) 2 วงต่อกับวงแหวนฟีนิล (phenyl ring) สารประกอบแอนโทไซยานิดินที่พบมากจะอยู่ในรูปของออกซิเนียมไอออน (oxonium ion) คือ ที่อะตอมของออกซิเจนมีประจุบวก ได้แก่ ไซยานิดิน (cyanidin) พีลาร์โกนิน (pelargonidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) และพีโอนิน (peonidin) พีทูนิน (Petunidin) มัลวิดิน (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 กัลยงุ่น ท้อ แอปเปิ้ล และสาลี่ แทนนินยังมีประโยชน์ในการทำไวน์ แต่ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้ไวน์มีรสชาติไม่ดี เช่นมีรสฝาด แทนนินแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ hydrolyzable tannins (แทนนินที่ไฮโดรไลซ์ได้) และ condensed tannins

Condensed tannins เป็นกลุ่มของสารประกอบแทนนินที่เป็นโพลีเมอร์ของ catechin หรือ epicatechin พบมากในผลไม้ ธัญพืช และพืชตระกูลถั่ว โดยมักสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อชั้นนอกของพืช

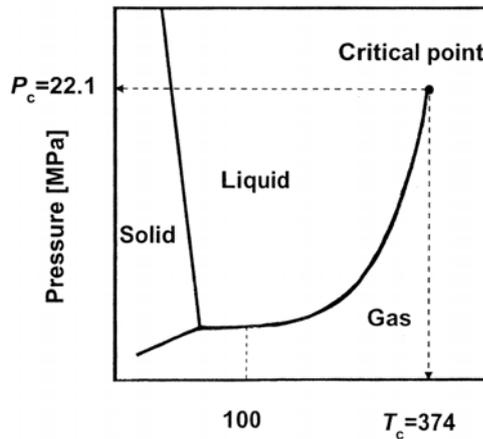
Hydrolyzable tannins เป็นกลุ่มของสารประกอบแทนนินที่เป็นโพลีเมอร์ของกรดแกลลิก (gallic acid) หรือ กรดเอลลาจิก (ellagic acid) เรียกว่า แกลโลแทนนิน

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

การสกัดสารประกอบฟีนอลิกในพืชขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีของสารนั้น วิธีที่ใช้การสกัด ขนาดของอนุภาคของตัวอย่าง ระยะเวลาการเก็บ สภาพที่ใช้ในการสกัด และสารรบกวน โดยความสามารถในการละลายของสารประกอบฟีนอลิกขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ (ความเข้มข้น) degree of polymerization ของสารประกอบฟีนอลิก และการเกิดปฏิกิริยากันระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับองค์ประกอบอื่นในอาหาร ตัวทำละลายที่มักใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน น้ำ เอธิลอะซีเตต โพรพานอล ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และสารผสมของตัวทำละลายเหล่านี้ (Naczka 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)

จากแผนภูมิวิภาคของน้ำ (ภาพที่ 4) เมื่อควบคุมความดันและอุณหภูมิของน้ำให้สูงเกินจุดวิกฤต (374 องศาเซลเซียส, 220 atm) ก็จะได้น้ำในสถานะที่เรียกว่าน้ำวิกฤตยวดยิ่ง (supercritical water) แต่เนื่องจากสถานะที่รุนแรงของน้ำวิกฤตยวดยิ่งทำให้มีการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารโดยตรงค่อนข้างน้อย 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)



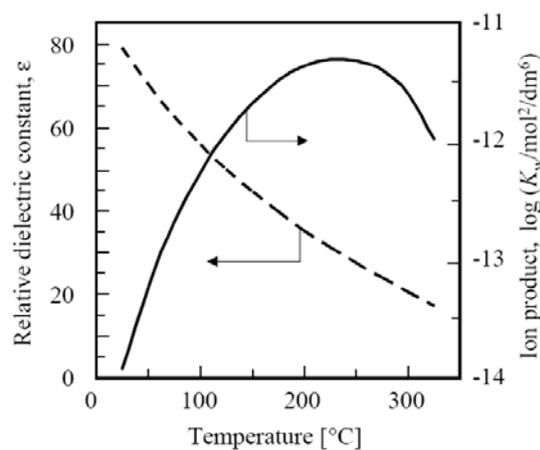
ภาพที่ 4 แผนภูมิวิภาคของน้ำ
ที่มา : ปราโมทย์ (2549)

2.2.1 คุณสมบัติของน้ำกึ่งวิกฤต

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

คุณสมบัติสำคัญของน้ำกึ่งวิกฤตที่แตกต่างไปจากน้ำที่สภาวะปกติ ได้แก่ ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) และค่าคงที่การแตกตัว (ion product) พิจารณาภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่าค่าคงที่ไดอิเล็กทริกสัมพัทธ์ (relative dielectric constant, ϵ 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 องศาเซลเซียสไปเป็น 200 องศาเซลเซียสและจากภาพที่ 5 จะสังเกตได้อีกว่าหากทำการปรับอุณหภูมิ

ให้เหมาะสมจะได้น้ำกึ่งวิกฤติที่มีความเป็นขั้วแตกต่างกันไปทำให้สามารถเลือกสกัดหรือละลายสารแต่ละกลุ่มได้ คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการของน้ำกึ่งวิกฤติคือมีค่าคงที่การแตกตัว (K_w) สูง โดยที่ความดัน 15 MPa ค่า $\log K_w$ เพิ่มขึ้นจาก -14 ที่ 25 องศาเซลเซียสเป็น -11.3 ที่อุณหภูมิในช่วง 200-250 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของไฮโดรเนียมไอออน(H_3O^+) และไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) เพิ่มขึ้นจาก 1×10^{-7} mol/L ไปเป็น 2.2×10^{-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)

เมื่อเทียบกับการสกัดที่สภาวะปกติแล้วการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตินั้นมีประสิทธิภาพสูงกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจากความสามารถในการละลายและการถ่ายเทมวลของสารที่ทำการสกัดเพิ่มขึ้นและเพิ่มการทำลายสมดุลระหว่างผิวสัมผัส (surface equilibria) โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ความสามารถในการละลายของตัวทำละลายต่างๆ มีสูงขึ้น ความหนืดของน้ำลดลง การแพร่เพิ่มขึ้นส่งผลให้น้ำสามารถแทรกผ่านเข้าไปในอนุภาคได้ดีขึ้น นอกจากนี้ถ้ามีการไหลต่อเนื่องในระหว่างการสกัดแบบไดนามิกแล้วจะเพิ่มการถ่ายเทมวล ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด ทั้งอุณหภูมิสูงและความดันสามารถทำลายสมดุลระหว่างผิวสัมผัสได้ การเพิ่มอุณหภูมิสามารถทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างตัวถูกละลายกับตัววัสดุ ได้แก่ แรงแวนเดอร์วาลส์ และพันธะไฮโดรเจน ทำให้การปลดปล่อยของสารออกจากวัสดุเกิดได้ง่ายขึ้น ส่วนความดันจะช่วยเพิ่มการสัมผัสระหว่างวัสดุกับน้ำ (Teo และคณะ, 2009)

2.2.2 การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (Subcritical water extraction)

การใช้ประโยชน์จากน้ำกึ่งวิกฤตที่สำคัญคือ การใช้แทนตัวทำละลายอินทรีย์ หรือแม้แต่การแทนที่คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งในการสกัดสารที่มีมูลค่าจากวัสดุทางการเกษตรโดยมีการศึกษาในวัตถุดิบหลายชนิด (Smith, 2002) ตัวอย่างการศึกษาการสกัดสารต่างๆ จากพืชโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่มีรายงานแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการศึกษาการใช้น้ำกึ่งวิกฤตในการสกัดสารต่างๆ 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	Khuwijtjaru และคณะ (2008)
สมอไทย	สารประกอบฟีนอลิก	Rangsrivong และคณะ (2009)
ใบออริกาโน	สารประกอบฟีนอลิก	Rodriguez-Meizoso และ คณะ (2006)
รำข้าว	สารประกอบฟีนอลิก	Pourali และคณะ (2010)
ปาน	สารประกอบฟีนอลิก	Kim และ Mazza (2006)
เมล็ดองุ่น	สารประกอบฟีนอลิก	Garcia-Marino และคณะ (2006)
เบลคเคอเรนท์	แอนโทไซยานินส์และ สารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ	Cacace และ Mazza (2002)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการศึกษาการใช้น้ำกึ่งวิกฤตในการสกัดสารต่างๆ จากพืช (ต่อ)

วัตถุดิบ	สารประกอบ	อ้างอิง
เปลือกองุ่นแดง	แอนโทไซยานินส์และ สารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ	Ju และ Howard (2005)
แครอทม่วง	แอนโทไซยานินส์	Gizir และคณะ (2008)
เมล็ดองุ่น	สารกลุ่มคาเทชินและ อิพิกาทะชิน	Piñeiro และคณะ (2004)
โรสแมรี่	สารแอนตี้ออกซิแดนท์	Ibanez และคณะ (2003)
ถั่วเหลือง	ไอโซฟลาโวนส์	Li-Hsun และคณะ (2004)
น้ำมันหอมระเหย		
เมล็ดผักชี	น้ำมันหอมระเหย	Eikani และคณะ (2007)
มินท์	น้ำมันหอมระเหย	Ozel และ Kaymaz (2004)
ออริกานโอ	น้ำมันหอมระเหย	Ayala และ Luque de Castro (2001)
เมล็ดยี่ห่วย	น้ำมันหอมระเหย	Gámiz-Gracia และ Luque de Castro (2000)

2.2.3 ความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต

การใช้ประโยชน์จากน้ำกึ่งวิกฤตในการสกัดสารที่มีมูลค่าจากวัตถุดิบทางการเกษตรนั้นได้รับความนิยมจากนักวิจัยจำนวนมาก โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีการศึกษาการประยุกต์ใช้น้ำกึ่งวิกฤตมาสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากพืชชนิดต่างๆ กันอย่างกว้างขวาง แต่ในการสกัดสารประกอบที่ไม่เสถียรต่อความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤต จะมีการสลายตัวเกิดขึ้นในบางครั้ง ซึ่งการศึกษาด้านความคงตัวของสารประกอบเหล่านี้ในน้ำกึ่งวิกฤตยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างเพียงพอ โดยงานวิจัยบางส่วนมีการรายงานว่า การเพิ่มอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้มีค่าลดลงหรือสูญเสียความสามารถในการเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเหล่านี้มีความคงทนต่อสภาวะในการสกัดได้ไม่ดีนัก เช่น Ju และ Howard (2005) พบว่าการใช้อุณหภูมิสูงกว่า 110 องศาเซลเซียส ในการสกัด

สารฟีนอลิกจากเปลือกองุ่นด้วยน้ำกึ่งวิกฤตจะทำให้เกิดการลดลงของทั้งปริมาณแอนโทไซยานินส์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม ส่วน Rangsiwong และคณะ (2009) ศึกษาการสกัด สารโพลีฟีนอลิกจากผลสมอไทยด้วยน้ำกึ่งวิกฤต พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 220 องศาเซลเซียส ปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ในสารสกัดลดลงซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาจเกิดการสลายตัวของ อุณหภูมิสูง และเมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดให้นานขึ้น ความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชัน ของสารสกัดต่ำลง เช่นเดียวกับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากมะระขี้นกด้วยน้ำกึ่งวิกฤต คือ ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณของ catechin, gentisic acid และ chlorogenic acid ที่สกัดได้และความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิ เพิ่มขึ้นถึง 200 องศาเซลเซียสแต่ปริมาณ gallic acid ที่สกัดได้ลดลงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียสแต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 230 องศาเซลเซียสปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมดที่สกัดได้ลดลง ซึ่งอาจเกิดการสลายตัวของอุณหภูมิสูงเช่นเดียวกัน (Butrat และ Shotipruk, 2009)

Herrera และ Luque de Castro (2005) รายงานความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกเมื่อ ผ่านการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่มีการเติมกรด HCl 1.2 M ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4) พบว่าสารประกอบฟีนอลิก 7 ชนิดสลายตัวหมด 100 % ภายในเวลา 10 นาที และมี เพียง 3 ชนิดเท่านั้นที่มีการสลายตัวอยู่ในช่วง 50 % แต่งานวิจัยจำนวนมากยังพบว่าสามารถ สกัดสารประกอบฟีนอลิกได้แม้ใช้อุณหภูมิสูงแสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดอาจจะ มีความคงตัวต่อความร้อนในน้ำกึ่งวิกฤตได้ดี

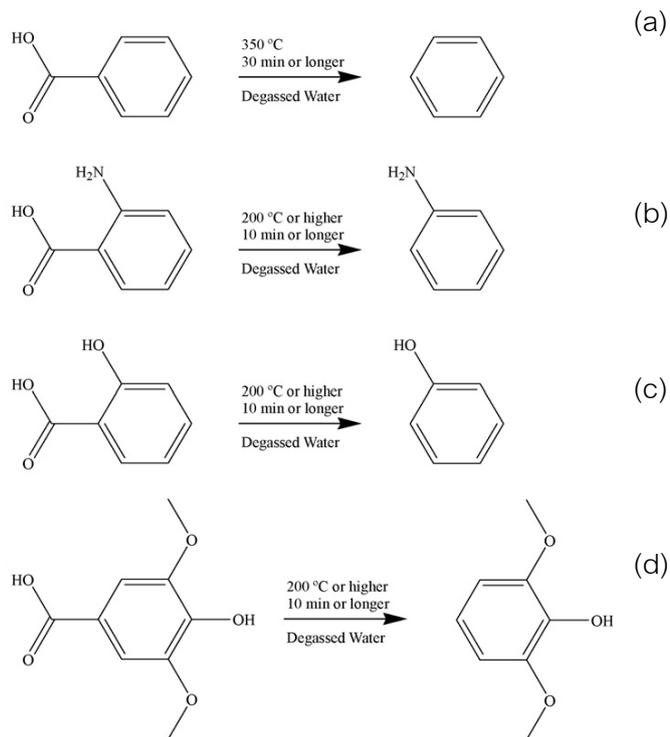
Lindquist และ Yang (2011) ศึกษาความคงตัวของ benzoic acid และอนุพันธ์ของ benzoic acid 3 ชนิด ได้แก่ anthranilic acid, salicylic acid และ syringic acid ภายใต้สภาวะ น้ำกึ่งวิกฤต โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 50-350 องศาเซลเซียสพบว่าการสลายตัวของอนุพันธ์ของ benzoic acid เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และมีความเสถียรน้อยลงเมื่อเพิ่มเวลาในการให้ความ ร้อน สารทั้ง 4 ชนิด ยังคงเสถียรจนถึงอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 150 องศา เซลเซียส อนุพันธ์ของ benzoic ทั้ง 3 ชนิด เกิดการสลายตัวเพียงเล็กน้อยหลังจากให้ความร้อน 30 นาที แต่สลายตัวมาก และสลายตัวอย่างสมบูรณ์ที่ 250 องศาเซลเซียสแต่ benzoic acid ยังคงเสถียรอยู่ที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส หลังจากให้ความร้อน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 200 และ 250 องศาเซลเซียส สารประกอบ anthranilic acid, salicylic acid, syringic acid และ benzoic acid เกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันไปเป็นสารประกอบตัวอื่นได้แก่ ได้แก่ aniline, phenol, syringol และ benzene ตามลำดับ (ภาพที่ 6) ซึ่งกลไกการเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของ

anthranilic acid แสดงดังภาพที่ 7

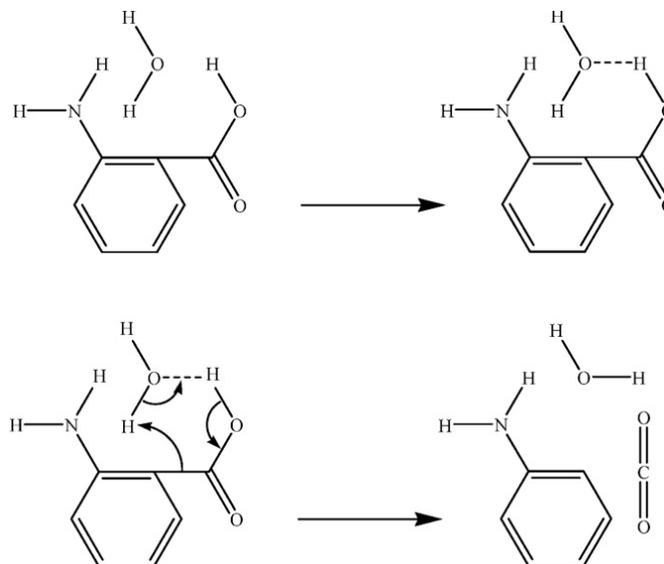
ตารางที่ 4 การสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกภายใต้การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต

Analyte	Degradation (%)
	Subcritical water extraction ที่เดิมกรด 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
syringic 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 : (a) benzoic acid (b) anthranilic acid (c) salicylic acid และ (d) syringic acid ที่มา: Lindquist และ Yang (2011)



ภาพที่ 7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซีไลเซชันของ anthranilic acid ที่มา: Lindquist และ Yang (2011)

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

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[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich, Germany)
- 3.1.10 Folin-ciocalteu (Merck, Germany)
- 3.1.11 Sodium carbonate anhydrous (Na₂CO₃) (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.12 เมทานอล (Merck, Germany)
- 3.1.13 กรดอะซีติก (J.T. Baker, Thailand)
- 3.1.14 L-ascorbic acid (Riedel-de Haën, China)
- 3.1.15 น้ำกลั่น

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 ชุดอุปกรณ์ให้ความร้อนแบบ batch-type (ภาพที่ 6ก) ซึ่งประกอบด้วย
 - เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller) (AS ONE, Japan)
 - อ่างซิลิโคน (Silicone oil bath)
 - เทอร์โมคัปเปิล
 - เทอร์มิสเตอร์ (Fluk รุ่น 52 II, China)

- High pressure reactor (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน×ความสูงภายนอก: 0.6×10.6 เซนติเมตร, ปริมาตร 3.3 มิลลิลิตร, บริษัทนานาสยามอินเตอร์เทรด จำกัด)

3.2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

- ชุดที่ 1 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)

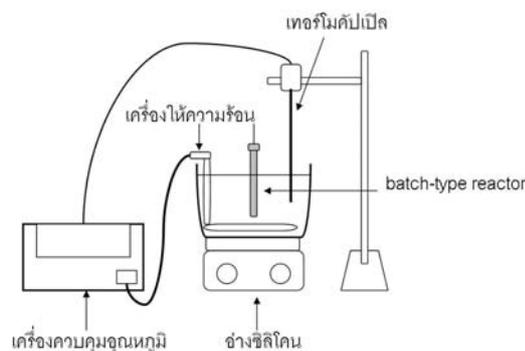
3.2.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Thermo Spectronic, รุ่น Genesys 10uv, USA)

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

3.2.5 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

3.2.6 ตู้แช่เยือกแข็ง ตู้เย็น

3.2.7 นาฬิกาจับเวลา



ข.

ภาพที่ 8 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองแบบ batch-type (

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 6 ก)

3.3.1.4 วางลงในอ่างซีลิโคนที่ตั้งอุณหภูมิที่ต้องการไว้ (ภาพที่ 6 ข) 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 ออกจากอ่างซีลิโคน ทำให้เย็นทันทีโดยการจุ่มลงในน้ำผสมน้ำแข็ง

3.3.1.6 เก็บสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนในขวดใส่ตัวอย่างสีขาว 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 ซึ่งผลการทดลองแสดงในหน่วยของมิลลิกรัมของวิตามินซีต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่าง (g VCEAC/g sample) วิธีการวิเคราะห์แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข

บทที่ 4

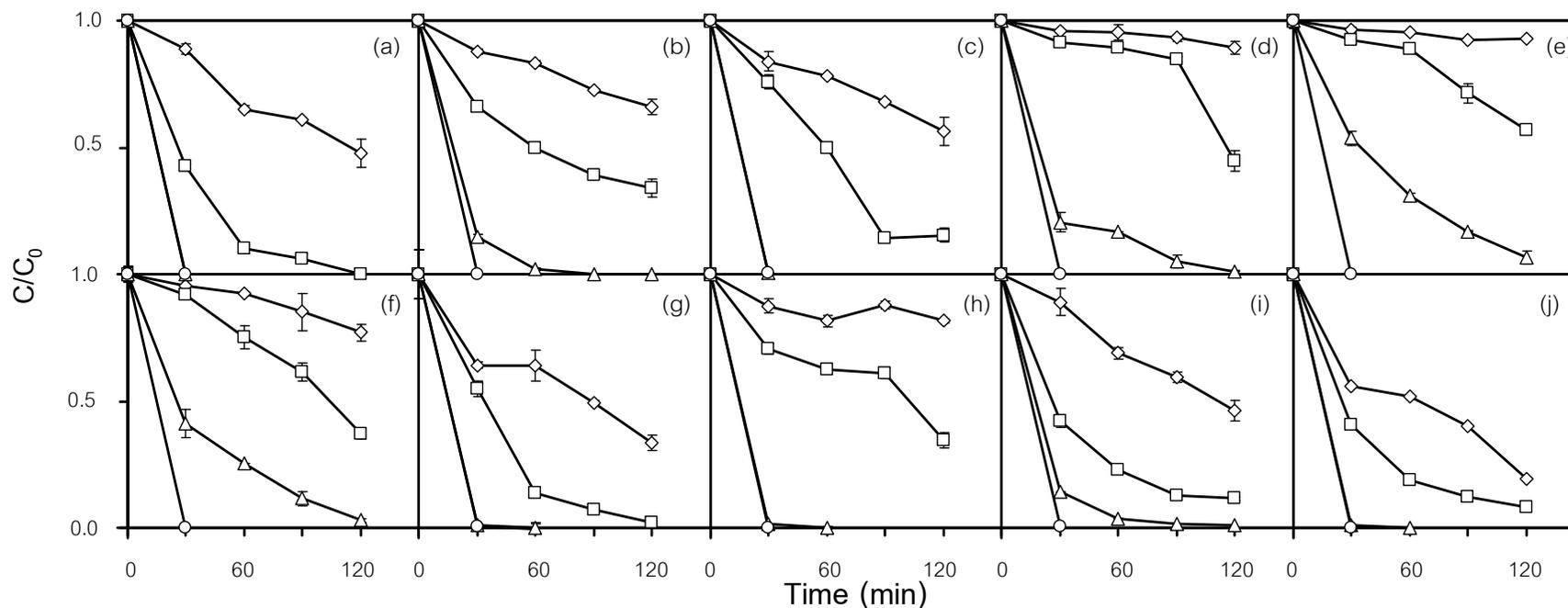
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

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 (△), 250°C (○) ที่เวลาต่างๆ โดย C คือความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่คงเหลือที่เวลาใดๆ และ C₀ คือ ความเข้มข้นที่เวลาเริ่มต้น

ในการเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ส่งผลให้สารประกอบฟีนอลิกทั้ง 10 ชนิด มีปริมาณลดลง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเกิดการสลายตัวขึ้นที่อุณหภูมิสูง ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ 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 กับเวลานั้นจะเห็นว่าได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (ภาพที่ 10) แสดงให้เห็นว่าการสลายตัวสามารถอธิบายได้ด้วยจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (first-order kinetics) ดังสมการ

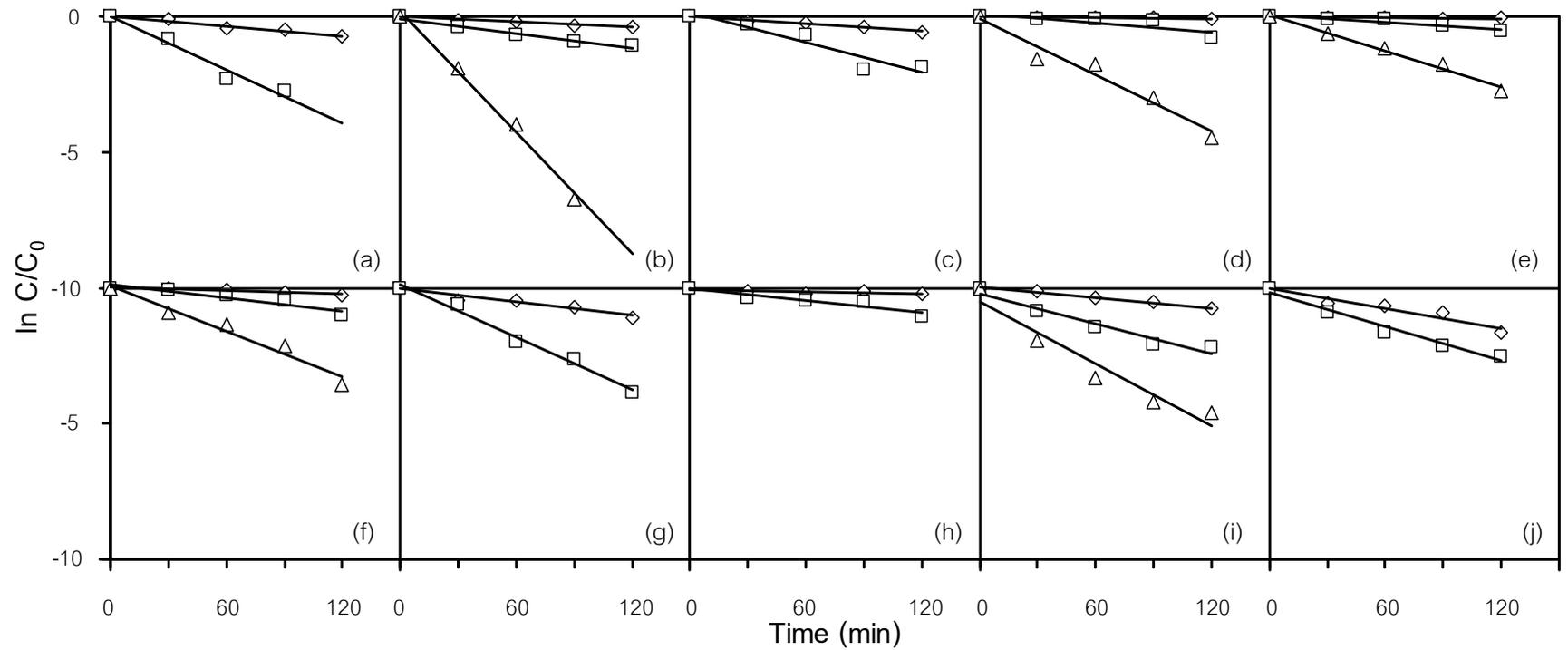
$$\ln C/C_0 = -kt \quad (1)$$

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 (\triangle)

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

สารประกอบฟีนอลิก	อุณหภูมิ (°C)								
	100			150			200		
	k (min ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (นาที)	k (min ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (นาที)	k (min ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (นาที)
gallic acid	0.0062	0.9720	112	0.0326	0.9658	21	nd	nd	nd
protocatechuic acid	0.0034	0.9865	204	0.0089	0.9637	78	0.0744	0.9922	9
gentisic acid	0.0046	0.9828	151	0.0180	0.8959	39	nd	nd	nd
vanillic acid	0.0009	0.9450	812	0.0056	0.6750	123	0.0346	0.9586	20
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	0.0006	0.8862	1082	0.0046	0.9127	151	0.0221	0.9878	31
syringic acid	0.0021	0.9527	326	0.0080	0.9108	87	0.0279	0.9687	25
caffeic acid	0.0082	0.9316	85	0.0324	0.9854	21	nd	nd	nd
<i>p</i> -coumaric acid	0.0014	0.5930	495	0.0076	0.8806	91	nd	nd	nd
chlorogenic acid	0.0065	0.9873	107	0.0185	0.9428	37	0.0381	0.9336	18
catechin	0.0130	0.8349	57	0.0153	0.8560	33	nd	nd	nd

nd หมายถึง ไม่สามารถคำนวณค่าได้เนื่องจากข้อมูลไม่เพียงพอ

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

โดยการสลายตัวของสารประกอบพินอลิกแต่ละชนิดในรูปของกราฟจลนพลศาสตร์แสดง ดังภาพที่ 10 และค่าคงที่อัตราการสลายตัว (k) และค่าครึ่งชีวิต (half-life, $t_{1/2}$) แสดงดังตารางที่ 5 ซึ่งเมื่ออุณหภูมิในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นจาก 100 องศาเซลเซียส ถึง 200 องศาเซลเซียส มีผลให้ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของของสารประกอบพินอลิกทั้ง 10 ชนิด มีค่าเพิ่มขึ้น และค่าครึ่งชีวิตมีค่าลดลง ซึ่งค่าครึ่งชีวิตหมายถึงเวลาที่ใช้ในการทำให้ความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่ง แต่สำหรับที่ อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส มีข้อมูลไม่เพียงพอสำหรับพล็อตกราฟ โดยค่าคงที่อัตราการสลายตัวของสารประกอบพินอลิกแต่ละชนิดที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่าค่าคงที่ อัตราการสลายตัวที่อุณหภูมิ 100 และ 150 องศาเซลเซียส มากอย่างเห็นได้ชัด และค่าครึ่งชีวิตก็มี ค่าลดลงมากอย่างเห็นได้ชัดเช่นกัน ดังนั้นการให้ความร้อนกับสารประกอบพินอลิกเหล่านี้ ด้วยน้ำ กึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิสูงทำให้สารประกอบเหล่านี้มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำ

จากผลการศึกษาที่สนับสนุนผลการทดลองของ Rangsrivong และคณะ (2009) ที่ศึกษา การสกัดสารโพลีฟีนอลิกจากผลสมอไทยด้วยน้ำกึ่งวิกฤต พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดสารถึง 220 องศาเซลเซียส ปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ในสารสกัดลดลง ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิด การสลายตัวที่อุณหภูมิสูง เช่นเดียวกับการทดลองของ Butrat และ Shotipruk (2009) ที่พบว่าเมื่อ เพิ่มอุณหภูมิในการสกัดเป็น 200-230 องศาเซลเซียส ในการสกัดสารประกอบพินอลิกจากมะระ ขึ้นด้วยน้ำกึ่งวิกฤตนั้น ทำให้สาร gallic acid ที่สกัดได้และปริมาณสารประกอบพินอลิกทั้งหมดมี ปริมาณลดลง ซึ่งเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิสูงเช่นเดียวกัน

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่อัตราการสลายตัวของสารประกอบพินอลิกแต่ละชนิด กับ อุณหภูมิแสดงด้วยสมการ Arrhenius

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

โดยที่ k คือ ค่าคงที่อัตรา

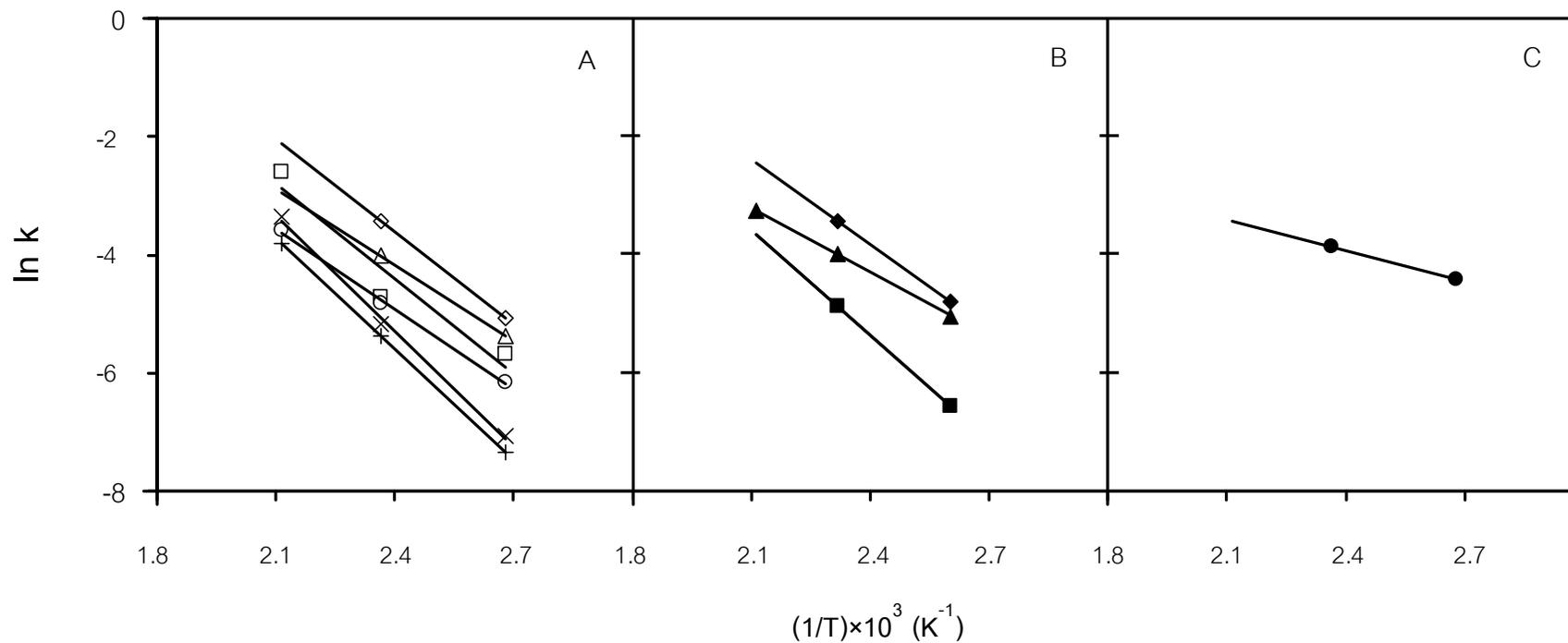
k_0 คือ ค่า Pre-exponential factor

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

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

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) พบว่าการสลายตัวของกรดฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤตเกิดปฏิกิริยาการปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่หมู่คาร์บอกซิลของกรดคาร์บอกซิลิกถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไฮโดรเจน



ภาพที่ 11 Arrhenius plot สำหรับการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มไฮดรอกซีเบนโซอิกแอซิด (A) : gallic acid (\diamond), protocatechuic acid (\square), gentisic acid (Δ), vanillic acid (\times), *p*-hydroxybenzoic acid ($+$), syringic acid (\circ) กลุ่มไฮดรอกซีซินนามิกแอซิด (B) : caffeic acid (\blacklozenge), *p*-coumaric acid (\blacksquare), chlorogenic acid (\blacktriangle) และกลุ่มฟลาโวนอยด์ (C) : catechin (\bullet)

ตารางที่ 6 ค่าพลังงานก่อกัมมันต์ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด

สารประกอบฟีนอลิก	E_a (kcal/mol)
Hydroxybenzoic acids	
vanillic acid	12.93
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	12.41
protocatechuic acid	10.61
gallic acid*	10.41
syringic acid	9.00
gentisic acid*	8.56
Hydroxycinnamic acids	
<i>p</i> -coumaric acid*	10.61
caffeic acid*	8.62
chlorogenic acid	6.22
Flavonoids	
catechin*	3.39

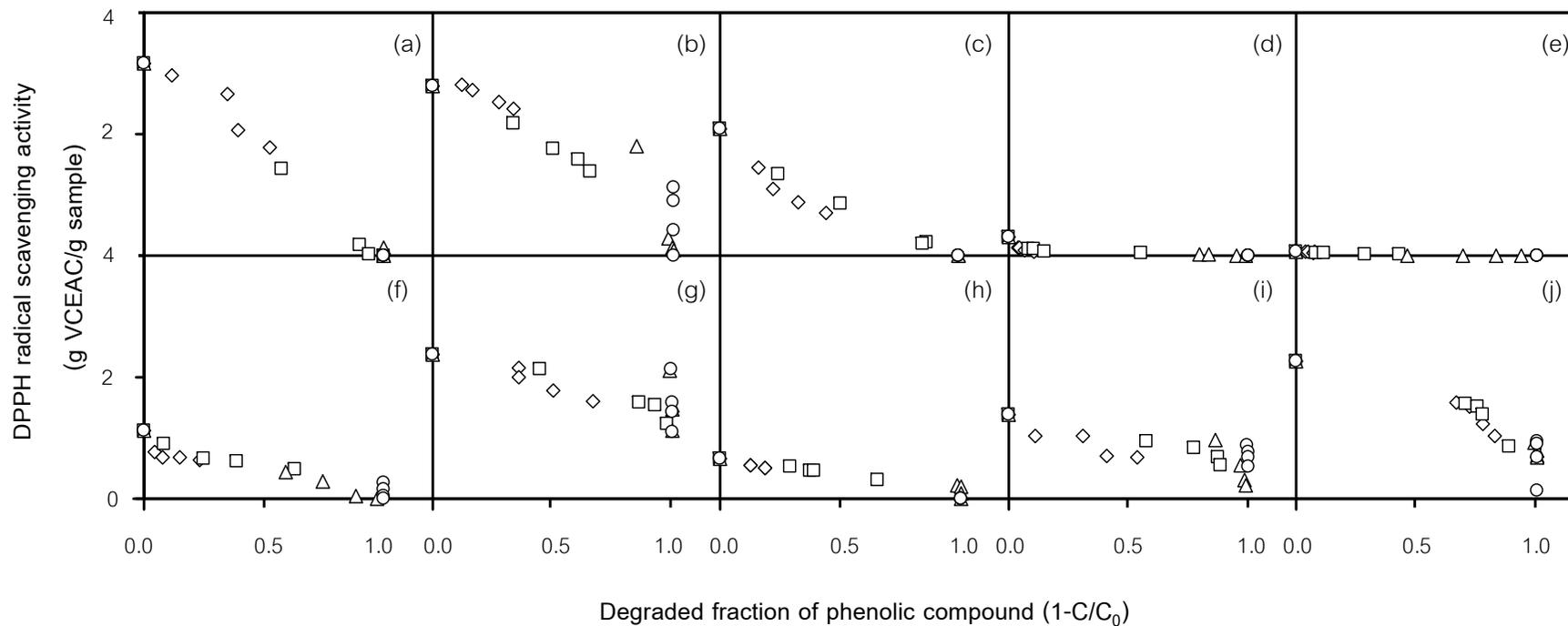
หมายเหตุ : * หมายถึง ค่าพลังงานก่อกัมมันต์ที่คำนวณได้จากอุณหภูมิในช่วง 100-150 องศาเซลเซียสเท่านั้น

4.2 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

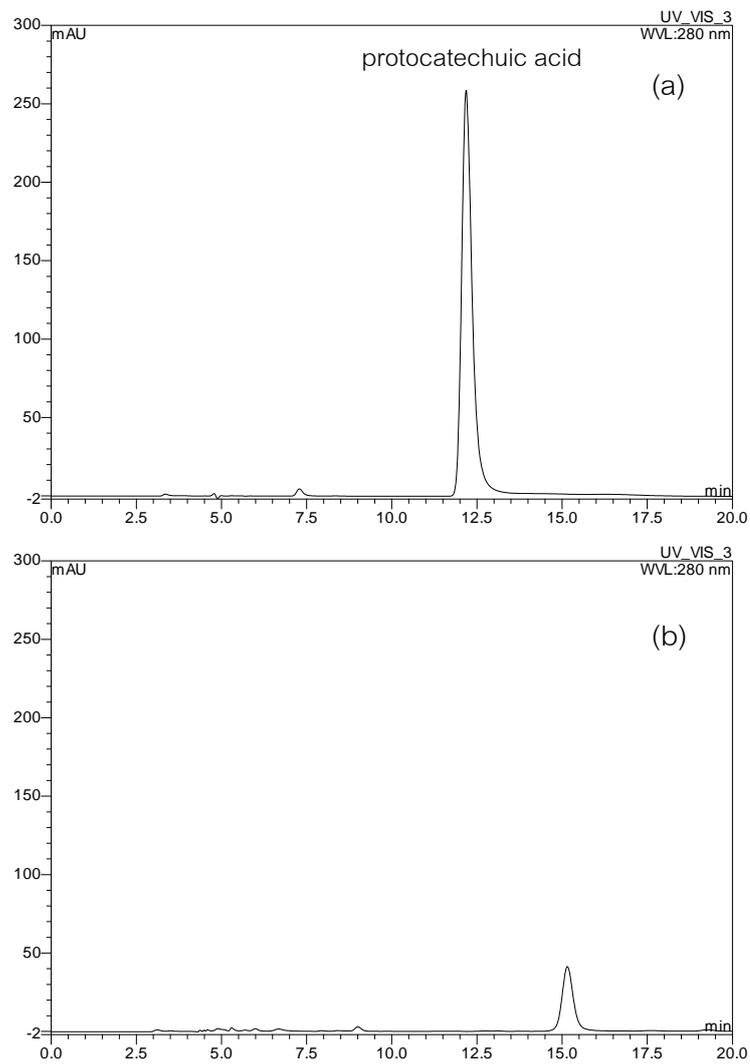
จากการนำสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร folin-ciocalteu กับสารประกอบฟีนอลิกทุกชนิดในสารละลายเพื่อให้เกิดสีที่สามารถติดตามด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่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

เมื่อสัดส่วนที่สลายตัวของสารประกอบเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารละลายลดลงด้วยเช่นกัน

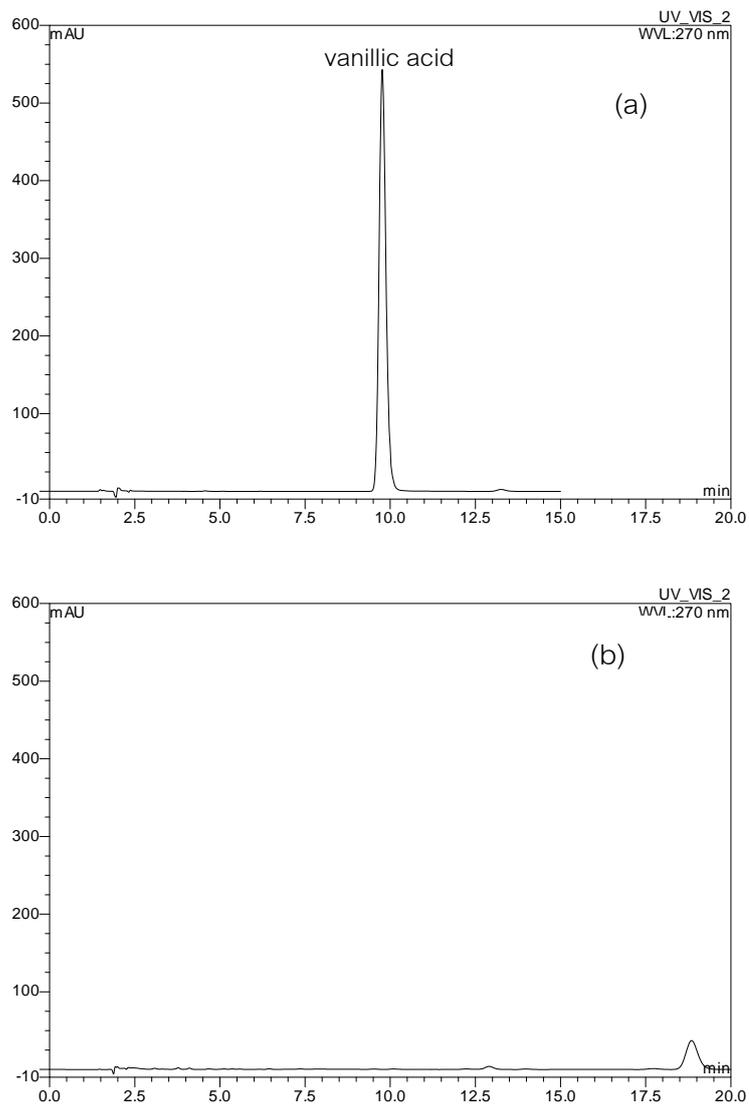
ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส สารละลายของ gallic acid และ gentisic acid ไม่พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการสลายตัว ที่ไม่พบสาร gallic acid และ gentisic acid ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ($1-C/C_0=1$) แต่สารละลายของ protocatechuic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic 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 โดยเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชันขึ้น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่หมู่คาร์บอกซิลของกรดคาร์บอกซิลิกถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไฮโดรเจน โดยขจัดหมู่คาร์บอกซิลออกไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ โดยสารประกอบ anthranilic acid, salicylic acid และ syringic acid เกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชันไปเป็นสารประกอบ aniline, phenol และ syringol ตามลำดับ (โครงสร้างของสารทั้ง 3 ชนิดแสดงดังภาพที่ 6) ซึ่งกลไกการเกิดเริ่มจากโมเลกุลของน้ำมาสร้างพันธะกับไฮโดรเจนในหมู่คาร์บอกซิล ตามด้วยการเคลื่อนที่ของไฮโดรเจนในหมู่คาร์บอกซิลไปสู่ น้ำ และสุดท้ายไฮโดรเจนของโมเลกุลน้ำมาเชื่อมต่อกับวงแหวนเบนซีน ซึ่งเป็นผลให้เกิดการสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์ โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ phenol และ syringol นั้นจัดเป็นสารประกอบในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก



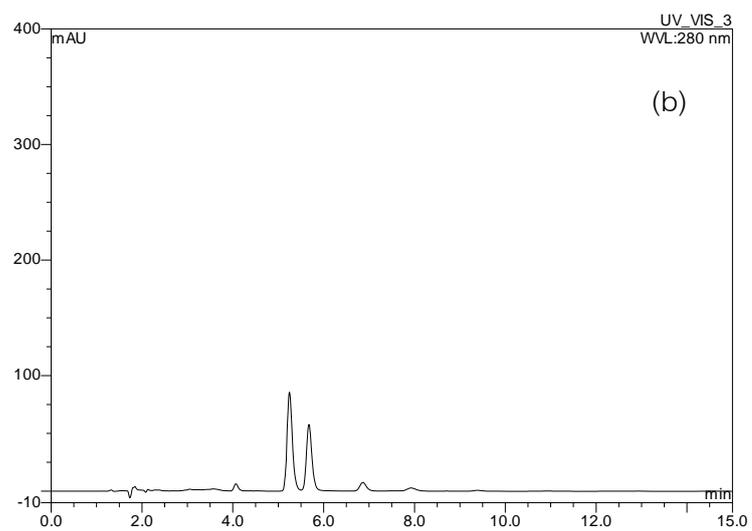
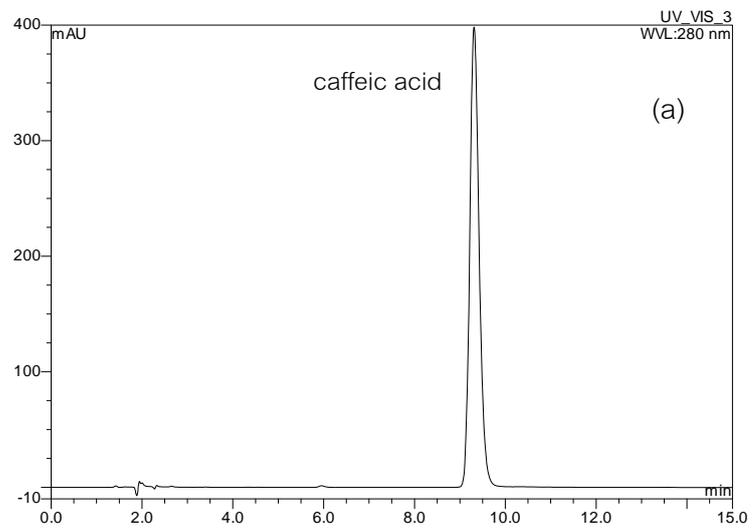
ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนที่สลายตัวของสาร gallic acid (a), protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d), *p*-hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g), *p*-coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j) กับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ที่อุณหภูมิ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



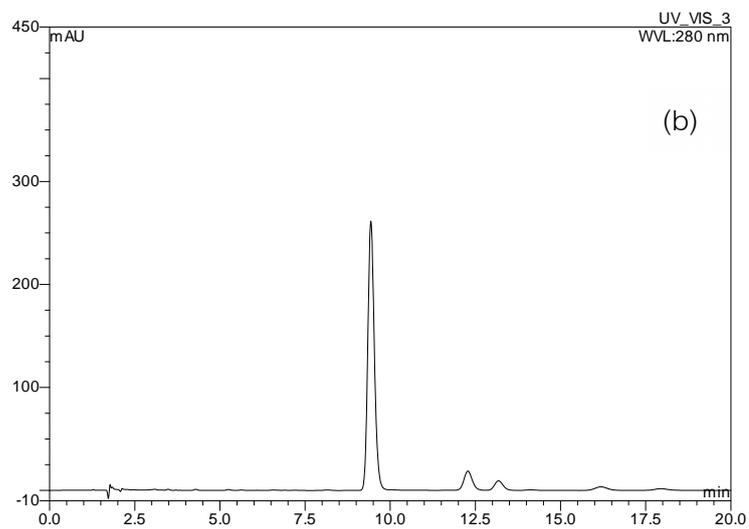
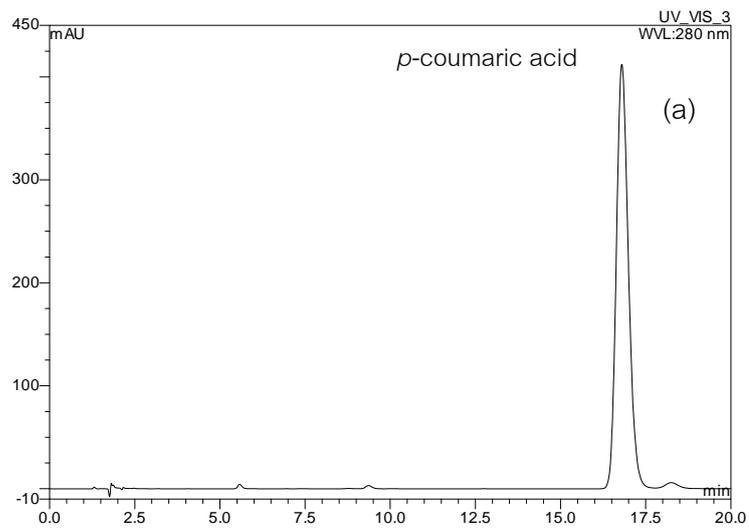
ภาพที่ 13 โครมาโตแกรมของสารละลาย protocatechuic acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b)



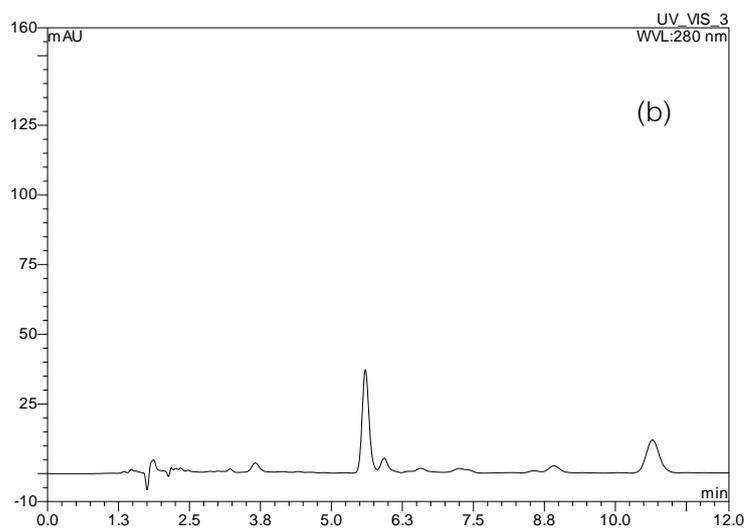
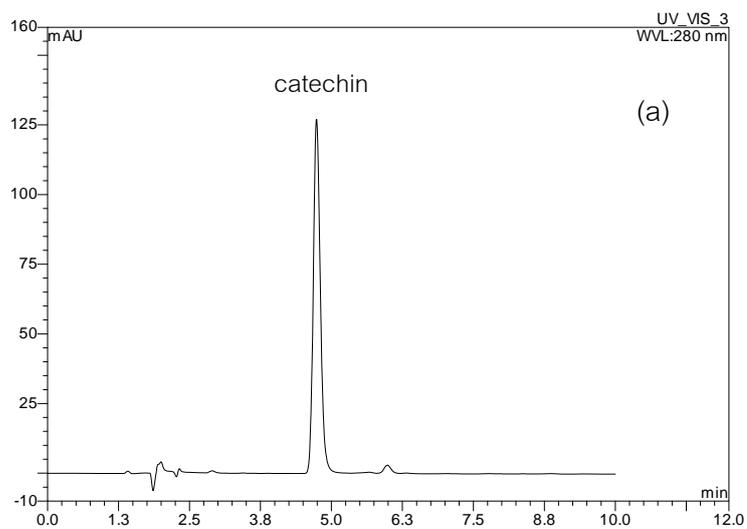
ภาพที่ 14 โครมาโตแกรมของสารละลาย vanillic acid ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (a) และที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส 30 นาที (b)



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



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



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

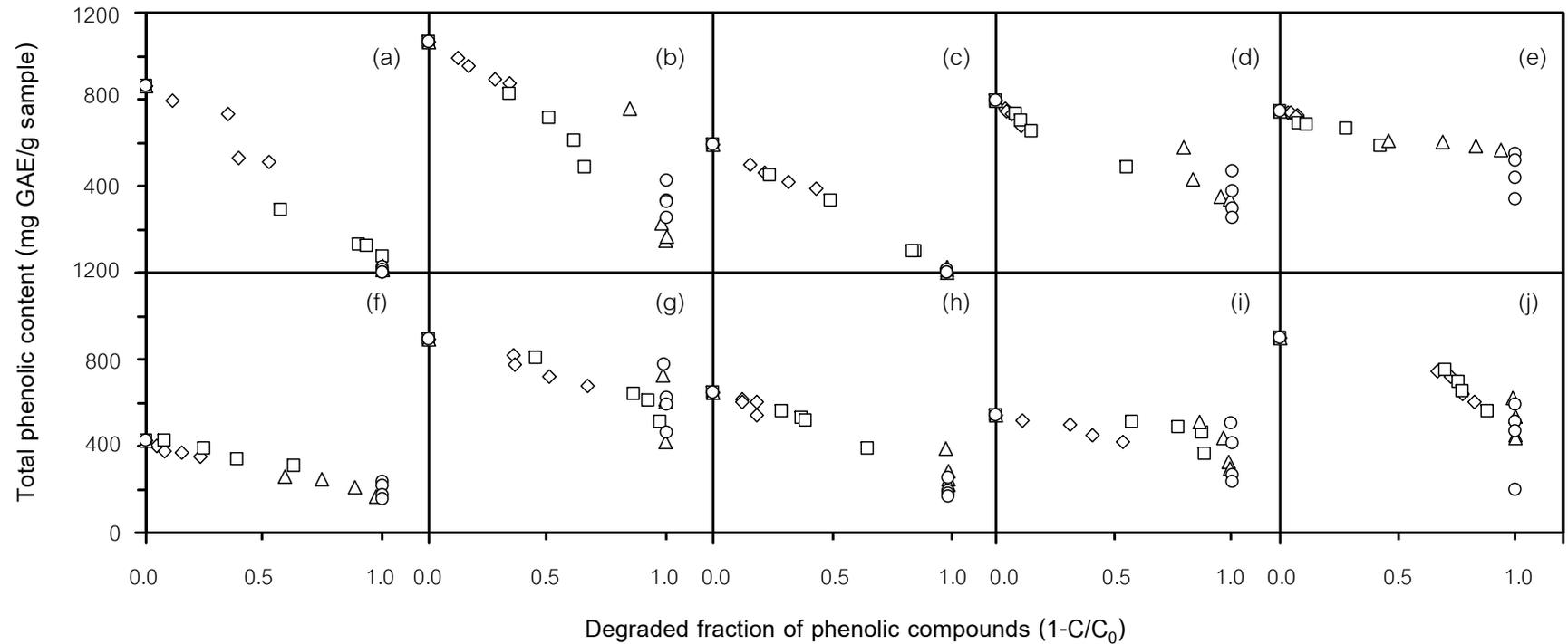
4.3 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ 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 ของสารแอนตี้ออกซิแดนซ์ 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
Hydroxybenzoic acids			
gallic acid	3.16	3	meta+para
protocatechuic acid	2.79	2	meta+para
gentisic acid	2.09	2	ortho+meta
vaniilic acid	0.30	1	para
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	0.07	1	para
syringic acid	1.12	1	para
Hydroxycinnamic acids			
caffeic acid	2.37	2	meta+para
<i>p</i> -coumaric acid	0.66	1	para
chlorogenic acid	1.39	2	meta+para
Flavonoids			
catechin	2.27	5	3,5,7,3',4'

หมายเหตุ : VCEAC ย่อมาจาก vitamin C equivalent antioxidant capacity

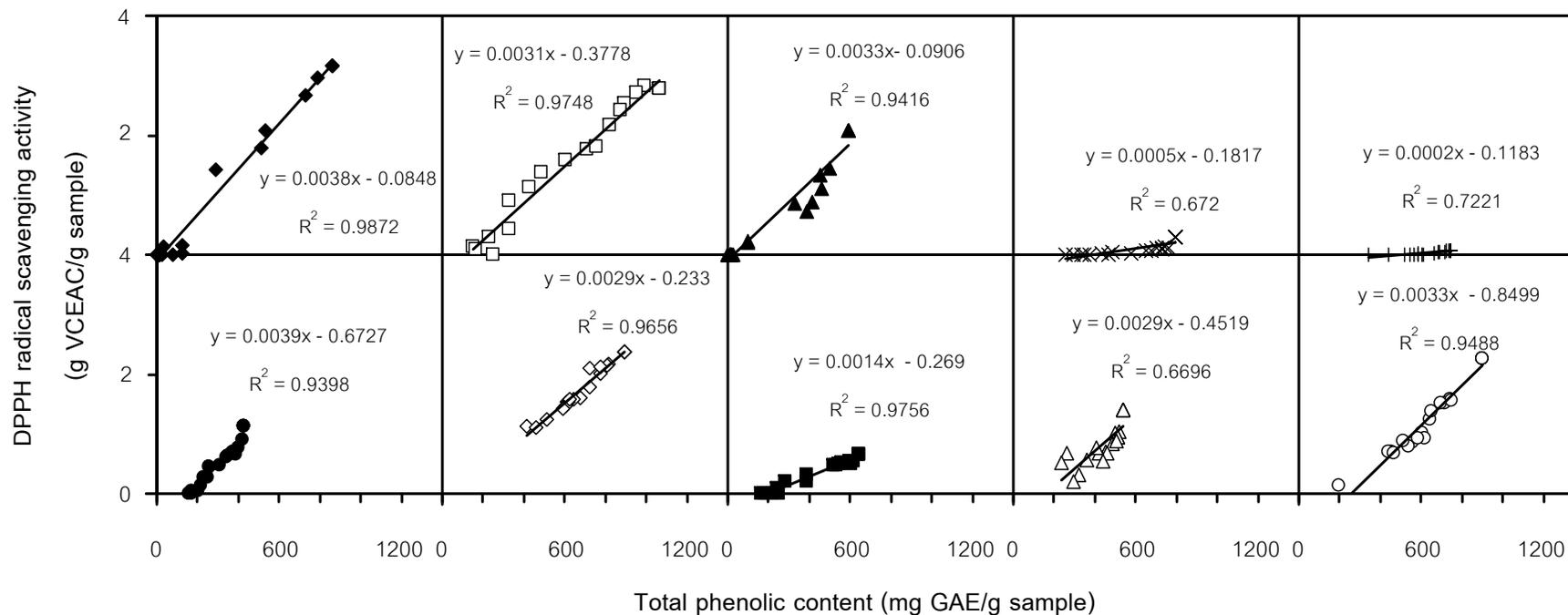


ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนที่สลายตัวของสาร gallic acid (a), protocatechuic acid (b), gentisic acid (c), vanillic acid (d), *p*-hydroxybenzoic acid (e), syringic acid (f), caffeic acid (g), *p*-coumaric acid (h), chlorogenic acid (i) และ catechin (j) กับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ที่อุณหภูมิ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

จากภาพที่ 18 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนที่สลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก ชนิดต่างๆกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารละลายที่ผ่านการให้ความร้อนพบว่าเมื่ออุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้น ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดลดลง ซึ่งที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส สารละลาย gallic acid, gentisic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenoic 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) ที่พบว่ามีการฟอสฟอไรต์ของสารประกอบอื่นเกิดขึ้นในโครมาโตแกรม 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 และยังคงทนต่ออนุมูลอิสระ นอกจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ caffeic acid แล้ว ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ protocatechuic acid, syringic acid, chlorogenic acid และ catechin ก็ยังคงมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน ดังนั้นถ้ามีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลาน้อยกว่า 30 นาที อาจจะทำให้ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระที่สูงกว่านี้ได้ จึงควรมีการศึกษาต่อไป

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดหลังจากผ่านการให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ แสดงดังภาพที่ 19 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารละลายสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง 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 (Naczka และ Shahidi, 2004)



ภาพที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร gallic acid (◆), protocatechuic acid (□), gentisic acid (▲), vanillic acid (×), p-hydroxybenzoic acid (+), syringic acid (●), caffeic acid (◇), p-coumaric acid (■), chlorogenic acid (△) 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 รัตนานพนนท์. 2549. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 487 หน้า.
- ปราโมทย์ คูวิจิตรจากรู. 2549. น้ำกึ่งวิกฤติ (subcritical water) และการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร. วารสารจรรยา Food & Health 14: 51-53.
- ยุทธนา พิมพ์ศิริผล. 2553. เทคนิคการประเมินอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร. บริษัท นพบุรีการพิมพ์ จำกัด. เชียงใหม่. 123 หน้า.
- 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, P. 52-76 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., 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Khuwijitjaru, P. 2004. Solubility of fatty acids and hydrolysis of their esters in subcritical water. Dissertation. Kyoto: Kyoto University. 44 p.
- Khuwijitjaru, 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 extracton. 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 gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. *Food Chemistry*, 110: 881–890.
- Liazid, A., Palma, M., Brigui, 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.
- Miller, D. J. and Hawthorne, S. B. 1998. Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water. *Analytical Chemistry*, 70(8): 1618-1621.
- Naczki, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95–111.

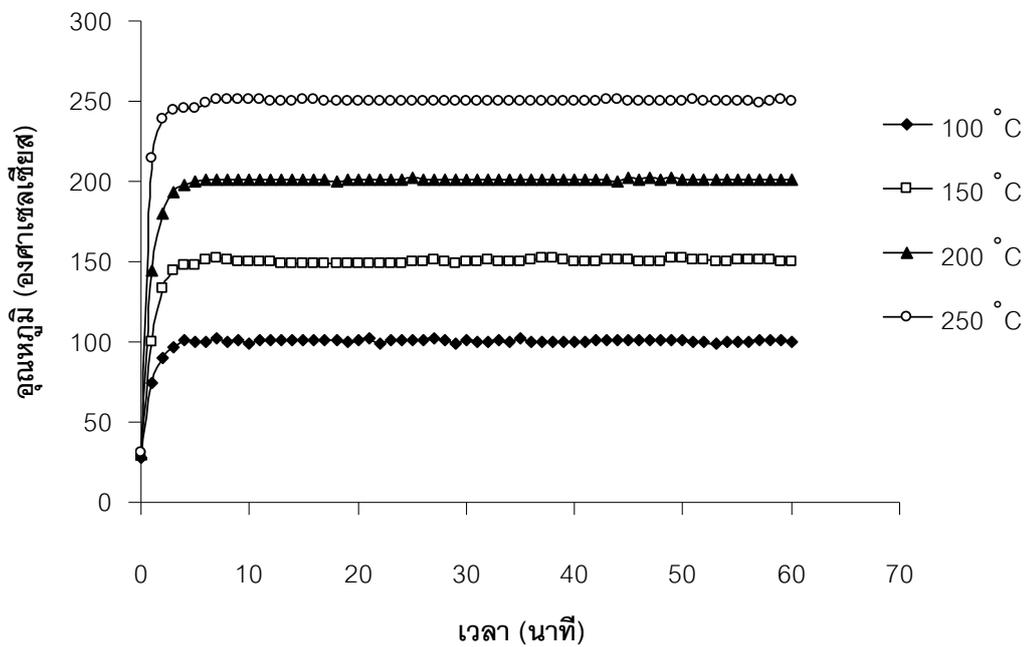
- Ozel, M. Z. and Kaymaz, H. 2004. Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 379: 1127-1133.
- Palma, M., Piñeiro, Z. and Barroso, C. G. 2001. Stability of phenolic compounds during extraction 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.
- 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., Yoshida, H. 2010. Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. Chemical Engineering Journal, 160: 259–266.
- Rangswiwong, 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.
- Van Boekel, M. A. J. S. 2008. *Kinetic Modeling of Reactions in Foods*. CRC Press. Boca Raton.
- 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
การให้ความร้อนด้วยน้ำกึ่งวิกฤต

การให้ความร้อนกับสารละลายสารประกอบฟีนอลิกด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิ 100, 150, 200 และ 250 องศาเซลเซียส สามารถแสดงการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิภายใน batch-type reactor เมื่อตั้งค่าที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้ดังภาพที่ 30



ภาพที่ 20 การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิภายใน batch-type reactor เมื่อตั้งค่าที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วย 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 มิลลิเมตรสำหรับ 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 และกำจัดฟองก๊าซออกด้วยอ่างอุลตราโซนิก 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 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

1.2.2 กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC

1.2.3 นำค่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดหาความสัมพันธ์ในรูปของสมการเส้นตรง

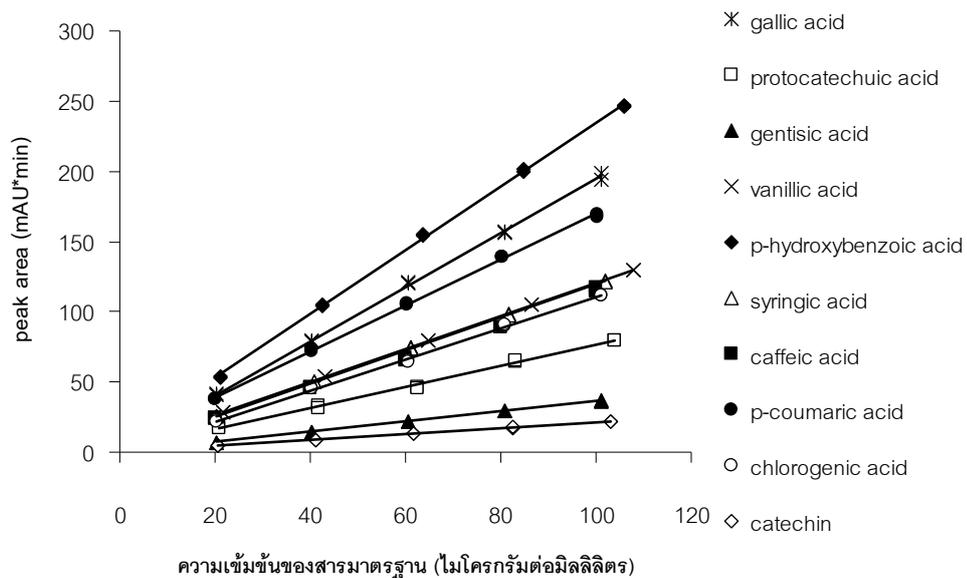
สมการเส้นตรงของสารมาตรฐานที่ได้เป็นดังนี้

$$\text{gallic acid} \quad y = 1.9242x + 2.1786, R^2 = 0.9991$$

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)

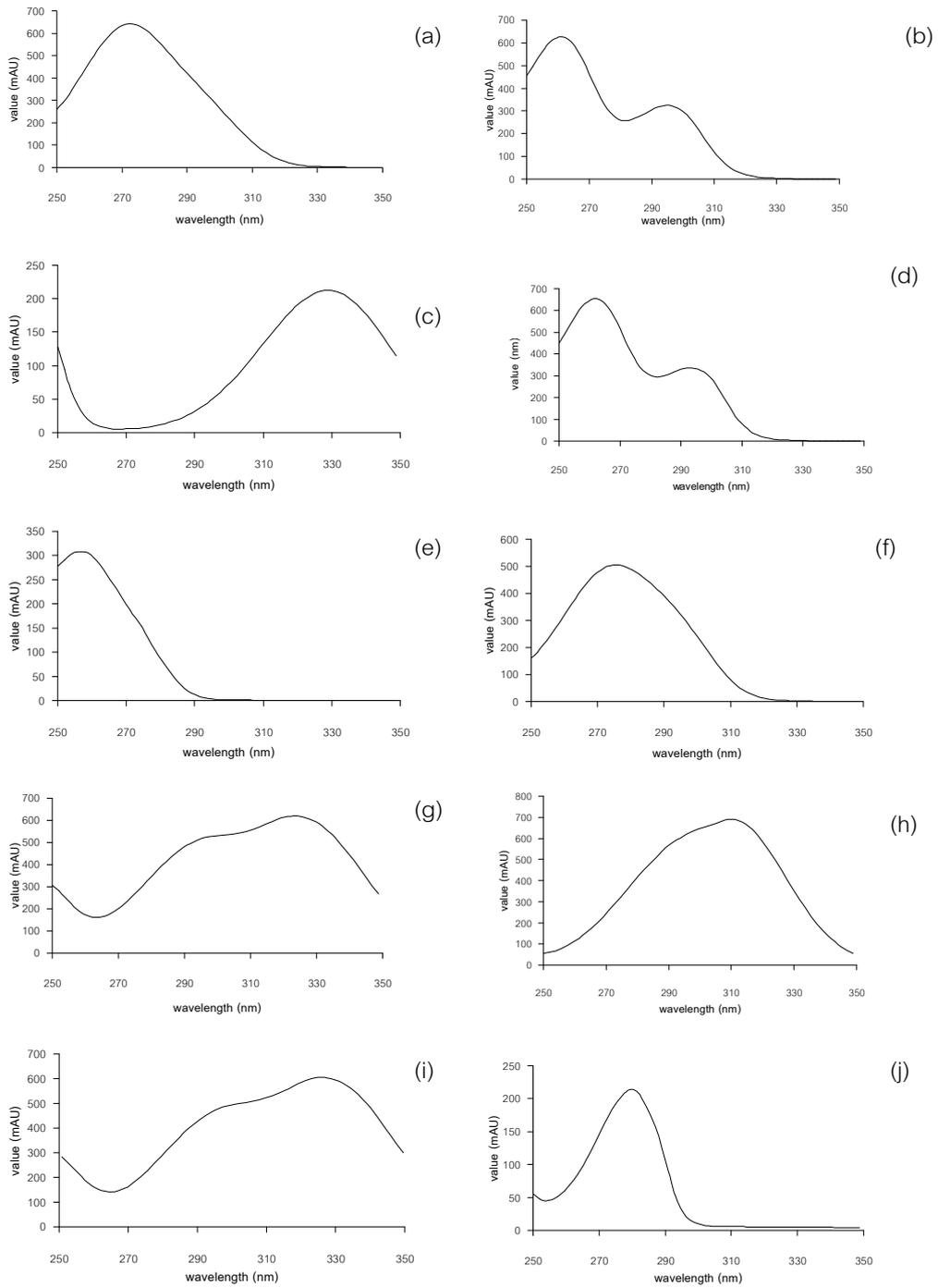
$x =$ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

1.3 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

กรองตัวอย่างผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับค่า retention time และเส้นสเปกตรัม (ภาพที่ 32) กับสารมาตรฐาน และคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานแต่ละชนิด



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

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

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10

2.1.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 7.5

2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

2.2.1 ชั่งสารกรดแกลลิกมาตรฐาน 0.0100 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนได้ 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 เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 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 ความเข้มข้นร้อยละ 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

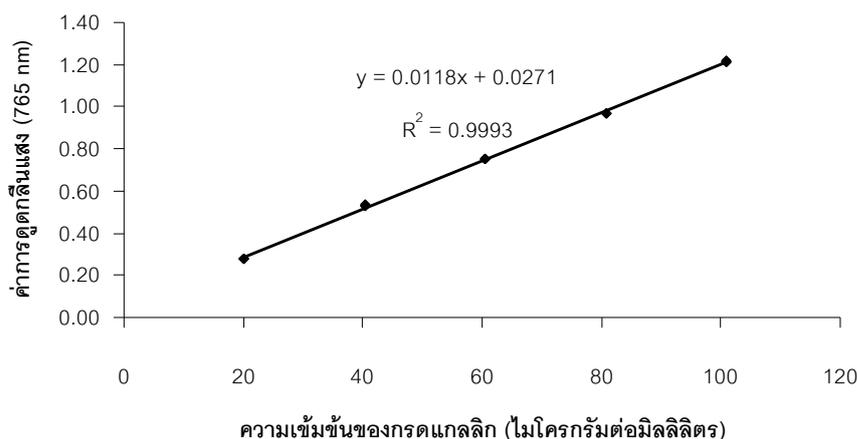
2.3.2 เติมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 3 นาที

2.3.3 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม

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 Na_2CO_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

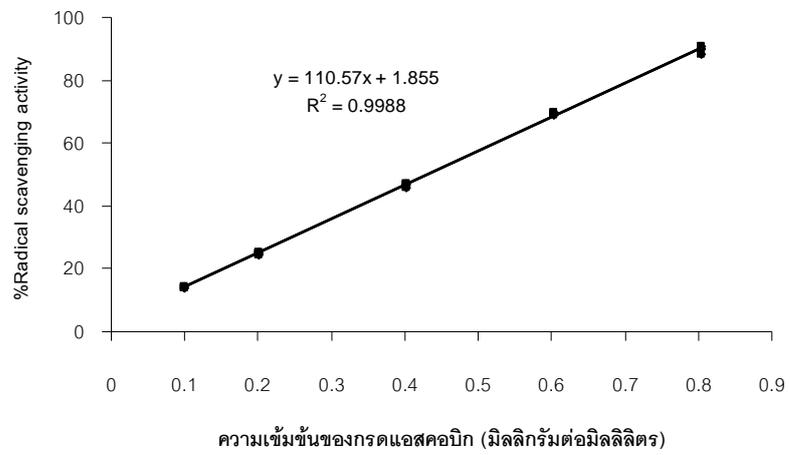
3.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ในขวดสีชา

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

ต้นฉบับบทความวิจัยสำหรับตีพิมพ์ในวารสาร
The Canadian Journal of Chemical Engineering

Subject: The Canadian Journal of Chemical Engineering - Decision on Manuscript ID
CJCE-13-0159.R1
From: jsoares@uwaterloo.ca
Date: 13/5/2556 4:09
To: kpramote@su.ac.th, pramote.khuwijitjaru@gmail.com

12-May-2013

Dear Dr. Khuwijitjaru,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Degradation Kinetics of Some Phenolic Compounds in Subcritical Water and Radical Scavenging Activity of Their Degradation Products" in The Canadian Journal of Chemical Engineering. The article will soon be reviewed by the Editorial Assistant to ensure all formats have been met prior to exporting for typesetting. Please note the article has been conditionally accepted until all formatting requirements have been met. She will liaise with you soon.

Thank you for your fine contribution.

Sincerely,

Prof. Joao Soares
Editor-in-Chief, The Canadian Journal of Chemical Engineering
jsoares@uwaterloo.ca

Reviewing: 1
Comments to the Author
I am pleased with the answer from authors.

Reviewing: 2
Comments to the Author
I confirmed that all the sentences pointed out have adequately been revised.



**Degradation Kinetics of Some Phenolic Compounds in
Subcritical Water and Radical Scavenging Activity of Their
Degradation Products**

Journal:	<i>The Canadian Journal of Chemical Engineering</i>
Manuscript ID:	CJCE-13-0159.R1
Wiley - Manuscript type:	Article
Date Submitted by the Author:	03-May-2013
Complete List of Authors:	Khuwijtjaru, Pramote; Silpakorn University, Department of Food Technology, Faculty of Engineering and Industrial Technology Plernjit, Jiraporn; Silpakorn University, Suaylam, Boonyanuch; Silpakorn University, Samuhaseneetoo, Suched; Silpakorn University, Pongsawatmanit, Rungnaphar; Kasetsart University, Department of Product Development, Faculty of Agro-Industry Adachi, Shuji; Kyoto University, Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture
Keywords:	Kinetics and mechanisms of reactions

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Degradation Kinetics of Some Phenolic Compounds in Subcritical Water and Radical Scavenging Activity of Their Degradation Products

Pramote Khuwijitjaru^{1*}, Jiraporn Plernjit¹, Boonyanuch Suaylam¹, Suched Samuhaseneetoo¹, Rungnaphar Pongsawatmanit², Shuji Adachi³

1. Department of Food Technology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

2. Department of Product Development, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

3. Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

***Corresponding author:**

Tel.: +66-034-219361; Fax: +66-034-272194

E-mail: kpramote@su.ac.th (P. Khuwijitjaru)

ABSTRACT

The degradation of ten phenolic compounds including nine phenolic acids (caffeic, chlorogenic, *p*-coumaric, gallic, gentisic, *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, syringic and vanillic acids) and one flavanol (catechin) in subcritical water at the initial concentration of 100 mg/L was investigated in a temperature range of 100 – 250°C for 30 – 120 min in a batch-type vessel. The degradation process followed the first-order kinetics model. After treatment at 250°C for 30 min, all the compounds completely disappeared. We also demonstrated that the subcritical water treatment of some phenolic compounds, especially, caffeic acid, resulted in products that were quite stable at high temperature and exhibited a high DPPH radical scavenging activity, i.e., retaining about 50% of the DPPH radical scavenging activity compared to the original caffeic acid solution after the treatment at 250°C for 120 min.

Keywords: Polyphenol; Flavonoids; Decarboxylation; Superheated water; Thermal stability

INTRODUCTION

In recent years, several studies have shown that subcritical water, i.e., water in the temperature range of 100 - 374°C under pressure that is high enough to keep it in liquid state, can be used as an extractant for various groups of compounds.^[1-3] The extraction of phenolic compounds from agricultural materials is one of the applications of subcritical water.^[4-7] Some advantages of subcritical water extraction over others conventional organic solvent extraction methods have been demonstrated in these studies, e.g., it is an environmental friendly method and has a high efficiency for the extraction of phenolic compounds.

Even though several authors have discussed the fact that the decomposition of phenolic compounds might occur during an extraction process under such severe conditions of subcritical water extraction, there has not been many studies to support this. Until now, only a few studies have reported data of phenolic compound degradation in subcritical water. González et al.^[8] studied the degradation of vanillic acid under sub- and supercritical water conditions and showed that the first-order kinetics was applicable for describing the reaction. More recently, Lindquist and Yang^[9] showed that syringic acid underwent a decarboxylation reaction in subcritical water to form syringol at temperatures higher than 150°C and the acid was completely degraded after treatment at 250°C for 30 min. Catechin degradation was studied in the temperature range of 25-165°C.^[10,11]

In addition, it has been suggested by several authors that the higher antioxidant activity from extracts at high temperatures using subcritical water was due to the higher amount

1
2
3 of phenolic compounds extracted and also from the Maillard reaction, caramellization
4 and thermal oxidation products.^[12, 13] However, in a different field of study, Guillot et
5 al.^[14] reported that the pyrolysis of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids resulted in
6 products that exhibited much higher antioxidative activities. The main products identified
7 earlier by Stadler et al.^[15] from pyrolysis of caffeic acid at 225°C were cyclocondensed
8 dimers and polymers. Since these products could be also formed by acid treatment,^[15] we
9 expected that it might be possible to obtain similar types of products from the subcritical
10 water treatment of phenolic compounds as well.

11
12
13 Due to the lack of these kinds of data, especially for a kinetic analysis, the objectives
14 of this study were to kinetically evaluate the degradation of ten phenolic compounds,
15 including nine phenolic acids and one flavanol, and to evaluate the DPPH radical
16 scavenging activity of these phenolic compound solutions which may lead to the
17 possibility of finding novel and efficient antioxidants by the chemical reaction of
18 phenolic compounds in subcritical water.

19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 **MATERIALS AND METHODS**

40 41 42 43 44 *Reagents*

45
46
47
48
49 The phenolic compounds used for the stability testing in this study were caffeic acid (\geq
50 95%, Fluka, China), chlorogenic acid (\geq 95%, Aldrich, India), *p*-coumaric acid (\geq 98%,
51 Fluka, UK), gallic acid (monohydrate, \geq 98%, Sigma, MO, USA), gentisic acid (sodium
52 salt hydrate, \geq 98%, Aldrich, MO, USA), *p*-hydroxybenzoic acid (\geq 99%, Aldrich,
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Steinheim, Germany), protocatechuic acid ($\geq 97\%$, Aldrich, Steinheim, Germany),
4 syringic acid ($\geq 95\%$, Sigma, UK), vanillic acid ($\geq 97\%$, Fluka, China) and catechin
5
6 (hydrate, $\geq 96\%$, Fluka, Indonesia). **The structures of phenolic compounds tested are**
7
8 **shown in Figure 1.** Pyrocatechol ($\geq 99\%$) was obtained from Aldrich (India). 4-
9
10 Ethylcatechol ($\geq 95\%$) was obtained from Aldrich (Germany). Folin-ciocalteu's phenol
11
12 reagent was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). DPPH (2,2-diphenyl-1-
13
14 picrylhydrazyl) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). L-Ascorbic
15
16 acid ($\geq 99\%$) was obtained from Ajax Finechem (NSW, Australia).
17
18
19
20
21
22
23
24

25 *Subcritical Water Treatment*

26
27
28
29
30 A solution of each phenolic compound (100 mg/L) was prepared in distilled water. A
31
32 sample (2.6 mL) was added to a 3.3-mL stainless steel vessel (108 × 9 mm o.d.)
33
34 fabricated by Nana Siam Intertrade (Bangkok, Thailand). The vessel was tightly closed
35
36 and heated in a silicone fluid bath at the specified temperatures (100, 150, 200 and
37
38 250°C). After the heat-up period for each treatment temperature (4, 6, 6 and 7 min,
39
40 respectively), the vessel was immediately cooled to stop the reaction and the remaining
41
42 concentration of each phenolic compound was considered as the initial concentration for
43
44 kinetics analysis. **Heating-up period resulted in decomposition of phenolic compounds**
45
46 **but less than 30 % for all conditions tested.** The treatment times (30, 60, 90 and 120 min)
47
48
49 were started after the heat-up period. Because the volume of the solution in the vessel
50
51 was *ca.*78.8%, the pressure inside the vessel was equal to the saturated vapor pressure of
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 water at that treatment temperature, i.e., 0.10, 0.48, 1.56 and 3.98 MPa, respectively. All
4
5 heating experiments were performed in triplicate.
6
7
8
9

10 *Quantitative Analysis of Phenolic Compounds*

11
12
13

14
15 The HPLC analyses were performed using a high pressure pump (P680) unit equipped
16
17 with a photodiode array detector (PDA-100) from Dionex (CA, USA). A reversed phase
18
19 separation was achieved on an Inertsil ODS-3 (250 × 4.6 mm, GL Science, Tokyo, Japan)
20
21 for the gallic and protocatechuic acids and on a Luna 5 μ C18 (150 × 4.6 mm,
22
23 Phenomenex, CA, USA) for the caffeic, chlorogenic, *p*-coumaric, gentisic, *p*-
24
25 hydroxybenzoic, syringic and vanillic acids and catechin. The mobile phase in all the
26
27 determinations was water/acetic acid/methanol (80/5/15 v/v) at the flow rate of 1.0
28
29 mL/min. *p*-Hydroxybenzoic acid was monitored at 250 nm, vanillic acid was monitored
30
31 at 270 nm, caffeic, *p*-coumaric, gallic, protocatechuic and syringic acids and catechin
32
33 were monitored at 280 nm, while the chlorogenic and gentisic acids were monitored at
34
35 320 nm.
36
37
38
39
40
41
42
43

44 *Total Phenolic Content (TPC)*

45
46
47
48

49 The TPC of the treated solutions was evaluated based on the reaction of the phenolic
50
51 compounds with Folin-ciocalteu reagent as described by Maisuthisakul et al.^[16] The TPC
52
53 was calculated as mg gallic acid equivalent (mg GAE).
54
55
56
57
58
59
60

DPPH Assay

The DPPH radical scavenging activity of the treated solutions was determined by mixing 50 μ L of the sample with 5 mL of a 0.1 mM DPPH solution. The absorbance of the mixture was measured at 517 nm after storage in the dark for 120 min. The radical scavenging activity was calculated from:

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A_C - A_S)}{A_C} \times 100 \quad (1)$$

where A_C and A_S were the absorbances of the DPPH solution without and with sample, respectively. Solutions of L-ascorbic acid (0.1-0.8 mg/mL) were used for calculating the ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (g AAEC/g).

RESULTS AND DISCUSSION

Degradation of Phenolic Compounds

Phenolic compounds tested in this study can be classified according to their chemical structures as benzoic acid derivatives (gallic, gentisic, protocatechuic, syringic, *p*-hydroxybenzoic, and vanillic acids), cinnamic acid derivatives (chlorogenic, caffeic and *p*-coumaric acids) and flavanol (catechin). The degradation of the ten phenolic compounds in subcritical water at 100 - 250°C was monitored for 30-120 min in a batch-type reactor. As expected, all the compounds degraded as the temperature and treatment time increased. However, each compound degraded at a different rate. At 100 and 150°C,

1
2
3 the degradation process of all the phenolic compounds could be described by the first-
4
5 order kinetics according to eq. (1):
6

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

7
8
9
10 where C and C_0 are the concentration of the tested phenolic compounds at time t and the
11
12 initial concentration, respectively, and k is the reaction rate constant. Typical first order
13
14 kinetic plots for all the compounds tested at 150°C are shown in Fig. 2 (a) and a plot for
15
16 each temperature for chlorogenic acid is shown in Fig. 2(b). A first-order kinetics model
17
18 was also used for describing the degradation of vanillic acid in the sub- and super-critical
19
20 water regions.^[8] The degradation rate constants for each compound are listed in Table 1.
21
22 However, at 200 and 250°C, the phenolic compounds degraded much faster. Only the
23
24 chlorogenic, *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic and syringic acids were present at 200°C
25
26 after 60 min or longer, while at 250°C, all the phenolic compounds completely degraded
27
28 after 30 min of treatment, and therefore, the kinetic data could not be derived at this
29
30 temperature. Lindquist and Yang^[9] also reported that benzoic acid and its derivatives
31
32 were almost completely degraded at 250°C within 10 min.
33
34
35
36
37
38

39
40 Lindquist and Yang^[9] indicated that substituent groups on the ring structure, such as
41
42 amino, hydroxyl and methoxyl, acted as an activating group which helps the thermal
43
44 decarboxylation of benzoic acid derivatives under subcritical water conditions.
45
46 Comparison of k values at 150°C (Table 1) indicated that gallic acid, which contains
47
48 three hydroxyl groups on its ring, decomposed much faster than other benzoic acid
49
50 derivatives (protocatechuic, syringic, vanillic, gentisic and *p*-hydroxybenzoic acids). This
51
52 may suggest that methoxyl group did not affect much on promoting of decarboxylation of
53
54 benzoic acid derivatives in subcritical water conditions. Contrastingly, caffeic acid,
55
56
57
58
59
60

1
2
3 which contains two hydroxyl groups, decomposed as fast as caffeic acid. Carboxylic
4 group on the acrylic acid side chain might be easily decarboxylated than carboxylic group
5
6 attached to the benzene ring. This was also true for *p*-coumaric acid in comparison with
7
8 syringic, *p*-hydroxybenzoic and vanillic acids, which contain only one hydroxyl group.
9
10 The structure of catechin is different from phenolic acids and therefore decomposition
11
12 mechanism might be different.
13
14
15
16

17 The Arrhenius plots for the degradation of chlorogenic, *p*-hydroxybenzoic,
18
19 protocatechuic and syringic acids are shown in Fig. 3 and the activation energies for their
20
21 degradation were estimated (Table 1). González et al.^[8] reported the average activation
22
23 energy for the degradation of vanillic acid in the subcritical water region (280 to 350 °C)
24
25 to be 57 kJ/mol. This was, in fact, in agreement with our result because higher activation
26
27 energy means that the temperature dependency is high, and therefore, the vanillic acid
28
29 degraded at a very high rate at the higher temperatures. Previous studies have shown that
30
31 the decarboxylation of phenolic acid might have occurred under subcritical water
32
33 conditions. González et al.^[8] specified that the main decomposition reaction for vanillic
34
35 acid was decarboxylation reaction and the product was guaiacol. Lindquist and Yang^[9]
36
37 have also shown that the product of syringic acid degradation in subcritical water was its
38
39 decarboxylated compound, syringol. Nevertheless, Stadler et al.^[15] also found that under
40
41 pyrolysis at 225-226°C, besides decarboxylation, other reactions including the
42
43 cyclocondensation of caffeic acid to form dimers and polymers also occurred. On the
44
45 other hand, catechin can undergo both degradation and epimerization.^[10, 11]
46
47
48
49
50
51
52

53 Identification of the products from the subcritical water treatment of caffeic acid at
54
55 250°C for 120 min was performed. The HPLC analysis using an Inertsil ODS-3 column
56
57
58
59
60

1
2
3 (250 × 4.6 mm, GL Science, Tokyo, Japan), methanol and 0.5% acetic acid (20:80 v/v) as
4 a mobile phase and a UV detection at 280 nm (SPD-M20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)
5 revealed that only small amount of the decarboxylated products, i.e., pyrocatechol
6 (retention time 6.1 min), was present in the treated solution (Fig 4.) while 4-ethyl-
7 catechol (retention time 43.0 min) was not detectable after the treatment under these
8 conditions. However, another large unknown peak at 7.3 min was observed.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 *TPC*

21
22
23
24
25 The TPC evaluated by the Folin-ciocalteu reagent can help in estimating the total
26 amount of phenolic compounds in the solution that could not be identified by the HPLC
27 analysis. Plotting the TPC of the subcritical water treated solution (TPC/TPC_0), in which
28 TPC_0 is the initial TPC value of the solution, and the fraction of degraded phenolic
29 compound ($1-C/C_0$), one can differentiate the phenolic compounds into two groups which
30 could be well exemplified by the gallic and caffeic acids, as shown in Fig. 5. For the
31 gallic acid, the TPC value decreased with the amount of gallic acid at the ratio of
32 approximately 1:1. This may suggest that the products from the gallic acid degradation
33 did not contain phenol structure or those products were thermally labile and thus readily
34 decomposed under these conditions. On the other hand, the caffeic acid degradation did
35 not give a linear relationship with the TPC value. The TPC gradually decreased with the
36 caffeic content to about 50% at 100 and 150°C. While the HPLC result indicated that all
37 the caffeic acid was absent after a 30-min treatment at 200°C, the TPC value was still
38 detectable at a high level (*ca.* 80%) and then gradually decreased with the treatment time
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 to *ca.* 47% after 120 min. A similar pattern also occurred at 250 °C with somewhat
4
5 higher TPC values at every treatment time. These results suggested that the degradation
6
7 products of caffeic acid contain the phenol structure and were very stable in subcritical
8
9 water even after treatment at 250 °C for 120 min. Similar results were also observed for
10
11 chlorogenic acid, vanillic acid and catechin.
12
13
14
15
16
17

18 *DPPH Radical Scavenging Activity*

19
20
21
22
23 Phenolic compounds act as hydrogen or electron-donating agents and therefore exhibit
24
25 free radical scavenging activities. For the phenolic acids, their free radical scavenging
26
27 activities depend on the number and position of hydroxyl groups in the molecules.^[17]
28
29

30 Among the ten compounds studied, the gallic, protocatechuic and caffeic acids, in
31
32 respective order, possessed the highest DPPH radical scavenging activity prior to the
33
34 subcritical water treatment (Table 2). Phenolic compounds Fig. 6 shows the changes in
35
36 the DPPH radical scavenging activity ($DPPH/DPPH_0$), where $DPPH_0$ is the initial DPPH
37
38 radical scavenging activity of the solution, with the degraded fraction of the phenolic
39
40 compound for the gallic and caffeic acids. The patterns were similar to their
41
42 corresponding TPC values in Fig. 5. This suggested that the degradation products from
43
44 gallic acid possessed no radical scavenging activity at all, while the degradation products
45
46 from caffeic acid exhibited a radical scavenging activity as high as 90% of the caffeic
47
48 acid. As shown in Fig. 3, only small peak of pyrocatechol was observed in the treated
49
50 caffeic acid solution and since it is known that pyrocatechol possess *ca.* 50-80%
51
52 antioxidant activity compared to caffeic acid,^[18, 19] therefore the large unknown peak
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 should be a major contribution to the DPPH radical scavenging activity of the treated
4
5
6 solution.

7
8
9
10 *Relationship between Degradation Rate Constant and DPPH Radical*
11
12 *Scavenging Activity*
13
14

15
16
17
18 We found that the degradation rate constant, k , of phenolic compounds at 100 and
19
20 150°C positively correlated with the DPPH radical scavenging activities of the
21
22 compounds prior to the subcritical water treatment (Fig. 7). The DPPH radical
23
24 scavenging activity of phenolic acids usually depends on the number and position of the
25
26 hydroxyl groups in the ring structure.^[17] As the DPPH radical scavenging activity of the
27
28 compound became higher, the higher the difference in k between 100 and 150°C. These
29
30 results revealed one of the important issues in subcritical water extraction. During the
31
32 phenolic compound extraction process, it is preferable to obtain compounds with a high
33
34 antioxidative activity. This study, however, demonstrated that highly antioxidative active
35
36 compounds might be highly susceptible to degradation under these conditions and
37
38 therefore an accurate control of the temperature and time during the extraction process is
39
40 critical to obtain these compounds.
41
42
43
44
45
46
47
48

49 **CONCLUSION**
50
51

52
53
54 This work demonstrated that the degradation of some phenolic acids and flavanol
55
56 (catechin) in subcritical water in the temperature range of 100 – 200°C for 30 – 120 min
57
58
59
60

1
2
3 could be described by the first-order kinetics model, and at 250°C, all compounds tested
4
5 completely degraded in 30 min. In addition, we also demonstrated that the degradation
6
7 products of some phenolic compounds, especially caffeic acid, possessed a phenol
8
9 structure, exhibited a DPPH radical scavenging activity and were very stable even after
10
11 treatment at 250°C for 120 min.
12
13
14
15
16
17

18 **ACKNOWLEDGEMENT**

19
20 This work was supported by a co-funded project between the Thailand Research Fund,
21
22 Office of the Higher Education Commission and Faculty of Engineering and Industrial
23
24 Technology, Silpakorn University (MRG5380123), and partly supported by a grant from
25
26 the Silpakorn University Research and Development Institute (SURDI 53/01/06).
27
28
29
30
31

32 **REFERENCES**

- 33
34
35
36
37 [1] J. Wiboonsirikul, S. Adachi, Food Sci. Technol. Res. **2008**, *14*, 319.
38
39
40 [2] M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibañez, Food Chem. **2006**, *98*, 136.
41
42
43 [3] C. C. Teo, S. N. Tan, J. W. H. Yong, C. S. Hew, E. S. Ong, J. Chromatogr. A **2010**,
44
45 *1217*, 2484.
46
47
48
49 [4] P. Khuwijitjaru, K. Chaloodong, S. Adachi, Food Sci. Technol. Res. **2008**, *14*, 1.
50
51
52
53 [5] Z. Y. Ju, L. R. Howard, J. Food Sci. **2005**, *70*, S270.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [6] P. Khuwijitjaru, N. Sayputikasikorn, S. Samuhasaneetoo, P. Penroj, P.
4
5 Siritwongwilaichat, S. Adachi, *J. Oleo Sci.* **2012**, *61*, 349.
6
7
8
9 [7] N. Viriya-Empikul, J. Wiboonsirikul, T. Kobayashi, S. Adachi, *Food Sci. Technol.*
10
11 *Res.* **2012**, *18*, 333.
12
13
14
15 [8] G. González, J. Salvadó, D. Montané, *J. Supercrit. Fluid.* **2004**, *31*, 57.
16
17
18 [9] E. Lindquist, Y. Yang, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2146.
19
20
21 [10] R. Wang, W. Zhou, X. Jiang, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2694.
22
23
24 [11] R. Wang, W. Zhou, R.-A. H. Wen, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5924.
25
26
27
28 [12] M. Plaza, M. Amigo-Benavent, M. D. del Castillo, E. Ibáñez, M. Herrero, *Food Res.*
29
30 *Int.* **2010**, *43*, 2341.
31
32
33 [13] M. Plaza, M. Amigo-Benavent, M. D. del Castillo, E. Ibáñez, M. Herrero, *Food Res.*
34
35 *Int.* **2010**, *43*, 1123.
36
37
38 [14] F. L. Guillot, A. Malnoë, R. H. Stadler, *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2503.
39
40
41 [15] R. H. Stadler, D. H. Welti, A. A. Stämpfli, L. B. Fay, *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*,
42
43 898.
44
45
46
47 [16] P. Maisuthisakul, M. Suttajit, R. Pongsawatmanit, *Food Chem.* **2007**, *100*, 1409.
48
49
50 [17] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Free Radical Bio. Med.* **1996**, *20*, 933.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 [18] L. K. Shpigun, M. A. Arharova, K. Z. Brainina, A. V. Ivanova, *Anal. Chim. Acta*
4
5 **2006**, 573-574, 419.
6
7

8
9 [19] D. Christodouleas, C. Fotakis, K. Papadopoulos, E. Yannakopoulou, A. C.
10
11 Calokerinos, *Anal. Chim. Acta* **2009**, 652, 295.
12
13

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1 Structures of phenolic compounds tested.

Figure 2 First-order kinetics plots for phenolic compounds fraction (C/C_0) remaining in subcritical water at (a) 150°C for caffeic (○, $R^2 = 0.8741$), chlorogenic (●, $R^2 = 0.8469$), *p*-coumaric (□, $R^2 = 0.9097$), gallic (■, $R^2 = 0.9100$), gentisic (△, $R^2 = 0.9431$), *p*-hydroxybenzoic (▲, $R^2 = 0.9264$), protocatechuic (▽, $R^2 = 0.9461$), syringic (▼, $R^2 = 0.9645$) and vanillic acids (◇, $R^2 = 0.7101$) and catechin (◆, $R^2 = 0.8445$) and at (b) 100 (◇, $R^2 = 0.9880$), 150 (□, $R^2 = 0.8469$) and 200 °C (△, $R^2 = 0.7579$) for chlorogenic acid.

Figure 3 Arrhenius plots for degradation of chlorogenic (○, $R^2 = 0.9976$), *p*-hydroxybenzoic (△, $R^2 = 0.8429$), protocatechuic (□, $R^2 = 0.9254$) and syringic acids (◇, $R^2 = 0.9973$).

Figure 4 HPLC analysis (UV detection at 280 nm) of subcritical water treated caffeic acid at 250°C for 120 min.

Figure 5 Changes in the total phenolic content (TPC/TPC₀) of the solution with degraded fraction of gallic (open symbol) and caffeic (closed symbol) acids ($1-C/C_0$) after subcritical treatment at 100 (◇, ◆), 150 (□, ■), 200(△, ▲) and 250°C (○, ●).

1
2
3 **Figure 6** Changes in the DPPH scavenging activity ($DPPH/DPPH_0$) of the solution with
4 degraded fraction of gallic (open symbol) and caffeic (closed symbol) acids ($1-C/C_0$)
5 after subcritical treatment at 100 (\diamond , \blacklozenge), 150 (\square , \blacksquare), 200(\triangle , \blacktriangle) and 250°C (\circ , \bullet).
6
7
8
9
10

11
12 **Figure 7** Relationships between the DPPH scavenging activities of the phenolic
13 compounds and the degradation rate constants, k , at 100 (\bullet) and 150°C (\square). Dotted lines
14 were drawn empirically.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1 Degradation kinetics parameters for phenolic compounds in subcritical water.

Compounds	Temperature (°C)	Rate constant, $k \times 10^3$ (min ⁻¹)*	Activation energy (kJ/mol)*
Caffeic acid	100	7.8 ± 0.6	-
	150	28.0 ± 2.1	
Chlorogenic acid	100	6.1 ± 0.3	28.4 ± 0.4
	150	18.4 ± 1.1	
	200	42.3 ± 1.9	
<i>p</i> -Coumaric acid	100	1.7 ± 0.3	-
	150	7.1 ± 0.8	
Gallic acid	100	5.9 ± 0.3	-
	150	32.2 ± 3.8	
Gentisic acid	100	4.3 ± 0.2	-
	150	16.1 ± 1.9	
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	100	0.7 ± 0.1	48.1 ± 2.5
	150	3.8 ± 0.5	
	200	18.8 ± 0.2	
Protocatechuic acid	100	3.3 ± 0.1	41.9 ± 11.9
	150	8.3 ± 0.3	
	200	60.7 ± 2.1	
Syringic acid	100	1.9 ± 0.2	35.3 ± 1.7
	150	6.6 ± 0.9	
	200	21.2 ± 0.6	
Vanillic acid	100	0.8 ± 0.1	-
	150	1.6 ± 0.1	
Catechin	100	11.7 ± 0.8	-
	150	20.6 ± 0.7	
Vanillic acid	280-350	-	57 [8]

*Data are expressed as estimated value ± standard error of estimation from linear regression.

Table 2 DPPH radical scavenging of phenolic acid compounds.

Compounds	DPPH radical scavenging activity (g AAEAC/g)*
Caffeic acid	2.37 ± 0.09
Chlorogenic acid	1.39 ± 0.12
<i>p</i> -Coumaric acid	0.66 ± 0.08
Gallic acid	3.16 ± 0.20
Gentisic acid	2.09 ± 0.25
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.07 ± 0.02
Protocatechuic acid	2.79 ± 0.21
Syringic acid	1.12 ± 0.09
Vanillic acid	0.30 ± 0.10
Catechin	2.29 ± 0.17

*Data are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

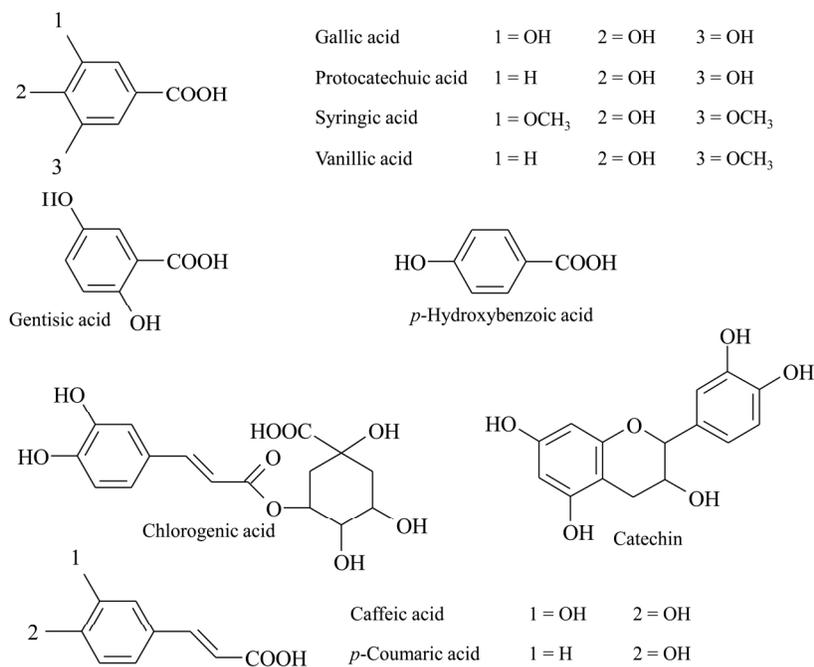


Figure 1
190x142mm (300 x 300 DPI)

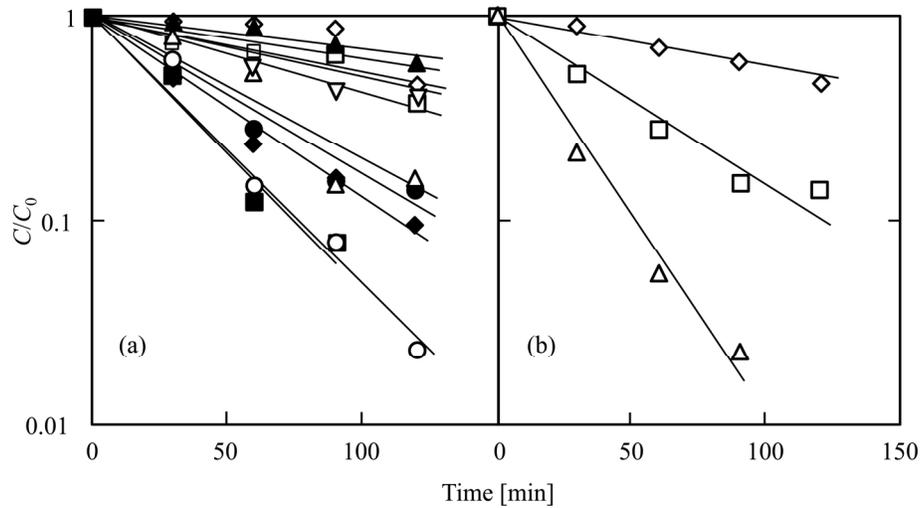


Figure 2
190x142mm (300 x 300 DPI)

Review

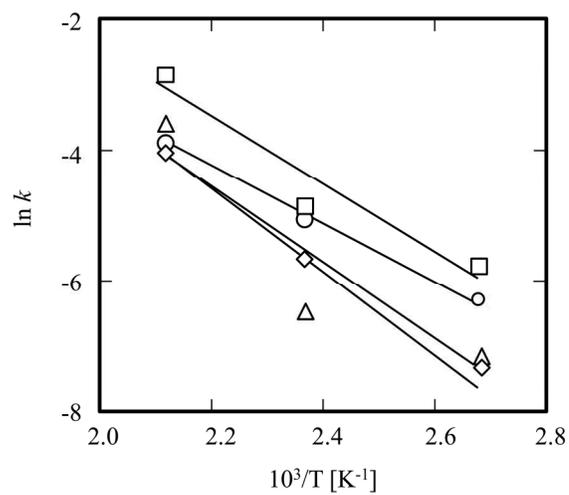


Fig 2

Figure 3
190x142mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

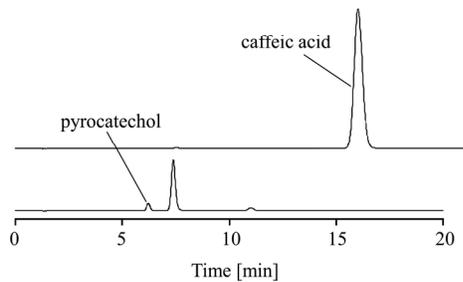


Figure 4
190x142mm (300 x 300 DPI)

review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

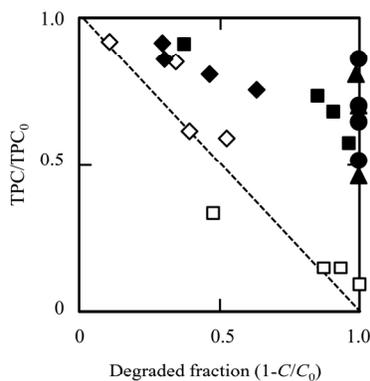


Figure 5
190x142mm (300 x 300 DPI)

review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

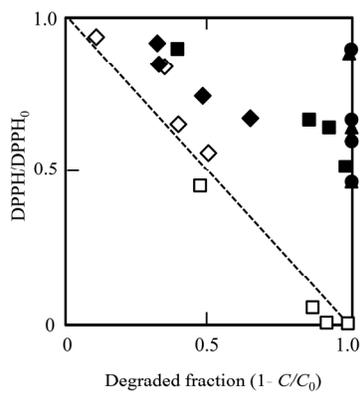


Figure 6
190x142mm (300 x 300 DPI)

Review

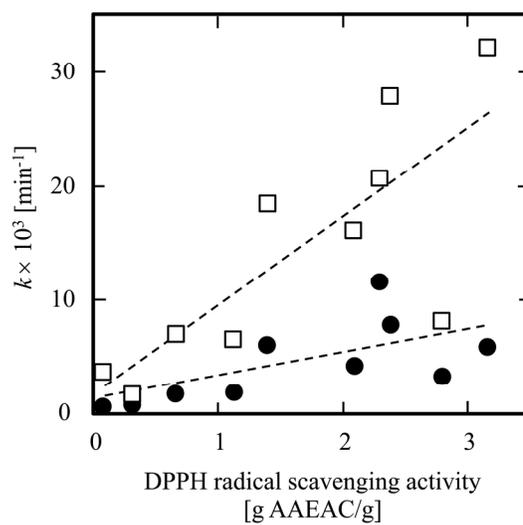


Figure 7
190x142mm (300 x 300 DPI)