รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงโดยวิธีไมโครเวฟร่วมและฤทธิต้านอนุมูลอิสระ

Optimization of Microwave Assisted Extraction for Crude Total Phenolic from *Cleistocalyx nervosum* Seeds and its antioxidant activity

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2557

จำนวน 50,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นายนักรบ นาคประสม

ผู้ร่วมโครงการ นางกาญจนา นาคประสม

ที่ปรึกษาโครงการ นางอุมาพร อุประ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

21/09/2558

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงโดยวิธีไมโครเวฟร่วมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Optimization of Microwave Assisted Extraction for Crude Total Phenolic from *Cleistocalyx nervosum* Seeds and its antioxidant activity) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2557 ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่อนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์บางอย่างที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสิ้นสมบูรณ์

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
บทที่ 1 บทนำ	3
1.1 ความสำคัญของปัญหา	3
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	5
2.1 ความรู้ทั่วไปของมะเกี๋ยง	5
2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ	6
2.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวกับการสกัดโดยวิธีไมโครเวฟ	7
2.4 การออกแบบการทดลอง	8
2.5 การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง	9
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	14
3.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเมล็ดมะเกี๋ยงอบแห้ง	14
3.2 การศึกษาการสกัดโดยวิธีไมโครเวฟร่วม	15
3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	18
บทที่ 4 ผลการวิจัย	20
4.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของเอทอลที่เหมาะสม	20
4.2 การศึกษาระยะเวลาในการสดักที่เหมาะสม	21
4.3 การศึกษากำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟที่เหมาะสม	22
4.4 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารฟีโนลิกและค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ดมะเกี๋ยงโดยใช้ไมโครเวฟ	24

สารบัญ (ต่อ)

4.5 ผลของการวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรอิสระต่อปริมาณสารฟีโนลิกแบบ Face-centered cubic design 27

4.6 ผลการวิเคราะห์ความเหมาะสมของแบบจำลอง 30

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 33

เอกสารอ้างอิง 34

ภาคผนวก 38

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2.1	ค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบพื้นฐานในผลมะเกี๋ยง	6
ตารางที่ 2.2	ค่าเฉลี่ยของวิตามินในผลมะเกี๋ยง	6
ตารางที่ 3.1	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าจริงและรหัสของตัวแปรที่ศึกษา	17
ตารางที่ 3.2	การวางแผนการทดลองด้วยวิธี Face-Centered Cubic Design	17
ตารางที่ 4.1	ปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้จากการใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกัน	20
ตารางที่ 4.2	ปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้จากการใช้ระยะเวลาในการสกัดที่แตกต่างกัน	21
ตารางที่ 4.3	ปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้จากการใช้กำลังไมโครเวฟในการสกัดที่แตกต่างกัน	23
ตารางที่ 4.4	ปัจจัยและระดับความสำคัญที่ใช้ในการทดลอง	24
ตารางที่ 4.5	ผลของการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารฟีโนลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (%Inhibition) โดยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Face-centered cubic design	25
ตารางที่ 4.6	การวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอย (regression coefficient) จากค่าเฉลี่ยของปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดในแผนการทดลอง Face-centered cubic design	30
ตารางที่ 4.7	เปรียบเทียบปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้จากการทดลองและสมการทำนายการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง	31

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 2.1	การออกแบบ Box-Behnken Design (BBD)	10
ภาพที่ 2.2	การออกแบบ Face-centered cubic design (FCD)	10
ภาพที่ 3.1	แผนภูมิวิธีการเตรียมตัวอย่างเมล็ดมะเกี๋ยงอบแห้ง	14
ภาพที่ 3.2	วิธีการบดเมล็ดมะเกี๋ยงอบแห้ง (ก)เครื่องบดแฮมเมอร์มิล (ข)ผงเมล็ดมะเกี๋ยงผ่านตะแกรง	15
ภาพที่ 4.1	ผลของความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัดต่อปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมด (กำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟ 450 วัตต์ เวลา 210 วินาที)	21
ภาพที่ 4.2	ผลของระยะเวลาในการสกัดต่อปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมด (ความเข้มข้นของเอทานอล 50 % กำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟ 450 วัตต์)	22
ภาพที่ 4.3	ผลของกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟในการสกัดต่อปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมด (ความเข้มข้นของเอทานอล 50 % เวลา 210 วินาที)	23
ภาพที่ 4.4	อิทธิพลของกำลังไมโครเวฟและระยะเวลาในการสกัด ที่ความเข้มข้นของเอทานอลคงที่มีผลต่อปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้	27
ภาพที่ 4.5	อิทธิพลของกำลังไมโครเวฟและความเข้มข้นของเอทานอลที่ระยะเวลาคงที่มีผลต่อปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้	28
ภาพที่ 4.6	อิทธิพลของระยะเวลาในการสกัดและความเข้มข้นของเอทานอลที่กำลังไมโครเวฟคงที่มีผลต่อปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้	29

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงโดยวิธีไมโครเวฟร่วมและฤทธิต้านอนุมูลอิสระ

Optimization of Microwave Assisted Extraction for Crude Total Phenolic from *Cleistocalyx nervosum* Seeds and its antioxidant activity

นักรบ นาคประสม กาญจนา นาคประสม และอุมาพร อุประ

Nukrob Narkprasom, Kanjana Narkprasom and Umaporn Upra

คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่ต้องการเพิ่มมูลค่าจากของเหลือทิ้งในกระบวนการอุตสาหกรรมเกษตร ซึ่งในกระบวนการผลิตน้ำมะเกี๋ยงพร้อมดื่มนั้นมีเมล็ดที่อุดมไปด้วยสารฟีโนลิกเป็นของเหลือทิ้งของกระบวนการ ดังนั้นการสกัดโดยวิธีไมโครเวฟร่วมจึงถูกนำมาใช้สกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum*) วิธีพื้นผิวตอบสนองถูกนำมาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง และวิธี Face-centered Cubic design ถูกนำมาใช้ในการออกแบบการทดลองของตัวแปร ได้แก่ กำลังวัตต์ของไมโครเวฟ เวลาในการสกัด และความเข้มข้นของเอทานอล จากการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาสมการคณิตศาสตร์พบว่า สมการพหุนามกำลังสองแบบควอซ์ดาติกสามารถเลือกใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารฟีโนลิกของเมล็ดมะเกี๋ยงโดยวิธีไมโครเวฟร่วม ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมสามารถสกัดสารฟีโนลิกมากที่สุดและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ คือ ที่กำลังไมโครเวฟ 450 วัตต์ เวลาในการสกัด 213 วินาที และความเข้มข้นของเอทานอล 51% โดยภายใต้สภาวะนี้สามารถสกัดสาร ฟีโนลิกที่ได้จากการคำนวณ 73.884 mgGAE/gDW และจากการทดลอง 74.177±0.459 mgGAE/gDW งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงโดยวิธีไมโครเวฟร่วมนั้นมีประสิทธิภาพสูงในด้านของใช้เวลาในการสกัดน้อย แต่ได้สารสกัดปริมาณสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมความงาม อาหารเพื่อสุขภาพ และอุตสาหกรรมทางด้านเภสัชกรรม

คำสำคัญ : มะเกี๋ยง / สารฟีโนลิก / การสกัดโดยไมโครเวฟ / ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

The objective of research wants to increase value of by product from agricultural industry process which *Cleistocalyx nervosum* seeds were the wasted product in beverage process of makiang (*Cleistocalyx nervosum*). Microwave assisted extraction method was employed to extract the total phenolics from makiang seeds. The optimal conditions of microwave assisted extraction of total phenolics from makiang seeds were determined by response surface method. The variables of microwave power, extraction time and ethanol proportion on effect of total phenolics were designed the experiment by face-centered cubic design. The statistical analysis of mathematical model indicated that the quadratic polynomial model was suggested to determine the optimal conditions of the microwave assisted extraction of total phenolics form makiang seeds. The optimal conditions to receive the highest yield of total phenolics from makiang seeds and antioxidant activity were as: microwave power, 450 W; extraction time, 213 second; ethanol proportion, 51% (v/v). Under these optimal conditions, the predicted and experimental values of total phenolics from makiang seeds were 73.884 mgGAE/gDW and 74.177±0.459 mgGAE/gDW, respectively. The research showed that total phenolics from makiang seeds by microwave assisted extraction have the high efficiency in terms of high yield and antioxidant activity within short time extraction which can apply to use in cosmetic product, health food and pharmaceutical industry.

Keywords : *Cleistocalyx nervosum*, Phenolic compounds, microwave-assisted extraction, Antioxidant activity

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

มะเกี๋ยงเป็นพืชในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช สนองพระราชดำริ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ลำต้นสูง 15-20 เมตร เปลือกลำต้นเป็นสีเทาหรือน้ำตาล ยอดเป็นทรงพุ่ม เส้นผ่านศูนย์กลางทรงพุ่ม 8-5 เมตร สามารถขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด และพบมากในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และน่าน (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2539) มะเกี๋ยงเป็นไม้ผลที่มีคุณประโยชน์ อุดมด้วยวิตามินซีป้องกันโรคหวัดโรคภูมิแพ้ และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต น้ำตาล วิตามินบี1 บี2 เหล็ก แคลเซียม และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งจัดเป็นสารประกอบฟีโนลิก ช่วยในการส่งเสริมสุขภาพ ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งและโรคหัวใจ รวมถึงเป็นตัวช่วยในการทำงานของระบบประสาท (Joseph et.al., 2005) ดังนั้นคณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จึงมีการนำผลของมะเกี๋ยงมาแปรรูปในอุตสาหกรรมอาหารเป็นจำนวนมาก เช่น น้ำมะเกี๋ยงพร้อมดื่ม ไวน์มะเกี๋ยง สีผสมอาหาร และอื่นส่งผลให้เมล็ดมะเกี๋ยงกลายเป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เมล็ดมะเกี๋ยงอุดมไปด้วยสารประกอบฟีโนลิก ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของฟีนอลมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านมะเร็ง Song et al. (2011) ดังนั้นเพื่อเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งทางการเกษตร จึงนำสารสกัดฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงมาใช้ประโยชน์ โดยนำไปเพื่อผสมในอาหาร ยา และเครื่องสำอางค์ (พิมพร, 2547)

ในปัจจุบันมีเทคนิคการสกัดด้วยไมโครเวฟ เมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิมเทคนิคนี้สามารถสกัดสารได้อย่างรวดเร็ว ใช้ตัวทำละลายน้อย อัตราการสกัดสูง ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดี และต้นทุนการผลิตถูก เพราะว่าวิธีการสกัดโดยใช้ไมโครเวฟนั้นมีหลักการทำงาน คือ ไมโครเวฟให้ความร้อนแก่สารละลายโดยตรง และมีความสัมพันธ์โดยตรงกับโมเลกุลน้ำอิสระในต่อมและท่อในเซลล์ระบบของวัตถุดิบ โดยทำให้เนื้อเยื่อของพืชแตกตัวและปล่อยสารสกัดออกมากับสารละลาย (Al-Harahsheh และ Kingman, 2004). ในปัจจุบันนี้ วิธีสกัดด้วยไมโครเวฟถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดสารประกอบฟีโนลิกจากพืชวัตถุดิบชนิดต่างๆ (Sutivisedsak et al., 2009; Beejmohun et al., 2007; Kalia et al., 2008) แต่เทคนิคการสกัดโดยไมโคเวพร่วมนี้ยังไม่มีผลวิจัยในการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง

เทคนิคพื้นผิวตอบสนองถูกนำมาใช้วิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาสภาะที่เหมาะสมของปัจจัยในการสกัดโดยวิธีไมโครเวพร่วม คือ กำลังวัตต์ เวลา และสัดส่วนเอทานอล และเพื่อทำให้แน่ใจความมีประโยชน์ของสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงจึงได้ทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธีวิเคราะห์ DPPH radical scavenging ณ สภาวะที่เหมาะสมของการสกัด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงโดยวิธีไมโครเวฟร่วม ซึ่งปัจจัยในการสกัดได้แก่ กำลังวัตต์ เวลาในการสกัด และสัดส่วนเอทานอลในตัวทำละลาย
2. เพื่อศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยง โดยวิธีวิเคราะห์ DPPH radical scavenging

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งสารสกัดฟีโนลิกที่ได้สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น สบู่ แชมพู ครีมลดริ้วรอย ต่อไปได้
2. ใช้ข้อมูลที่ได้ นำไปพัฒนา และขยายผลต่อยอดสู่ระดับอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ได้

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร

2.1 ความรู้ทั่วไปของมะเกี๋ยง

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของมะเกี๋ยง

มะเกี๋ยง เป็นพืชในอันดับ Myrtales จัดอยู่ในวงศ์ Myrtaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cleistocalyx nervosum* มะเกี๋ยงมักมีดอกจำนวน 3 ดอก ติดอยู่รวมกันเป็นกลุ่มช่อดอกย่อย มีฐานดอกรูปถ้วยขนาดใหญ่กว่า 4 มิลลิเมตร ผลรูปไข่ขอบขนาน (oval-oblong) และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางผลมากว่า 1.5 เซนติเมตร มะเกี๋ยงเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ลำต้นสูง 15-20 เมตร เปลือกลำต้นเป็นสีเทาหรือน้ำตาล มีเสี้ยนค่อนข้างมาก ยอดเป็นทรงพุ่ม เส้นผ่านศูนย์กลางทรงพุ่ม 8-5 เมตร แตกกิ่งก้านปานกลาง ลักษณะผิวกิ่งอ่อนเรียบสีเขียวหรือสีเขียวปนน้ำตาล รูปสี่เหลี่ยมยาวมีสันโค้ง กิ่งแก่สีเขียวปนเทารูปทรงกระบอกเกือบกลม ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ระบบรากเป็นรากแก้ว พบมากในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และน่าน

2.1.2 คุณค่าทางโภชนาการของผลมะเกี๋ยง

ผลมะเกี๋ยงนิยมนำมาบริโภคทั้งในรูปผลสด และผลิตภัณฑ์แปรรูป ซึ่งจากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของผลมะเกี๋ยง โดยกลุ่มงานคุณค่าทางโภชนาการ และชีวเคมี กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม โดยใช้ตัวอย่างผลมะเกี๋ยงสด จำนวน 37 ตัวอย่าง ที่ออกผลในช่วงเดือน กรกฎาคม ถึงสิงหาคม มาทำการวิเคราะห์ องค์ประกอบหลัก แร่ธาตุ วิตามิน และกรดอะมิโน ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 2.1 ค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบพื้นฐานในผลมะเกี๋ยง

องค์ประกอบ	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง
ความชื้น (ร้อยละ)	86.72 ± 03.29	-
โปรตีน (ร้อยละ)	0.89 ± 0.22	6.64 + 1.29
ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)	0.31 ± 0.10	2.41 + 0.73
ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)	0.61 ± 0.19	4.57 + 0.72
ปริมาณกาก (ร้อยละ)	3.52 ± 1.20	26.32 + 4.01
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	07.95 ± 2.05	59.91 + 4.84
ค่าพลังงานทั้งหมด (กิโลแคลอรี)	38.19 ± 8.95	279.58 + 37.66
น้ำตาล (ร้อยละ)	1.94 ± 1.34	13.92 + 6.81

ที่มา : กรมวิทยาศาสตร์บริการ (2539)

ตารางที่ 2.2 ค่าเฉลี่ยของวิตามินในผลมะเกี๋ยง

ปริมาณวิตามิน	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง
วิตามินเอ (เบต้า-แคโรทีน) (IU /100 g)	625.36 ± 526.43	4574.73 ± 3708.25
วิตามินบี 2	95.89 ± 48.41	717.30 ± 280.16
วิตามินบี 1	47.66 ± 24.39	357.44 ± 154.81
วิตามินอี	0.9 ± 0.0	5.85 ± 1.28
วิตามินซี	ไม่พบ	ไม่พบ

ที่มา : กรมวิทยาศาสตร์บริการ (2539)

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) กำลังได้รับความสนใจจากคนส่วนใหญ่ เนื่องจากเชื่อว่าเป็นสารที่มีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ความสามารถในการชะลอการเสื่อมสภาพของเซลล์ในร่างกาย ความสามารถในการป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากการหืนหรือการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลในผักผลไม้ เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระได้ (เจนจิรา และประสงค์, 2554) ในหลายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ได้พิสูจน์ว่า สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง และโรคหัวใจ เป็นต้น (Chew และคณะ2008)

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (Synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระเป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant) คือ สารที่ทำลายอนุมูลอิสระ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่คือ เอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ในร่างกายเรา ที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระมีอยู่อย่างจำกัด เราจึงต้องรับประทานสารกำจัดอนุมูลอิสระพวกที่ไม่ใช่เอนไซม์ สารดังกล่าว ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระมีมากในพืชผักและผลไม้บางชนิด จึงได้มีการสนับสนุนให้รับประทานสิ่งเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น

ลักษณะสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระหรือสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนนั้นตัวสารอนุมูลอิสระจะมีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ จำเป็นต้องมีสารอื่นมาช่วยให้เกิดการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่ป้องกันสารชีวโมเลกุลที่สำคัญภายในร่างกาย เช่น ไขมัน ดีเอ็นเอ และเอนไซม์ที่สำคัญ หรือป้องกันโครงสร้างของเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ ยกตัวอย่างเช่น ฟลาโวนอยด์ กรดโฟติกและโพลีฟีนอล มีสารจำนวนมากเกินกว่าที่สามารถยกตัวอย่างได้หมด ที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ เพื่อป้องกันเซลล์จากการทำลายหรือผลเสียที่จะเกิดตามมา (บุหรัน, 2556 และไมตรี และคณะ, 2555)

2.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวกับการสกัดโดยวิธี ไมโครเวฟ

การสกัดด้วยไมโครเวฟร่วมมีประสิทธิภาพในการสกัดและลดเวลาในการเตรียมตัวอย่างและลดปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการสกัดตัวอย่างแบบเดิม โดยการให้ความร้อนสำหรับ การสกัดด้วยไมโครเวฟร่วมอยู่บนพื้นฐานของการสกัดโดยตรงของคลื่นไมโครเวฟ ต่อโมเลกุลพลังงานจากคลื่นไมโครเวฟมีผลทำให้โมเลกุลเกิดการเคลื่อนไหว โดยเกิดการไมเกรตของไอออน และการหมุนของคู่ขั้วโดยการหมุนของคู่ขั้วเป็นผลให้เกิดเป็นสนามไฟฟ้าของโมเลกุลทั้งในตัวทำละลายและในตัวอย่างทำให้มีความร้อนเกิดขึ้นอย่างฉับพลัน

2.3.1 ปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

- ความเข้มข้นของตัวทำละลาย
- สัดส่วนของตัวอย่าง
- กำลังไมโครเวฟ
- เวลาการสกัด

ปริมาณพลังงานที่เกิดจากไมโครเวฟสามารถเปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อนในสารประกอบไดอิเล็กทริกได้โดยคำนวณจากสมการ

$$P_D = 55.61 \times 10^{-14} E^2 f k' tan\delta \quad \text{.....2.1}$$

P_D = พลังงานที่สารประกอบดูดซับไว้ได้ มีหน่วย (วัตต์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร watt /cm^3)

E = ความเข้มข้นสนามไฟฟ้า มีหน่วย (โวลต์ต่อเซนติเมตร, Volt / cm)

f = ความถี่ของคลื่นไมโครเวฟ มีหน่วย (เฮิรตซ์, Hz)

k' = ค่าคงที่ไดอิเล็กทริกสัมพัทธ์

$\tan\delta$ = loss tangent

2.4 การออกแบบการทดลอง (Design of Experiment: DOE)

การออกแบบการทดลองเป็นการออกแบบเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเหมาะสม โดยการหาค่าที่เหมาะสมที่สุด (Optimization) ซึ่งอาศัยแบบจำลองหรือสมการทางคณิตศาสตร์มาอธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ สามารถศึกษาผลของหลายๆ ปัจจัยพร้อมกันในเวลาเดียวกัน ด้วยวิธี ใช้จำนวนการทดลองน้อยกว่าการศึกษาทีละปัจจัย การออกแบบการทดลองจึงเป็นวิธีการเก็บข้อมูลที่มีประสิทธิภาพ โดยการเปลี่ยนแปลงหรือปรับค่าของ input (factors) อย่างมีจุดมุ่งหมายที่จะสังเกตุการเปลี่ยนแปลงของ output (response) ที่เกิดขึ้นกระบวนการที่มีปัจจัย (factor) หรือ input (X_1, X_2, X_3, X_4) ต่างๆ ที่ส่งผลต่อค่า Y ซึ่งเป็นคุณลักษณะด้านคุณภาพ (quality characteristic) ของกระบวนการ ในการออกแบบการทดลองต้องทำการทดลองอย่างเป็นระบบเพื่อที่จะหาความสัมพันธ์เชิงสถิติของ Y และ X ต่างๆ โดยที่พยายามใช้ทรัพยากรในการทดลองให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด ความสัมพันธ์เชิงสถิติที่ได้จะทำให้เรามีความรู้เกี่ยวกับกระบวนการ (process knowledge) เพื่อนำไปปรับปรุงกระบวนการต่อไป ในการออกแบบการทดลองนี้

2.5 การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Design)

วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) เป็นการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์และทางสถิติที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหา โดยที่ผลตอบสนองที่สนใจขึ้นอยู่กับหลายตัวแปร และมีวัตถุประสงค์ที่จะหาค่าที่ดีที่สุดของผลตอบสนอง

$$y = \int(X_1, X_2) + \varepsilon \qquad \text{.....2.3}$$

โดยกำหนดให้ปัจจัยนั้นแทนค่าด้วย x และ ε คือ ค่าความผิดพลาดของผลตอบ y ที่เป็นผลมาจากการทดลอง ถ้ากำหนดว่า $E(y) = \int(X_1, X_2) = \eta$ ดังนั้น สามารถเขียนสมการของพื้นผิวตอบสนองได้คือ

$$\eta = \int(X_1, X_2) \qquad \text{.....2.4}$$

ซึ่งจะเรียกว่า " พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface)" โดยส่วนใหญ่จะแสดงพื้นผิวตอบสนองโดยที่ η จะถูกพล็อตกับระดับของ X_1 และ X_2 เพื่อที่จะช่วยให้มองรูปร่างของพื้นผิวตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจจะพล็อตเส้นโครงร่าง (Contour Plot) ของผลตอบสนอง โดยที่ปัญหาในส่วนใหญ่จะไม่ทราบความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนองและตัวแปรอิสระ โดยในขั้นแรก จะต้องหาตัวประมาณที่เหมาะสมที่ใช้เป็นตัวแทนสำหรับแสดงความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่าง Y และเซตของตัวแปรอิสระอาจจะเป็น แบบจำลองของพื้นผิวตอบสนองมีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้นกับตัวแปรอิสระฟังก์ชันที่ใช้เป็นแบบจำลองกำลังหนึ่งดังสมการที่ 2.3

$$y = \beta_0 + \beta_{1X_1} + \beta_{2X_2} + .. + \beta_{kX_k} + \varepsilon \qquad \text{.....2.5}$$

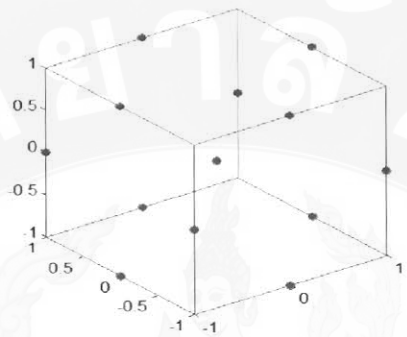
แต่ถ้ามีส่วนโค้งเกี่ยวข้องในระบบ จะใช้ฟังก์ชันพหุนามที่มีกำลังสูงขึ้น เช่นพหุนามกำลังสองดังสมการที่ 2.4

$$y = \beta_0 + \sum_{l=1}^{k} \beta_{1X_1} + \sum_{l=1}^{k} \beta_{2X_2} + \sum\sum_{i<j} + \varepsilon \qquad \text{.....2.6}$$

ปัญหาเกี่ยวกับพื้นผิวตอบสนองส่วนมากจะใช้แบบจำลองกำลังหนึ่งหรือแบบจำลองกำลังสองในการหาผลตอบสนอง แต่แบบจำลองทั้งสองชนิดไม่สามารถใช้ประมาณความสัมพันธ์ตลอดพื้นผิวทั้งหมดของตัวแปรอิสระ ถ้าพื้นผิวที่เราสนใจอยู่มีขนาดใหญ่ การออกแบบพื้นผิวตอบสนองมีวิธีการที่นำมาใช้ในการหาค่าที่ดีที่สุดของผลตอบสนองอยู่หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ วิธีการกำลังสองน้อยสุด การออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอับดับที่หนึ่ง และการออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอับดับที่สอง ซึ่งการออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอับดับที่สองนี้เป็นการเน้นไปที่การสร้างแบบจำลองควอซ์ดาติกของผลตอบสนอง มีวิธีการที่น่าสนใจอยู่ 2 วิธีด้วยกัน คือ

2.5.1 Box-Behnken Design (BBD)

เป็นการออกแบบสามระดับสำหรับฟิตพื้นผิวตอบสนอง การออกแบบนี้ถูกสร้างขึ้นจากการรวมการออกแบบแฟกทอเรียล 2k กับ การออกแบบบล็อกไม่สมบูรณ์ ผลของการออกแบบมีประสิทธิภาพในด้านจำนวนของการรันที่ต้องการ

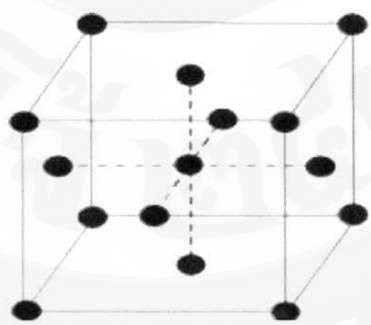


ภาพที่ 2.1 การออกแบบ Box-Behnken Design (BBD)

(http://www.mathworks.com/help/stats/bbdesign.html)

2.5.2 Face-centered cubic design (FCD)

เป็นวิธีกาหารวิธีการหาพื้นผิวผลตอบสนองที่นิยมใช้เพื่อหากระบวนการที่เหมาะสม เป็นการออกแบบที่ทุกระดับโดยการทำการทดลองที่มุมทั้ง 4 มุมของกล่อง และทดลองที่จุดกึ่งกลางของผิวหน้าแต่ละด้านของกล่องทั้ง 6 ด้าน



ภาพที่ 2.2 การออกแบบ Face-centered cubic design (FCD)

(http://www.enginsoft.net/software/modefrontier/documentation/doe.html)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ธนธร (2549) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากผลมะเกี๋ยงในด้านผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง พบว่า สารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงได้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ลดริ้วรอยในรูปแบบเจลและครีม พบว่ามีประสิทธิภาพลดริ้วรอยได้ และมีเสถียรภาพทางฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นอย่างดี

พิมพร (2547) ได้ศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยง โดยสกัดสารจากเมล็ดมะเกี๋ยงบดแห้ง ด้วยวิธีหมักในเอทานอล 95% จากการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น พบว่ามีองค์ประกอบของสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน และแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ สกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และตรวจพิสูจน์สารองค์ประกอบหลักในสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและบิวทานอล โดยวิธีโครโมโทกราฟีผิวบาง พบว่า ประกอบไปด้วย quercetin, kaempferol และ phenol caboxylic acids

พิมพ์ใจ (2549) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ของสารสกัดและน้ำหมักชีวภาพจากพืชสมุนไพร พบว่าสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงแห้งสกัดโดยการ reflux สารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงสดที่สกัด โดยการ reflux ด้วยเอทานอล 50 % และหมักด้วยเอทานอล 95 % มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* ดีกว่า benzoyl peroxide ในความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ 10% , 5% และ 1% w/v และจากการหาค่า MIC โดยวิธี agar well diffusion ซึ่งเตรียมความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 10% w/v พบว่า สารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงสดที่สกัดโดยการ reflux มีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* ต่ำสุด คือ 0.625 % w/v หรือ 6.25 mg/ml

Proestos และ Komaitis (2008) ประยุกต์ใช้ไมโครเวฟเพื่อลดระยะเวลาการสกัดสารฟีโนลิกจากพืชโดยใช้หลักการสกัดแบบไมโครเวฟร่วม ซึ่งได้ศึกษาการสกัดสารฟีโนลิกจากพืชที่มีกลิ่นหอมโดยใช้สารละลายชนิดต่างๆ สารฟีโนลิกถูกตรวจสอบและวิเคราะห์เพื่อยืนยันสารด้วยเครื่อง RP-HPLC โดยที่ปริมาณฟีโนลิกคำนวณโดยใช้มาตรฐานของ Folin-Ciocalteu การศึกษาในครั้งนี้ได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดแบบ reflux กับ การสกัดแบบไมโครเวฟร่วม ซึ่งผลการทดลองพบว่า วิธีสกัดแบบไมโครเวฟร่วมเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากกว่า ลดระยะเวลาในการสกัด ลดปริมาณการใช้สารละลาย และได้ปริมาณสารสกัดฟีโนลิกมากกว่าวธีการสกัดแบบ reflux

Rangkadilok et al. (2012) ได้ศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารโพลีฟีโนลิกจากเมล็ดลำไย โดยที่จุดประสงค์เพื่อประเมินการต้านเชื้อราของสารสกัดจากลำไยและเปรียบเทียบกับสารสกัดต่างๆ ซึ่งผลการทดลอง พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยสารมารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา และยีสต์ ซึ่งในทางตรงกันข้าม เนื้อและผลทั้งหมดของลำไยไม่ได้แสดงผลในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ ในเมล็ดลำไยมีกรดเอลลาจิกมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา สำหรับแบคทีเรียเมล็ดลำไยมีคอริลาจินและกรด

กาลิกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Staphylococcus aureus และStreptococcus mutans นอกจากนี้เมล็ดลำไยยังถูกใช้ประยุกต์ในผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปาก เนื่องจากสารสกัดลำไย 5% สามารถลดการยึดติดของหินปูน ซึ่งน้ำยาบ้วนปากที่ประกอบด้วยสารสกัดลำไย 0.5% แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากในเชิงพาณิชย์ การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดลำไยและสารโพลีฟีโนลิกสามารถใช้ต้านเชื้อราในผลิตภัณฑ์ในช่องปากและใช้สำหรับการรักษาการติดเชื้อจากยีสต์

Song et al. (2011) ศึกษาสกัดโดยใช้เทคนิคไมโครเวฟร่วมมาใช้ในการสกัดฟีโนลิกจากใบมันเทศ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดถูกหาโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง การออกแบบศูนย์กลางแต่ละด้านของลูกบาศก์ (Face-Centered Cubic Design) ถูกนำมาประยุกต์และพัฒนาสำหรับผลกระทบของแต่ละปัจจัยในการสกัดประกอบไปด้วย กำลังไมโครเวฟ, เวลาในการสกัด และอัตราส่วนเอทานอล ต่อปริมาณสารสกัดฟีโนลิกจากใบมันเทศ การวิเคราะห์จากความถดถอยของสมการทางคณิตศาสตร์แสดงให้เห็นว่า สมการพหุนามกำลังสองสามารถนำมาใช้ทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟีโนลิกจากใบมันเทศ จากกราฟพื้นผิวตอบสนองพบว่า กำลังไมโครเวฟ, เวลาในการสกัด และอัตราส่วนเอทานอล มีผลกระทบโดยตรงต่อการสกัดสารฟีโนลิกจากใบมันเทศ สภาวะที่สกัดสารฟีโนลิกจากใบมันเทศมากที่สุดคือ กำลังไมโครเวฟ 302 W, เวลาในการสกัด 123 วินาที และอัตราส่วนเอทานอล 53%v/v สารฟีโนลิกที่ได้จากการสกัดถูกนำไปตรวจพบว่า สารฟีโนลิกที่สกัดโดยวิธีไมโครเวฟร่วมนั้นมีปฏิกิริยาต่อการต้านอนุมูลอิสระ สามารถนำมาใช้กับอาหารเพื่อสุขภาพและอุตสาหกรรมยา

Garofulic et al. (2013) ศึกษาอิทธิพลของการสกัดด้วยไมโครเวฟต่อสารแอนโทไซยานินและกรดฟีโนลิกจากเชอร์รี่เปรี้ยว Marasca ปัจจัยในการศึกษาได้แก่ อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส เวลาการฉายรังสี 5-12 นาที และกำลังของไมโครเวฟ 350-500 W สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยไมโครเวฟของสารแอนโทไซยานิน คือ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเวลาการฉายรังสี 6-9 นาที ขณะที่กรดฟีโนลิก คือ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และเวลาการฉายรังสี 10 นาที ซึ่งกำลังที่เหมาะสมของไมโครเวฟของทั้งสองสารสกัดไม่แตกต่างกันคือที่ 400 W วิธีสกัดด้วยไมโครเวฟนี้มีประสิทธิภาพสูงมากเมื่อเทียบกับการสกัดแบบเดิม

Gallo et al. (2010) ศึกษาการสกัดฟีโนลิกจากเครื่องเทศ 4 ชนิด (Cinnamomum zeylanicum, Coriandrum sativum, Cuminum cyminum, Crocus sativus) โดยวิธีไมโครเวฟร่วมเครื่องเทศและสมุนไพรนั้นไม่ได้มีประโยชน์แต่เพียงกลิ่นและรสชาติเท่านั้น แต่ยังคงมีประโยชน์ในด้านคุณสมบัติทางยาอีกด้วย ทั้งเครื่องเทศและสมุนไพรถูกใช้เป็นยาพื้นบ้านเพื่อรักษาโรค เช่น โรคหวัด เบาหวาน อาการไอ และมะเร็ง ซึ่งจุดประสงค์ในงานนี้คือเปรียบเทียบระหว่าง 2 เทคนิค

การสกัด คือ การสกัดแบบอัลตาโซนิก และการสกัดแบบไมโครเวฟร่วม เพื่อให้ได้คุณภาพและปริมาณของสารสกัดจากเครื่องเทศทั้ง 4 ชนิด ผลการทดลองพบว่า การสกัดแบบไมโครเวฟร่วมมีประสิทธิภาพมากกว่าการสกัดแบบอัลตาโซนิก ในด้านทั้งคุณภาพและปริมาณ อีกยังใช้ระยะเวลาในการสกัดที่สั้นกว่า

Sudjaroen et al. (2012) ได้ศึกษาสารสำคัญและลักษณะของสารโพลีฟีโนลิกในเมล็ดลำไย ลำไยนั้นเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในภาคเหนือของไทย ลำไยนั้นนิยมบริโภคทั้งผลสด อบแห้ง และบรรจุกระป๋อง ทำให้ในอุตสาหกรรมลำไยกระป๋องของไทยนั้นจึงมีเมล็ดลำไยซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการผลิตเป็นจำนวนมาก ดังนั้นเมล็ดเหล่านี้อาจจะเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจำพวกฟีโนลิกจากธรรมชาติ สารโพลีฟีโนลิกดิบจากเมล็ดลำไยได้รับจากการสกัดด้วยเมทานอล และทำให้บริสุทธิ์โดยการลดกรดไขมันด้วยเฮกเซน สารเฮกเซนสกัดกรดไขมันซึ่งมีส่วนประกอบของกรดพาลมิติก (35%) และกรดโอเลอิก (28%) ซึ่งสารโพลีฟีนิกดิบ(80.90 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักแห้ง) ประกอบด้วยกรด ellagic (25.84 กรัม /กก.) ellagitannins corilagin (13.31 กรัม/กก.), กรด chebulagic (13.06 กรัม/กก.), กรด ellagic 4 OAL-arabinofuranoside (9.93 กรัม/กก.), กรด isomallotinic (8.56 กรัม/กก.) และ geraniin (5.79 กรัม/กก.) โดยที่สารสกัดโพลีฟีนิกจากแมทานอลนั้นถูกแสดงโครงสร้างโดย Mass Spectrometry และตรวจพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

3.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเมล็ดมะเกี๋ยงอบแห้ง

ภาพที่ 3.1 แผนภูมิวิธีการเตรียมตัวอย่างเมล็ดมะเกี๋ยงอบแห้ง

(ก)

(ข)

ภาพที่ 3.2 วิธีการบดเมล็ดมะเกี๋ยงอบแห้ง (ก)เครื่องบดแฮมเมอร์มิล (ข)ผงเมล็ดมะเกี๋ยงผ่านตะแกรง

3.2 การศึกษาการสกัดโดยวิธีไมโครเวฟร่วม (Microwave-Assisted Extraction)

การศึกษาการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยตัวทำละลายโดยวิธีไมโครเวฟร่วมวางแผนการทดลองด้วยวิธีโครงร่างพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) โดยศึกษา 4 ปัจจัย คือความเข้มข้นของตัวทำละลาย ซึ่งใช้ความเข้มข้นของเอทานอล (ตั้งแต่ 0 ถึง 100) สัดส่วนของตัวอย่างกับตัวทำละลาย พลังงานไมโครเวฟ (100-700 วัตต์) และเวลาที่ใช้ในการสกัด (30-300 วินาที) จากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Optimization ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองศึกษาการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยตัวทำละลายโดยเทคนิคไมโครเวฟช่วยสกัด นำค่าที่วัดได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ และสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนอง สร้างสมการเพื่อทำนายสภาวะที่เหมาะสมโดยพิจารณาปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้ ทำการทดลองที่สภาวะที่ให้ปริมาณสารฟีโนลิกสูงสุด เพื่อเปรียบเทียบกับสมการทางคณิตศาสตร์

3.2.1 ศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของเอทานอลต่อปริมาณการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง

ในการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของเอทานอลที่มีผลต่อการสกัดสารฟีโนลิกนั้น ทำการศึกษาที่ความเข้มข้นของเอทานอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90% โดยกำหนดกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟ 450 วัตต์ และระยะเวลาในการสกัดคงที่ 210 วินาที สัดส่วนของผงเมล็ดมะเกี๋ยง 1:30 ต่อสารละลายเอทานอล กรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองโดยชั่งเมล็ดมะเกี๋ยงอบแห้งที่บดละเอียด 1 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม จากนั้นเติมสารละลายเอทานอลที่ระดับ

ความเข้มข้นต่างๆ 30 มิลลิลิตร และสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า และระยะเวลาที่กำหนด ปิเปตสารสกัดฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง 0.1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มเข้น 7 % ปริมาณ 2 มิลลิลิตร และเติม Folin-Ciocalteu's phenol 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

3.2.2 ศึกษาผลกระทบของระยะเวลาที่มีผลต่อปริมาณสารสกัดฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง

ในการศึกษาผลกระทบของระยะเวลาที่มีผลต่อการสกัดสารฟีโนลิก นั้นทำการศึกษาที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน ได้แก่ 120, 150, 180, 210, 240 และ 270 วินาที โดยกำหนดความเข้มข้นของเอทานอลคงที่ 50 % และกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟคงที่ 450 วัตต์ สัดส่วนของผงเมล็ดมะเกี๋ยงต่อสารละลายเอทานอล 1:30 กรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองโดย ชั่งเมล็ดมะเกี๋ยงอบแห้งที่บดละเอียด 1 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม จากนั้นเติมสารละลายเอทานอลปริมาณ 30 มิลลิลิตร และสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า และระยะเวลาที่กำหนด ปิเปตสารสกัดฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง 0.1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7 % ปริมาณ 2 มิลลิลิตร และเติม Folin-Ciocalteu's phenol 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

3.2.3 ศึกษาผลกระทบของกำลังไมโครเวฟต่อปริมาณการสกัดสารฟีโนลิกจากมะเกี๋ยง

ในการศึกษาผลกระทบของกำลังไมโครเวฟที่มีผลต่อการสกัดสารฟีโนลิก นั้นทำการศึกการศึกษาที่กำลังไมโครเวฟที่แตกต่างกัน ได้แก่ 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 วัตต์ โดยกำหนดความเข้มข้นของเอทานอลคงที่ 50 % และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดคงที่ 210 วินาที สัดส่วนของผงเมล็ดมะเกี๋ยงต่อสารละลายเอทานอล 1:30 กรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองโดยชั่งเมล็ดมะเกี๋ยงอบแห้งที่บดละเอียด 1 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม จากนั้นเติมสารละลายเอทานอลปริมาณ 30 มิลลิลิตร และสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า และระยะเวลาที่กำหนด ปิเปตสารสกัดฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง 0.1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มเข้น 7 % ปริมาณ 2 มิลลิลิตร และเติม Folin-Ciocalteu's phenol 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

3.2.4 Face-Centered Cubic Design

นำสภาวะต่างๆที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงจากการทดลองมาวางแผนการทดลองโดยตั้งค่ารหัสจากตารางที่ 3.1 มาออกแบบ Face-Centered Cubic Design ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าจริงและรหัสของตัวแปรที่ศึกษา

ปัจจัยที่ต้องศึกษา	ตัวแปร	ระดับความสำคัญ		
		-1	0	1
กำลังไมโครเวฟ (วัตต์)	X_1			
เวลาที่ใช้ในการสกัด (วินาที)	X_2			
ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	X_3			

ตารางที่ 3.2 การวางแผนการทดลองด้วยวิธี Face-Centered Cubic Design

Run	X_1	X_2	X_3	Y
1	-1	-1	-1	
2	1	-1	-1	
3	-1	1	-1	
4	1	1	-1	
5	-1	-1	1	
6	1	-1	1	
7	-1	1	1	
8	1	1	1	
9	-1	0	0	
10	1	0	0	
11	0	-1	0	
12	0	1	0	
13	0	0	-1	
14	0	0	1	
15	0	0	0	
16	0	0	0	
17	0	0	0	

3.2.5 การวิเคราะห์ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

1) การเตรียมสารละลาย DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เข้มข้น 0.1 mM ในเมทานอล ชั่ง DPPH 0.1972 กรัม ละลายด้วยเมทานอลจนสารละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้ สารละลาย DPPH เข้มข้น 5 มิลลิโมล่าร์ จากนั้นปิเปตสารละลายนี้มา 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้งาน

2) การวิเคราะห์ DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Shimada et al. (1992) และ ประภาพรรณ (2551)โดยปิเปตสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เข้มข้น 0.1 mM ในเมทานอล มา 2.9 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมตัวอย่างลงไป 0.1 มิลลิลิตร เขย่า ให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที พร้อมทั้งทำตัวอย่างควบคุม (Control) หรือสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่าง สารสกัดโดยใช้เมทานอล จำนวน 0.1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างวิเคราะห์ ตามวิธีการเดียวกัน เมื่อครบ 30 นาที นำตัวอย่างและตัวอย่างควบคุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าความสามารถฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) ได้ดังสมการนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Control} - \text{Sample}}{\text{Control}} \times 100 \qquad \text{.....3.1}$$

เมื่อ:

ตัวอย่างควบคุม คือ DPPH 2.9 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล 0.1 มิลลิลิตร

ตัวอย่างทดลอง คือ DPPH 2.9 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดน้ำจากเมล็ดมะเกี๋ยง 0.1 มิลลิลิตร

3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

จากการวางแผนการทดลองแบบ Face-Centered Cubic Design ศึกษา 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ทางคณิตศาสตร์โดยใช้แบบจำลองการถดถอย (Regression Model) ของการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองในลักษณะของแบบจำลองการถดถอยมีทั้งหมด 3 แบบ ดังนี้

1.) สมการชิงเส้น Linear Model

$$E(y) = \beta + \sum_{i=1}^{p} \beta_i X_i \quad \text{.....3.2}$$

2.) สมการกำลังสอง Quadratic Model

$$E(y) = \beta + \sum_{i=1}^{p} \beta_i X_i \sum \sum_{i<j}^{p} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^{p} \beta_{ii} X^2{}_i. \quad \text{.....3.3}$$

3.) สมการปฏิสัมพันธ์ (Interaction)

$$E(y) = \beta + \sum_{i=1}^{p} \beta_i X_i \sum \sum_{i<j}^{p} \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{.....3.4}$$

เมื่อ Y คือผลการตอบสนอง ได้แก่ ปริมาณของสารฟีโนลิก

X_i, X_j คือ ตัวแปรอิสระหรือปัจจัยที่ศึกษา

β_o คือ ค่าคงที่สมการ

β_i, β_j คือ สัมประสิทธิ์ Linear Model

β_{ii}, β_{jj} คือ สัมประสิทธิ์ Quadratic Model

β_{ij} คือ สัมประสิทธิ์ Interaction

จากแบบจำลองการถดถอยผลตอบสนองทั้งหมดจะนำมาสร้าง กราฟ 3 มิติ เพื่อดูพื้นผิวตอบสนองโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของค่าสูงสุดในแต่ละผลตอบสนอง เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการสกัด

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสม

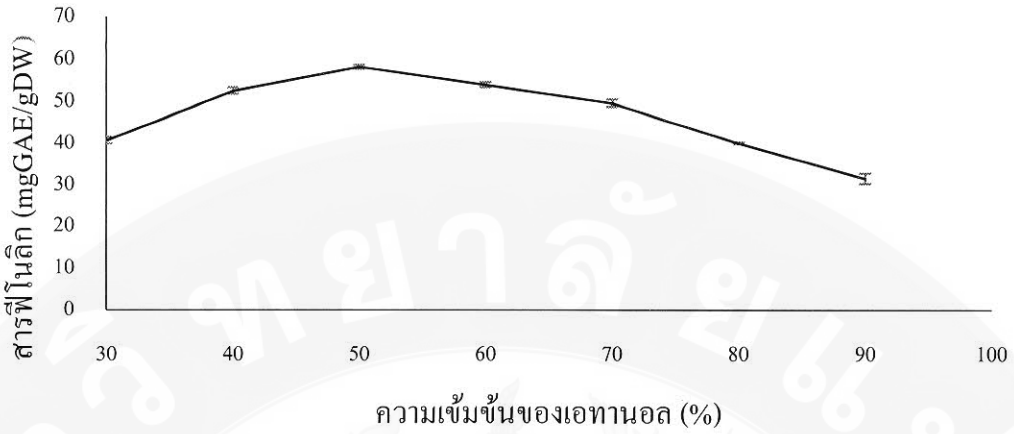
จากการศึกษาความเข้มข้นของเอทานอล ที่มีผลต่อการสกัดสารฟีโนลิก 7 ระดับ ได้แก่ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 % โดยกำหนดกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟ และระยะเวลาในการสกัดคงที่ (ไมโครเวฟ 450 วัตต์ เวลา 210 วินาที) พบว่าความเข้มข้นของเอทานอล 50 % ให้ปริมาณสารฟีโนลิกมากที่สุด (ภาพที่ 4.1 และตารางที่ 4.1) และเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้น (60-90 %) ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดจะค่อยๆลดลง ด้วยเหตุนี้จึงเลือกระดับความเข้มข้นของเอทานอลในช่วง 40-60 %ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสาร ฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้จากการใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของเอทานอล	ปริมาณสารฟีโนลิก (mgGAE/gDW)
30	40.68 ± 0.75^{e}
40	52.46 ± 0.76^{c}
50	58.11 ± 0.51^{a}
60	53.87 ± 0.61^{b}
70	49.53 ± 0.89^{d}
80	40.13 ± 0.09^{e}
90	31.46 ± 1.24^{f}

หมายเหตุ 1. ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95



ภาพที่ 4.1 ผลของความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัดต่อ ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมด (กำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟ 450 วัตต์ เวลา 210 วินาที)

4.2 การศึกษาระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสม

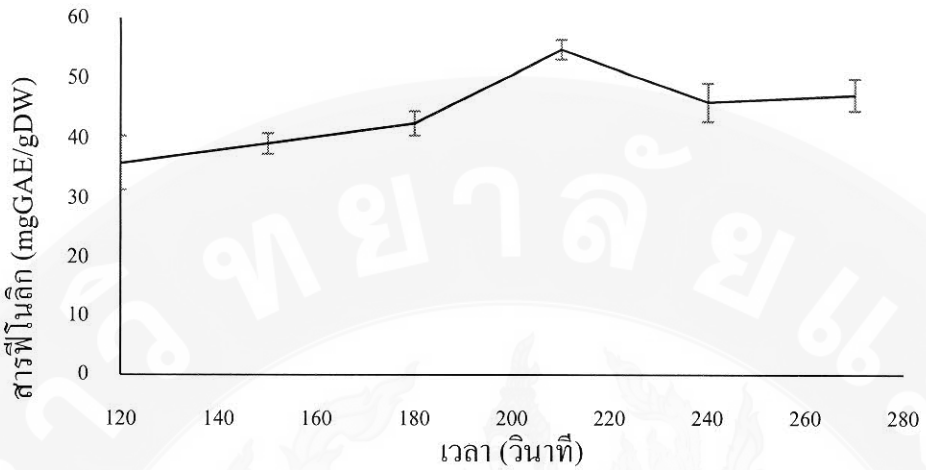
จากการศึกษาเวลาในการสกัดที่ 120, 150, 180, 210, 240, และ 270 วินาที โดยกำหนดความเข้มข้นของเอทานอล และกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟคงที่ (เอทานอล 50 % ไมโครเวฟ 450 วัตต์) พบว่าเมื่อระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น 210วินาที จะได้ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่เมื่อระยะเวลาในการสกัดเป็น 240 วินาที ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดจะค่อยๆลดลง (ดังภาพที่ 4.2 และตารางที่ 4.2) ด้วยเหตุนี้จึงเลือกระยะเวลาในการสกัดในช่วง 180-240 วินาที ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้จากการใช้ระยะเวลาในการสกัดที่แตกต่างกัน

เวลา (วินาที)	ปริมาณสารฟีโนลิก (mgGAE/gDW)
120	35.97 ± 4.52^{d}
150	39.20 ± 1.72^{cd}
180	42.55 ± 2.00^{cd}
210	54.74 ± 1.65^{a}
240	46.03 ± 3.22^{bc}
270	47.26 ± 2.67^{b}

หมายเหตุ 1. ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 4.2 ผลของระยะเวลาในการสกัดต่อปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมด (ความเข้มข้นของเอทานอล 50 % กำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟ 450 วัตต์)

4.3 การศึกษากำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟที่เหมาะสม

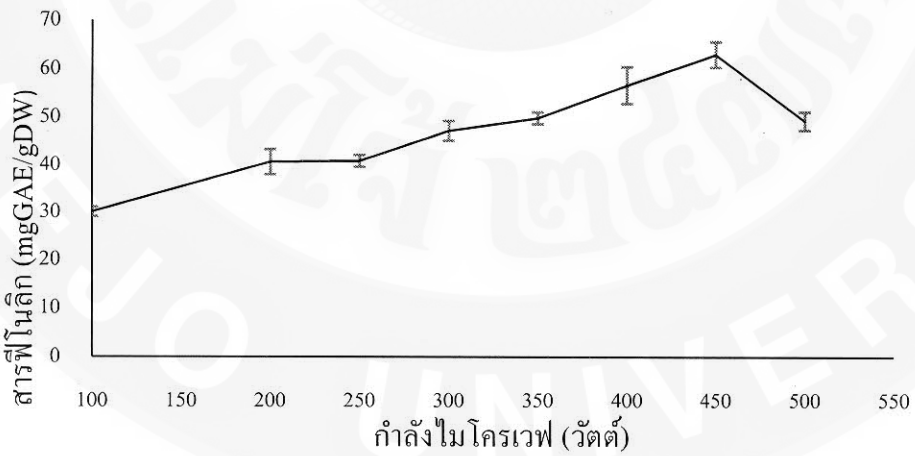
จากการศึกษากำลังไฟฟ้าของเครื่องไมโครเวฟในการสกัด 6 ระดับ ได้แก่ 100, 200, 250, 300, 350, 400 ,450 ,500 และ 550 วัตต์ โดยกำหนดความเข้มข้นของเอทานอล และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดคงที่ (เอทานอล 50 % เวลา 210 วินาที) พบว่าการใช้กำลังไฟฟ้าเพิ่มขึ้นในช่วง 100 - 450 วัตต์ จะได้ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น และมีค่าสูงสุดเมื่อใช้กำลังไฟฟ้า 450 วัตต์ แต่เมื่อให้กำลังไฟฟ้า เพิ่มขึ้นเป็น 500 วัตต์ ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดจะลดลง (ดังภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.3) ด้วยเหตุนี้จึงเลือกกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟในช่วง 400 – 500 วัตต์ ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้จากการใช้กำลังไมโครเวฟในการสกัดที่แตกต่างกัน

กำลังไมโครเวฟ (วัตต์)	ปริมาณฟีโนลิก (mgGAE/gDW)
100	30.15±0.99[f]
200	40.68±2.64[d]
250	40.88±1.26[d]
300	47.19±2.06[c]
350	49.26±1.28[c]
400	49.81±3.85[c]
450	63.03±2.62[a]
500	56.66±1.91[a]

หมายเหตุ 1. ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 4.3 ผลของกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟในการสกัดต่อปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมด (ความเข้มข้นของเอทานอล 50 % เวลา 210 วินาที)

4.4 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารฟีโนลิกและค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ดมะเกี๋ยงโดยใช้ไมโครเวฟ

การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง การทดลองแบบ Face-centered cubic design เป็นการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาผลของปัจจัยหรือตัวแปรอิสระต่อกระบวนการ ซึ่งในโครงงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของตัวแปรอิสระ 3 ตัวแปร คือ กำลังไมโครเวฟในการสกัด (X_1) , ระยะเวลาในการสกัด (X_2) และความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัด (X_3) ซึ่งกำหนดค่าปัจจัยเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1), ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) โดยทำการทดลองที่สภาวะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 แล้ววัดปริมาณสารสกัดฟีโนลิก (Total phenolic content) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (%Inhibition) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จากนั้นวิเคราะห์ผลจากข้อมูลที่วัดได้ด้วยเทคนิคทางสถิติที่เรียกว่า วิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RMSE) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสารสกัดฟีโนลิก (Total phenolic content) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (%Inhibition)

ตารางที่ 4.4 ปัจจัยและระดับความสำคัญที่ใช้ในการทดลอง

ปัจจัยที่ต้องการศึกษา	ตัวแปร	ระดับความสำคัญ		
		-1	0	1
กำลังไมโครเวฟ (วัตต์)	X_1	400	450	500
เวลาที่ใช้ในการสกัด (วินาที)	X_2	180	210	240
ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	X_3	40	50	60

ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ต้องการศึกษาที่ได้จากการทดลองต่อปริมาณสารฟีโนลิกของผลกระทบจากกำลังไมโครเวฟ เวลา และความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัดแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลของการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารฟีโนลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (%Inhibition) โดยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Face-centered cubic design

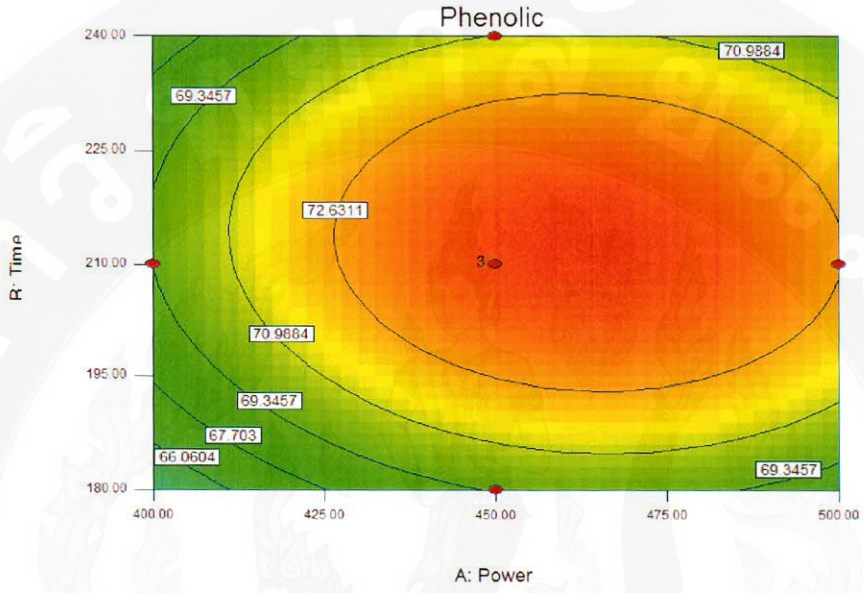
กำลังไมโครเวฟในการสกัด (วัตต์) (X_1)	ระยะเวลาในการสกัด (วินาที) (X_2)	ความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัด (%) (X_3)	ปริมาณสารฟีโนลิก (mgGAE/gDW)	ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (%Inhibition)
400	180	50	60.13±0.25	55.45±0.48
500	180	50	61.63±1.50	59.826±1.30
400	240	50	61.23±1.70	58.615±1.10
500	240	50	66.14±0.96	57.87±0.45
400	210	40	57.39±0.70	63.334±0.92
500	210	40	62.54±2.65	48.184±1.44
400	210	60	61.98±1.39	63.179±3.13
500	210	60	68.06±1.23	63.862±0.94
450	180	40	70.52±2.09	53.524±6.90
450	240	40	69.20±0.84	64.794±1.49
450	180	60	69.33±2.41	57.746±1.34
450	240	60	68.79±2.81	62.341±0.89
450	210	50	68.303±4.19	66.5321.72
450	210	50	67.547±1.90	60.695±0.29
450	210	50	74.877±2.09	63.148±2.53
450	210	50	76.234±1.81	61.006±1.54
450	210	50	75.569±2.49	62.713±3.26

หมายเหตุ 1. ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

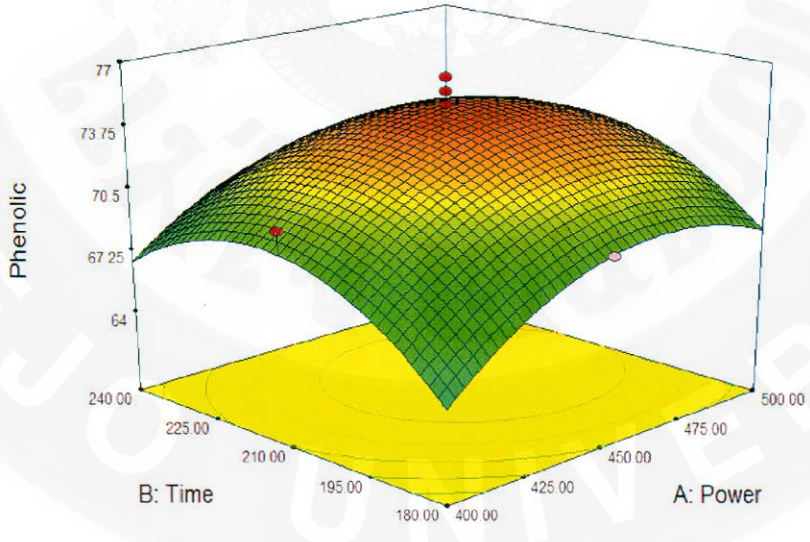
2. ในการศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระเจือจางสารฟีโนลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยน้ำกลั่น 20 เท่า

จากการออกแบบการทดลองแบบ Face-centered cubic design ค่าปริมาณสารฟีโนลิกที่สูงสุด จากการทดลองที่กำลังไมโครเวฟ 450 วัตต์ เวลาที่ 210 วินาที และความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 50 ได้ปริมาตรสารประกอบฟีโนลิก 76.234 mgGAE/gDW บวกลบความคลาดเคลื่อน 1.81 mgGAE/gDW ค่าปริมาณสารฟีโนลิกที่ต่ำที่สุดคือ กำลังไมโครเวฟ 400 วัตต์ เวลาที่ 210 วินาที และความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 40 ได้ 57.39 mgGAE/gDW ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดคือ กำลังไมโครเวฟ 450 วัตต์ เวลาที่ 210 วินาที และความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 50 พบว่ามีความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ 66 % Inhibition

4.5 ผลของการวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรอิสระต่อปริมาณสารฟีโนลิก แบบ Face-centered cubic design

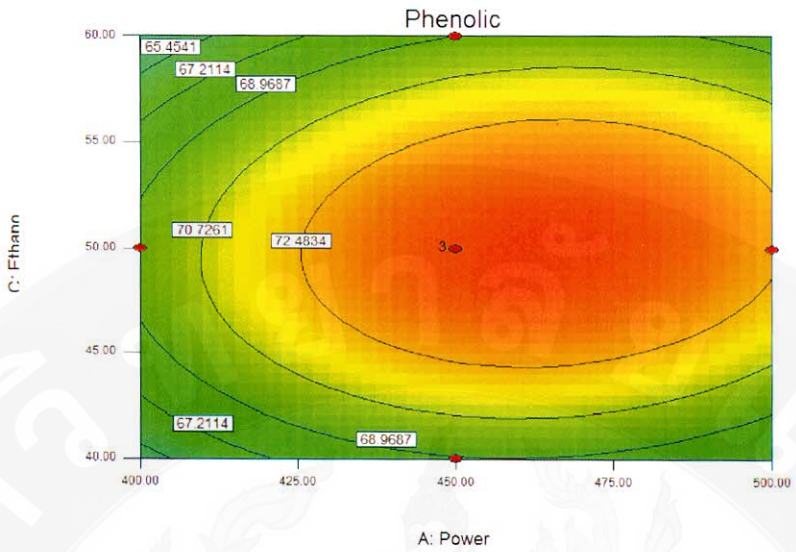


(ก) Contour Plot



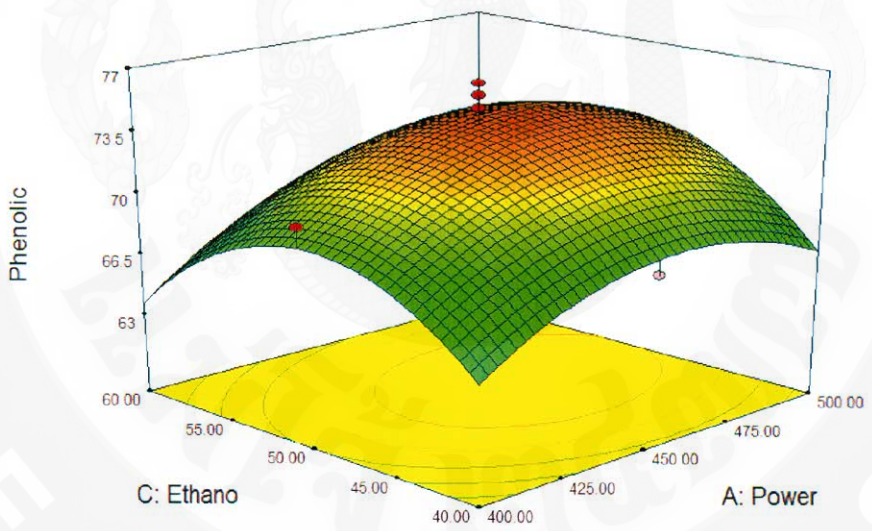
(ข) Surface Plot

ภาพที่ 4.4 อิทธิพลของกำลังไมโครเวฟและระยะเวลาในการสกัด ที่ความเข้มข้นของเอทานอลคงที่มีผลต่อปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้



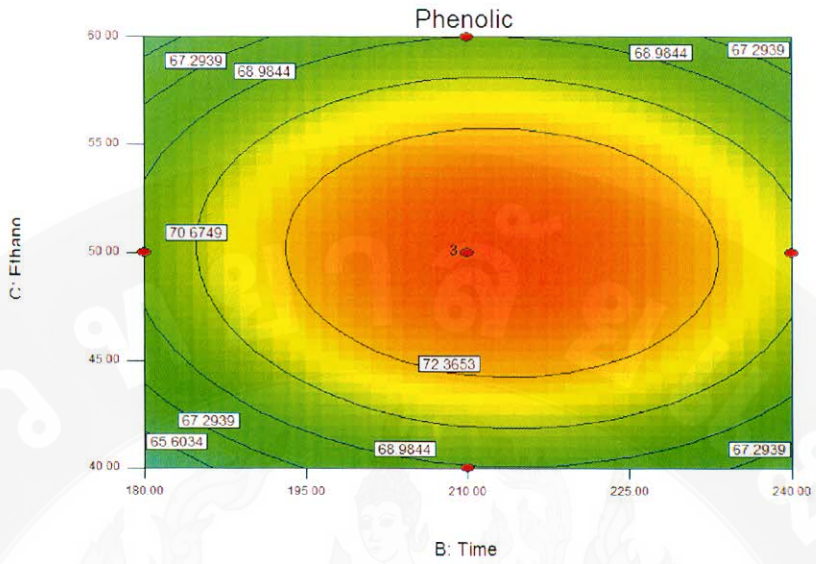
(ก) Contour Plot

(ข)

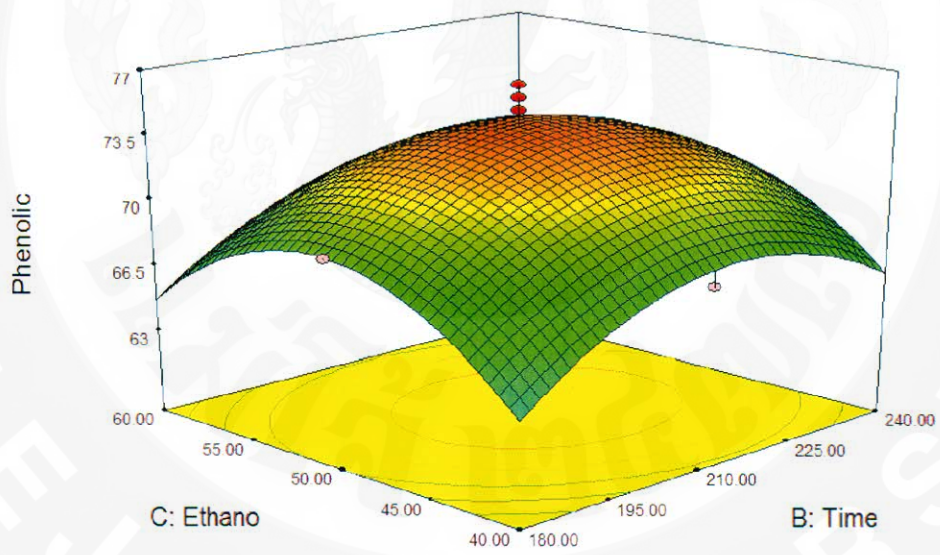


(ค) Surface Plot

ภาพที่ 4.5 อิทธิพลของกำลังไมโครเวฟและความเข้มข้นของเอทานอลที่ระยะเวลาคงที่มีผลต่อปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้



(ก) Contour Plot



(ข) Surface Plot

ภาพที่ 4.6 อิทธิพลของระยะเวลาในการสกัด และความเข้มข้นของเอทานอลที่กำลังไมโครเวฟคงที่ มีผลต่อปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้

4.6 ผลการวิเคราะห์ความเหมาะสมของแบบจำลอง

การวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i) ของสมการกำลังสอง Quadratic Model ดังสมการต่อไปนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$
$$+\beta_{11} x_1^2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2$$

โดยที่ β คือค่าสัมประสิทธ์การถดถอยของแต่ละตัวแปรในสมการซึ่งสามารถนำมาอธิบายแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีโนลิกกับตัวแปรต่างๆได้ แบบจำลอง full quadratic สามารถแสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยได้ดัง ตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอย (regression coefficient) จากค่าเฉลี่ยของปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมด ในแผนการทดลอง Face-centered cubic design

Factor	Coefficient estimate	Standard Error	P-value	Standard error	95% CI low	95% CI high
Intercept	73.904	0.997	0.021	0.997	71.547	76.26
Power(X_1)	1.632	0.736	0.062	0.736	-0.11	3.373
Time(X_2)	1.621	0.736	0.064	0.736	-0.12	3.363
Ethanol(X_3)	0.043	0.736	0.955	0.736	-1.699	1.785
$X_1 X_2$	0.541	0.823	0.532	0.823	-1.406	2.488
$X_1 X_3$	0.603	0.823	0.488	0.823	-1.344	2.55
$X_2 X_3$	0.561	0.823	0.518	0.823	-1.386	2.508
X_1^2	-2.800	1.423	0.09	1.423	-6.164	0.565
X_2^2	-4.117	1.423	0.023	1.423	-7.482	-0.752
X_3^2	-4.913	1.423	0.011	1.423	-8.277	-1.548

จากการวิเคราะห์สมการถดถอยจากตารางที่ 4.7 แสดงถึงขนาดและทิศทางของปัจจัยต่างๆ และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารฟีโนลิกทั้งหมด พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของการออกแบบการทดลอง สมาการพหุนาม X_2^2 และสมาการพหุนาม X_3^2 มีผลต่อปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรพบว่า มีค่าความสัมพันธ์ R^2 เท่ากับ 0.922 แสดงว่า สมการดังกล่าวสามารถอธิบายตัวแปรในค่าตอบสนองได้ 92.2 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองถูกนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ สำหรับหาค่าที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัยที่ส่งผลให้ได้ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดจากเมล็ดมะเกี๋ยงสูงสุด

สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการหาปริมาณสารฟีโนลิกที่ดีที่สุด ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยใช้สมการพหุนามกำลังสอง คือ กำลังไมโครเวฟ เวลาที่ใช้ในการสกัด และความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้ในการสกัด ซึ่งเป็นสภาวะให้ปริมาณสารฟีโนลิกที่สูงที่สุด และยังสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับค่าการตอบสนองของปัจจัยเป็นสมการถดถอยได้โดยแสดงเป็นสมการ ดังนี้

$$\text{ปริมาณสารฟีโนลิกรวม} = 73.884 + 1.701X_1 + 0.942X_2 + 0.113X_3 - 0.307X_1X_2 + 0.690X_1X_3 - 0.287X_2X_3 - 2.765X_1^2 - 4.082X_2^2 - 4.878\ X_3^2$$

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบปริมาณสารฟีโนลิกที่ได้จากการทดลอง และสมการทำนายการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง

	กำลังไมโครเวฟ (วัตต์)	เวลา (วินาที)	ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	ปริมาณสารฟีโนลิก (mgGAE/gDW)
สมการทำนายสภาวะที่เหมาะสม	465.00	213	50.31	74.194
สมการทำนายสภาวะที่ทดลองจริง	450.00	213	50.00	73.884
ผลการทดลองจากสภาวะทดลองจริง	450.00	213	51.00	74.177±0.458

จากตารางที่ 4.7 พบว่าผลจากสมการทำนายสภาวะที่เหมาะสม มีค่าใกล้เคียงกันกับผลของสมการทำนายสภาวะที่ทดลองจริงและผลการทดลองจากสภาวะทดลองจริง ก็มีปริมาณสารฟีโนลิกที่ใกล้เคียงกัน

พบว่าพื้นที่ผิวการตอบสนองแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมด เมื่อกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟ และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น เนื่องจากการสกัดด้วยไมโครเวฟอาศัยการส่งผ่านคลื่นไมโครเวฟไปยังเซลล์ของเมล็ดมะเกี๋ยง ด้วยการกระจายความร้อนสู่ตัวทำละลาย เปลี่ยนพลังงานจลน์เป็นพลังงานความร้อน ทำให้ตัวทำละลายแพร่ความร้อนเข้าสู่เมล็ดมะเกี๋ยงทำให้เซลล์แตกและปล่อยสารฟีโนลิกออกมาผสมกับเอทานอลที่เป็นตัวทำละลาย ในการสกัดและเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจากการแพร่กระจายความร้อนของคลื่นไมโครเวฟ จะส่งผลทำให้มีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่กระจายเข้าสู่เปลือกเมล็ดมะเกี๋ยงและถ่ายเทสารฟีโนลิกออกมามากขึ้น รวมทั้งขนาดอนุภาคของเมล็ดมะเกี๋ยงมีขนาดเล็ก จึงทำให้มีพื้นที่ผิวในการถ่ายเทมวลสารมาก และระยะทางของตัวถูกละลายซึ่งเป็นสารฟีโนลิกที่อยู่ภายในเมล็ดมะเกี๋ยงมีระยะทางสั้นต่อการสกัด จึงทำให้เอทานอลแพร่เข้าทำการสกัดได้เร็วขึ้นดังนั้น การให้ความร้อนและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ตัวทำละลายสามารถแพร่ความร้อนเข้าสู่เมล็ดมะเกี๋ยงได้มากกว่า ทำให้ได้ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดสูงขึ้น

บทที่ 5 สรุป

จากการศึกษาเบื้องต้นทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงโดยใช้ไมโครเวฟให้ได้ปริมาณสารฟีโนลิกด้วยพื้นผิวตอบสนอง คือ การใช้เอทานอล 50% ร่วมกับกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟ 450 วัตต์ เป็นระยะเวลา 210 วินาที ซึ่งเป็นสภาวะให้ปริมาณสารสกัดฟีโนลิกที่สูงที่สุด

จากการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารฟีโนลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสำหรับการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงโดยใช้ไมโครเวฟให้ได้ปริมาณสารฟีโนลิก โดยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Face-centered cubic design พบว่าสมการพหุนามกำลังสองที่ได้ คือ การใช้เอทานอล 51% ร่วมกับกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟ 450 วัตต์ เป็นระยะเวลา 213 วินาที ซึ่งเป็นสภาวะให้ปริมาณสารสกัดฟีโนลิกที่สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 74.177 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และยังสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับค่าการตอบสนองของปัจจัยเป็นสมการถดถอยได้โดยแสดงเป็นสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณสารฟีโนลิก} = 73.884 + 1.701X_1 + 0.942X_2 + 0.113X_3 - 0.307X_1X_2 + 0.690X_1X_3 - 0.287X_2X_3 - 2.765X_1^2 - 4.082X_2^2 - 4.878\,X_3^2$$

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด 66.53% Inhibition

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์บริการ . 2539. รายงานกิจกรรมฉบับที่ 54 ปีงบประมาณ 2539 กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ: 330 หน้า.

คณะกรรมการงานอนุรักษ์และใช้ประโยชน์พืชมะเกี๋ยง. 2545 . มะเกี๋ยงพืชในโครงการอนุรักษ์. ปทุมธานี: ศูนย์กลางสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

ณรงค์ชัย สถาวรวิจิตร. 2549. การศึกษาวิธีพื้นผิวผลตอบสนองโดยการทดลองแบบบ๊อก-เบ็นเกน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสถิติประยุกต์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จิราวรรณ ฤกจิตร์. 2554. การผลิตน้ำผลไม้เข้มข้นพร้อมดื่มจากน้ำมะเกี๋ยงผสมน้ำหม่อนโดยการระเหยภายใต้สุญญากาศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 105 หน้า.

จารุวรรณ แตงเที่ยง.2547.เปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินจากถั่วดำที่สกัดในตัวทำละลายและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชราชภัฏนครปฐม

เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. 2554. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. 1 (1): 59-70.

ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน [ออนไลน์]: http://www.surathai.net/index.php?lay =show&ac = article&Id=5351088&Ntype=4. (วันที่สืบค้นข้อมูล: 30 มีนาคม 2557).

บุหรัน พันธุ์สวรรค์ และคณะ. 2556. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 21, 3: 277-278.

ปราณี วราสวัสดิ์ .2551.เคมีอาหาร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร,มหาวิทยาลัยแม่โจ้ .

ประภาพรรณ พรหมหิรัญกูล.2551.การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มสมุนไพรและไวน์ไทย. เวชสารโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา. 32(2) : 101 – 108 หน้า.

ปารเมศ ชุติมา .2554 . การออกแบบการทดลองทางวิศวกรรม. เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ:จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 542 หน้า.

ปริยานุช อินทร์รอด. 2551. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้น เร่วหอมและว่านสาวหลง. การค้นคว้าแบบอิสระวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ผดุงศักดิ์ รัตนเดโช. 2551 . พื้นฐานการทำความร้อนด้วยไมโครเวฟ. เล่มที่ 1 . กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัย ธรรมศาสตร์. 559 หน้า.

พิมพร อุดมภัณฑ์ .2547. การศึกษาพฤกษาเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงเพื่อใช้ทางยาเสริมอาหารและเครื่องสำอาง วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเภสัชเวท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ทรงศิริ วงศ์จิตภิญโญ .2552. ผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด แอนโธไซยานินทั้งหมด และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกและเมล็ดองุ่น วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ. 2555. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. เชียงใหม่: สมาร์ท โคตรติ้งแอนด์เซอร์วิสม. 38 หน้า.

ศราญดา ตั๋นโน. 2555. การใช้ไมโครเวฟช่วยสกัดและการหาลักษณะเฉพาะของลิปิดจากสาหร่ายเทา. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมพลังงาน, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สรินยา ขัดชุ่มแสง. 2547. องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้องแข้งม้า. การค้นคว้าแบบอิสระเภสัชศาสตร์บัณฑิตคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สิริญญา ทะยะ . 2554. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเกี๋ยง และผลต่อการเกิดมะเร็งตับหลายขั้นตอนที่เหนี่ยวนำด้วยสารเคมีในหนูขาว.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุวรรณา สุภิมารส. 2543. เทคโนโลยีการผลิตลูกกวาดและช็อกโกแลต . สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ลือชัย บุตคุป. 2554. สารประกอบฟีโนลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. Journal of Science and Technology MSU. 31 (4): 443-455 หน้า.

อัญชนา เจนวิถีสุข. 2544. การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Chew, Y.L., Y.Y. Lim, M. Omar and K.S. Khoo. 2008. Antioxidant Activity of Three Edible Seaweeds from Two Areas in South East Asia. Journal of food Science and Technology 41 (6): 1067-1072.

Gallo, M., Ferracane, R., Graziani, G., Ritieni., A. and Fogliano, V. 2010. Microwave Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Four Different Spices. Molecule 15: 6365-6374.

Garofulic, I.E., Uzelac, V.D., Jambrak, A. R., Jukic, M. 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus var. Marasca*). Journal of Food Engineering 117:437-442.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine. Fourth Edition; Oxford University P. 268-340.

Jiangfeng Song, Dajing Li Chunquan Liu and Ying Zhang. 2011. Optimized microwave-assisted extractionof total phenolics (TP) from Ipomoeabatatas leaves and its antioxidant activity. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12: 282–287.

Joseph, J. A., Fisher, D. R., & Bielinski, D. 2005. Blueberry extract alters oxidative stressmediatedsignaling in COS-7 cells transfected with selectively vulnerable muscarinic receptor subtypes. Journal of Alzheimers Disease, 9: 35-42.

Liyana-Pathirana, C., & Shahidi, F. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chemistry, 93: 47-56.

Pulugurtha, S. 2011.Gallic acid & its uses (ออนไลน์). http://www.livestrong.com/article/ 496550-gallic-acid-its-uses/ [9 กุมภาพันธ์ 2557].

Reynolds, L. D. and Wilson, N. G. 1991. **Gallic acid**. (ออนไลน์). http://en.wikipedia.org /wiki/gallic_acid. [9 กุมภาพันธ์ 2557].

Roberta, RE., et al. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cationdecolorization assay. Free Radic. Bio. Med. 26: 9-10

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative Properties of Xanthans on the Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40 (6) : 945-948.

Silva, E. M., Rogez, H., & Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from Inga edulis leaves using response surface methodology. Separation Purification Technology, 55, 381-387.

Singh, R.P., Chidambara Muryhy, K.N. and Jayaprakasha, G.K. 2002. Article studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punicagranatum) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50: 81-86.

Tsai, T.H., Tsai, P.J. and Ho, S.C. 2005. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Several Commonly Used Spices. Journal of Food Science, 70: 43-C49.

Tremblay, L. 2011. Foods with gallic acid (ออนไลน์). http://www.livestrong.com/article /535607-foods-with-gallic-acid/ [9 กุมภาพันธ์ 2557].

Vita, J. A. 2005. Polyphenols and cardiovascular disease: Effects on endothelial and platelet function. American Journal of Clinical Nutrition, 81: 292-297.

Zheng, X.Z., Wang,X., Lan,Y. B., Shi, J., Xue,J. S.,& Liu,C. H. 2009. A comparison study on Microwave-assisted extraction of Potentilla anserine L.polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. Carbohydrate Polymers, 80: 84-93.

ภาคผนวก

บทความวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Nukrob Narkprasom, Kanjana Narkprasom and Umaporn Upara. 2015. Optimization of Total Phenolic from *Cleistocalyx nervosum* by Microwave-Assisted Extraction. **American Journal of Engineering and Applied Sciences**. 8 (3): 302-309.

American Journal of Engineering and Applied Sciences

Original Research Paper

Optimization of Total Phenolic from *Cleistocalyx nervosum* by Microwave-Assisted Extraction

Nukrob Narkprasom, Kanjana Narkprasom and Umaporn Upara

Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand, 50290, Thailand

Article history
Received: 09-06-2014
Revised: 01-05-2015
Accepted: 25-05-2015

Corresponding author:
Nukrob Narkprasom
Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand, 50290, Thailand
Email: narkprasom@hotmail.com

Abstract: The objective of this research was to extract phenolic compounds from Makiang (*Cleistocalyx nervosum*) seeds waste obtained from the elaboration of makiang beverages using the microwave assisted extraction method. The optimal conditions of microwave assisted extraction of total phenolics from makiang seeds were determined using response surface method. The variables of microwave power, extraction time and ethanol proportion on effect of total phenolic were designed the experiment by Box Behnken design. The estimation of the mathematical model indicated that the second-order polynomial model was appropriate to determine optimal conditions of microwave assisted extraction of total phenolics from makiang seeds. The highest yield of total phenolic from makiang seed and antioxidant activity were obtained when the extraction process was set at a microwave power, 450 W, an extraction time of 213 second and an ethanol proportion of 51%(v/v). Under these optimal conditions, the predicted and experimental values of total phenolic from makiang seeds were the 75.659 mgGAE/gDW and 75.132±0.576 mgGAE/gDW, respectively. The research showed that total phenolics from makiang seeds by microwave assisted extraction have the high efficiency in terms of high yield and antioxidant activity within short time extraction which can apply to use in cosmetic product, health food and pharmaceutical industry.

Keywords: *Cleistocalyx nervosum*, Total Phenolic, Microwave-Assisted Extraction, Antioxidant Activity

Introduction

Makiang (*Cleistocalyx nervosum*) seeds are commonly used for the elaboration of beverages because of its high content of carbohydrates, vitamin b1, vitamin b2, calcium and flavonoids (Taya *et al*., 2014; Khumtue and Naphrom *et al*., 2013). However, there is an abundant waste of makiang seeds rich in phenolic compounds during the process of elaboration of beverages (Patthamakanokporn *et al*., 2008; Sriwanthana *et al*., 2007). Many studies report that numerous plants contain phenolic compounds that help reduce the risk of cancers, heart and neurodegenerative diseases (Joseph *et al*., 2005; Nuengchamnong and Inkaninan, 2009).

A traditional method of extracting phenolic compounds was by using water bath; however, this extraction process requires long periods of time. At present, the extraction of phenols using microwave (-assisted) has gain interest, because it requires a shorter extraction period, uses less solvent, has a better extraction rate and operates under a lower cost. This technique has been widely used in the extraction of pheolic compounds from several plants and vegetables (Gallo *et al*., 2010; Garofulic *et al*., 2013; Song *et al*., 2011). However, extraction of Total Phenolic compounds from Making Seeds (TPMS) using microwave methods has yet to be attempted. Therefore, microwave-assisted extraction of TPMS was investigated by response surface methodology to determine the optimal condition of process. Moreover, antioxidant activities of TPMS were studied.

Box Behnken Design (BBD) is a statistical technique of response surface methodology that uses experimental data to simulate mathematical equation and then solve problem to determine the optimal condition. This method has been applied to optimize biochemical and physical process in many researches (Cansee *et al*.,

Science Publications

© 2015 Nukrob Narkprasom, Kanjana Narkprasom and Umaporn Upara. This open access article is distributed under a Creative Commons Attribution (CC-BY) 3.0 license.

2008; Omar *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2008; Narkprasom *et al.*, 2013) because, this excellent design spends minimal experiment to obtain the best outcome.

Therefore, microwave-assisted extraction of TPMS was investigated by response surface methodology to determine the optimal condition of process. Moreover, antioxidant activities of TPMS were studied.

Materials and Methods

Material

Samples of makiang seeds (*Cleistocalyx nervosum*, RIT) were obtained from the waste beverage process of pilot plant located at Maejo University. The seeds were separated manually from the rest of the waste and then were washed with fresh water. After washing, the seeds were dried at 60°C for 3 days and then were milled to powder at 40 mesh. The powder was then packed in aluminum foil bags and kept in desiccators.

Chemicals

Gallic acid, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ethanol, Na_2CO_3 and Folin-Ciocalteu's phenol were purchased from union science (Chiang Mai, Thailand).

Microwave-Assisted Extraction

A microwave oven (Samsung, ME711K) and soxhlet extractor set (Fig. 1) were used for the extraction of phenol compounds from the making seeds. The microwave oven was connected to a cooling system (Thermo Electron Haake WKL 25 Recirculator Chiller) that was set at 30°C to control temperature of circulated water. The leak of microwave-assisted extraction was checked with microwave leakage detector (RCME).

Quantification of Total Phenolic from Makiang Seeds

Makiang powder was mixed with ethanol at a ratio of 1:30 g mL^{-1}. The TPMS were extracted from the samples using different microwave power and extraction time. The samples were then centrifuged at 5000×g for 5 min to separate between the supernatant and solid portions of the dilution. One mL of the supernatant was diluted with 3 mL of distilled water. The 100 µL of mixed sample was added with 2 mL of 7%w/v Na_2CO_3 and 100 µL of Folin-Ciocalteu's phenol and then the samples were kept at room temperature for 30 min. TPMS was quantified using a spectrophotometer at 750 nm (Tookjit, 2011).

Assay of DPPH Radical Scavenging Activity

Antioxidant activity of TPMS was measured using Shimada *et al.* (1992) DPPH assay. About 100 µL of TPMS were mixed with 2900 µL of 0.1 mM DPPH in methanol. The samples were kept in the dark for 30 minutes and then, were measured DPPH radical scavenging activity by spectrophotometer at 515 nm. The antioxidant activity was calculated according to the following Equation 1:

$$\% \text{ Inhibition} = \left(\frac{1 - \text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}}\right) \times 100 \quad (1)$$

Box Behnken Design and Statistical Analysis

The preliminary variables used in this study consisted of microwave power (x_1), extraction time (x_2) and ethanol proportion (x_3). The effects of these variables on the microwave-assisted extraction of the making seeds were investigated and analyzed using the ANOVA available at SPSS 17. The groups in homogenous subsets by Duncan method were displayed for designed level of BBD in next step. Based on ANOVA, the level of each factor was selected to design experiment which presented in Table 1.

Each level of the variables used in this study were coded -1, 0, 1. BBD was employed to determine the optimal condition. The whole design of 17 experimental points carried out and show on Table 2.

Fig. 1. Microwave-assisted extraction and microwave leakage detector for optimization of TPMS

Table 1. Factors and levels for designed experiment

			Level		
Factor			-1	0	1
Microwave power	x_1	W	400	450	500
Extraction time	x_2	s	180	210	240
Ethanol proportion	x_3	%v/v	40	50	60

Table 2. Box Behnken design and response of TPMS

Runs	Microwave power (W) x_1	Extraction time (s) x_2	Ethanol proportion (%v/v) x_3	Yield of TPMS (mgGAE/gDW)	
				Experimental	Predicted*
1	-1(400)	-1(180)	0(50)	60.13	60.552
2	1(500)	-1	0	61.23	61.972
3	-1	1(240)	0	60.29	59.547
4	1	1	0	66.14	65.717
5	-1	0(210)	-1(40)	57.39	58.355
6	1	0	-1	62.54	63.185
7	-1	0	1(60)	61.98	61.335
8	1	0	1	65.06	64.095
9	0(450)	-1	-1	68.25	66.862
10	0	1	-1	69.20	68.977
11	0	-1	1	69.33	69.552
12	0	1	1	68.79	70.177
13	0	0	0	74.88	75.560
14	0	0	0	76.23	75.560
15	0	0	0	75.57	75.560

*R^2 = 98.19%; Adjusted R^2 = 94.94%; Predicted R^2 = 99.09%; P-value<0.0001

The data obtained from the experiment was used to build a mathematical model (Equation 2). The model was modified to fit a quadratic equation in order to correlate the relationship between the independent variables and the dependent response for optimization:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 \quad (2)$$

Where:

Y = The predicted response
x_1, x_2 and x_3 = The independent variables
β_0 = The model constant
β_1, β_2 and β_3 = The linear coefficients
β_{12}, β_{13} and β_{23} = The interacted coefficients
β_{11}, β_{22} and β_{33} = The quadratic coefficients

Microsoft Excel 2007 was used to analyze the regression of quadratic model.

Results

Effect of the Extraction Time on the Yield of TPMS

As observed in Fig. 2, the yield of TPMS increased at the beginning of the extraction time (120-210 s); however, yield of TPMS decreased after 210 s. The Maximum yield of TPMS (54.74±1.65 mgGAE/gDW was found at 210 s. Therefore, the level of extraction time for optimization was set at 180, 210 and 240 s.

Effect of Microwave Power on the Yield of TPMS

Results in Fig. 3 indicate that the yield of TPMS increased until the microwave was set to 450 W. The highest yield of TPMS as 63.03±2.62 mgGAE/gDW obtains at 450 W of microwave power. Voltages higher than 450 W reduced the yield of TPMS was deceased.

Effect of Different Ethanol Proportion on the Yield of TPMS

Different ethanol proportion was varied from 30-90%v/v to investigate the yield of crude extraction. Microwave power and extraction time were fixed at 450 W and 210 s, respectively. The results show that the highest yield of TPMS (58.11±0.51 mgGAE/gDW) was obtained when ethanol was diluted at a proportion of 50%v/v (Fig. 4).

The yield of TPMS increased when using an ethanol proportion ranging from 30 to 50%v/v. In contrast, when the solvent of ethanol and water was higher than 50%v/v, the yield of TPMS decreased.

Optimization of Microwave-Assisted Extraction for the Yield of TPMS

Table 2 indicates that the maximum yield of TPMS was found when microwave extraction process was set at a microwave power of 450 W, an extraction time of 210 s and ethanol proportion of 50%v/v. By applying regression analysis on the experimental data, the independent variables and dependent variable are related by the following second-order polynomial equation:

$$Y = 75.56 + 1.897x_1 + 0.685x_2 + 0.972x_3 + 1.187x_1x_2 - 0.517x_1x_3 - 0.372x_2x_3 - 10.381x_1^2 - 3.231x_2^2 - 3.436x_3^2 \quad (3)$$

where, Y was the yield of TPMS, whereas x_1, x_2 and x_3 are the variables of microwave power, extraction and ethanol proportion, respectively. Estimation of Equation 3 with OLS yielded a P-value of <0.0001 and high values of R^2 (0.98) and adjusted R^2 (0.94). This indicates that model (Equation 3) can be used to optimize of the extraction of TPMS using microwave-assisted extraction. The ANOVA was shown in Table 3.

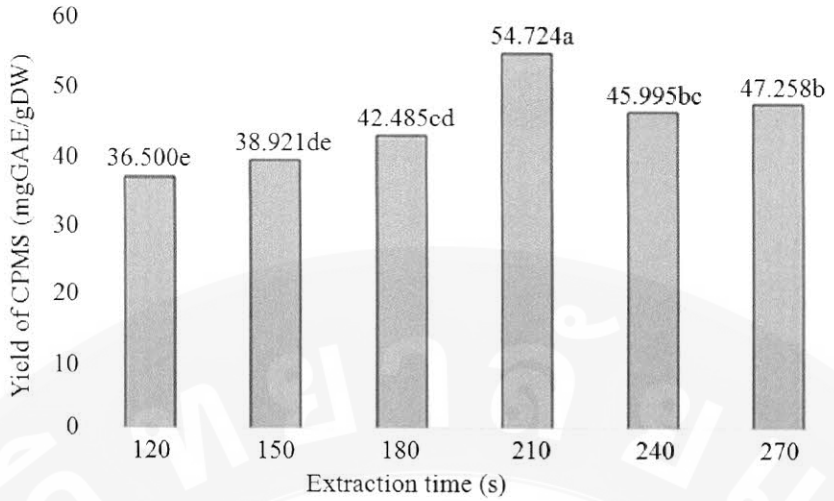


Fig. 2. Effect of different extraction time on extraction yield of TPMS

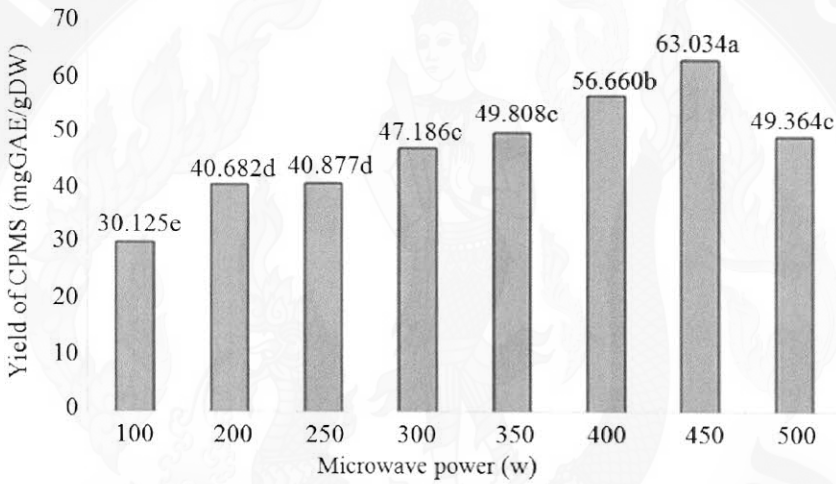


Fig. 3. Effect of different microwave power on extraction yield of TPMS

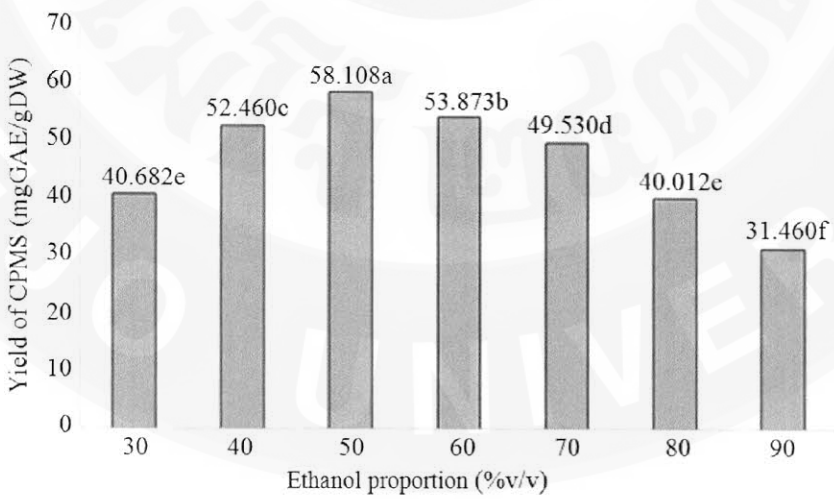


Fig. 4. Effect of different ethanol proportion on extraction yield of TPMS

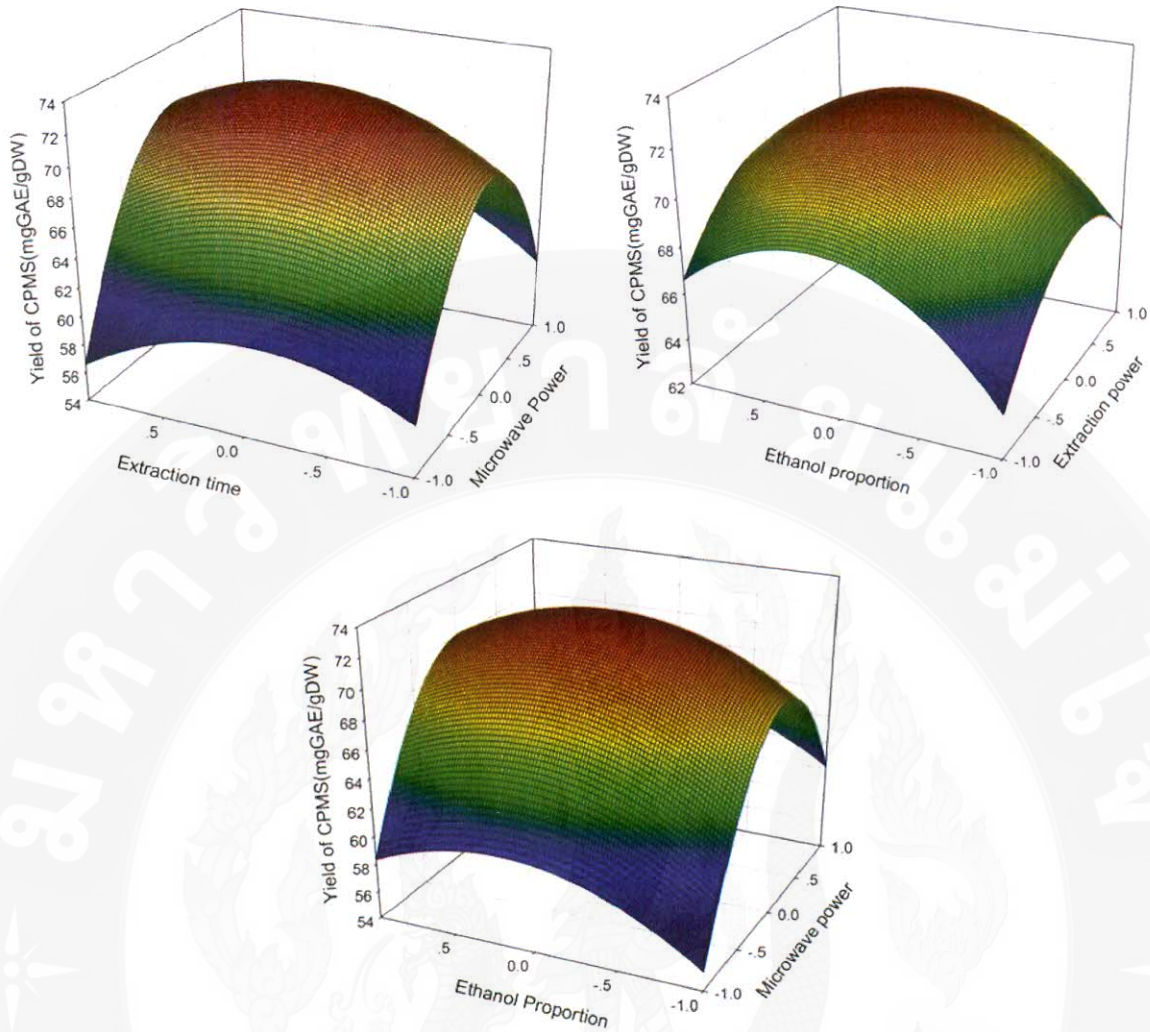
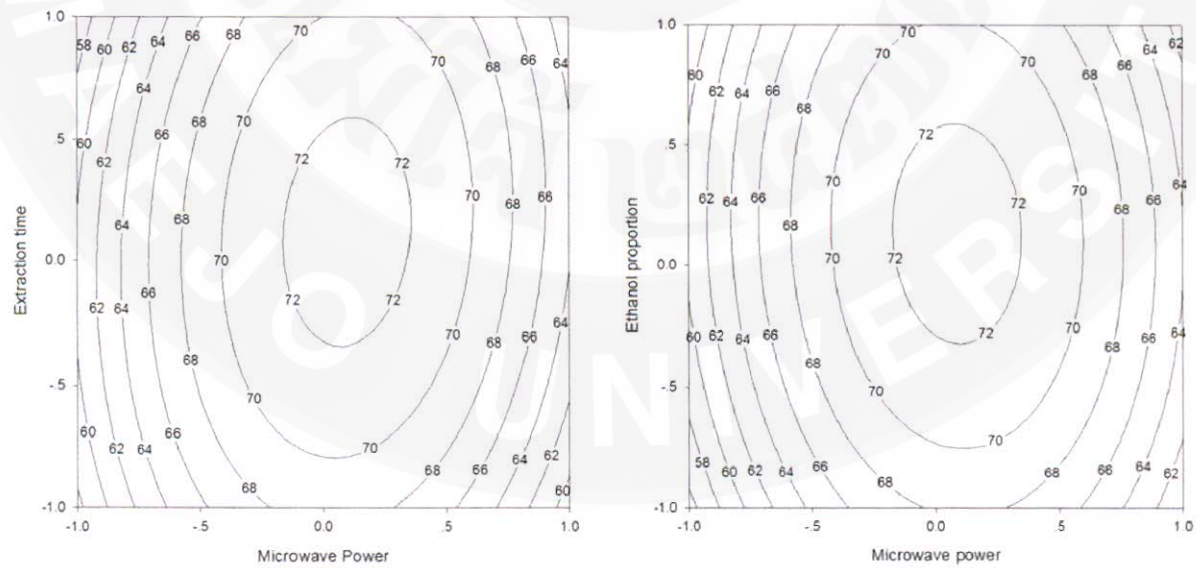


Fig. 5. The 3D plots showing the effect of the microwave power, extraction time and ethanol proportion on the response of extraction yield of TPMS



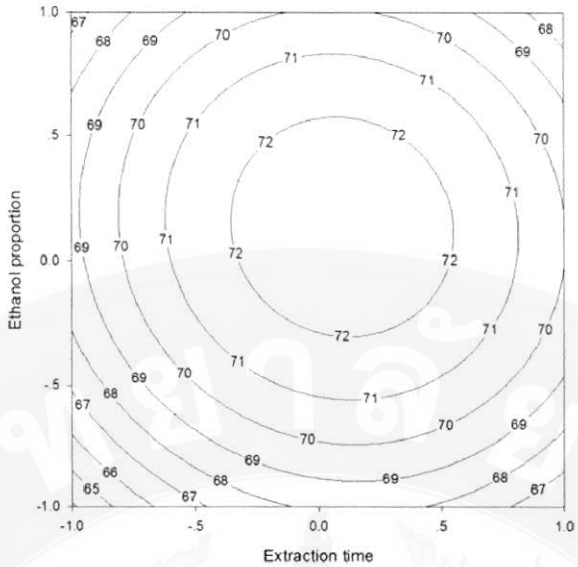


Fig. 6. The contour plots showing the effect of the microwave power, extraction time and ethanol proportion on the response of extraction yield of TPMS

Table 3. Estimated regression model of relationship between response variable and independent variables

Coefficients		Standard error	t Stat	P-value
β_0	75.560	0.775	97.467	0.000
β_1	1.898	0.475	3.997	0.010
β_2	0.685	0.475	1.443	0.209
β_3	0.973	0.475	2.049	0.096
β_{12}	1.188	0.671	1.769	0.137
β_{13}	-0.517	0.671	-0.771	0.476
β_{23}	-0.372	0.671	-0.555	0.603
β_{11}	-10.381	0.699	-14.856	0.000
β_{22}	-3.231	0.699	-4.624	0.006
β_{33}	-3.436	0.699	-4.917	0.004

The calculated significant of each coefficient was check by P-value. The calculated significant of each coefficient was check by P-value. The small P-value is more significant in corresponding coefficient which can found from the linear coefficient of β_1 and quadratic coefficients of β_{11} and β_{33}.

Estimates of Equation 3 were then made into 3D and contour plots (Fig. 5 and 6. respectively) to account for the interaction between the independent variables and the responses of the dependent variable.

The effects of microwave power, extraction time and ethanol proportion on the yield of TPMS were exhibited in Fig. 5 for 3D plots and Fig. 6 for contour plots, whereas the optimal conditions of model (Equation 3) was solved to calculate the maximum yield of TPMS under experimental condition.

According to the results from the solver in Microsoft Excel 2007, the highest yield of TPMS (75.659 mgGAE/gDW) was obtained when the extraction process was completed with a microwave power of 450 W; an extraction time of 213 sec and a dilution with ethanol at a proportion of 51%v/v. These results were confirmed by replicating the experiment with the aforementioned conditions. The mean yield of TPMS was 75.132±0.576 mgGAE/gDW., while the antioxidant activity was found to be 85% of inhibition.

Discussion

The parameters of microwave power, extraction time and ethanol proportion for microwave assisted extraction of TPMS were studies. The results of optimal condition according to Song *et al.* (2011) that long period of extraction time and higher power of microwave degrade phenolic compound from plants, which would explain the results reported in Fig. 2 and 3. The kind of solvent is also important for extraction process. From literature reviews found that ethanol is the best solvent for antioxidant compound and it is safe for human consumption (Dai and Mumper, 2010). According to Pavlović *et al.* (2013), the highest antioxidant activity in *in-vitro* was found when ethanol

was used as a solvent in microwave-assisted extraction The TPMS from microwave assisted extraction was found antioxidant activity. According to many studies indicated that bioactive phenolic compound is the utilization of agricultural waste as natural food ingredients because, there are safe and healthy (Dorta *et al*., 2014; Ribas-Agustی *et al*., 2014).

Conclusion

The maximum yield of TPMS (75.659 mgGAE/gDW) was found when the microwave-assisted extraction was done using a microwave power of 450 W, an extraction time of 213 s and ethanol proportion of 51%v/v. The optimal conditions were replicated, the yield of TPMS (75.132±0.576 mgGAE/gDW) was closely with predicted yield. TPMS of this research may uses in food and pharma-ceutical industries to enhance nutritional values and also to add in healthy and cosmetic products.

Acknowledgement

This research was financially supported by a grant of Maejo University, Thailand. The authors would like to thank undergraduate students in food engineering, Miss Suphan Ritdatwong and Miss Aouynuon Koudkum for collecting and analyzing the all data of research.

Author's Contribution

Nukrob Narkprasom: Contributed in all experiments, research plan, data-analysis and writing of manuscript.

Kanjana Narkprasom: Contributed in experiments, prepared the raw material and analysis of total phenolic and antioxidant activity.

Umaporn Upara: Coordinated all process of makiang production in pilot plant of Maejo University, Thailand.

Ethics

This article is original and contains unpublished material. The corresponding author confirms that all of the other authors have read and approved the manucript and no ethical issues involved.

References

Cansee, S., J. Uriyapongson, C. Watyotha, T. Thivavarnvongs and J. Varith, 2008. Amphoteric starch in simultaneous process preparation with boxbehnken design for optimal conditions. Am. J. Applied Sci., 5: 1535-1542. DOI: 10.3844/ajassp.2008.1535.1542

Dai, J. and R.J. Mumper, 2010. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15: 7313-7352. DOI: 10.3390/molecules15107313

Dorta, E., M. GonzÙlez, M.G. Lobo, C. SÙnchez-Moreno and B. de Ancos, 2014. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera Indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. Food Res. Int., 57: 51-60. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.01.012

Gallo, M., R. Ferracane, G. Graziani, A. Ritieni and V. Fogliano, 2010. Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. Molecules, 15: 6365-6374. DOI: 10.3390/molecules15096365

Garofulic, I.E., V. Dragovic-Uzelac, A.R. Jambrak and M. Jukic, 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). J. Food Eng., 117: 437-442. DOI: 10.1016/j.jfoodeng. 2012.12.043

Joseph, J.A., D.R. Fisher and D. Bielinski, 2005. Blueberry extract alters oxidative stress mediated signaling in COS-7 cells transfected with selectively vulnerable muscarinic receptor subtypes. J. Alzheimers Dis., 9: 35-42.

Khumtue, S. and D. Naphrom, 2013. Effects of plant growth regulators on quality of makiang fruit (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*). Proceedings of the International Graduate Research Conference, Dec. 20, iGRC2013, Chiang Mai University, Thailand, pp: 200-204.

Narkprasom, N., J.H. Guo, T.C. Huang and Y.K. Guu, 2013. Combination of statistical techniques for submerged fermentation for extracellular polysaccharide and biomass of *Ganoderma tsugae*. Am. J. Biostat., 3: 38-46. DOI: 10.3844/ajbssp.2013.38.46

Nuengchamnong, N. and K. Inkaninan, 2009. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. LWT-Food Sci. Technol., 42: 297-302. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.04.012

Omar, R., M.A. Abdullah, M.A. Hasan and M. Marziah, 2004. Development of growth medium for *Centella Asiatica* cell culture via response surface methodology. Am. J. Applied Sci., 1: 215-219. DOI: 10.3844/ajassp.2004.215.219

Patthamakanokporn, O., P. Puwastien, A. Nitithamyong and P.P. Sirichakwal, 2008. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. J. Food Composit. Anal., 21: 241-248. DOI:10.1016/j.jfca.2007.10.002

Pavlović, M.D., A.V. Buntić, S.S. Šiler-Marinković and S.I. Dimitrijević-Branković, 2013. Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee. Separat. Purificat. Technol., 118: 503-510. DOI: 10.1016/j.seppur.2013.07.035

Ribas-Agustچ, A., M. Gratacs-Cubarsچ, C. Sدrraga, M.D. Guàrdia and J. Garcچa-Regueiro *et al.*, 2014. Stability of phenolic compounds in dry fermented sausages added with cocoa and grape seed extracts. LWT-Food Sci. Technol., 57: 329-336. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.12.046

Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara and T. Nakamura, 1992. Antioxidative properties of xanthans on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem., 40: 945-948. DOI: 10.1021/jf00018a005

Song, J., D. Li, C. Liu and Y. Zhang, 2011. Optimization microwave-assisted extraction of Total Phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity. Innovative Food Sci. Emerg. Technol., 12: 282-287. DOI:10.1016/j.ifset. 2011.03.001

Sriwanthana, B., W. Treesangsri, B. Boriboontrakul, S. Niumsakul and P. Chavalittumrong, 2007. *In vitro* effects of Thai medical plants on human lymphocyte activity. Songklanakarin J. Sci. Technol., 29: 17-28.

Taya, S., C. Punvittayagul, W. Inboot, S. Fukushima and R. Wongpoomchai, 2014. *Cleistocalyx nervosum* extract ameliorates chemical-induced oxidative stress in early stages of rat hepatocarcinogenesis. Asian Pacific J. Cancer Prevent., 15: 285-2830. DOI: 10.7314/APJCP.2014.15.6.2825

Tookjit, J., 2011. Production of ready to drink juice concentrate produced from makiang and mulbery using vacuum evaporation. MSc Thesis, Chiang Mai University.

Xu, H., L.P. Sun, Y.Z. Shi, Y.H. Wu and B. Zhang *et al.*, 2008. Optimization of cultivation conditions for extracellular polysaccharide and mycelium biomass by *Morchella esculenta* As51620. Biochem. Eng. J., 39: 66-73. DOI:10.1016/j.bej.2007.08.013

Zhu, T., H.J. Heo and K.H. Row, 2010. Optimization of crude polysaccharides extraction from *Hizikia fusiformis* using response surface methodology. Carbohydrate Polymers, 82: 106-110. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.04.029

ลงลายมือชื่อ หัวหน้าโครงการวิจัย และผู้ร่วมวิจัย พร้อม วัน เดือน ปี

วัน เดือน ปี	ชื่อ-สกุล	ลายมือชื่อ	
21/9/2558	ดร. นักรบ นาคประสม		หัวหน้าโครงการ
21/9/2558	ดร. กาญจนา นาคประสม		ผู้ร่วมวิจัย

คำรับรอง

รายงานโครงการวิจัยฉบับนี้ได้ผ่านการพิจารณาตรวจสอบความถูกต้องและความสมบูรณ์เรียบร้อยแล้ว จึงอนุญาตให้นำส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ได้

(ลงชื่อ).....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อุมาพร อุประ)

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

วัน 21 เดือน กันยายน พ.ศ 2558

ลงชื่อ).....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สิทธิสิน บวรสมบัติ)

คณบดีวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร

วัน 21 เดือน กันยายน พ.ศ 2558