

รายงานวิจัย

โครงการเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มจากผลผลิตทางการเกษตรและอาหาร

Technology for Development of Value Added Agricultural and Food Products

สัญญาเลขที่ CU-CLUSTER-Food-13-49-53

ผู้วิจัย

รศ.ดร.อาทิตย์วรรณ โชติพฤษ

รศ.ดร.ประเสริฐ ภวสันต์

โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุน โดยโครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (CU-CLUSTER-FUND)

บทคัดย่อ

ในรายงานนี้ผู้วิจัยสรุปผลการทดสอบการสกัดสารสำคัญสองชนิด ได้แก่ สารแอสตาแซนทินจากสาหร่ายเซลล์เดียว *H. Pluvialis* และสารประกอบฟีนอลิกจากผลสมอไทย ในการสกัดสารแอสตาแซนทินพบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการสกัดคืออะซิโตน และกระบวนการสกัดโดยใช้ไมโครเวฟร่วมในระหว่างการสกัดให้ผลได้ของสารสกัดสูงที่สุด สำหรับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลสมอไทยพบว่าตัวทำละลายผสมของน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พรอพอลีนไกลคอล มีความเหมาะสมต่อการสกัด และในระบบตัวทำละลายผสมดังกล่าว การทำให้เข้มข้นขึ้นของสารสกัดยังสามารถทำได้ โดยใช้กระบวนการที่เรียกว่า sugaring out ซึ่งนับเป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค

Abstract

This report summarizes the results of extraction of two important plant derived compounds such as astaxanthin from unicellular microalgae, *H. pluvialis*, and phenolic compounds from fruits of *T. chebula*. The appropriate solvent for astaxanthin extraction was found to be acetone and the technique that gave the highest extraction yield was microwave assisted extraction. For extraction of total phenolics from *T. chebula*, water-EtOH and water-propylene glycol were found to be appropriate solvent systems which also allow sugaring out concentration of the compounds to be possible. The sugaring out concentration process is considered benign to human and environment.

สารบัญเรื่อง

บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 วิธีดำเนินการวิจัย	2
1.4 ขอบเขตการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การสกัดสารแอสตาแซนทินจาก <i>H. pluvialis</i>	
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	4
2.1.1 สาหร่ายและสารเคมี	4
2.1.2 ขั้นตอนการทดลอง	4
2.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทิน	5
2.2 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	5
2.2.1 วิธีการสกัดด้วยการแช่ (Maceration)	5
2.2.2 วิธีการใช้คลื่นเหนือเสียงร่วมด้วยในการสกัด (UAE)	6
2.2.3 วิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมด้วยในการสกัด (MAE)	7
2.2.4 เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารแอสตาแซนทิน	8
2.3 สรุปและเสนอแนะ	9
2.4 บรรณานุกรม	9
บทที่ 3 การสกัดและการทำให้เข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกจากผลสมอไทย	
3.1 วิธีการทำการวิจัย	11
3.1.1 วัตถุประสงค์และสารเคมี	11
3.1.2 การสกัด	11
3.1.3 กระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล	12
3.1.4 การวิเคราะห์	13
3.2 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	15
3.2.1 การวิเคราะห์สถิติ และผลของตัวแปรหลักในการสกัดต่อปริมาณฟีนอลิก	15
3.2.2 สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโดยใช้น้ำ-เอทานอล และน้ำ-พอลิธินไกลคอลของสารประกอบฟีนอลิกจากผล <i>T.chebula</i>	18
3.2.3 การคำนวณพื้นที่ผิวดูดซับสำหรับปริมาณฟีนอลิกที่มีมากที่สุด	24
3.2.4 กระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล (Sugaring out concentration)	27

3.2.5 สัมประสิทธิ์การกระจายของสารประกอบฟีนอลิก	29
3.2.5 Antioxidant activity	30
3.3 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	34
3.3.1 สรุปผลการวิจัย	34
3.3.2 ข้อเสนอแนะ	35
3.4 เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	36
ผลลัพธ์ของ โครงการ ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ	37
ประวัติผู้วิจัย	38

สารบัญตาราง

บทที่ 2 การสกัดสารแอสตาแซนทินจาก <i>H. pluvialis</i>	
ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยวิธีต่างๆ	9
บทที่ 3 การสกัดและการทำให้เข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกจากผลสมอไทย	
ตารางที่ 3.1 รหัสของตัวแปรสำหรับการสกัด	12
ตารางที่ 3.2 Spherical CCD สำหรับสามตัวแปรอิสระ	12
ตารางที่ 3.3 อัตราส่วน โดยปริมาตรของ สารสกัด:สารละลาย ABTS	14
ตารางที่ 3.4 ผลจากการสกัดจากทุกการทดลอง	16
ตารางที่ 3.5 ตาราง ANOVA ของปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดโดยน้ำ-เอทานอล	17
ตารางที่ 3.6 ตาราง ANOVA ของปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากการสกัด โดยน้ำ-พอร์ฟิลลิน ไกลคอล	18
ตารางที่ 3.7 แบบจำลองรวมของ $Y_{\text{water-EtOH}}$ (ฟีนอลิกที่มีในระบบน้ำ-เอทานอล)	18
ตารางที่ 3.8 ตาราง ANOVA สำหรับสถานะที่เหมาะสมที่สุด ของฟีนอลิกที่มีของ $Y_{\text{water-EtOH}}$	19
ตารางที่ 3.9 สัมประสิทธิ์ของสมการพื้นผิวตอบสนองของ $Y_{\text{water-EtOH}}$	19
ตารางที่ 3.10 แบบจำลองรวมของ $Y_{\text{water-PG}}$	19
ตารางที่ 3.11 ตาราง ANOVA สำหรับสถานะที่เหมาะสมที่สุด ของฟีนอลิกที่มีของ $Y_{\text{water-PG}}$	20
ตารางที่ 3.12 สัมประสิทธิ์ของสมการพื้นผิวตอบสนองของ $Y_{\text{water-PG}}$	20
ตารางที่ 3.13 กรดแกลลิกและอิลาจิกที่มีหลังการสกัดจากผล <i>T.chebula</i>	26
ตารางที่ 3.14 ความเข้มข้นของกรดแกลลิกและอิลาจิก และสัมประสิทธิ์การกระจาย	29

สารบัญรูป

บทที่ 2 การสกัดสารแอสตาแซนทินจาก <i>H. pluvialis</i>	
รูปที่ 2.1 แสดงปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ด้วยวิธีการแช่ (Maceration)	6
รูปที่ 2.2 แสดงปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ด้วยใช้	
คลื่นเหนือเสียงร่วมด้วยในการสกัด (UAE)	7
รูปที่ 2.3 แสดงปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ด้วยใช้	
คลื่นไมโครเวฟร่วมด้วยในการสกัด (MAE)	8
บทที่ 3 การสกัดและการทำให้เข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกจากผลสมอไทย	
รูปที่ 3.1 Central composite orthogonal rotatable design	11
รูปที่ 3.2 พื้นผิวตอบสนองของฟีนอลิกรวมในระบบน้ำ-เอทานอลในตัวแปรของ	
(ก) อุณหภูมิและความเข้มข้น (ข) อุณหภูมิและเวลา (ค) ความเข้มข้นและเวลา	22
รูปที่ 3.3 พื้นผิวตอบสนองของฟีนอลิกรวมในระบบน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลในตัวแปรของ	
(ก) อุณหภูมิและความเข้มข้น (ข) อุณหภูมิและเวลา (ค) ความเข้มข้นและเวลา	23
รูปที่ 3.4 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการทดลองและที่ได้จากการทำนายของระบบน้ำ-เอทานอล	
(ข) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการทดลองและที่ได้จาก	
การทำนายของระบบน้ำ-พรอพิลีนไกลคอล	24
รูปที่ 3.5 HPLC chromatogram ของสารสกัด <i>T.Chebula</i> 1) กรดแกลลิกและ 2) กรดเอลลาจิก	26
รูปที่ 3.6 เฟสบนและเฟสล่างภายหลังกระบวนการทำให้เข้มข้น	27
รูปที่ 3.7 อัตราส่วนเฟสของสารสกัดที่ความเข้มข้นของกลูโคสต่างๆกัน	28
รูปที่ 3.8 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในเฟสบนและ	
เฟสล่างหลังกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล	28
รูปที่ 3.9 % PI ของแต่ละอัตราส่วนของสารสกัดต่อ ABTS ในระบบตัวทำละลายน้ำ-เอทานอล	
ก่อนและหลังกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำ	31
รูปที่ 3.10 %PI ของแต่ละอัตราส่วนของสารสกัดต่อ ABTS ในระบบตัวทำละลายน้ำ-พรอพิลีน	
ไกลคอลก่อนและหลังกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำ	32
รูปที่ 3.11 Antioxidant activity (IC50) ของสารสกัดที่ได้จาก <i>T.chebula</i> ในระบบน้ำ-เอทานอล	
และน้ำ – พรอพิลีนไกลคอล ก่อนและหลังการกระบวนการทำให้เข้มข้น	33

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและมูลเหตุจูงใจ

ประเทศไทยมีทรัพยากรอาหารและการเกษตรที่สมบูรณ์และหลากหลายเนื่องจากมีสภาวะภูมิประเทศและภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเกษตร ไม่ว่าจะเป็นพืชอาหาร พืชสมุนไพร หรือแม้แต่การเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดต่าง ๆ เพื่อเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าสำหรับมนุษย์และสัตว์เศรษฐกิจของประเทศ หากแต่การจัดการทางด้านอาหารและการเกษตรของประเทศในปัจจุบันนั้นยังอาจเป็นไปได้โดยไม่ครบวงจร ภารกิจอย่างหนึ่งของเกษตรกร ผู้ประกอบการ นักวิจัยและผู้เกี่ยวข้อง คือการคำนึงถึงความสำคัญของการวิจัยและพัฒนาเพื่อแปรรูปสินค้าเกษตรเหล่านี้ให้เก็บรักษาได้นานขึ้นและมีมูลค่าเพิ่มขึ้น สำหรับการบริหารทรัพยากรทางการเกษตรและกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบทางการเกษตรอย่างครบวงจรนั้น นอกจากจะต้องคำนึงถึงผลตอบแทนทางเศรษฐศาสตร์แล้ว ยังจำเป็นต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

เนื่องจากอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น กุ้งกุลาดำ กุ้งขาว และหอยสองฝาชนิดต่างๆ เป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ทำให้มีความต้องการสาหร่ายเซลล์เดียวสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนในปริมาณมาก สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำเศรษฐกิจหลายชนิด เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารแอสตาแซนทิน (astaxanthin) ซึ่งเป็นสารสีจำพวกคาโรทีนอยด์ซึ่งทำให้สัตว์น้ำมีสุขภาพแข็งแรงและมีสีสด เป็นที่ต้องการของตลาด นอกจากนี้สารแอสตาแซนทินยังมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูงโดยมีรายงานว่ามีฤทธิ์สูงกว่าวิตามินอีถึง 100 เท่า ทำให้นิยมใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและเครื่องสำอางหลายประเภท (Kaewpintong et al, 2007)

แม้ว่าสารแอสตาแซนทินเป็นสารที่สามารถผลิตได้ด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยที่กล่าวว่าสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพ (เช่น จุลินทรีย์บางประเภท เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย หรือจุลสาหร่าย เช่น *H. pluvialis*) มีโครงสร้างที่เหมาะสมและเป็นประโยชน์ต่อการใช้งานของมนุษย์มากกว่าสารแอสตาแซนทินที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการทางเคมี โดยมีผลการวิเคราะห์จากงานวิจัยหลายชิ้นที่กล่าวว่าสาหร่าย *H. pluvialis* สามารถสะสมสารแอสตาแซนทินธรรมชาติได้ในปริมาณที่สูงที่สุดคือ มากถึง 3-5% ของน้ำหนักแห้ง

ผู้วิจัยศึกษาการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยกระบวนการที่มีปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์กึ่งวิกฤต ซึ่งทำให้ได้สารสกัดที่มีความปลอดภัยและปราศจากการปนเปื้อนจากตัวทำละลายอินทรีย์ (Thana et al., 2008 และ Krichnavaruk et al., 2008) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาหากลไกในการรักษาสภาพการต่อต้านอนุมูลอิสระของสารแอสตาแซนทินในสาหร่ายชนิดนี้ อย่างไรก็ตามการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์กึ่งวิกฤตยังคงมีราคาค่อนข้างสูง จึงยังจำเป็นต้องศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยวิธีอื่นๆด้วย

สารอนุมูลอิสระอีกกลุ่มหนึ่งที่ผู้วิจัยได้ศึกษาการสกัดได้แก่สารกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งสามารถละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายมีขั้ว หรือตัวทำละลายผสม ผู้วิจัยได้ศึกษาการสกัดสารนี้จากผลสมอไทยโดยใช้น้ำ

กึ่งวิกฤตและพบว่าน้ำกึ่งวิกฤตสามารถสกัดสารดังกล่าวได้ดีในบางสภาวะ ขณะที่สารฟีนอลิกจะเกิดการสลายตัวได้หากสกัดที่สภาวะอุณหภูมิที่สูงเกินไป (Rangsiwong et al, 2009) ดังนั้นจึงควรที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงกระบวนการสกัดที่เหมาะสม ซึ่งในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเสนอทางเลือกในการสกัดในระบบสกัดที่มีอุณหภูมิต่ำลง โดยสกัดในตัวทำละลายผสมที่ปลอดภัย เช่น น้ำ-เอทานอล และ น้ำ-โพพิลีนไกลคอล ระบบดังกล่าวนี้นอกจากจะมีความปลอดภัยแล้ว สารสกัดที่ได้ยังสามารถถูกนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นได้ด้วยกระบวนการแยกเฟส

ดังนั้นในโครงการนี้ผู้วิจัยเสนอที่จะทดสอบการสกัดสารสำคัญสองชนิดได้แก่สารแอสตาแซนทินจากสาหร่ายเซลล์เดียว *H. Pluvialis* และสารประกอบฟีนอลิกจากผลสมอไทย โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ อีกทั้งทดสอบวิธีการทำให้เข้มข้นขึ้นของสารสกัด โดยเฉพาะในกรณีของสมอไทยซึ่งใช้ตัวทำละลายแอลกอฮอล์หรือ โพพิลีนไกลคอลร่วมกับน้ำเป็นสารสกัด เนื่องจากสารสกัดในระบบดังกล่าวสามารถทำให้เข้มข้นขึ้นได้โดยง่ายด้วยวิธี sugaring out ซึ่งนับเป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อทดสอบกระบวนการสกัดสารแอสตาแซนทินแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายน้ำจืด *Heamatococcus pluvialis*
2. ทดสอบการสกัดและการทำให้เข้มข้นขึ้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากผลสมอไทย

1.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. รวบรวมและทบทวนเอกสารวิจัย
2. ทดสอบวิธีการวิเคราะห์สารสกัด
3. ทดลองการสกัดแคโรทีนอยด์แอสตาแซนทินจากสาหร่าย *H. pluvialis* สารประกอบฟีนอลิกจากผลสมอไทย
4. ทดลองการทำให้เข้มข้นขึ้นของสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากผลสมอไทย
5. สรุปผลและทำรายงานและเตรียมผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1.4 ขอบเขตการวิจัย

1. ทดสอบวิธีการวิเคราะห์สารสกัด
2. ทดลองการสกัดแคโรทีนอยด์แอสตาแซนทินจากสาหร่าย *H. pluvialis* ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้อัตราส่วนและไมโครเวฟช่วยในการสกัด
3. ทดลองการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลสมอไทยด้วยตัวทำละลายเช่น เอทานอลและตัวทำละลายผสม เช่น เอทานอล-น้ำ และ โพพิลีนไกลคอล-น้ำ
4. ทดสอบการทำให้เข้มข้นขึ้นของสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากผลสมอไทยด้วยกระบวนการ sugaring out

5. สรุปผลและทำรายงานและเตรียมผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลงานที่ได้รับสามารถนำไปพัฒนาใช้กับอุตสาหกรรมอาหารและการเกษตรของประเทศ เป็นการพัฒนากระบวนการสกัดพืชสมุนไพรและผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มทางด้านอาหารและการเกษตร

1.6 เอกสารอ้างอิง

1. Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., Pavasant, P. 2007. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative Cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor, *Bioresource Technology*, 98: 288-295.
2. Krichnavaruk S., Shotipruk A., Goto M., Pavasant, P. 2008. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oil as co-solvent, *Bioresource Technology*, 99(13): 5556-5560.
3. Thana P., Machmudah S., Goto M., Sasaki M., Pavasant P., Shotipruk A. 2008. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, *Bioresource Technology*, 99 (8): 3110-3115.
4. Rangsriwong P., Rangkadilok N., Satayavivad J., Goto M., Shotipruk A. 2009. Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula Retz.* fruits, *Separation and Purification Technology*, 66(1): 51-56.

บทที่ 2 การสกัดสารแอสตาแซนทินจาก *H. pluvialis*

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1.1 สาหร่ายและสารเคมี

สาหร่ายแห้งเกรดอาหารสัตว์ สั่งซื้อมาจากบริษัทไซยาโนเทค (Cyanatech) ทะเลสาวยูท ยานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Motonobu Goto สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน และอะซิโตนไนไตร สั่งซื้อมาจากบริษัท Fisher-Scientific สารมาตรฐานแอสตาแซนทินสั่งซื้อมาจาก Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.2 ขั้นตอนการทดลอง

ขั้นตอนแรกก่อนการสกัดด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ วิธีการสกัดด้วยการแช่ (Maceration) วิธีการใช้คลื่นเหนือเสียงร่วมในการสกัด (UAE) วิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมในการสกัด (MAE) จะทำการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมจากสารละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกับสารแอสตาแซนทิน ได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซิโตนไนไตรล์ และอะซิโตน โดยตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้ปริมาณมากที่สุดจะนำไปเป็นตัวทำละลายเพื่อศึกษาอิทธิพลของตัวแปร ที่มีอิทธิพลต่อการสกัดด้วยวิธีต่างๆ โดยทำการทดลองทุกซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานควบคู่ไปกับผลการทดลอง

2.1.2.1 วิธีการสกัดด้วยการแช่ (Maceration)

การทดลองด้วยวิธีการแช่ ดำเนินการโดยใช้สาหร่าย 0.1 กรัมแช่ในตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ณ อุณหภูมิในช่วง 30-60°C โดยปริมาณตัวทำละลายที่นำมาใช้นี้จะทำการทดลองก่อนในเบื้องต้นเพื่อหาอัตราส่วนของตัวทำละลายและปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสม โดยศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดในช่วงเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 90 นาที ภายหลังจากการสกัด นำสารสกัดที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร ซึ่งทำจาก Polyethylene terephthalate (PET) (Whatman, USA) แล้วจึงวิเคราะห์สารสกัดด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

2.1.2.2 วิธีการสกัดด้วยชุดอุปกรณ์ Soxhlet

วิธีการสกัดด้วยชุดอุปกรณ์ Soxhlet เป็นวิธีการสกัดที่งานวิจัยโดยทั่วไปใช้หาองค์ประกอบของสารทั้งหมดในสารตัวอย่าง ในงานวิจัยนี้ใช้สาหร่าย 0.5 กรัม ใส่ลงใน thimble cartridge ของชุดอุปกรณ์ แล้วนำไปต่อกับขวดกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุด้วยตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยหม้อให้ความร้อน (Electro mantle, USA) ทำการสกัดนาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารที่ได้จากการทดลองกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตรซึ่งทำจาก Polyethylene terephthalate (PET) (Whatman, USA) แล้วจึงวิเคราะห์สารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC)

2.1.2.3 วิธีการใช้คลื่นเหนือเสียงร่วมในการสกัด (UAE)

การสกัดด้วยวิธีการใช้คลื่นเหนือเสียงร่วม จะใช้อ่างกำเนิดคลื่นเหนือเสียง รุ่น 275DAE (Crest Ultrasonics, USA) การทดลองนี้ดำเนินการโดยใช้สาหร่าย 0.1 กรัม สกัดในตัวทำละลาย 30 มิลลิลิตร ซึ่งจะใส่สารทั้งสองในขวดสี่ขา แช่ขวดตรงกลางอ่างกำเนิดคลื่นเหนือเสียงที่บรรจุน้ำเปล่า 2.2 ลิตร โดยให้กัน

ขวดอยู่เหนือกันอย่างประมาณ 5 เซนติเมตร การสกัดดำเนินการในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 60°C เป็นเวลา 0 ถึง 90 นาที จากนั้นนำสารที่ได้จากการทดลองกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร ซึ่งทำจาก Polyethylene terephthalate (PET) (Whatman, USA) แล้วจึงวิเคราะห์สารด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

2.1.2.4 วิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมในการสกัด (MAE)

การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟดำเนินการโดยใช้เครื่อง ไมโครเวฟรุ่น MARS 5™ (CEM Mathews, USA) การทดลองนี้ดำเนินการโดยใช้สารหยาบ 0.1 กรัม สกัดในตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร บรรจุลงในกระบอกทดลองที่ทำจาก polyetheretherketone (PEEK) ขนาด 100 มิลลิลิตร โดยใช้ 60% ของกำลังไฟฟ้า 1200 วัตต์ และเวลาในการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเพื่อให้ถึงอุณหภูมิที่ต้องการประมาณ 2 นาที ในการทดลองนี้ศึกษาอิทธิพลของเวลาที่ให้คลื่นไมโครเวฟและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารแอสตาแซนทิน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากการทดลองกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร ซึ่งทำจาก Polyethylene terephthalate (PET) (Whatman, USA) แล้วจึงนำไปวิเคราะห์สารด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

2.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทิน

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) ใช้คอลัมน์ Venisep GES C18 4.6×150 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร ด้วยความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง เมทานอล และน้ำ ด้วยอัตราส่วนต่อปริมาตรเป็น 95 ต่อ 5 ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารแอสตาแซนทินในแต่ละการทดลองจะอ้างอิงจากพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ที่ละลายในตัวทำละลายแต่ละชนิด การหาประสิทธิภาพในการสกัดจะเปรียบเทียบกับปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่สกัดด้วยวิธีไมโครเวฟ และรายงานในรูปแบบของ % recovery ดังสมการ

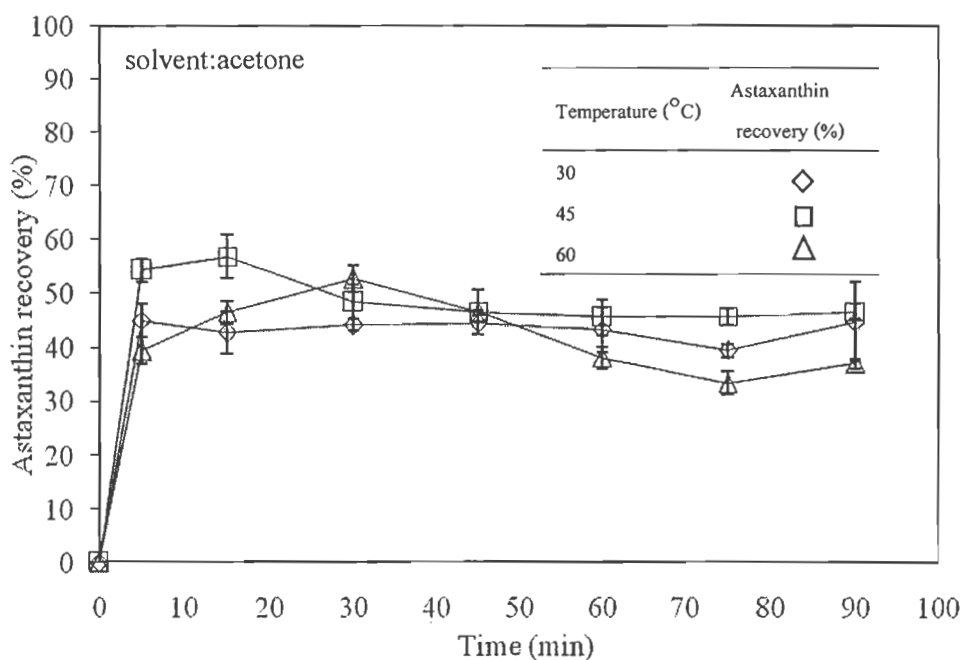
$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{ปริมาณสารออกซ์แอนเทนินที่ได้จากการสกัด}}{\text{สารออกซ์แอนเทนินทั้งหมดในสารหยาบ}} \quad (2.1)$$

2.2 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

2.2.1 วิธีการสกัดด้วยการแช่ (Maceration)

ผลของเวลาที่ใช้ในการแช่สารหยาบในตัวทำละลายและอุณหภูมิที่ใช้ต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินจากสารหยาบแสดงดังรูปที่ 2.1 พบว่าทุกช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสารแอสตาแซนทิน อัตราการสกัดสารแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงการสกัด 5 นาทีแรก เนื่องมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารแอสตาแซนทินระหว่างภายในเซลล์และภายนอกเซลล์สารหยาบทำให้อัตราการสกัดสารแอสตาแซนทินมากในช่วงแรก หลังจากสกัดได้นานกว่า 5 นาที อัตราการสกัดลดลง โดยปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มากที่สุด คือ 57±4% สกัดได้ที่อุณหภูมิ 45°C หลังจากสกัดไปได้ 15 นาที ขณะที่ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ 60°C 60 นาที ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มาก

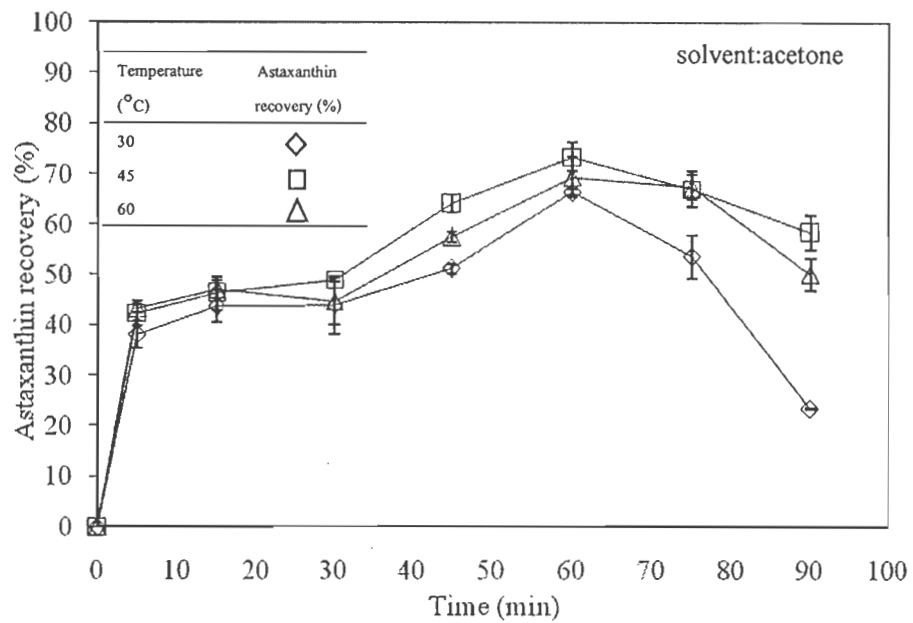
ขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัด เนื่องมาจากการเพิ่มอุณหภูมิเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายของสารแอสตาแซนทิน และลดความหนืดของตัวทำละลาย อย่างไรก็ตามการเพิ่มอุณหภูมิสูงมากเกินไปอาจทำให้สารแอสตาแซนทินเสื่อมสภาพได้



รูปที่ 2.1 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ด้วยวิธีการแช่ (Maceration)

2.2.2 วิธีการใช้คลื่นเหนือเสียงร่วมในการสกัด (UAE)

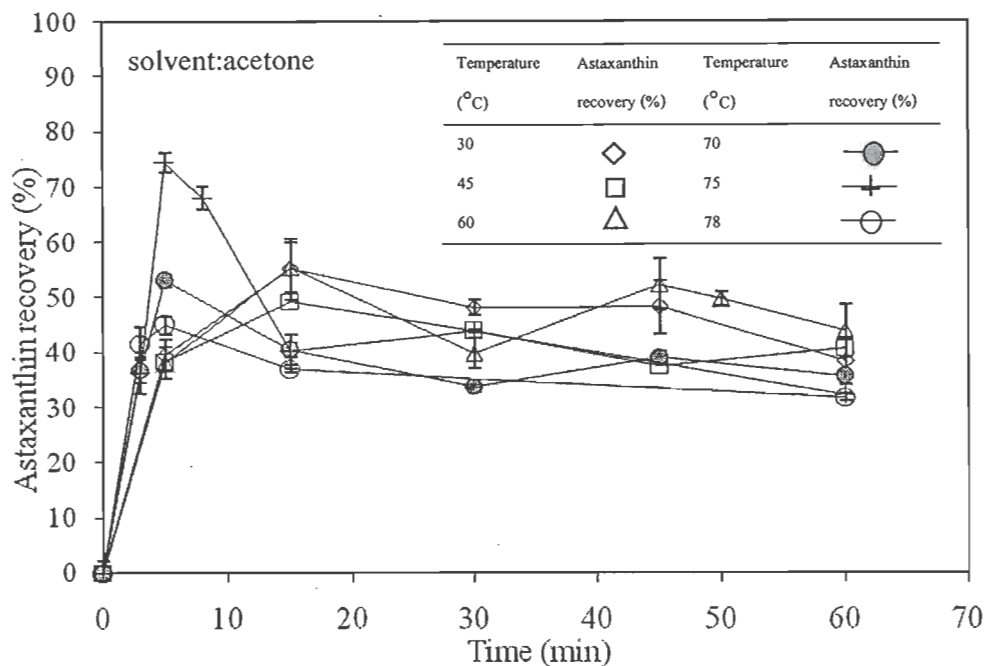
ผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยวิธีการใช้คลื่นเหนือเสียงแสดงดังรูปที่ 2.2 พบว่าทุกช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสารแอสตาแซนทิน อัตราการสกัดสารแอสตาแซนทินเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาการสกัด 5 นาทีแรก ได้ปริมาณสารแอสตาแซนทินมากที่สุด คือ $41.17 \pm 1.97\%$ ในช่วง 5 ถึง 30 นาที อัตราการสกัดสารแอสตาแซนทินลดลงและการใช้คลื่นเหนือเสียงร่วมในการสกัดไม่ได้ทำให้ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยวิธีแช่ ทั้งนี้เนื่องจากผลของการอัดและการขยายตัวของฟองก๊าซในระบบทำให้อุณหภูมิเฉพาะจุดสูงมากขึ้นและไปทำลายสารแอสตาแซนทิน (Zhao et al., 2006, Toma et al., 2001) และเมื่อทำการสกัดนานขึ้น และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้เพิ่มขึ้นอีกครั้งจนมีค่าประมาณ $70 \pm 2\%$ ที่เวลาการสกัด 60 นาที หลังจากนั้นปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ลดลงเมื่อใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น ดังนั้นสภาวะที่สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้มากที่สุดคือ 45°C สกัดนาน 60 นาที



รูปที่ 2.2 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ด้วยใช้คลื่นเหนือเสียงร่วมด้วยในการสกัด (UAE)

2.2.3 วิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมในการสกัด (MAE)

ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงการสกัด 5 นาทีแรกในทุกอุณหภูมิการสกัด หลังจากนั้น การสกัดที่อุณหภูมิ 30 45 และ 60°C ปริมาณสารแอสตาแซนทินคงที่ตลอดช่วงเวลาในการสกัด ที่อุณหภูมิ 70 และ 75°C พบว่าสกัดสารแอสตาแซนทินได้มากที่สุดในช่วง 5 นาทีแรกและหลังจากนั้นจะตกลง ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 75°C ประมาณ 74±4% หลังจากสกัดไปได้นาน 5 นาที เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงถึง 78°C ไม่สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินเพิ่มได้อีก เนื่องจากสารแอสตาแซนทินเปลี่ยนโครงสร้างจาก (all-E)-astaxanthin ไปเป็น (13Z)-astaxanthin (Zhao et al., 2006)



รูปที่ 2.3 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ด้วยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมด้วยในการสกัด (MAE)

2.2.4 เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารแอสตาแซนทิน

ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากแต่ละวิธีแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มากที่สุดคือประมาณ $74 \pm 4\%$ สกัดได้จากวิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมในการสกัดที่อุณหภูมิ 75°C และการสกัดด้วยวิธีการใช้คลื่นเหนือเสียงร่วมที่อุณหภูมิในการสกัด 45°C ได้ปริมาณสารแอสตาแซนทินมากเป็นอันดับสอง คือประมาณ $73 \pm 3\%$ การสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยคลื่นไมโครเวฟสามารถสกัดได้ที่อุณหภูมิสูงเหนือจุดเดือดของอะซิโตน เนื่องจากระบบคลื่นไมโครเวฟสามารถให้ความร้อนได้อย่างรวดเร็ว และใช้เวลาในการสกัดสั้น ซึ่งจะช่วยลดการเสื่อมสภาพของสาร อย่างไรก็ตามการใช้คลื่นเหนือเสียงร่วมในการสกัดสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้ปริมาณใกล้เคียงกันกับวิธีใช้คลื่นไมโครเวฟ แต่ใช้เวลาในการสกัดนานกว่าถึง 60 นาที และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยในอดีตที่สกัดสารแอสตาแซนทินด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (60–83 %) (Machmudah et al., 2006, Krichnavaruk et al., 2008, Thana et al., 2008) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบทั้งสองวิธีในการสกัดสารแอสตาแซนทินในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม ทั้งการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมในการสกัดและการสกัดด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียง สิ่งที่ต้องควรระวังคือสารแอสตาแซนทินสามารถเสื่อมสลายได้ง่าย ผลของปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้รวมทั้งการเสื่อมสลายของสารแอสตาแซนทินที่ค้นพบในงานวิจัยนี้ ยืนยันได้ว่าวิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมในการสกัดสอดคล้องกับการประมาณที่ได้จากงานวิจัยของ Zhao et al. (2009)

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยวิธีต่างๆ

Methods	Temperature (°C)	Time (min)	% astaxanthin recovery
Maceration	45	15	57±4
Soxhlet	56.5	4 hour	70±2
UAE	45	60	73±3
MAE	75	5	74±4

2.3 สรุปและเสนอแนะ

การสกัดสารแอสตาแซนทินสำหรับการสกัดทุกวิธี สามารถสกัดได้ดีด้วยตัวทำละลายอะซิโตน และสามารถสกัดได้ดีด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียง และการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมในการสกัด การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 75 °C โดยใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย สามารถสกัดสารได้ในระยะเวลาอันสั้น จากผลการทดลองข้างต้นยืนยันได้ว่าวิธีการสกัดสารด้วยคลื่นไมโครเวฟสามารถสกัดสารสำคัญจากสาหร่าย *H. pluvialis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.4 บรรณานุกรม

1. Zhao, L., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., Hu, X. 2006. Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (*all-E*)-astaxanthin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54: 8346-8351.
2. Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, J.T. 2001. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues solvent extraction. *Ultrasonic Sonochemistry*, 8: 137-142.
3. Machmudah, S., Shotipruk, A., Goto, M., Sasaki, M., Hirose, T. 2006. Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using supercritical CO₂ and ethanol as entrainer. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45: 3652-3657.
4. Krichnavaruk, S., Shotipruk, A., Goto, M., Pavasant, P. 2008. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oils as co-solvent. *Bioresour. Technology*, 99: 5556-5560.
5. Thana, P., Machmudah, S., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P., Shotipruk, A. 2008. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.*, 99: 3110-3115.

6. Zhao, L., Chen, G., Zhao, G., Hu, X. 2009. Optimization of microwave-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis* by response surface methodology and antioxidant activities of the extracts. *Separation Science Technology*, 44: 243–262.

บทที่ 3 การสกัดและการทำให้เข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกจากผลสมอไทย

3.1 วิธีการทำการวิจัย

3.1.1 วัตถุดิบและสารเคมี

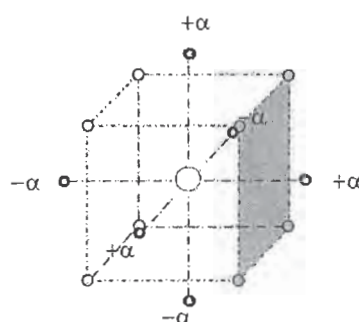
ผลแห้งของ *Terminalia chebula* จากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ตัวอย่างทุกตัวอย่างที่ผ่านการบดแล้วถูกนำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 500 μm สารมาตรฐาน (กรดแกลลิก และกรดคิลาจิก) และตัวกระทำ Folin-Ciocalteu ซื้อมาจากSigma-Aldrich Chemicals (Missouri, USA) น้ำที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้น้ำกลั่นและน้ำ de-ionized Ethanol, formic acid และ HPLC grade Methanol ซื้อมาจาก Merck (Darmstadt, FR Germany) Propylene glycol ซื้อมาจากหน้าเขียน (กรุงเทพฯ ประเทศไทย) กลูโคสซื้อมาจาก Ajax Finechem (NSW, Australia)

3.1.2 การสกัด

นำผลแห้งของ *T. chebula* ไปบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 500 μm จากนั้นชั่ง 1 กรัมของผงผล *T. chebula* นำไปใส่ขวดแก้วก้นกลมสองขวด ต่อเข้ากับคอลัมน์ reflux และเทอร์โมมิเตอร์ สกัดสารตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย (น้ำ-เอทานอล หรือน้ำ-พอร์พิลีน ไกลคอล) 150 ml โดยศึกษาผลของอุณหภูมิ ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ และเวลาต่อปริมาณฟีนอลิกในสารสกัด

3.1.2.1 การออกแบบการทดลองสำหรับการสกัด

ในการศึกษาเพื่อหาความเหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดด้วยน้ำ-เอทานอล (EtOH) และน้ำ-พอร์พิลีน ไกลคอล (PG) ใช้การออกแบบการทดลอง spherical CCD ดังแสดงในรูปที่ 3.1 เมื่อ $\alpha = \sqrt{k}$ โดยที่ k คือจำนวนตัวแปรที่ศึกษา ในที่นี้ ศึกษาตัวแปร 3 ตัว ได้แก่ อุณหภูมิ (X_1), ความเข้มข้น (X_2) และเวลา (X_3) ค่า factorial และ axial design points บนพื้นผิวของทรงกลมรัศมีเท่ากับ \sqrt{k} แสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 Central composite orthogonal rotatable design

ระดับล่าง กลาง และบนของแต่ละค่าที่เปลี่ยนแปลงถูกออกแบบที่ -1.73, 0 และ +1.73 ตามลำดับ สัดส่วน α เทียบกับค่าจริงถูกเขียนไว้ในตารางที่ 3.1 โดยจะทำการทดลองทั้งหมด 17 ครั้ง ได้แก่ 8 factorial points สำหรับตัวแปร 3 ตัวแปร 6 axial points และ 3 center runs โดย 3 center runs ใช้สำหรับการ

วัดค่าความคลาดเคลื่อน ดังนั้นสามารถสรุป experimental matrix สำหรับ three - variable spherical central composite design แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 รหัสของตัวแปรสำหรับการสกัด

Variables	Levels				
	-1.73	-1	0	1	1.73
$X_1 = \text{Temp } (^{\circ}\text{c})$	29	40	55	70	81
$X_2 = \text{EtOH } (\%v/v)$	0	17	40	63	80
$X_2 = \text{PG } (\%v/v)$	13	20	30	40	47
$X_3 = \text{Time } (\text{min})$	19	30	45	60	71

ตารางที่ 3.2 Spherical CCD สำหรับตัวแปรอิสระ 3 ตัวแปร

Run	X_1	X_2	X_3
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	-1.73	0	0
10	1.73	0	0
11	0	-1.73	0
12	0	1.73	0
13	0	0	-1.73
14	0	0	1.73
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระแต่ละตัวและการตอบสนองถูกคำนวณด้วยสมการ second - order polynomial ต่อไปนี้

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j; i \neq j \quad (3.1)$$

เมื่อ Y = ค่าตอบสนอง X_i = รหัสของตัวแปรในสมการ β_0 = ค่าคงที่ β_{ii} = regression coefficient และ β_{ij} = cross-product coefficient การออกแบบและการวิเคราะห์ของการทดลอง central composite ทำโดยใช้ Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)

3.1.3 กระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล

ในการทำให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นด้วยน้ำตาลนั้น นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พอร์พิลลิน ไกลคอลที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ที่มีสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดปริมาณ 10 ml ถูกนำมาใส่ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติมกลูโคสเข้าไปในสารสกัด หลังจากนั้นให้ความร้อนจนกว่ากลูโคสที่เติมเข้าไปจะละลายจนหมด เมื่อถึงจุดนี้จะทำให้เกิดการแยกเฟสของสาร โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกัน (50, 100, 150, 200 และ 250 g/L) ต่อประสิทธิภาพในการแยกเฟสซึ่งจะอยู่ในรูปของอัตราส่วนเฟส (R)

$$R = V_{top}/V_{bottom} \quad (3.2)$$

เมื่อ V_{top} และ V_{bottom} คือปริมาตรของเฟสบนและเฟสล่างตามลำดับ เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสที่ให้ค่าอัตราส่วนเฟสมากที่สุด ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวม และสารประกอบจำเพาะ (กรดแกลลิก แลกรดอลิสิก) ของแต่ละเฟสจะถูกวิเคราะห์ด้วย HPLC

สัมประสิทธิ์การกระจาย (D) ของสารประกอบฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และกรดแอลลิจิกในน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พอร์พิลลิน ไกลคอลคำนวณได้จตามสมการ

$$D = C_{top}/C_{bottom} \quad (3.3)$$

เมื่อ C_{top} และ C_{bottom} คือสัดส่วนความเข้มข้นสารประกอบของเฟสบนและเฟสล่างตามลำดับ

3.1.4 การวิเคราะห์

3.1.4.1 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม

ปริมาณฟีนอลิกรวมนั้นหาโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu ปรับจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Rodríguez-Meizoso et al., 2006) กล่าวคือนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พอร์พิลลิน ไกลคอล ปริมาณ 0.1 ml มาละลายในน้ำกลั่น 2.8 ml จากนั้นนำสารผสมดังกล่าวไปเติมสารละลาย 2%

โซเดียมคาร์บอเนตในน้ำ ปริมาณ 2 ml หลังจาก 3 นาที เติม 50% Folin- Ciocalteu reagent ปริมาณ 0.1 ml ลงไปในสารผสมและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm โดยใช้ น้ำกลั่นในการอ้างอิง ปริมาณฟีนอลิกรวมคำนวณบนพื้นฐานของ calibration curve ของกรดแกลลิก

3.1.4.2 การวิเคราะห์สารสกัด *T.chebula* ด้วย HPLC

การวิเคราะห์กรดแกลลิกและกรดคิลาจิกทำได้โดยใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 10 μ L และ gradient system ของ 0.1% formic acid (ตัวทำละลาย A): methanol (ตัวทำละลาย B) ที่อัตราการไหล 1 ml/min ที่อุณหภูมิของคอลัมน์คงที่ที่ 25 $^{\circ}$ C และเครื่องตรวจวัด UV ที่ 270 nm โดย gradient system เริ่มจาก 4% ตัวทำละลาย B ที่นาทีที่ 0 และเปลี่ยนเป็น 80% ตัวทำละลาย B ที่นาทีที่ 27 ภายในระยะเวลา 30 นาที

3.1.4.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

Antioxidant activity สารสกัดที่ได้จากน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พริกพลีสตีนไกลคอลลที่มี สารประกอบฟีนอลิกที่มากที่สุดถูกวัดทั้งก่อนและหลังกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลด้วยวิธี ABTS โดยใช้วิธีที่อธิบายโดย Re et al., 1999

ต่างๆกัน ค่า IC_{50} หรือความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทำให้เกิดการลดลงของการดูดกลืนตามแนวรัศมี ถึง 50 % ถูกใช้เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด เพื่อหาค่านี้ สารสกัด เข้มข้นถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่น จากนั้นสารสกัดเจือจางถูกนำไปผสมกับสารละลาย ABTS^{•+} (สารละลายที่มี น้ำ 7 mM ABTS และ 2.45 mM potassium persulfate มีค่าการดูดกลืนของ 0.70 \pm 0.02 ที่ 734 nm) ที่ อัตราส่วนโดยปริมาตรเท่ากับ 1:10 (สารละลายตัวอย่าง:สารละลายABTS) สารละลายถูกผสมกันโดยใช้ vortex และสารผสมที่ได้ถูกนำไปไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ 734 nm โดยใช้ น้ำกลั่นในการอ้างอิง

ค่าของ percent inhibition (PI) ถูกคำนวณโดยใช้สมการ

$$PI\% = [(1 - A_t/A_r)] \times 100 \quad (3.4)$$

A_t และ A_r คือค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างและสารอ้างอิง ABTS ตามลำดับ ค่านี้นำไปพล็อตเทียบกับ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างและ linear regression ของข้อมูลถูกสร้างขึ้นเพื่อหาค่า IC_{50}

นอกจากค่า IC_{50} ที่กล่าวมาแล้ว antioxidant activity ก่อนและหลังกระบวนการทำให้เข้มข้นของ สารสกัดยังถูกเปรียบเทียบในรูปของ percent inhibition สำหรับอัตราส่วนโดยปริมาตรของ สารสกัด: สารละลาย ATBS ที่หลายๆค่า ดังแสดงในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 3.3 อัตราส่วนโดยปริมาตรของ สารสกัด:สารละลาย ABTS

Volume ratio (ml) of Extract : ABTS solution

0.025:2, 0.025:5, 0.025:10, 0.025:15

3.2. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ในงานวิจัยนี้แยกออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกศึกษาการสกัด *T.chebula* โดยใช้ตัวทำละลาย น้ำ-เอทานอล และน้ำ-พอร์พิลลิน ไกลคอลเพื่อหาผลของตัวแปรหลักและผลกระทบบระหว่างตัวแปรแต่ละตัวโดยใช้ spherical central composite design (spherical CCD) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสมการพหุนามสองเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด ในส่วนที่สองสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดจากการสกัดทั้งสองระบบที่ศึกษาในส่วนแรกนั้น จะถูกนำมาทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล โดยการเติมสารสกัดด้วยกลูโคสเพื่อให้เกิดการแยกเฟสของสาร ฮาอ์ตราส่วนเฟสและสัมประสิทธิ์การกระจายของฟีนอลิกรวม และสารประกอบฟีนอลิกที่มีความจำเพาะมากกว่านั้นได้แก่ กรดอิลาลิจิกและกรดแกแลลิกในท้ายที่สุดหา antioxidant activity ของสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยน้ำ-เอทานอลและน้ำ-พอร์พิลลิน ไกลคอลเปรียบเทียบกับที่ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นแล้ว

3.2.1 การวิเคราะห์สถิติ และผลของตัวแปรหลักในการสกัดต่อปริมาณฟีนอลิก ที่ได้ (mg/gDW)

ในการศึกษานี้ใช้การออกแบบการทดลองแบบ spherical CCD หาผลของตัวแปรหลักและผลกระทบบระหว่างตัวแปรแต่ละตัวที่ใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก (ค่าตอบสนอง Y) จาก *T.chebula* ตัวแปรที่สนใจได้แก่อุณหภูมิ (X_1) ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (X_2) และเวลา (X_3) โดยตัวแปรและระดับของ spherical central composite design แสดงดังตารางที่ 3.1 และผลของปริมาณฟีนอลิกรวมที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ผลจากการสกัดจากทุกการทดลอง

Run	X ₁	X ₂	X ₃	Y _{water-EtOH}	Y _{water-PG}
1	-1	-1	-1	179.41	165.96
2	1	-1	-1	177.34	177.62
3	-1	1	-1	177.01	176.97
4	1	1	-1	184.89	171.49
5	-1	-1	1	158.86	157.00
6	1	-1	1	162.97	168.53
7	-1	1	1	174.59	177.58
8	1	1	1	218.40	205.64
9	-1.73	0	0	162.36	142.38
10	1.73	0	0	173.08	167.62
11	0	-1.73	0	128.67	175.47
12	0	1.73	0	187.26	188.39
13	0	0	-1.73	197.37	186.80
14	0	0	1.73	176.53	165.30
15	0	0	0	205.74	174.65
16	0	0	0	200.09	176.13
17	0	0	0	201.32	175.97

จากตารางที่ 3.4 จากการวิเคราะห์ความเปลี่ยนแปลง (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0 เพื่อหาตัวแปรที่มีความสำคัญต่อปริมาณฟีนอลิก จากการวิเคราะห์พบว่าแบบจำลองมีความน่าเชื่อถืออยู่ที่ร้อยละ 95 และผลทั้งหมดถูกรวบรวมไว้ในตารางที่ 3.5 – 3.6 สำหรับน้ำ – เอทานอล และน้ำ – พรอพิลดีนไกลคอลตามลำดับ

ตารางที่ 3.5 ตาราง ANOVA ของปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดโดยน้ำ – เอทานอล

Dependent Variable: Y

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7142.080 ^a	14	510.149	57.879	.017
Intercept	303022.492	1	303022.492	34379.272	.000
X ₁	1860.177	3	620.059	70.349	.014
X ₂	4811.742	3	1603.914	181.971	.005
X ₃	504.776	3	168.259	19.090	.050
X ₁ * X ₂	308.099	1	308.099	34.955	.027
X ₁ * X ₃	221.648	1	221.648	25.147	.038
X ₂ * X ₃	544.692	1	544.692	61.798	.016
X ₁ * X ₂ * X ₃	110.789	1	110.789	12.570	.071
Error	17.628	2	8.814		
Total	560077.059	17			
Corrected Total	7159.708	16			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .980)

จากการวิเคราะห์ด้วย ANOVA สำหรับระบบน้ำ-เอทานอล แสดงให้เห็นว่าผลจากทุกตัวแปร ได้แก่ อุณหภูมิ (X₁) ความเข้มข้น (X₂) และเวลา (X₃) และการจับคู่กันของตัวแปรต่อปริมาณฟีนอลิกที่มี (Y) ขณะนี้ในการสกัดด้วยระบบน้ำ-พอลิเอทิลีนไกลคอล ดังแสดงในตารางที่ 3.6 แสดงให้เห็นถึงผลของทั้งสามตัวแปรและผลกระทบบ้างกันและกันระหว่างอุณหภูมิและเวลา และอุณหภูมิและความเข้มข้นมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกที่ได้ (Y) จากผล *T.chebula* พอๆกัน

ตารางที่ 3.6 ตาราง ANOVA ของปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดโดยน้ำ-พรวดฟิลลีน ไกลคอล

Dependent Variable: Y

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2921.504 ^a	14	208.679	318.297	.003
Intercept	306178.104	1	306178.104	467012.623	.000
X ₁	1088.977	3	362.992	553.671	.002
X ₂	621.000	3	207.000	315.737	.003
X ₃	266.168	3	88.723	135.328	.007
X ₁ * X ₂	.047	1	.047	.071	.814
X ₁ * X ₃	139.595	1	139.595	212.924	.005
X ₂ * X ₃	348.746	1	348.746	531.941	.002
X ₁ * X ₂ * X ₃	141.800	1	141.800	216.288	.005
Error	1.311	2	.656		
Total	516053.467	17			
Corrected Total	2922.816	16			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = .996)

3.2.2 สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโดยใช้น้ำ-เอทานอล และน้ำ-พรวดฟิลลีน ไกลคอลของสารประกอบฟีนอลิกจากผล *T.chebula*

ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรแต่ละตัวและสารประกอบฟีนอลิกถูกจำลองด้วยพื้นผิวตอบสนอง โดยใช้แบบจำลอง 2nd order polynomial โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS 16.0 การวิเคราะห์ที่ได้รวมไว้ในตารางที่ 3.7 – 3.9 และ 3.10 – 3.12 สำหรับน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พรวดฟิลลีน ไกลคอลตามลำดับ

ตารางที่ 3.7 แบบจำลองรวมของ Y_{water-EtOH} (ฟีนอลิกที่มีในระบบน้ำ – เอทานอล)

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.949 ^a	.901	.775	10.042

a. Predictors: (Constant), X₃X₃, X₂X₃, X₁X₃, X₁X₂, X₃, X₂, X₁, X₂X₂, X₁X₁

ตารางที่ 3.8 ตาราง ANOVA สำหรับสถานะที่เหมาะสมที่สุดของฟีนอลิกที่มีของ $Y_{\text{water-EtOH}}$

	Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	6453.797	9	717.089	7.111	.008 ^a
	Residual	705.911	7	100.844		
	Total	7159.708	16			

a. Predictors: (Constant), X_3X_3 , X_2X_3 , X_1X_3 , X_1X_2 , X_3 , X_2 , X_1 , X_2X_2 , X_1X_1

b. Dependent Variable: Y

ตารางที่ 3.9 สัมประสิทธิ์ของสมการพหุคูณตอบสนองของ $Y_{\text{water-EtOH}}$

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized	t	Sig.
		B	Std. Error	Coefficients		
1	(Constant)	202.360	5.798		34.903	.000
	X_1	5.167	2.685	.228	1.924	.096
	X_2	12.703	2.685	.561	4.731	.002
	X_3	-2.851	2.685	-.126	-1.062	.324
	X_1X_2	6.206	3.550	.207	1.748	.124
	X_1X_3	5.264	3.550	.176	1.483	.182
	X_2X_3	8.251	3.550	.276	2.324	.053
	X_1X_1	-9.975	2.880	-.447	-3.463	.011
	X_2X_2	-13.234	2.880	-.594	-4.594	.003
	X_3X_3	-3.550	2.880	-.159	-1.232	.258

a. Dependent Variable: Y

ตารางที่ 3.10 แบบจำลองรวมของ $Y_{\text{water-PG}}$ (ฟีนอลิกที่มีในระบบน้ำ - พรอพิลีนไกลคอล)

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.910 ^a	.828	.607	8.473

a. Predictors: (Constant), X_3X_3 , X_2X_3 , X_1X_3 , X_1X_2 , X_3 , X_2 , X_1 , X_2X_2 , X_1X_1

ตารางที่ 3.11 ตาราง ANOVA สำหรับสถานะที่เหมาะสมที่สุดของพีนอลิกที่มีของ $Y_{\text{water-PG}}$

	Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2420.200	9	268.911	3.745	.048 ^a
	Residual	502.587	7	71.798		
	Total	2922.787	16			

a. Predictors: (Constant), X_3X_3 , X_2X_3 , X_1X_3 , X_1X_2 , X_3 , X_2 , X_1 , X_2X_2 , X_1X_1

b. Dependent Variable: Y

ตารางที่ 3.12 สัมประสิทธิ์ของสมการพินผิวตอบสนองของ $Y_{\text{water-PG}}$

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized	t	Sig.	
	B	Std. Error	Coefficients Beta			
1	(Constant)	175.574	4.892		35.889	.000
	X_1	6.395	2.266	.442	2.822	.026
	X_2	6.071	2.266	.420	2.679	.032
	X_3	-1.465	2.266	-.101	-.647	.538
	X_1X_2	-.077	2.996	-.004	-.026	.980
	X_1X_3	4.177	2.996	.219	1.394	.206
	X_2X_3	6.602	2.996	.345	2.204	.063
	X_1X_1	-6.089	2.431	-.428	-2.505	.041
	X_2X_2	2.909	2.431	.204	1.197	.270
	X_3X_3	.946	2.431	.066	.389	.709

a. Dependent Variable: Y

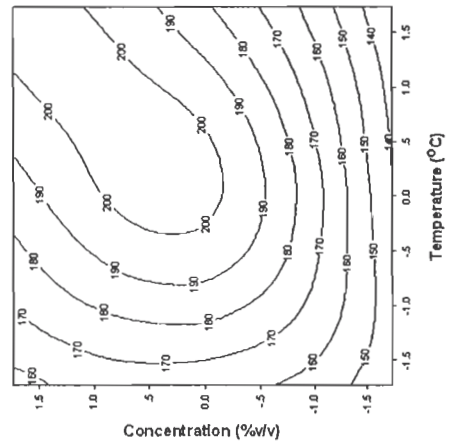
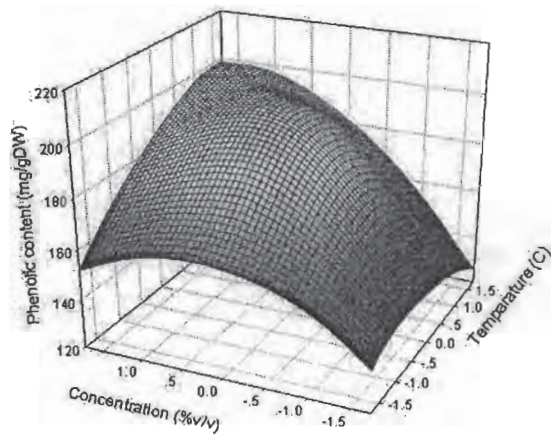
พินผิวตอบสนองสำหรับระบบน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พรอพิลีน ไกลคอล ที่ได้จากการวิเคราะห์ได้ตามสมการ

$$Y_{\text{water-EtOH}} = 202.36 + 5.167X_1 + 12.703X_2 - 2.851X_3 + 6.206X_1X_2 + 5.264X_1X_3 + 8.251X_2X_3 - 9.975(X_1)^2 - 13.234(X_2)^2 - 3.55(X_3)^2 \quad (3.1)$$

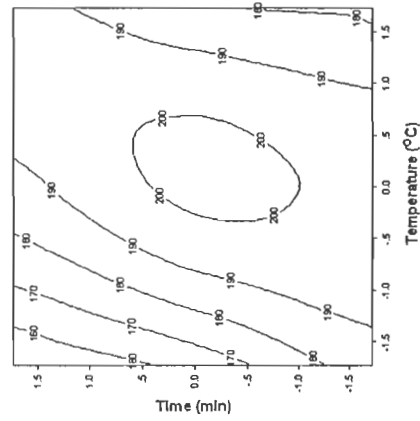
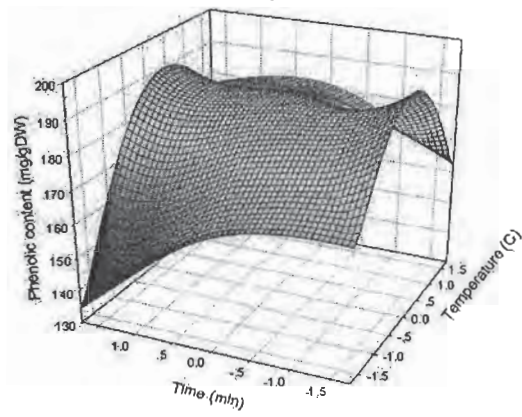
$$Y_{\text{water-PG}} = 175.574 + 6.395X_1 + 6.071X_2 - 1.465X_3 - 0.077X_1X_2 + 4.177X_1X_3 + 6.602X_2X_3 - 6.089(X_1)^2 + 2.909(X_2)^2 + 0.946(X_3)^2 \quad (3.2)$$

เมื่อ Y คือปริมาณฟีนอลิกที่มี (mg/gDW) X_1 , X_2 และ X_3 แทนตัวแปรของอุณหภูมิ ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ และเวลา ความสำคัญของสัมประสิทธิ์แต่ละตัวถูกคำนวณจาก P - value ถ้าค่าของ P น้อยกว่า 0.05 แบบจำลองสัมประสิทธิ์จะมีความน่าเชื่อถือ สำหรับระบบน้ำ - เอทานอล ความเข้มข้นของเอทานอล (X_2) พจน์กำลังสองของอุณหภูมิ (X_1^2) และความเข้มข้น (X_2^2) มีความสำคัญ สำหรับระบบน้ำ - พรอฟิลลีนไกลคอล อุณหภูมิ (X_1) และความเข้มข้น (X_2) และพจน์กำลังสองของอุณหภูมิ (X_1^2) มีความสำคัญ พื้นผิวตอบสนองของสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดแสดงในรูปของกราฟสามมิติดังรูปที่ 3.2 และ 3.3 สำหรับระบบน้ำ - เอทานอล และน้ำ - พรอฟิลลีนไกลคอลตามลำดับ กราฟที่แสดงนั้นจะรวมตัวแปรสองตัว โดยที่ตัวหนึ่งจะคงที่ที่ระดับศูนย์

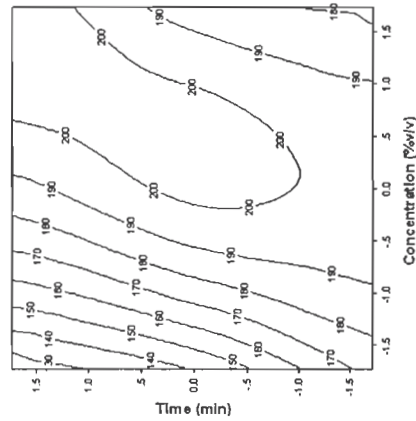
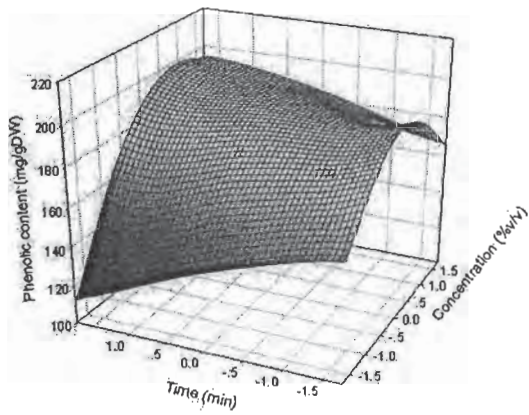
หมายเหตุ: แบบจำลอง (สมการที่ 3.1 และ 3.2) ทำที่สารสกัดที่อุณหภูมิระหว่าง 29–81 °C ความเข้มข้นของเอทานอลระหว่าง 0 – 80 % v/v และความเข้มข้นของพรอฟิลลีนไกลคอลระหว่าง 13–47 % v/v



(ก)

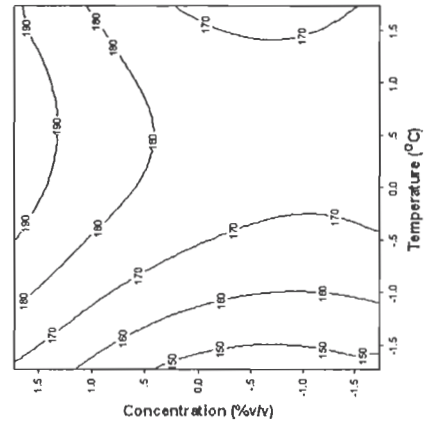
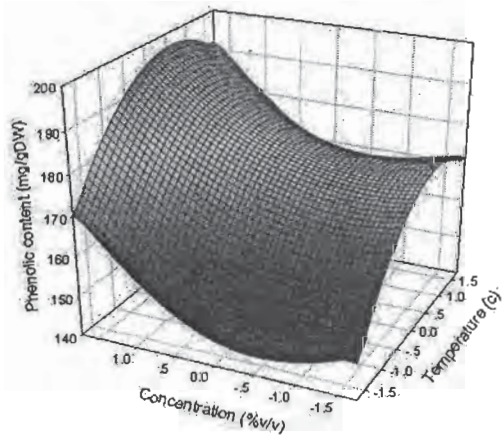


(ข)

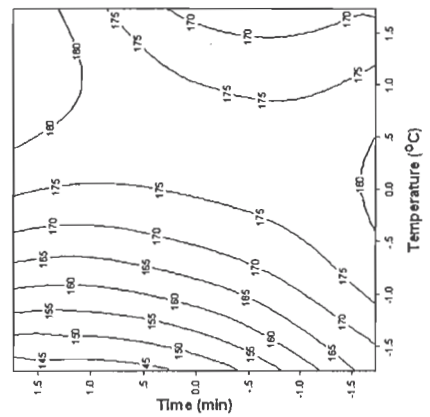
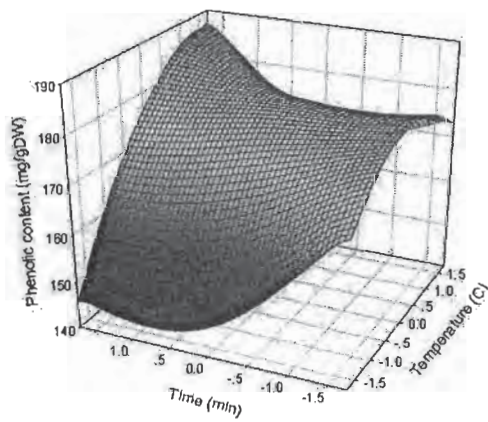


(ค)

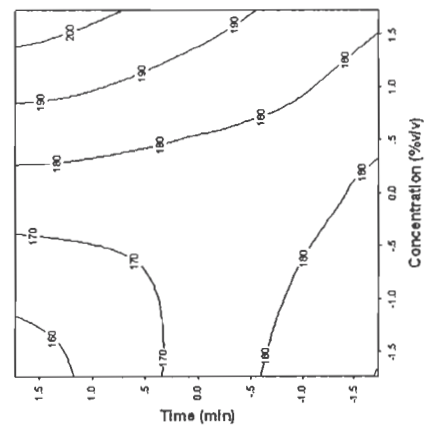
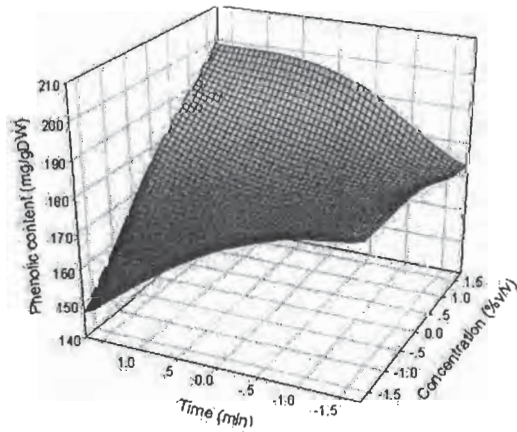
รูปที่ 3.2 พื้นผิวตอบสนองของฟีนอลิกรวมในระบบน้ำ-เอทานอลในตัวแปรของ (ก) อุณหภูมิและความเข้มข้น (ข) อุณหภูมิและเวลา (ค) ความเข้มข้นและเวลา



(ก)



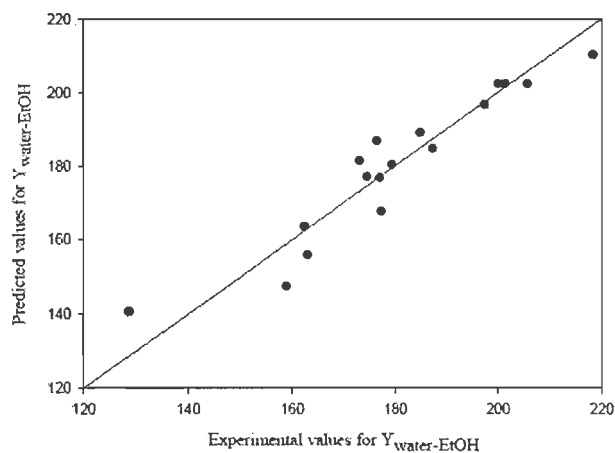
(ข)



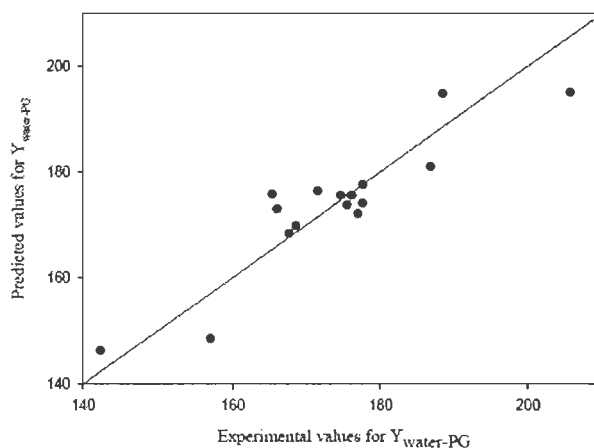
(ค)

รูปที่ 3.3 พื้นผิวตอบสนองของพีนอลิกรวมในระบบน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลในตัวแปรของ (ก) อุณหภูมิ และความเข้มข้น (ข) อุณหภูมิและเวลา (ค) ความเข้มข้นและเวลา

ค่าจากการทดลองและค่าที่ทำนายแสดงในรูปที่ 3.4 (ก) และ (ข) สำหรับระบบน้ำ-เอทานอล และ น้ำ-พริกพลีตีนไกลคอลลตามลำดับ จากผลแสดงให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือของการทำนายของการทดลองผล โดยแบบจำลอง



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.4 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการทดลองและที่ได้จากการทำนายของระบบน้ำ-เอทานอล (ข) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการทดลองและที่ได้จากการทำนายของระบบน้ำ-พริกพลีตีนไกลคอล

3.2.3 การคำนวณพื้นผิวตอบสนองสำหรับสภาวะการสกัดที่เหมาะสม

Response surface methodology (RSM) ถูกใช้เพื่อคำนวณสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด ในที่นี้ RSM ถูกใช้เพื่อหาการตอบสนองที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัด *T.chebula* โดยระบบน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พริกพลีตีนไกลคอล

สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดสามารถคำนวณได้จากการกำหนดให้ partial derivative จากสมการพื้นผิวตอบสนองข้างต้นเทียบกับตัวแปรแต่ละตัวมีค่าเท่ากับศูนย์ ดังนั้น

$$\left[\frac{\partial Y_{(3,1)}}{\partial X_1} \right]_{x_2, x_3} = 0 \quad (3.3)$$

$$\left[\frac{\partial Y_{(3,1)}}{\partial X_2} \right]_{x_1, x_3} = 0 \quad (3.4)$$

$$\left[\frac{\partial Y_{(3,1)}}{\partial X_3} \right]_{x_1, x_2} = 0 \quad (3.5)$$

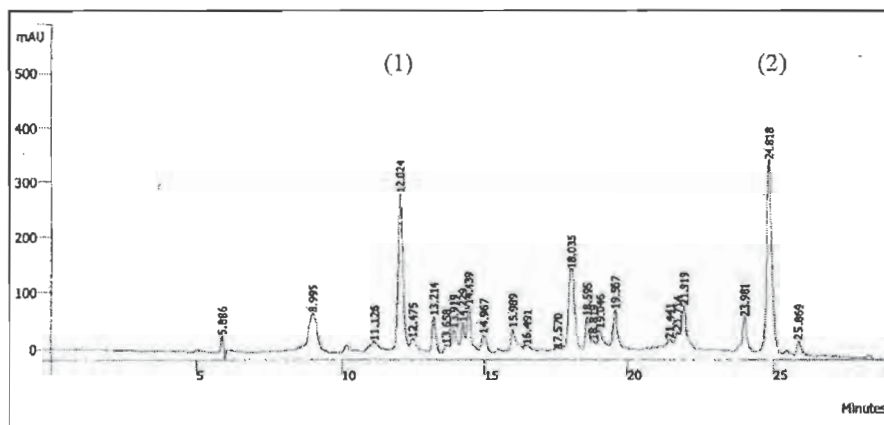
$$\left[\frac{\partial Y_{(3,2)}}{\partial X_1} \right]_{x_2, x_3} = 0 \quad (3.6)$$

$$\left[\frac{\partial Y_{(3,2)}}{\partial X_2} \right]_{x_1, x_3} = 0 \quad (3.7)$$

$$\left[\frac{\partial Y_{(3,2)}}{\partial X_3} \right]_{x_1, x_2} = 0 \quad (3.8)$$

ค่าตอบสนอง $Y_{\text{water} - \text{EtOH}}$ จากการคำนวณแสดงให้เห็นว่าปริมาณฟีนอลิกที่สกัดได้มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 212.51 mg/gDW และสกัดได้ที่ $X_1 = 1.41$, $X_2 = 1.48$ และ $X_3 = 2.48$ กล่าวแบบจำลองแสดงถึงปริมาณฟีนอลิกที่สกัดได้จะมากที่สุดจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 76 °C ความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 76.4 %v/v และนาน 82 นาที ส่วนค่าตอบสนอง $Y_{\text{water} - \text{PG}}$ ที่สูงที่สุดเท่ากับ 178.64 mg/gDW จะเกิดขึ้นที่สภาวะ $X_1 = 0.013$, $X_2 = 0.63$ และ $X_3 = -1.48$ หรือเทียบเท่ากับอุณหภูมิ 57 °C ความเข้มข้นพรอพิลีนไกลคอล 36 %v/v และเวลาที่ใช้เท่ากับ 23 นาที

จากการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวิเคราะห์ปริมาณของกรดแกลลิกและกรดอิลาลิจิกในสารสกัด *T.chebula* ด้วย HPLC (รูปที่ 3.5 แสดง chromatogram ของสารสกัดซึ่งแสดงให้เห็นถึง retention time ของกรดแกลลิกและกรดอิลาลิจิกมีค่าเท่ากับ 12.024 และ 24.818 นาทีตามลำดับ) จากผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณกรดแกลลิกและกรดอิลาลิจิกที่ได้จากการสกัดโดยระบบน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พรอพิลีนไกลคอล เมื่อเปรียบเทียบกับที่ได้จากการใช้น้ำกึ่งวิกฤตและการสกัด Soxhlet ที่ใช้น้ำและแอลกอฮอล์จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Rangsrivong et al., 2009) สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 3.13



รูปที่ 3.5 HPLC chromatogram ของสารสกัด *T.chebula* (1) กรดแกลลิกและ (2) กรดแอสลาจิก

ตารางที่ 3.13 กรดแกลลิกและอิลาจิกที่มีหลังการสกัดจากผล *T.chebula*

Extraction methods	Temperature (°C)	Extraction time (min)	Total phenolic content (mg/gDW)	Component content (mg)	
				GA	EA
Water-EtOH	70	60	218.40	11.00±0.04	9.11±0.06
Water-PG	70	60	205.64	9.83±0.055	5.93±0.07
Subcritical water extraction*	120	37.5	172.74	7.4±0.51	2.36±0.11
	180	37.5	116.16	14.72±0.22	5.38±0.15
Soxhlet water extraction*	100	120	173.4	6.37±0.21	2.27±0.15
	100	240	151.627	7.59±0.16	2.14±0.21
Soxhlet ethanol extraction*	78.3	120	84.45	4.92±0.20	3.01±0.22
	78.3	240	76.093	3.33±0.11	2.35±0.40
Hot water extraction in stirred vessel*	100	120	157.73	7.04±0.23	1.48±0.14

*(Rangsiwong et al., 2009)

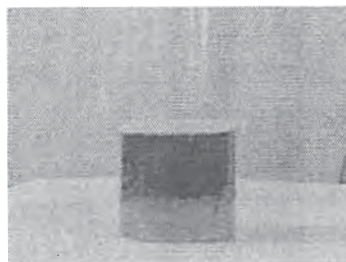
ดังแสดงในตารางที่ 3.13 ปริมาณกรดแกลลิกที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ-เอทานอลและน้ำ-พروفิลลีน ไกลคอลนั้นมากกว่าที่ได้จากวิธีอื่นยกเว้นที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิ 180 °C กรดอิลาจิกที่ได้จากน้ำ-เอทานอลและน้ำ-พروفิลลีน ไกลคอลนั้นมากกว่าที่ได้จากวิธีอื่น และเมื่อเปรียบเทียบกับ การสกัด โดยน้ำกึ่งวิกฤตผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยระบบน้ำ-เอทานอลและน้ำ-พروفิลลีน ไกลคอลนั้นใช้อุณหภูมิน้อยกว่าซึ่งสามารถลดการเสื่อมสภาพของสารได้

3.2.4 กระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล (Sugaring out concentration)

สารสกัดที่มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่มากที่สุดจะถูกใช้เพื่อศึกษากระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล กระบวนการทำให้เข้มข้นนี้ทำโดยเติมกลูโคสลงในสารสกัดที่ได้เพื่อให้เกิดการแยกของสารเป็นเฟสที่มีตัวทำละลายมาก (Solvent rich phase: เอทานอลหรือพรอพิลลิโนไกลคอล) และเฟสที่มีน้ำมาก (water rich phase) ในที่นี้จะหาอัตราส่วนเฟส (R) หรืออัตราส่วนของปริมาตรของเฟสที่มีตัวทำละลายมาก (อยู่บน) และเฟสที่มีน้ำมาก (อยู่ล่าง) และผลต่อค่า R จากความเข้มข้นของกลูโคสที่เติมลงไป โดยความเข้มข้นของกลูโคสที่ให้อัตราส่วนเฟสน้อยที่สุดและให้ความเข้มข้นของสารสกัดมากที่สุดถูกเลือกเพื่อนำไปหาสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (distribution coefficient: D) ของสารประกอบฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และกรดแกลลาจิกระหว่างสองเฟสในทั้งสองระบบตัวทำละลาย นอกจากนี้ยังหา antioxidant Activity ของสารสกัดที่ทำให้เข้มข้นแล้วอีกด้วย โดยเปรียบเทียบกับสารสกัดก่อนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล โดย antioxidant activity จะแสดงอยู่ในรูปของ Percent inhibition (%PI) และ IC_{50}

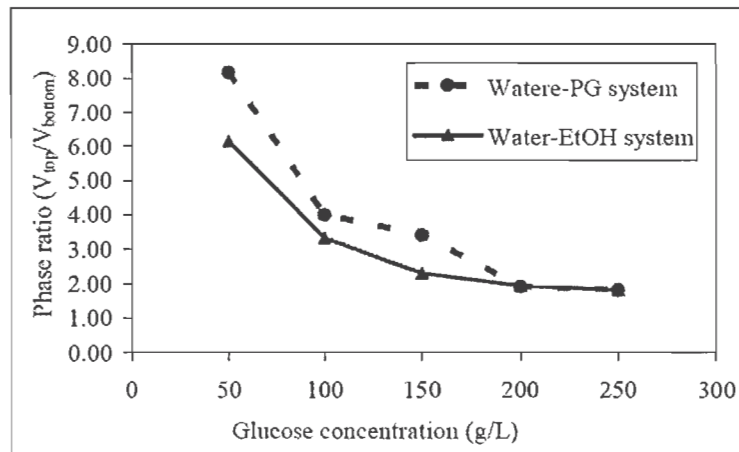
3.2.4.1 อัตราส่วนเฟส (Phase ratio)

ในกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล จะเกิดการแยกเฟส (ดังรูปที่ 3.6) หลังจากที่กลูโคสที่เติมลงไปในการสกัดได้รับความร้อนจนกระทั่งละลายจนหมด พบว่าเฟสที่มีสารอินทรีย์มากจะอยู่ด้านบนและเฟสที่มีน้ำมากจะอยู่ด้านล่าง ซึ่งโดยปกติแล้วเอทานอลและพรอพิลลิโนไกลคอลจะสามารถละลายในน้ำได้เนื่องจากผลของหมู่ OH ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำ แต่การแยกเฟสเกิดขึ้นเมื่อเติมน้ำตาลลงไปเนื่องจากโมเลกุลน้ำตาลเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำ และผลักโมเลกุลของน้ำออกจากเอทานอลหรือพรอพิลลิโนไกลคอล และเกิดเฟสกลูโคส-น้ำแยกตัวออกจากสารละลายเริ่มต้น ในกรณีนี้ที่เอทานอลและพรอพิลลิโนไกลคอลสามารถละลายได้ในน้ำ การแยกเฟสของสารด้วยการเติมกลูโคสจึงต้องอาศัยความร้อนเล็กน้อยเพื่อไปทำลายพันธะระหว่างเอทานอลและพรอพิลลิโนไกลคอลกับน้ำ ผลของของความเข้มข้นของกลูโคสต่ออัตราส่วนเฟส (R) ของสารสกัดซึ่งหมายถึงอัตราส่วนของปริมาตรของเฟสด้านบนต่อเฟสด้านล่างแสดงดังรูปที่ 3.7 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส น้ำก็จะแยกออกไปยังเฟสด้านล่างมากขึ้นด้วย จากรูป พบว่าที่ 200 g/L ของกลูโคสอัตราส่วนเฟสของระบบน้ำ-เอทานอลและน้ำ-พรอพิลลิโนไกลคอลมีค่าเท่ากับ 1.94 และ 1.85 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มกลูโคสมากกว่า 200 g/L อัตราส่วนเฟสนั้นค่อนข้างคงที่ในทั้งระบบน้ำ-เอทานอลและน้ำ-พรอพิลลิโนไกลคอล ดังนั้นความเข้มข้นนี้จึงถูกเลือกเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 3.6 เฟสบนและเฟสด่างภายหลังจากกระบวนการทำให้เข้มข้น

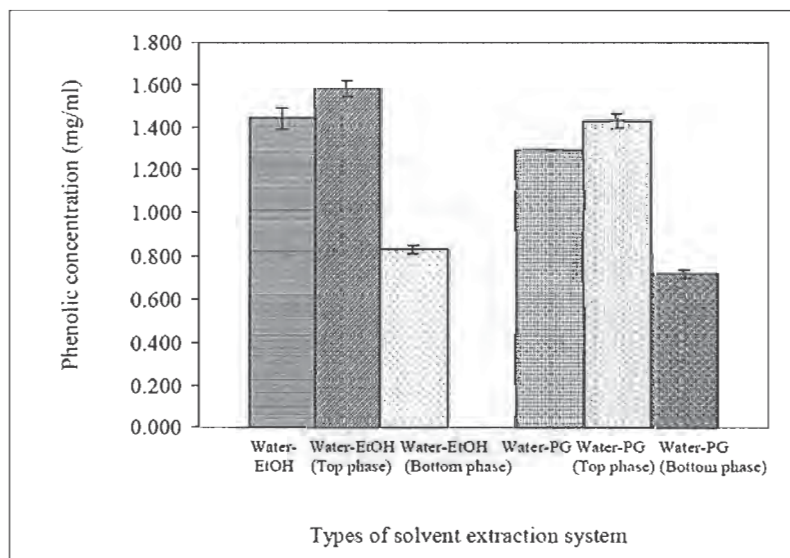
รูปที่ 3.6 เฟสบนและเฟสล่างภายหลังจากกระบวนการทำให้เข้มข้น



รูปที่ 3.7 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่ออัตราส่วนเฟสของสารสกัด

ที่ความเข้มข้นของกลูโคสต่ำกว่า 200 g/L อัตราส่วนเฟสของระบบน้ำ-พอร์ฟิลลิน ไกลคอลนั้นสูงกว่าของระบบน้ำ-เอทานอล ซึ่งอาจเกิดมาจากความสามารถในการละลายของพอร์ฟิลลิน ไกลคอลในน้ำมีค่ามากกว่าส่งผลให้การแยกน้ำออกจากสารผสมน้ำ-พอร์ฟิลลิน ไกลคอลเกิดขึ้นได้ยากกว่า

เมื่อผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลแล้ว พบว่าเฟสบนนั้นมีสีเข้มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเฟสล่างหรือสารสกัดเริ่มต้น ซึ่งแสดงว่าสารประกอบฟีนอลิกขึ้นไปอยู่ที่ชั้นบน สารสกัดก่อนและหลังกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลถูกนำไปวัดปริมาณของฟีนอลิกรวมด้วย spectrophotometer และวัดปริมาณกรดแกลลิกและกรดแกลลาจิกซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในผล *T.chebula* ด้วย HPLC



รูปที่ 3.8 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในเฟสบนและเฟสล่างหลังกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล

รูปที่ 3.8 แสดงความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวมหลังกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล พบว่าความเข้มข้นของฟีนอลิกนั้นเพิ่มขึ้นร้อยละ 10 ในระบบน้ำ-เอทานอล (จาก 1.44 เป็น 1.58

mg/ml) ในระบบน้ำ-พอรอลีนไกลคอลความเข้มข้นของฟีนอลิกเพิ่มขึ้นร้อยละ 11 (จาก 1.29 เป็น 1.43 mg/ml) สัมประสิทธิ์การกระจายของสารประกอบฟีนอลิกแสดงในตารางที่ 3.14

3.4.2 สัมประสิทธิ์การกระจายของสารประกอบฟีนอลิก

ในกระบวนการทำให้เข้มข้นโดยทั่วไปนั้น สัมประสิทธิ์การกระจาย (D) เป็นค่าที่ใช้ในการหาประสิทธิภาพของกระบวนการทำให้เข้มข้น D คือ อัตราส่วนของความเข้มข้นของสารละลายของเฟสที่เข้มข้น (เฟสบน) ต่อเฟสที่เจือจาง (เฟสล่าง) จากฟีนอลิกรวมที่วัดได้ เมื่อผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้น โดยน้ำตาลที่ความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 200 g/L สัมประสิทธิ์การกระจายของสารประกอบฟีนอลิกสำหรับระบบ น้ำ-เอทานอล และน้ำ-พอรอลีนไกลคอล เท่ากับ 1.98 ในทั้งสองระบบ นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ยังสามารถทำให้คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของ กรดแกลลิกและกรดอิลาลิจระหว่างสองเฟส ดังแสดงในตารางที่ 3.14 ซึ่งรวบรวมผลจากการทดลองทั้งหมดของปริมาณของสารสกัดและความเข้มข้นของกรดแกลลิกและกรดอิลาลิจในแต่ละเฟส ที่จะนำไปใช้คำนวณสัมประสิทธิ์การกระจายตัว

สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของน้ำ-เอทานอลและน้ำ-พอรอลีนไกลคอล (D_{GA}) มีค่าเท่ากับ 4.89 และ 4.34 ตามลำดับ และของน้ำ-เอทานอลและน้ำ-พอรอลีนไกลคอล (D_{EA}) มีค่าเท่ากับ 3.52 และ 3.22 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.14 ความเข้มข้นของกรดแกลลิกและอิลาลิจและสัมประสิทธิ์การกระจายตัว

System of Extraction	Volume (ml)	Concentration of compounds (mg/ml)		Amount of GA and EA (mg)		Distribution coefficient		Phase ratio (From Fig. 4.4)
		GA	EA	GA	EA	GA	EA	
Water-EtOH (Original)	10	0.073± 0.0028	0.061± 0.0043	0.73	0.61			
Water-EtOH (Top)	7	0.072± 0.0058	0.061± 0.0026	0.51	0.43	4.89	3.52	1.94
Water-EtOH (Bot)	3.6	0.015± 0.0006	0.017± 0.0014	0.05	0.06			
Water-PG (Original)	10	0.066± 0.0037	0.040± 0.0048	0.66	0.40			
Water-PG (Top)	6.95	0.062± 0.0027	0.045± 0.0021	0.43	0.31	4.34	3.22	1.85
Water-PG (Bot)	3.75	0.014± 0.0044	0.014± 0.0056	0.05	0.05			

จะเห็นว่าปริมาณหลังจากผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นแล้ว ความเข้มข้น (mg/ml) ของกรดแกลลิกและกรดคลอโรจิกในเฟสบนระบบของน้ำ-เอทานอลนั้นเกือบจะเหมือนกันเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเริ่มต้น ความเข้มข้นของกรดแกลลิกของสารตัวอย่างเริ่มต้นและเฟสบนเท่ากับ 0.073 และ 0.072 mg/ml ตามลำดับ ความเข้มข้นของกรดคลอโรจิกของสารตัวอย่างและเฟสบนเท่ากับ 0.061 mg/ml ในทั้งสองส่วน สำหรับระบบน้ำ-พอร์พิลิติน ไกลคอลความเข้มข้นของกรดแกลลิกลดลงจาก 0.066 เป็น 0.062 mg/ml ในเฟสบน ในขณะที่ความเข้มข้นของคลอโรจิกเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 12.5 จาก 0.040 เป็น 0.045 mg/ml ในเฟสบน แม้ว่าสารประกอบฟีนอลิกรวมน่าจะมีเข้มข้นขึ้นในเฟสบน ความเข้มข้นของกรดแกลลิกในเฟสบนมีค่าต่ำในระบบน้ำ-เอทานอลและน้ำ-พอร์พิลิติน ไกลคอล และเช่นเดียวกันกับความเข้มข้นของกรดคลอโรจิก ซึ่งอาจเกิดมาจากการเสื่อมสภาพของกรดแกลลิกและกรดคลอโรจิกในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนในกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล ซึ่งได้รับการยืนยันโดยการคำนวณปริมาณของกรดแกลลิกและกรดคลอโรจิกหลังจากกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล ดังแสดงในตารางที่ 4.13 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณของกรดแกลลิกและแอลลาจิกทั้งหมดหลังจากกระบวนการทำให้เข้มข้นของทั้งสองระบบตัวทำละลายมีค่าลดลงสำหรับระบบน้ำ-เอทานอล ปริมาณกรดแกลลิกลดลงจาก 0.73 เป็น 0.56 mg ปริมาณของกรดคลอโรจิกลดลงจาก 0.61 เป็น 0.49 mg สำหรับระบบน้ำ-พอร์พิลิติน ไกลคอลปริมาณของกรดแกลลิกทั้งหมดลดลงจาก 0.66 เป็น 0.48 mg และปริมาณกรดคลอโรจิกลดลงจาก 0.40 เป็น 0.36 mg

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าปริมาณสารจะลดลงดังกล่าวมาข้างต้น สัมประสิทธิ์การกระจายของกรดแกลลิกและกรดคลอโรจิกยังมีค่าสูง ซึ่งแสดงว่ากระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลนั้นมีศักยภาพในการทำให้สารมีความเข้มข้นขึ้น

3.2.5 Antioxidant activity

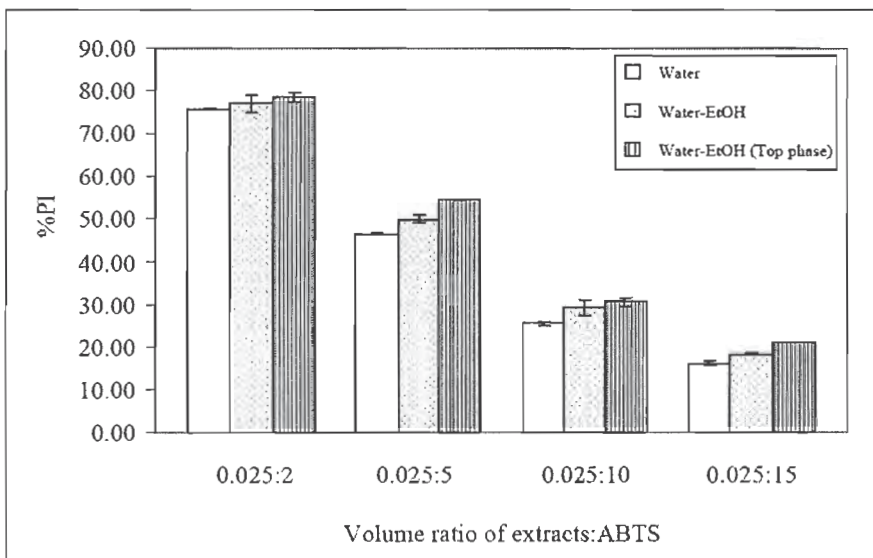
จากการทำให้เข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวม เราสามารถเห็นได้ว่าความเข้มข้นของฟีนอลิกรวมของสารสกัดหลังผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลนั้นมีค่าเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.9) สารสกัดเข้มข้นจึงถูกนำไปวัดค่า Antioxidant activity และเปรียบเทียบกับสารสกัดเริ่มต้น Antioxidant activity ของสารสกัดคำนวณจากความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และแสดงในรูปของ percent inhibition (%PI) และ ค่า IC_{50}

3.2.5.1 Percent Inhibition

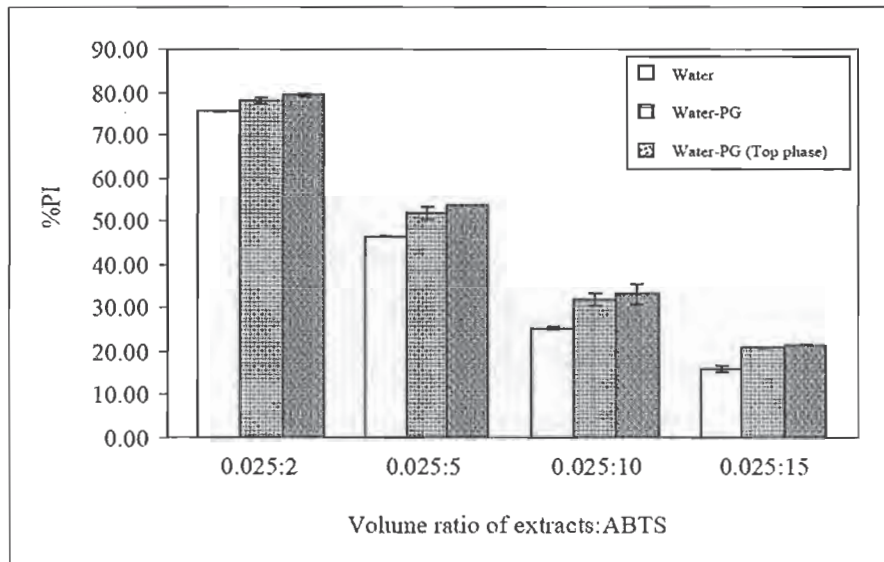
Percent Inhibition (%IP) แสดงความสามารถของสารสกัดฟีนอลิกที่ได้จากผลของ *T.chebula* ที่ปฏิบัติเหมือนตัวยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระนี้ คำนวณได้จาก $[1-(A_1/A_2)] \times 100$ เมื่อ A_1 คือค่าการดูดกลืนของสารตัวอย่าง และ A_2 คือค่าการดูดกลืนของ ABTS อ้างอิง โดยวัดค่าดังกล่าวสำหรับอัตราส่วนโดยปริมาตร (ml) ของสารสกัดต่อ ABTS ที่ต่างกันไป สารสกัดที่ใช้ในการศึกษานี้ได้จกสารสกัดที่ได้จากการสกัดที่สภาวะที่ดีที่สุดของระบบน้ำ-เอทานอล น้ำ-พอร์พิลิติน ไกลคอล และ

น้ำ และสารสกัดที่ได้หลังจากผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 200 g/L

รูปที่ 3.10 แสดง %PI ของสารที่ได้จากการสกัดด้วยระบบน้ำ น้ำ-เอทานอล และสารสกัดเข้มข้นของน้ำ-พอลิกลีซีนไกลคอลล ที่อัตราส่วนโดยปริมาตรของสารสกัดและ ABTS 0.025:2, 0.025:5, 0.025:10 และ 0.25:15 ตัวอย่างของกราฟแสดงให้เห็นว่าที่ทุกอัตราส่วนโดยปริมาตรของสารสกัดและ ABTS สารสกัดเข้มข้นของที่ได้จากน้ำ-เอทานอลให้ %PI ที่มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากน้ำ น้ำ-พอลิกลีซีนไกลคอลล และที่สกัดด้วยน้ำโดยไม่มีการทำให้เข้มข้น ผลที่ได้ก็นั้นเหมือนกันกับระบบน้ำ-พอลิกลีซีนไกลคอลล รูปที่ 3.9 แสดง %PI ของสารสกัดในน้ำ-พอลิกลีซีนไกลคอลลและสารสกัดเข้มข้นของน้ำ-พอลิกลีซีนไกลคอลลหลังจากผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำ ที่ทุกอัตราส่วนของสารสกัดต่อ ABTS โดยจะเห็นว่าสารสกัดที่เข้มข้นแสดงค่า percent inhibition ของอนุมูลอิสระสูงที่สุด



รูปที่ 3.9 %PI ของแต่ละอัตราส่วนของสารสกัดต่อ ABTS ในระบบตัวทำละลายน้ำ – เอทานอลก่อนและหลังกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำ

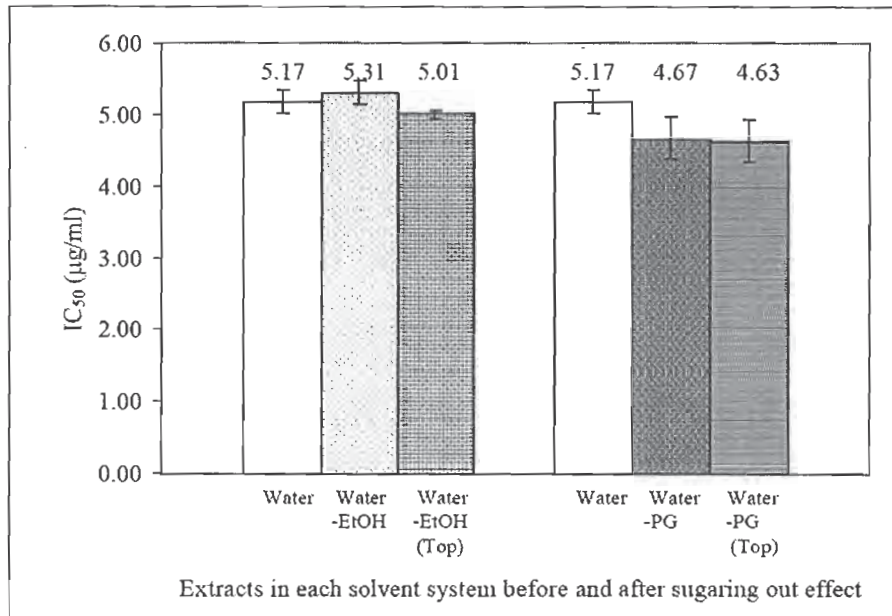


รูปที่ 3.10 %PI ของแต่ละอัตราส่วนของสารสกัดต่อ ABTS ในระบบตัวทำละลายน้ำ – พรอพิลีนไกลคอลก่อนและหลังกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำ

แม้ว่าความเข้มข้นของกรดแกลลิกและกรดคิลาจิกในเฟสบนนั้นไม่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด percent inhibition ของสารประกอบฟีนอลิกในเฟสบนนั้นเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 10 หลังจากกระบวนการทำให้เข้มข้น การเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟีนอลิกที่มีนั้นเกิดจากสารสกัดเข้มข้นนั้นมีประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ

3.2.5.2 IC_{50}

นอกเหนือจากการยับยั้งอนุมูลอิสระ ค่า antioxidant activity ของสารสกัดยังสามารถแสดงในรูปของ IC_{50} ได้แก่ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่จะลดการดูดซับของอนุมูลได้ร้อยละ 50 ซึ่งหมายความว่ายิ่ง IC_{50} มีค่ามาก antioxidant activity ได้น้อย



รูปที่ 3.11 Antioxidant activity (IC₅₀) ของสารสกัดที่ได้จาก *T.chebula* ในระบบน้ำ-เอทานอลและน้ำ-พรอพิลีนไกลคอล ก่อนและหลังการกระบวนการทำให้เข้มข้น

รูปที่ 3.11 แสดงค่า IC₅₀ ของสารสกัดที่ได้จากน้ำ น้ำ-พรอพิลีนไกลคอล และน้ำ-เอทานอล (เฟสบน) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.17, 5.13 และ 5.01 µg/ml ตามลำดับ และที่ได้จากระบบน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลและน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลเฟสบน มีเท่ากับ 4.67 และ 4.63 µg/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าผลที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ-เอทานอลเมื่อเปรียบเทียบกับที่สกัดด้วยน้ำมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลนั้นมี IC₅₀ ที่น้อยกว่าที่สกัดด้วยน้ำ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเริ่มต้นที่ได้จากน้ำเอทานอล สารสกัดเข้มข้นที่ได้จากน้ำ-เอทานอลนั้นมี IC₅₀ น้อยกว่า (antioxidant activity มากกว่า) ในขณะที่สารสกัดเข้มข้นที่ได้จากน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลนั้นมี IC₅₀ ใกล้เคียงกันกับที่ได้จากสารสกัดเริ่มต้นที่ได้จากน้ำ-พรอพิลีนไกลคอล สารสกัดที่ได้จากน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลมี IC₅₀ น้อยกว่าที่ได้จากน้ำ เมื่อสนใจที่ระบบการสกัดบนพื้นฐานของค่า IC₅₀ เท่านั้น จะสรุปได้ว่าระบบน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลมีความน่าสนใจที่จะนำมาใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก โดยให้ค่า IC₅₀ ที่น้อยกว่า นอกจากนี้ยังเพิ่ม antioxidant activity ของสารสกัดที่ได้จากระบบนี้ซึ่งอาจเกิดมาจากคุณสมบัติเป็นวัตถุดิบเสถียรของพรอพิลีนไกลคอล ซึ่งอาจช่วยให้สารสกัดสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี สารสกัดเข้มข้นของทั้งสองระบบนั้นมีความสัมพันธ์ของ IC₅₀ ที่เหมือนกันกับสารสกัดเริ่มต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการต้าน antioxidant ของสารสกัดไม่ได้รับผลกระทบจากกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล จากผลที่ได้กระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดจากผล *T.chebula*

3.3 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

3.3.1 สรุปผลการวิจัย

สารประกอบฟีนอลิกที่ได้จาก *T. chebula* สามารถถูกสกัดได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้ระบบตัวทำละลายน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลมีได้ผลได้มากขึ้น โดยใช้อุณหภูมิที่สกัดค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดโดยใช้น้ำกึ่งวิกฤต การวิเคราะห์ของความผันผวนของการผลทดลองอยู่บนพื้นฐานของการออกแบบการทดลองแบบ CCD วิเคราะห์โดย SPSS 16.0 แสดงให้เห็นว่ามีความน่าเชื่อถือที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ค่าตัวแปรที่มีความสำคัญมีผลต่อผลได้ของการสกัดโดยน้ำ-เอทานอลได้แก่อุณหภูมิที่ใช้ ความเข้มข้นของเอทานอล และเวลา และปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้น อุณหภูมิและเวลา และความเข้มข้นและเวลา

สำหรับระบบน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลตัวแปรที่มีผลต่อผลได้ได้แก่อุณหภูมิความเข้มข้นและเวลา และผลกระทบซึ่งกันและกันระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้น อุณหภูมิและเวลา และความเข้มข้นและเวลา โดยความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรแต่ละตัว และสารประกอบฟีนอลิกถูกจำลองด้วยแบบจำลอง 2nd order polynomial และจากสมการการตอบสนองของพื้นผิวของ $Y_{\text{water-EtOH}}$ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือที่ $X_1 = 1.41$, $X_2 = 0.158$ และ $X_3 = 2.48$ โดยมีผลได้เท่ากับ 212.51 mg/gDW หรือเท่ากับอุณหภูมิ 76 °C ความเข้มข้นของเอทานอล 76.4 %v/v และเวลาเท่ากับ 82 นาที สำหรับ Water – PG สภาวะที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ $X_1 = 0.013$, $X_2 = 0.63$ และ $X_3 = -1.48$ โดยมีผลได้เท่ากับ 178.64 mg/gDW หรือเท่ากับอุณหภูมิ 57 °C ความเข้มข้นของ PG 36 %v/v และเวลาเท่ากับ 23 นาที

กระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลของสารประกอบฟีนอลิกในทั้งสองระบบตัวทำละลายสามารถทำได้โดยเติมกลูโคส และความเข้มข้น 200 g/l ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ที่ส่งผลให้เกิดการแยกเฟส ที่ความเข้มข้นนี้อัตราส่วนระหว่างปริมาณของเฟสบนและปริมาณของเฟสล่างมีค่าน้อยที่สุด คือ 1.94 และ 1.85 สำหรับน้ำ-เอทานอลและ น้ำ-พรอพิลีนไกลคอลตามลำดับ และเมื่อผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลแล้ว ความเข้มข้นของฟีนอลิกรวมในเฟสบน (เฟสที่เข้มข้น) เพิ่มขึ้น 10 % และ 11 % สำหรับระบบน้ำ-เอทานอล และ water-PG ตามลำดับ ค่าคงที่การกระจายของฟีนอลิกรวมของทั้งสองตัวทำละลายเท่ากับ 1.98 อัตราส่วนการกระจายของกรดแกลลิกหลังจากกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลมีค่าเท่ากับ 4.89 และ 4.34 สำหรับระบบน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลตามลำดับ อัตราส่วนการกระจายของกรดอะลิจมีค่าเท่ากับ 3.52 และ 3.22 สำหรับน้ำ-เอทานอล และน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลตามลำดับ อัตราส่วนการกระจายแสดงให้เห็นว่ากระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลมีความสามารถที่จะเพิ่มความเข้มข้นให้กับกรดแกลลิกและกรดอะลิจในเฟสที่เราสนใจ อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนในระหว่างกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลอาจทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของกรดแกลลิกและกรดอะลิจได้

ค่าการ antioxidant ของสารสกัดจะถูกหาให้อยู่ในรูปของร้อยละของการยับยั้ง (%PI) และ IC_{50} โดยสารสกัดเข้มข้นที่ได้จากระบบน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลแสดงให้เห็นถึงค่าการ antioxidant ที่มากที่สุด ระบบตัวทำละลายน้ำ-พรอพิลีนไกลคอลนั้นมีประสิทธิภาพและเป็นตัวทำละลายที่น่าสนใจในการนำไป

สกัดผล *T.chebula* โดยให้ผลได้ของสารประกอบฟีนอลิกที่มาก หลังจากกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลสารสกัดเข้มข้นที่ได้จากน้ำ-พรีฟิลลีนไกลคอลยังแสดงให้เห็นถึงค่าการ antioxidant ที่สูงที่สุด (lowest IC₅₀) โดยมากกว่าที่ได้จากการสกัดโดยน้ำและน้ำ-เอทานอลกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาลจึงสรุปได้ว่าเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นและแยกสารของระบบการสกัดโดยตัวทำละลายน้ำ-อินทรีย์ และมีความน่าสนใจในการเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบทางธรรมชาติ

3.3.2 ข้อเสนอแนะ

ในระบบการสกัดที่ได้ศึกษานี้ตัวทำละลายอินทรีย์ (เอทานอลและพรีฟิลลีนไกลคอล) มีหมู่ OH (กลุ่ม Hydroxy) ที่มาจากพันธะ hydrogen จากน้ำ ซึ่งมีลักษณะของพันธะ O-H ที่เหมือนกับโมเลกุลที่ได้จากกลูโคส โดยการแยกเฟสสามารถทำได้ง่ายขึ้นถ้ารูปแบบของปฏิกิริยาระหว่างน้ำ – ตัวทำละลาย และน้ำ – กลูโคสมีความแตกต่างกัน ควรมีการศึกษาตัวทำละลายประเภทอื่น และในกรณีที่ไม่จำเป็นต้องมีการให้ความร้อนเพื่อให้เกิดการแยกเฟสของสาร และผลของการเสื่อมสภาพของสารประกอบฟีนอลิกสามารถทำให้ลดลงได้ โดยควรจะศึกษาตัวทำละลายที่มีพันธะ N-H hydrogen กับน้ำ ในการเพิ่มสารที่ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นลงในตัวทำละลาย กระบวนการที่มีความเหมาะสมที่สุดควรมีการศึกษาต่อไปเพื่อหาผลของตัวแปรที่แตกต่างกัน เช่น ชนิดของน้ำตาล ความเข้มข้นของน้ำตาล และความเข้มข้นที่สมดุลอุณหภูมิ นื่องจากนี้ ผลจากการศึกษานี้แนะนำว่ากระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับการทำให้สารที่สกัดได้จากธรรมชาติหลายๆตัวให้มีความเข้มข้นมากขึ้น

3.4 เอกสารอ้างอิง

1. 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.
2. Rangsiwong, P., Rangkadilokb, N., Satayavivadb, J., Goto, M., and Shotipruk, A. 2009. Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. Fruits. *J. Separation and Purification Technology*, 66: 51–56.
3. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Free Radical Biology and Medicine 26: 1231–1237.

ภาคผนวก

ผลลัพธ์ของโครงการ

1. Ruen-ngam D., Shotipruk A., and Pavasant P. Comparison of Extraction Methods for Recovery of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, Separation Science and Technolgy, In press, corrected proof.
2. Chantaporn Tubtimdee and Artiwan Shotipruk, Extraction of Phenolics from *Terminalia chebula* Retz with Water-Ethanol and Water-Propylene Glycol and Sugaring-Out Concentration of Extracts, Separation and Purification Technology (Accepted).

Comparison of Extraction Methods for Recovery of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*

Duangkamol Ruen-ngam, Artiwan Shotipruk, and Prasert Pavasant

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Solvent extraction, ultrasound assisted extraction (UAE), and microwave assisted extraction (MAE) were examined for the extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. In all cases, acetone was found to give the highest astaxanthin recovery compared with other selected solvents, i.e., methanol, ethanol, and acetonitrile. Among the various methods, MAE at 75°C for 5 min resulted in the highest astaxanthin recovery (74 ± 4%).

Keywords accelerated extraction; conventional extraction method; microwave-assisted; ultrasound-assisted

INTRODUCTION

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) is a highly efficient antioxidant (1) and displays anti-cancer properties. This carotenoid plays vital roles in immune system enhancement and in fighting off tissue damage and cardiovascular diseases (2, 3, 4, and 5). Astaxanthin is naturally produced by various microorganisms and microalgae species, an important example of which is the unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*, which produces 0.5–5.0% dry weight of astaxanthin. The thick cell wall of *H. pluvialis* makes astaxanthin extraction difficult. For this reason, various extraction techniques have been proposed, including solvent extraction (6), enzyme-assisted solvent extraction (7), extraction with vegetable oils (8), pressurized fluid extraction (9), and supercritical fluid extraction (10, 11, 12, 13, 14, and 15).

Recently, accelerated techniques, such as ultrasound-assisted extraction (UAE) and microwave-assisted extraction (MAE) have gained considerable interest for the extraction of bioactive substances from plants and microorganisms (16,17). These methods offer many advantages, such as short extraction times, reduced solvent usage, and higher extraction yield. In UAE, as ultrasound passes through a solvent, the expansion cycle of the ultrasonic

waves creates cavities. These micro-bubbles grow during the expansion cycles and contract during each compression cycle. The increase in pressure and temperature caused by the localized compression leads to the collapse of the bubbles, resulting in enhanced mass transfer and consequent disruption of algal cell walls (18). By contrast, MAE promotes rapid heating and pressure buildup within the sample tissue due to the rotation of the solvent's molecular dipole in the microwave field. As a result, transfer of biological compounds from the cells into the extraction medium is accelerated. Although optimization of MAE for *H. pluvialis* has been carried out and shown to be more effective than conventional extraction methods (19), a detailed comparison of MAE, UAE, and other conventional methods requires additional investigation. This study sought to determine suitable conditions (time, temperature, and solvent type) for UAE and MAE of astaxanthin from *H. pluvialis*. The extraction efficiencies at these conditions were then compared with each other and with those offered by conventional extraction techniques (maceration and Soxhlet extraction).

MATERIALS AND METHODS

Materials

Red dried samples of feed grade *Haematococcus pluvialis* were purchased from Cyanotech Corporation, Hawaii Ocean, Science and Technology Park, USA (supported by Professor Motonobu Goto, Kumamoto University, Japan). The samples were stored in a dry, tight aluminum pack at 5°C to prevent degradation. Analytical grade solvents (for astaxanthin extraction) i.e., methanol, ethanol, acetone, and acetonitrile and HPLC grade methanol were all purchased from Fisher Scientific. Calibration curves of astaxanthin in various types of solvent were provided from a standard compound of >92% purity purchased from Sigma-Aldrich, USA.

Methods

For each extraction method (maceration, Soxhlet extraction, UAE, and MAE), trials were first carried out

Received 30 December 2009; accepted 12 May 2010.

Address correspondence to Prasert Pavasant, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Tel.: +66-2-218-6870; Fax: +66-2-218-6877. E-mail: prasert.p@chula.ac.th

TABLE 1
Experimental variables and ranges studied

Methods	Temperature (°C)	Time (min)
Maceration	30, 45, and 60	0, 5, 15, 30, 45, 60, 75, and 90
Soxhlet	Boiling point of solvent	240
Ultrasonic	30, 45, and 60	0, 5, 15, 30, 45, 60, 75, and 90
Microwave	30, 45, 60, 75, and 78	0, 5, 15, 30, 45, and 60

to investigate the extraction potential of, in turn, methanol, ethanol, acetonitrile, and acetone, solvents chosen on account of their polarity relative to astaxanthin. The most suitable solvent was then used in subsequent determination of the optimal extraction conditions, by varying temperature and reaction time as summarized in Table 1. All experiments were performed in triplicate and the standard errors are presented for all data.

Maceration

For maceration, *Haematococcus pluvialis* powder was extracted in a 125 ml flask at 30–60°C. A sample-to-solvent ratio of 0.1 g algae powder to 10 ml of organic solvent was used, since our preliminary results had shown this ratio to be optimal (data not show). Each extraction was carried out for 0–90 min. The extract mixture was then passed through a 0.45 µm pore size polyethylene terephthalate (PET) syringe filter (Whatman, USA) and the astaxanthin content of the filtrate was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Soxhlet Extraction

Soxhlet extractions were also carried out to compare possible recovery of astaxanthin in a continuous solvent extraction system. To this end, 0.5 g of the algae sample was placed in a thimble cartridge which was connected to a 500 ml round-bottom flask containing 150 ml of solvent. The flask was placed in a heater pocket (Electro mantle, USA) and extracted for 4 h. The solution was then passed through a 0.45 µm pore size PET syringe filter (Whatman, USA) and the filtrate was subsequently analyzed by HPLC.

UAE

The ultrasonic bath (275DAE, 270 W, Crest Ultrasonics, USA) was a rectangular container (23.5 cm × 13.3 cm × 10.2 cm), featuring two 38.5 kHz transducers annealed at the bottom. The extraction of algae was conducted by adding alga (0.1 g) in a 30 ml amber glass bottle of solvent (10 ml). The bottle was immersed in tap water (2.2 L) and

positioned at the center of the ultrasonic bath, 5 cm clear of its base. Extraction runs were performed at various temperatures between 30 and 60°C for 0–90 min (Table 1). After extraction, the solution was filtered through a 0.45 µm pore size PET syringe filter (Whatman, USA) and the filtrate then analyzed by HPLC for the astaxanthin content.

MAE

The extraction was performed on 12 × 100 ml closed polyetheretherketone (PEEK) vessels covered with special TFM[®] sleeves, a power sensor, a temperature sensor, and a temperature controller of MARS 5TM (1200 W, 2450 MHz), microwave accelerated reaction system from CEM Corp. (Mathews, NC, USA). The extraction was conducted by adding algae (0.1 g) to each of the six vessels containing the extraction solvent (10 ml). The vessels were closed and then placed symmetrically in the microwave field. In all MAE experiments, 60% of 1200 W power output was used and the ramping time was 2 min. The experimental conditions (irradiation time and temperature) are listed in Table 1. After each extraction, the solution was filtered through a 0.45 µm pore size PET syringe filter (Whatman, USA) and the filtrate analyzed by HPLC for astaxanthin content.

Analysis of Astaxanthin

The extracts were analyzed by HPLC (Venisep GES C18 4.6 × 150 mm, 5 µm HPLC column) at 475 nm using a methanol-water (95:5 v/v) mobile phase at a flow rate of 1 ml/min. Astaxanthin concentration of samples was determined by the peak area based on our calibration using an astaxanthin standard. As the basis for the determination of extraction efficiency, the total amount of astaxanthin in *H. pluvialis* was determined from the amounts of astaxanthin repeatedly extracted by MAE in acetone at the condition giving the highest % recovery. The percentage recovery of astaxanthin was defined as the ratio between the amount of astaxanthin extracted and the total amount of astaxanthin in the alga according to Eq. 1.

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{astaxanthin from the extraction}}{\text{total astaxanthin in the alga}} \times 100 \quad (1)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Solvent Types

Acetone gave the highest astaxanthin recovery for all extraction methods (Fig. 1). It should be noted that the ranges of extraction conditions selected for the study were not the same for all extraction methods since each method differs in nature and thus the operation limits. The discussion of the results was therefore given first for each extraction method. The results obtained at the

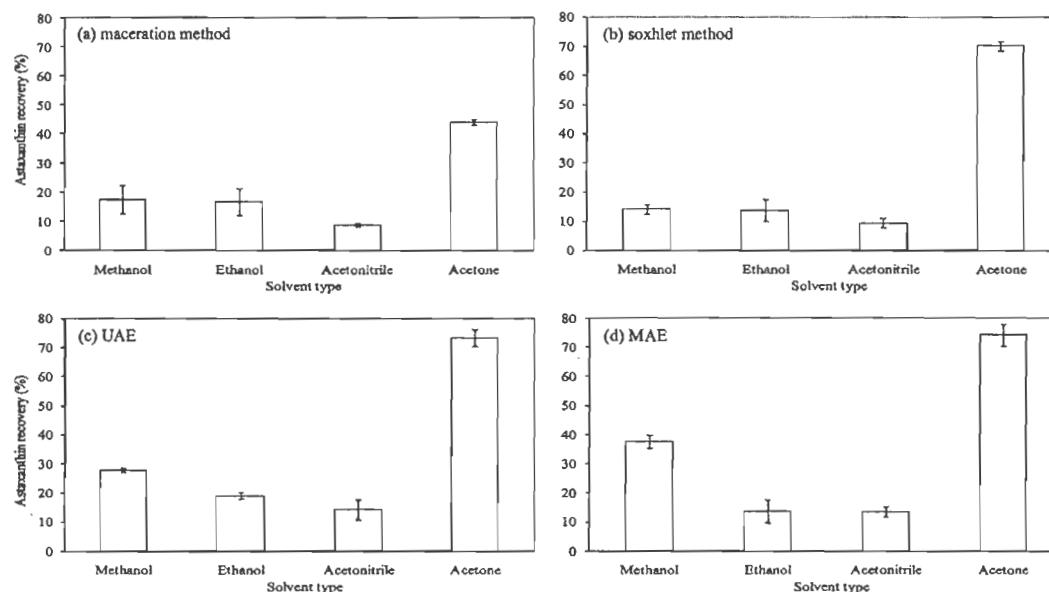


FIG. 1. Effect of solvent type on astaxanthin extraction (a) maceration at 30°C, 30 min, (b) Soxhlet extraction for 4 h, (c) UAE at 45°C, 60 min, 18.40 W, and (d) MAE at 75°C, 5 min, power 720 W.

most suitable condition for each method were then compared.

Maceration

The determination of the suitable solvent for maceration was conducted at 30°C for 30 min. As shown in Fig. 1(a), acetone resulted in the highest astaxanthin recovery, ($44 \pm 1\%$), followed by methanol ($18 \pm 5\%$), ethanol ($17 \pm 5\%$), and acetonitrile ($9 \pm 1\%$). Of all the solvents studied, acetone has the lowest polarity, indicated by the dielectric constant (Table 2), making it the most appropriate solvent to dissolve the fat soluble molecules like astaxanthin. Moreover, the structure of astaxanthin is most similar to that of acetone, in as much as both feature carbonyl groups.

TABLE 2
Properties of solvents used for extraction

Type of solvents	Dielectric constant (ϵ')	Surface tension (mN/cm)	Vapor pressure (mmHg)	Viscosity (cP)
Methanol	32.6	22.6	127.05	0.6
Ethanol	24.6	23.7	59.02	1.2
Acetonitrile	37.5	19.1	88.47	0.38
Acetone	20.7	23.7	229.52	0.32

Data from (20).

Determined at 20°C.

Soxhlet Extraction

Soxhlet extraction in acetone gave as high as $70 \pm 2\%$ astaxanthin recovery (Fig. 1(b)), compared with only $44 \pm 1\%$ obtained by 30 min maceration at 30°C. The increased extraction efficiency was expected since Soxhlet extraction provides the algae continual contact with the fresh solvent. Nevertheless, none of the other solvents showed similar improvement in the astaxanthin recovery. Since Soxhlet extractions must be done at the solvent boiling temperatures (56.5, 64.7, 78.5, and 81.6°C for acetone, methanol, ethanol, and acetonitrile respectively), possible thermal degradation of the astaxanthin in higher boiling point solvents could account for these unimproved recoveries.

UAE

The results in Fig. 1(c) show the effects of extraction solvents on astaxanthin recovery for UAE carried out at 18.40 watt at 45°C and 60 min. The highest % astaxanthin recovery ($73 \pm 3\%$) was again obtained with acetone. It should be noted that, in UAE, acoustic cavitation is an important phenomenon that is responsible for enhanced extraction recovery other than the solvent polarity. The degree of ultrasonic cavitation depends on various thermodynamic properties of the solvent. In solvents with low vapor pressures, bubble collapses tend to be strong, facilitating the disruption of algal cells and the release of astaxanthin. However, the localized severe high temperatures and pressures could prompt compound degradation and thus have the opposite effect. Less severe bubble

collapses in high vapor pressure solvents like acetone or methanol, by contrast, should therefore lead to minimal product degradation. This could explain the high % astaxanthin recovery obtained by UAE when using acetone. Methanol, which also has relatively high vapor pressure, was also observed to give rather high recovery (compared with ethanol) despite the greater differences in polarities and molecular structures between this solvent and the astaxanthin. These results suggest that, in UAE, acoustic cavitation significantly influences the extraction efficiency of the solvents.

Another solvent property generally known to affect the extraction recovery in UAE is surface tension. Specifically, bubble cavitation occurs more readily in solvents with higher surface tension (20). In this study however, the effect of solvent surface tension was deemed negligible since the surface tensions of the selected solvents did not differ considerably (Table 2).

MAE

To determine the effect of the solvent type on MAE, the experiments were carried out at 75°C for 5 min. The extraction recoveries obtained with MAE followed the same order as the data obtained with maceration, that is, acetone (74 ± 4%) > methanol (38 ± 2%) > ethanol (14 ± 4%) > acetonitrile (13 ± 2%). Nevertheless, the degree of enhancement of astaxanthin recovery in methanol and acetone was higher than the other solvents. In general, MAE enhances the extraction capability of solvents because the electromagnetic field causes rapid heating of the solvent, the rate of which depends on a parameter called the dissipation factor ($\tan \delta$), defined as follows.

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (2)$$

where ϵ' is the dielectric constant or relative permittivity and ϵ'' is the dielectric loss factor. ϵ' describes the polarizability of the solvent molecule in an electric field, a measure of the ability of the solvent to store electromagnetic radiation. ϵ'' is a measure of the efficiency by which the absorbed microwave energy is converted into heat when an electric field is applied. From this definition, the dissipation factor ($\tan \delta$) therefore represents the ability of the solvent to absorb the microwave energy and dissipate that energy into heat. The rate of heating under microwave irradiation is generally expected to be high if both the dielectric constant and dissipation factor of the solvent are high. It is likely, therefore, that the enhanced astaxanthin recoveries observed using acetone and methanol under microwave irradiation were due to the relatively high ϵ' and $\tan \delta$ values of these solvents (20) (Table 3). By comparison, ethanol and acetonitrile are characterized by low dielectric loss factors, which explain their poorer ability to

TABLE 3
Properties of solvents used for MAE

Type of solvents	ϵ'^a (F/m)	ϵ''^b	$\tan \delta$
Methanol	32.6	15.2	0.5032
Ethanol	24.3	6.1	0.2564
Acetonitrile	37.5	2.3	0.0614
Acetone	20.7	11.5	0.6207

Data from (20).

^aDetermined at 20°C.

^bAt 2450 MHz.

dissipate the absorbed microwave energy into heat, thus lower the astaxanthin recovery.

In short, since acetone consistently gave the highest astaxanthin recovery, it was chosen for subsequent optimization studies.

Suitable Extraction Conditions

Maceration

The effects of time and temperature on extraction efficiency (Fig. 2) indicate that for all extraction temperatures the astaxanthin recovery was rapid and essentially complete after 5 min. It is likely that the high initial astaxanthin extraction rate was due to the high concentration gradient of astaxanthin mass transfer between inside and outside the algal cell. Beyond this time, the rate of further astaxanthin extraction appears to drop markedly. The highest astaxanthin recovery (57 ± 4%) was obtained after 15 min at 45°C, whereas lower recoveries were observed beyond 60 min at 60°C. Higher extraction temperatures should increase astaxanthin solubility and decrease solvent viscosity, thereby increasing the astaxanthin recovery. However, prolonged exposure to high temperatures could also lead to compound degradation, accounting for our observed drop in astaxanthin levels.

UAE

For UAE, all extraction temperatures showed rapid astaxanthin recovery (up to 41 ± 2%) within the first 5 min, and thereafter, between 5 to 30 min, increasing only gradually (Fig. 3). It should be noted that, despite the cavitation effect of UAE, astaxanthin recovery did not increase significantly, compared with maceration, for the first 30 min. This could be due to the fact that ultrasonic cavitation gives rise to localized hot spots that destroy astaxanthin molecules (21,22). After 30 min, however, the extraction recovery increased again until 60 min to around 70 ± 2%. Following this maximum, the astaxanthin level finally dropped as the extraction time approached 90 min. The maximum astaxanthin recovery for UAE was found at the extraction temperature of 45°C and 60 min.

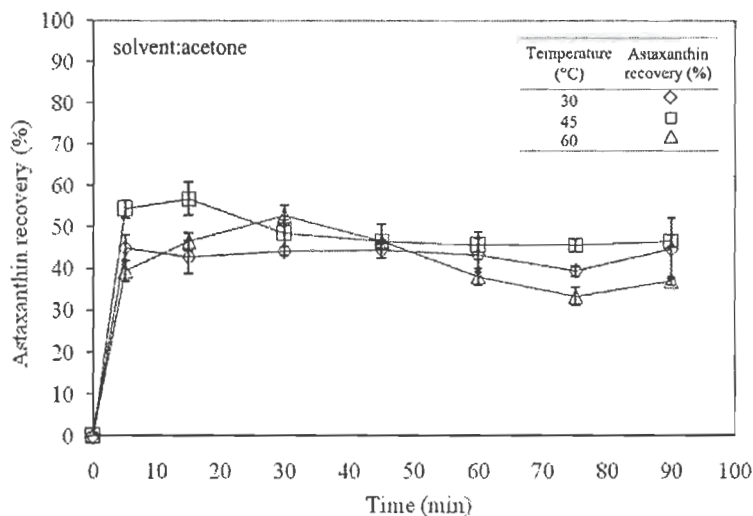


FIG. 2. Effect of time and temperature on astaxanthin recovery by maceration.

MAE

In a closed, microwave-irradiated system, astaxanthin recovery was seen to increase instantly in the first 5 min at all extraction temperatures (Fig. 4). For extraction temperatures of 30, 45, and 60°C, astaxanthin recovery remained relatively constant over time, whereas for extraction temperatures of 70 and 75°C, the highest % astaxanthin recovery was again reached at 5 min, immediately dropping thereafter. The highest recovery ($74 \pm 4\%$) was obtained with MAE at 75°C after 5 min. The increase in temperature to 78°C did not further increase the

astaxanthin recovery, possibly due to its structural decomposition of astaxanthin, i.e., via the conversion from (all-E)-astaxanthin to (13Z)-astaxanthin (21).

Comparison of Extraction Methods

The % astaxanthin recovery obtained by different methods at the most suitable conditions are summarized in Table 4. The highest % astaxanthin recovery ($74 \pm 4\%$) was obtained by 5 min MAE at 75°C, followed by UAE at 45°C ($73 \pm 3\%$). The closed system used for MAE allowed high extraction temperature (above the boiling

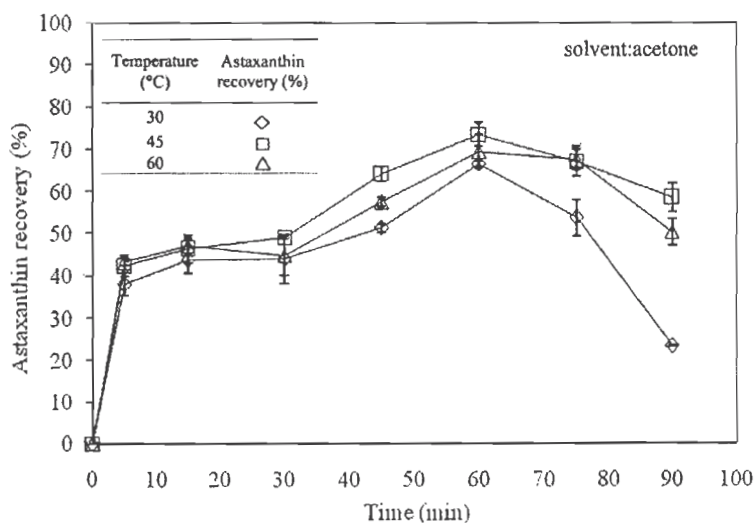


FIG. 3. Effect of time and temperature on astaxanthin recovery by UAE (power 18.40 W).

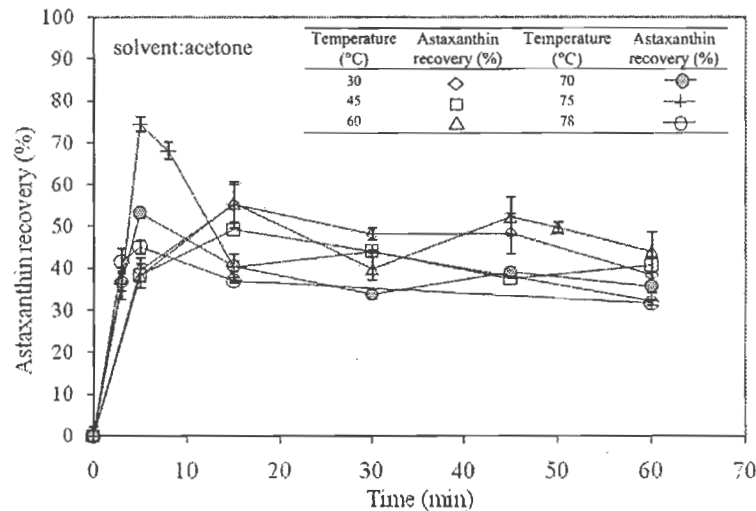


FIG. 4. Effect of time and temperature on astaxanthin recovery by MAE (power 720 W).

point of acetone), and because of rapid heating caused by microwave irradiation, shorter extraction time is required. Brief extraction times are considered favorable since they are expected to minimize compound degradation. Although comparable astaxanthin recovery could be achieved with UAE, it required much longer extraction time (60 min). When compared with the extraction recoveries by other nonconventional methods such as supercritical carbon dioxide extraction (60–83%) (11,13,14), MAE achieves equally impressive recoveries but in a much shorter extraction time. Despite an enhanced recovery, careful considerations must be made when employing MAE and UAE as compound degradation can easily occur. The results on the astaxanthin yield as well as the possible degradation observed in this study nevertheless are in good agreement with the detailed optimization study of MAE reported by Zhao et al. (2009), thus supporting the potential use of MAE for astaxanthin recovery from *H. pluvialis* (19).

TABLE 4

Comparison of astaxanthin recoveries obtained with various extraction methods

Methods	Temperature (°C)	Time (min)	% astaxanthin recovery
Maceration	45	15	57 ± 4
Soxhlet	56.5	240	70 ± 2
UAE	45	60	73 ± 3
MAE	75	5	74 ± 4

CONCLUSIONS

For all extraction methods, acetone was found to give the best astaxanthin recovery. The use of UAE and MAE considerably enhances astaxanthin recovery though there are limits to the conditions in which each of these methods can be employed. MAE at 75°C, using acetone as the extraction solvent, was found to give the highest astaxanthin recovery in a relatively short time. The results of this study suggest therefore that MAE features great potential for the extraction of valuable compounds from *H. pluvialis* microalgae.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Thailand National University Project of the Office of the Higher Education Commission, the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (FWA) and the Thailand Research Fund (TRF). Also, Miss Duangkamol Ruen-gnam is thankful to TRF-Royal Golden Jubilee Ph.D. Program for the financial support of her Ph.D. study. Dr. Thomas Gale is thanked for the help in proofreading the manuscript and professor Motonbu Goto for providing our *H. pluvialis* sample.

REFERENCES

- Shimidzu, N.; Goto, M.; Miki, W. (1996) Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fish Sci.*, 62: 134.
- Jyonouchi, H.; Sun, S.; Iijima, K.; Gross, M.D. (2000) Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutrition & Cancer*, 36 (1): 59–65.
- Guerin, M.; Huntley, E.M.; Olaizola, M. (2003) *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.*, 21: 210–216.
- Ohgami, K.; Shiratori, K.; Kotake, S.; Nishida, T.; Mizuki, N.; Yazaw, K.; Ohno, S. (2003) Effects of astaxanthin on

- lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo invest. *Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44: 2694–2701.
5. Tzu-Hua, W.; Jiahn-Haurliao, L.; Wen-Chi, H.; Fu-Yung, H.; Timothy, J.M.; Chao-Chien, H. (2006) Astaxanthin protects against oxidative stress and calcium-induced porcine lens protein degradation. *Agric. J. Food Chem.*, 54: 2418–2423.
 6. Sarada, R.; Vidhyathi, R.; Usha, D.; Ravishankar, A.G. (2006) An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Agric. J. Food Chem.*, 54: 7585–7588.
 7. Kobayashi, M.; Kurimura, Y.; Sakamoto, Y.; Tsuji, Y. (1997) Selective extraction of astaxanthin and chlorophyll from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Tech.*, 11: 657–660.
 8. Kang, C.D.; Sim, S.J. (2008) Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils. *Biotechnol. Lett.*, 441–444.
 9. Denery, R.J.; Dragull, K.; Tang, S.C.; Li, X.Q. (2004) Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Anal. Chim. Acta.*, 501: 175–181.
 10. Valderrama, O.J.; Perrut, M.; Majewski, W. (2003) Extraction of astaxanthin and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data*, 48: 827–830.
 11. Machmudah, S.; Shotipruk, A.; Goto, M.; Sasaki, M.; Hirose, T. (2006) Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using supercritical CO₂ and ethanol as entrainer. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45: 3652–3657.
 12. Nobre, B.; Marcelo, F.; Passos, R.; Beirão, L.; Palavra, A.; Gouveia, L.; Mendes, R. (2006) Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Eur. Food Res. Technol.*, 223: 787–790.
 13. Krichnavaruk, S.; Shotipruk, A.; Goto, M.; Pavasant, P. (2008) Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oils as co-solvent. *Bioresour. Technol.*, 99: 5556–5560.
 14. Thana, P.; Machmudah, S.; Goto, M.; Sasaki, M.; Pavasant, P.; Shotipruk, A. (2008) Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.*, 99: 3110–3115.
 15. Careri, M.; Furlattini, L.; Mangia, A.; Musci, M.; Anklam, E.; Theobald, A.; von Holst, C. (2001) Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina pacifica* algae: A chemometric approach. *J. Chromatogr. A*, 912: 61–71.
 16. Rostagno, A.M.; Palma, M.; Barroso, G.C. (2003) Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A*, 1012: 119–128.
 17. Hemwimon, S.; Pavasant, P.; Shotipruk, A. (2007) Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Sep. Purif. Technol.*, 54: 44–50.
 18. Hemwimon, S.; Pavasant, P.; Shotipruk, A. (2006) Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrason. Sonochem.*, 13: 543–548.
 19. Zhao, L., Chen, G.; Zhao, G.; Hu, X. (2009) Optimization of microwave-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis* by response surface methodology and antioxidant activities of the extracts. *Sep. Sci. Technol.*, 44: 243–262.
 20. Zlotorzynski, A. (1995) The application of microwave radiation of analytical and environmental chemistry. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 25: 43–75.
 21. Zhao, L.; Zhao, G.; Chen, F.; Wang, Z.; Wu, J.; Hu, X. (2006) Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (*all-E*)-astaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 8346–8351.
 22. Toma, M.; Vinatoru, M.; Paniwnyk, L.; Mason, J.T. (2001) Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues solvent extraction. *Ultrason. Sonochem.*, 8: 137–142.



Extraction of phenolics from *Terminalia chebula* Retz with water–ethanol and water–propylene glycol and sugaring-out concentration of extracts

Chantaporn Tubtimdee, Artiwan Shotipruk*

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Phayathai Rd., Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2010

Received in revised form 4 November 2010

Accepted 1 January 2011

Keywords:

Optimization

Response surface methodology

Sugaring-out

Terminalia chebula Retzius

Phenolic compounds

ABSTRACT

In this study, the spherical central composite design (Spherical CCD) was employed to determine the effect of conditions (temperature, solvent composition and extraction time) for extraction of total phenolics from *Terminalia chebula* fruits with water–EtOH and water–propylene glycol (PG) mixtures. Then the feasibility of sugaring-out concentration to concentrate the extracts was examined. Second order polynomial models on extraction yields of total phenolics as functions of extraction conditions were proposed and the models showed reasonable prediction of the experimental data with R^2 of 0.901 and 0.828 for water–EtOH and water–PG, respectively. When glucose was added to water–ethanol (EtOH) and water–propylene glycol (PG) extracts of *T. chebula*, the mixtures were separated into two phases: (1) the top phase rich in EtOH or PG, into which phenolic compounds were concentrated and (2) the glucose rich aqueous phase. The suitable glucose concentration to induce phase separation in both systems was 200 g/L. The distribution coefficients of total phenolics, gallic acid and ellagic acid in water–EtOH were 1.98, 4.89 and 3.52, respectively, while those for water–PG system were 1.98, 4.34 and 3.22, respectively.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Terminalia chebula Retzius is a plant widely distributed in tropical areas of the world. The fruits of *T. chebula*, commonly known as black Myroblans [1], and have traditionally been used to produce medicines in the treatment of asthma, sore throats, vomiting, hiccupping, diarrhoea, bleeding piles, gout and heart and bladder diseases [2]. They have been reported to have high content of phenolic compounds, the major ones being gallic acid (GA) and ellagic acid (EA), which possess strong antioxidant, anticancer, antimicrobial, and anti-inflammatory activities [3].

Extraction of phenolic compounds from *T. chebula* fruits is generally carried out using various types of organic solvents such as 95% ethyl acetate [4], hot water [5], 70% methanol [6], and 95% ethanol [7]. Recently, a number of studies employed subcritical water whose temperature is between normal boiling point (100 °C) and critical temperature (347 °C) and pressure is high enough to maintain the liquid state, for extraction of various organic compounds from plants and natural materials [8,9]. By increasing water temperature, water polarity decreases, allowing plant organic compounds to become more soluble in water. Although our recent study on subcritical water extraction (SWE) of phenolic compounds

from dried ripe fruits of *T. chebula* Retz demonstrated the increase in the yield of phenolic compounds with increasing temperature up to 180 °C [3], the compound degradation rapidly occurred as a result of high temperature. To improve extraction efficiency, enzymatic hydrolysis and microwave-assisted enzymatic hydrolysis in hot pressurized fluid extraction process has recently been applied [10,11].

As an alternative to the above extraction processes, water–cosolvent systems have been investigated for use in the extraction of various plant compounds [12–15]. Kiathest [15] demonstrated that the use of the solution of water and a non-ionic surfactant could significantly reduce the temperature of extraction for damnacanthol from *Morinda citrifolia*. In water–cosolvent systems, the solubility of organic compounds can be improved by varying the composition of the cosolvent, thus extraction can be carried out at lower temperatures compared with SWE. Other examples of water–cosolvent systems include water–EtOH or hydroalcoholic mixtures, and of comparable interest, mixtures of water–propylene glycol (PG). Water–EtOH system has been investigated widely for extraction of various phytochemicals from medicinal plants [14,16]. Water–PG system on the other hand has not been investigated for its role in enhancing extraction efficiency of natural compounds, despite its well known pharmaceutical applications including enhancement of the water solubility of lipophilic drug such as valdecoxib and paracetamol and as a preservative in medicine and food ingredients. Furthermore, PG is

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 6868; fax: +66 2 218 6877.
E-mail address: artiwan.sh@chula.ac.th (A. Shotipruk).

Table 1
Levels of actual and coded factors.

Actual/coded variables	X_i				
	-1.73	-1	0	1	1.73
Temperature (°C)	29	40	55	70	81
EtOH concentration (% v/v)	0	17	40	63	80
PG concentration (% v/v)	13	20	30	40	47
Extraction time (min)	19	30	45	60	71

generally recognized as safe (GRAS) chemical by the U.S. Food and Drug Administration (FDA), and aqueous systems of PG as high as 40% are regarded as nontoxic for human consumption [17,18].

As the further step of product isolation, concentration of the water–EtOH and water–PG extracts of *T. chebula* was investigated in this study. Aqueous two phase concentration, namely *salting out* concentration, using short chain alcohol/salt systems such as ethanol/ K_2HPO_4 or isopropanol/ammonium sulfate have recently been investigated to concentrate organic synthetic and natural compounds [19–20]. This technique offers several advantages as it is convenient, economical, and it requires low energy. However, since salting out takes place at high concentration of salt, some unwanted chemical reactions could occur. In a recently published study, monosaccharide or disaccharide such as glucose and xylose were shown to enable the separation of acetonitrile and water which are normally miscible in any proportion otherwise, via a process called *sugaring out* effect [21].

In this study, the feasibility of employing *sugaring-out concentration* for the separation of biomolecules from plant extract was investigated for the first time. Initially, the extraction of phenolic compounds from the fruits of *T. chebula* using water–EtOH and water–PG mixtures was investigated. Central composite design (CCD) was employed to provide the experimental data on the yields of total phenolics. The response surface methodology (RSM) was applied to determine the optimal set of experimental extraction conditions: concentration of EtOH and PG in the solvent mixtures, extraction temperature and extraction time. Furthermore, the contents of specific phenolic compounds: gallic acid (GA) and elagic acid (EA) extracted with both systems were evaluated. As for the investigation of the feasibility of *sugaring-out* concentration, the *T. chebula* water–EtOH and water–PG extracts that gave the highest contents of total phenolics were used. The suitable amounts of sugar to obtain proper phase separation and product concentration were determined. In addition, the antioxidant activities of the original and the concentrated extracts in both solvent systems were compared.

2. Experimental

2.1. Materials and chemicals

The dried ripe fruits of *T. chebula* were obtained from Chulabhorn Research Institute (Bangkok, Thailand). The GA and EA standards and Folin–Ciocalteu reagent were purchased from Sigma–Aldrich Chemicals (Missouri, USA). Water used in the experiments was distilled and de-ionized water. EtOH, formic acid and HPLC grade MeOH were purchased from Merck (Darmstadt, FR Germany). PG was purchased from Namsian (Bangkok, Thailand). Glucose was purchased from Ajax Finechem (NSW, Australia).

2.2. Extraction of total phenolics from *T. chebula*

Dried fruits of *T. chebula* were powdered in a blender. The powdered sample was sieved through a screen (mesh size of 500 μ M).

For extraction, one gram of powdered sample was suspended in a 2 necked round bottom flask with a thermometer and a reflux column connected to it. The flask was filled with 150 mL of an extraction solvent: water–EtOH or water–PG. Extractions were carried out according to the CCD spherical design to be described, to determine the effect of temperature, concentration of organic solvent and time on the yield of total phenolics. After each extraction, the sample residue was separated from the extracts by filtering through a filter paper (Whatman No. 1, Whatman, USA). The resulting extracts were analyzed for total phenolic content by using a spectrophotometer. The concentrations of GA and EA in some selected extracts were also determined by using HPLC.

2.3. Design of extraction experiment

Optimization of conditions for extraction of total phenolics from *T. chebula* extracts with water–EtOH and water–PG solvent systems was carried out using a spherical central composite design (Spherical CCD). Three independent variables were chosen: temperature (X_1), concentration (X_2) and time (X_3). The levels of factor were designed by $\alpha = \sqrt{k}$, where k is the number of variables ($k=3$). This design puts all the factorial and axial design points on the surface of a sphere of radius \sqrt{k} . The low, middle and high levels of each variable were designated -1.73 , 0 and $+1.73$, respectively. The corresponding actual values for each variable are listed in Table 1. It should be noted that the range of temperatures selected was between the room temperature and the maximum possible temperature of the solvent mixtures used for extraction. The range of EtOH concentration was selected based on the preliminary data which indicated that the selected range cover the optimal concentration for extraction of total phenolics. The range of PG concentration was within the limit of PG concentration normally used in pharmaceutical application. Finally, the extraction times for this study were in the suitable range based on the preliminary extraction results. The spherical CCD including the factors, their levels, and the results from each test are shown in Table 2. The correlation between the independent variables and the response was described by the following second-order polynomial model (Eq. (1)).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j; \quad i \neq j \quad (1)$$

where Y = response, X_i = coded variables of input variables, β_0 = interception, β_{ii} = regression coefficient and β_{ij} = cross-product coefficient. The analysis of the central composite experimental design was carried out using SPSS 16.0 statistical package. The optimal extraction conditions for both water–EtOH and water–PG systems can be calculated from the following equation:

$$\left[\frac{\partial Y}{\partial X_i} \right]_{x_j x_k} = 0, \quad \text{where } i = 1, 2, 3; \quad j = 1, 2, 3; \quad k = 1, 2, 3; \quad i \neq j \neq k \quad (2)$$

Table 2
Spherical CCD experimental results for extraction yields of total phenolic compounds.

Run	X ₁	X ₂	X ₃	Y _{water-EtOH} (mg GAE/gDW)	Y _{water-PG} (mg GAE/gDW)
1	-1	-1	-1	179.41	165.96
2	1	-1	-1	177.34	177.62
3	-1	1	-1	177.01	176.97
4	1	1	-1	184.89	171.49
5	-1	-1	1	158.86	157.00
6	1	-1	1	162.97	168.53
7	-1	1	1	174.59	177.58
8	1	1	1	218.40	205.64
9	-1.73	0	0	162.36	142.38
10	1.73	0	0	173.08	167.62
11	0	-1.73	0	128.67	175.47
12	0	1.73	0	187.26	188.39
13	0	0	-1.73	197.37	186.80
14	0	0	1.73	176.53	165.30
15	0	0	0	205.74	174.65
16	0	0	0	200.09	176.13
17	0	0	0	201.32	175.97

2.4. Sugaring-out concentration of *T. chebula* extracts

10 mL of extract from the water–EtOH and water–PG solutions – where the conditions used gave the highest total phenolics – were charged into a test tube. Glucose was added into the extracts, and the mixture was then heated on a heating plate (without stirring) until all added glucose dissolved completely. At the point in which sugar dissolved, phase separation was observed. The effects of the glucose concentrations (50, 100, 150, 200, and 250 g/L) on the efficiencies of phase separation were determined for both solvent systems.

The efficiency of phase separation was evaluated in terms of phase ratio (*R*) according to Eq. (3).

$$R = \frac{V_{\text{top}}}{V_{\text{bottom}}} \quad (3)$$

where V_{top} and V_{bottom} are the volumes of the top and the bottom phase, respectively. The glucose concentration giving the highest phase separation was then selected for subsequent study in which the efficiencies of product concentrations were evaluated. The concentrations of the total phenolics, GA and EA in each phase were analyzed using HPLC. Two parameters that determine the efficiency of the concentration process include compound distribution coefficient and enriched factor.

The distribution coefficients (D_i) of compound *i* (total phenolic, EA or GA) for both water–EtOH and water–PG solvent systems were determined from Eq. (4).

$$D_i = \frac{C_{\text{top},i}}{C_{\text{bottom},i}} \quad (4)$$

where $C_{\text{top},i}$ and $C_{\text{bottom},i}$ are the concentrations of compound *i* in the top and the bottom phases, respectively.

The enriched factor (E_i) was defined as the ratio of the compound *i* concentration in the top phase, $C_{\text{top},i}$, to the concentration of the compound in the original sample, $C_{\text{original},i}$, according to the following equation.

$$E_i = \frac{C_{\text{top},i}}{C_{\text{initial},i}} \quad (5)$$

It should be noted that in order to calculate the distribution coefficients and the enriched factors of total phenolics and GA and EA according to Eqs. (4) and (5), the concentrations of total phenolic content, GA and EA of the original extracts and those of the two phases separated as a result of sugaring-out concentration must be known.

2.5. Analysis of total phenolic content

The determinations of the total phenolic content in the original extract and in each of the two separated phases subsequent to sugaring-out concentration were carried out using Folin–Ciocalteu method modified from that described in previous study [22]. Initially, 0.1 mL of the extracts from water–EtOH and water–PG extractions were dissolved in distilled water 2.8 mL. Each mixture was added with 2 mL of 2% aqueous sodium carbonate solution. After 3 min, 0.1 mL of 50% Folin–Ciocalteu reagent was added to the mixtures and left at room temperature for 30 min, after which the absorbance was measured at 750 nm using distilled water as a reference. The concentration of total phenolics was determined based on our calibration using gallic acid standard.

2.6. HPLC analysis of GA and EA

The analyses of GA and EA in the original extract and in each of the two phases subsequent to sugaring-out concentration were performed using a reversed phase HPLC with UV detection at 270 nm. 10 μ L of sample was injected to a column (250 mm \times 4.6 mm Phenomenex-Luna-C18), whose temperature was maintained at 25 $^{\circ}$ C. The sample was eluted using a gradient system of mobile phase, 0.1% formic acid (solvent A): methanol (solvent B), at a flow rate of 1 mL/min, starting with 4% of solvent B at 0 min, and was changed to 80% of solvent B in 27 min, with the total run time of 30 min. The chromatogram in Fig. 1 shows that the retention times of GA and EA were 12.0 and 24.8 min, respectively.

2.7. Determination of antioxidant activity

Antioxidant activity of the original water–EtOH and water–PG extracts and the concentrated extract in the top phase were measured in terms of percentage radicals inhibition (%PI) using ABTS method modified from that described by Re et al. [23]. The extract was added into ABTS*[•] solution (aqueous solution of 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate having absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm) at the volume ratio of 1:200 (sample solution:ABTS solution). The solutions were then mixed using a vortex and the mixtures were incubated in the dark at room temperature for 10 min, after which the absorbance was measured at 734 nm using distilled water as a reference. The value of percent inhibition (PI) was calculated using the following equation:

$$\text{PI}(\%) = \left[\left(1 - \frac{A_t}{A_r} \right) \right] \times 100 \quad (6)$$

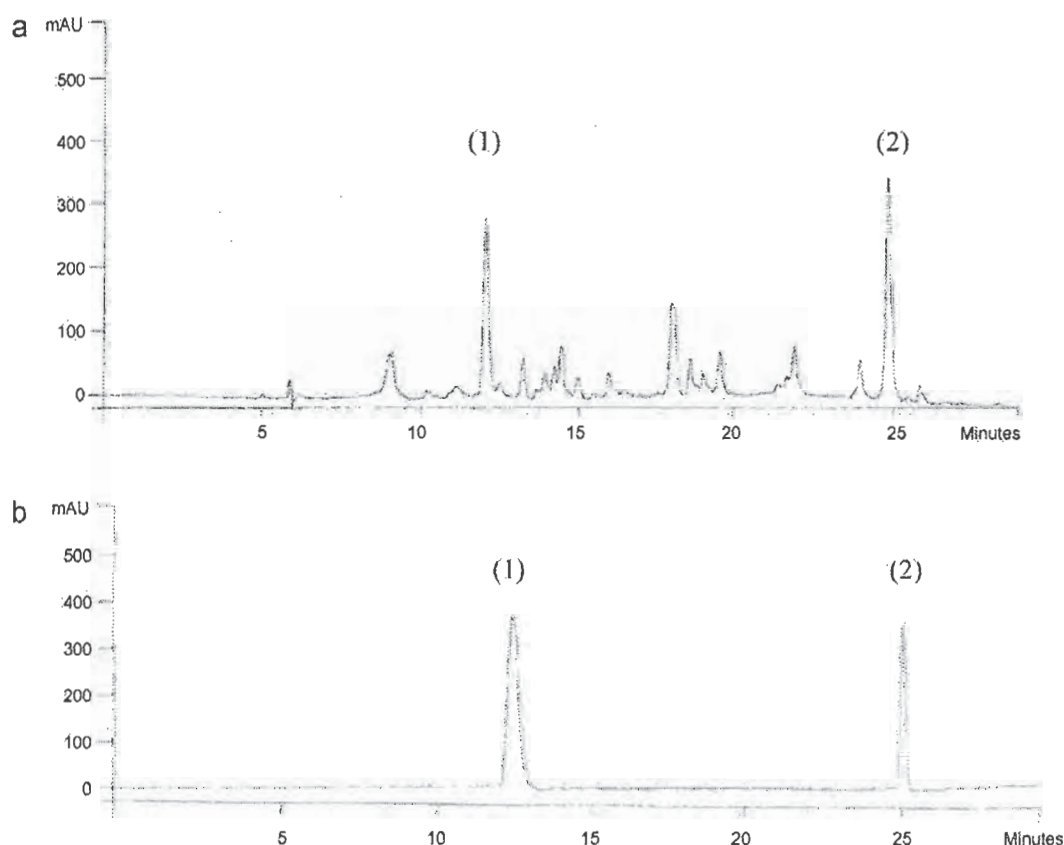


Fig. 1. HPLC chromatograms of (a) *T. chebula* extract (b) standard compounds: GA (1) and EA (2).

A_t and A_r are absorbances of test sample and ABTS reference, respectively. In addition to PI, the concentration of sample producing 50% reduction of the radial absorbance (IC_{50}) was also used as an antioxidative index, for the purpose of comparing the antioxidant activities of various extracts. To find this value, the extract was diluted in series in distilled water and each diluted extract was added into the ABTS^{•+} solution, prepared as previously described, at the volume ratio of 1:10 (sample solution:ABTS solution). The PI values were determined for the series of diluted extracts and were plotted against sample concentrations, and linear regression of the data were made and used to determine the value of IC_{50} .

3. Results and discussion

3.1. Extraction of *T. chebula*

3.1.1. Analysis of variance (ANOVA) and estimation of regression coefficient

The spherical CCD experimental design was used to evaluate the main and the interaction effects on the extraction of total phenolics (response Y) from *T. chebula*. The yields of the total phenolics extracted with water–EtOH and water–PG are summarized in Table 2. From these results, the analysis of variance (ANOVA) was conducted using SPSS 16.0 program to determine the factors that have significant effects on phenolics yields at 95% confidence (sig. < 0.05). The results are summarized in Tables 3 and 4 for water–EtOH and water–PG extractions, respectively.

From the ANOVA analysis of water–EtOH system (Table 3), the main effect of all factors, temperature (X_1), concentration (X_2) and time (X_3), and all pair-wise interactions of the factors were significant to the amount of total phenolics extracted. On the other

hand, for extraction with water–PG, the ANOVA analysis (Table 4) indicated that the main effects of all three factors, the pair-wise interactions between temperature and time and concentration and time, as well as the interactions of all three factors were significant to the yield of the total phenolics (Y) from *T. chebula* fruits.

The experimental data in Table 2 were fitted with quadratic models described by Eqs. (7) and (8), for phenolics extraction from water–EtOH and water–PG systems, respectively. The results of the response surface model fitting in the form of ANOVA are shown in Table 5. The ANOVA of the quadratic regression models demonstrated the models to be significant with low probability ($p = 0.008$ and 0.048 for water–EtOH and water–PG systems, respectively). The predicted versus observed values of the total phenolic yields for both systems indicated good agreement between the polynomial regression model and the experimental data, with the coefficient of determination of 0.901 for $Y_{\text{water–EtOH}}$ and 0.828 for $Y_{\text{water–PG}}$, respectively.

$$Y_{\text{water–EtOH}} = 202.36 + 5.167X_1 + 12.703X_2 - 2.851X_3 + 6.206X_1X_2 + 5.264X_1X_3 + 8.251X_2X_3 - 9.975(X_1)^2 - 13.234(X_2)^2 - 3.55(X_3)^2 \quad (7)$$

$$Y_{\text{water–PG}} = 175.574 + 6.395X_1 + 6.071X_2 - 1.465X_3 - 0.077X_1X_2 + 4.177X_1X_3 + 6.602X_2X_3 - 6.089(X_1)^2 + 2.909(X_2)^2 + 0.946(X_3)^2 \quad (8)$$

The significance of each regression coefficient was determined by statistical analysis using t -test and p -values. The analyses indi-

Table 3
ANOVA of spherical CCD of the yields of total phenolic compounds for water–EtOH extraction ($Y_{\text{water-EtOH}}$).

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected model	7142.080	14	510.149	57.879	0.017
Intercept	303,022.492	1	303,022.492	34,379.272	0.000
X_1	1860.177	3	620.059	70.349	0.014
X_2	4811.742	3	1603.914	181.971	0.005
X_3	504.776	3	168.259	19.090	0.050
$X_1 \times X_2$	308.099	1	308.099	34.955	0.027
$X_1 \times X_3$	221.648	1	221.648	25.147	0.038
$X_2 \times X_3$	544.692	1	544.692	61.798	0.016
$X_1 \times X_2 \times X_3$	110.789	1	110.789	12.570	0.071
Error	17.628	2	8.814		
Total	560,077.059	17			

Table 4
ANOVA of spherical CCD of the yields of total phenolic compounds for water–PG extraction ($Y_{\text{water-PG}}$).

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected model	2921.504	14	208.679	318.297	0.003
Intercept	306,178.104	1	306,178.104	467,012.623	0.000
X_1	1088.977	3	362.992	553.671	0.002
X_2	621.000	3	207.000	315.737	0.003
X_3	266.168	3	88.723	135.328	0.007
$X_1 \times X_2$	0.047	1	0.047	0.071	0.814
$X_1 \times X_3$	139.595	1	139.595	212.924	0.005
$X_2 \times X_3$	348.746	1	348.746	531.941	0.002
$X_1 \times X_2 \times X_3$	141.800	1	141.800	216.288	0.005
Error	1.311	2	0.656		
Total	516,053.467	17			

Table 5
ANOVA for the quadratic models.

	Model	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Water–EtOH	Regression	6453.797	9	717.089	7.111	0.008
	Residual	705.911	7	100.844		
	Total	7159.708	16			
Water–PG	Regression	2420.200	9	268.911	3.745	0.048
	Residual	502.587	7	71.798		
	Total	2922.787	16			

cated that X_2 , $(X_1)^2$ and $(X_2)^2$ are significant model terms for water–EtOH system and significant model terms for water–EtOH while X_1 , X_2 and $(X_1)^2$ are significant model terms for water–PG system ($p < 0.05$).

3.1.2. Response surface plots and response optimization

Response surface methodology was used to determine the optimal response for *T. chebula* extraction using EtOH–water and PG–water systems. The three dimensional plots of predicted responses based on the models Eqs. (3) and (4) as a function of the combination of two test variables with the other maintained at its respective zero level are shown in Fig. 2. Each of these plots allows the visualization of the significant factors derived from the statistical analysis.

The optimal conditions giving the maximum response for $Y_{\text{water-EtOH}}$ calculated from Eq. (7) were $X_1 = 1.41$ and $X_2 = 0.158$ and $X_3 = 2.48$, resulting in $Y_{\text{water-EtOH,max}} = 212.51$ mg GAE/gDW. In other words, the model predicted the highest phenolic content of 212.51 mg GAE/gDW, for extraction at the temperature of 76 °C with water–EtOH mixture at the concentration of water–EtOH of 76.4%v/v for 82 min. On the other hand, the response surface model (Eq. (8)) for water–PG extraction predicted the yield of total phenolic content, $Y_{\text{water-PG}}$, of 178.64 mg GAE/gDW at the optimal condition of $X_1 = 0.013$, $X_2 = 0.63$ and $X_3 = -1.48$. These conditions correspond to the temperature of 57 °C, the concentration of PG of 36% (v/v) and extraction time of 23 min. The experiments were carried out to validate the model prediction.

At the above predicted optimal conditions, the total phenolic content obtained with water–EtOH extraction was approximately 210.54 mg GAE/gDW, and for water–PG extraction, was approximately 180.21 mg GAE/gDW, respectively.

3.1.3. HPLC analysis of GA and EA

The extracts containing the highest total phenolic content (218.40 and 205.64 mg GAE/gDW for water–EtOH and water–PG, respectively) were analyzed for gallic acid and ellagic acid using HPLC. The amounts of GA and EA in the extracts are summarized in Table 6, which were compared with our previous results obtained by SWE. It can be drawn from these results that the amounts of GA obtained from water–EtOH and water–PG systems were higher than that with SWE at 120 °C. Although this yield was slightly less than that of SWE at 180 °C [3], the extraction temperature can be reduced significantly to only 70 °C. Similar observations were observed for the yields of EA from water–EtOH and water–PG extraction, which were higher than those obtained with SWE at all temperatures.

3.2. Sugaring-out concentration

Because the optimal values of temperature, concentration and time are difficult to operate in the actual extraction experiments, it should therefore be noted that the sugaring out experiments were carried out using the extracts from the water–EtOH and water–PG solutions – where the conditions used gave the highest total phenolics.

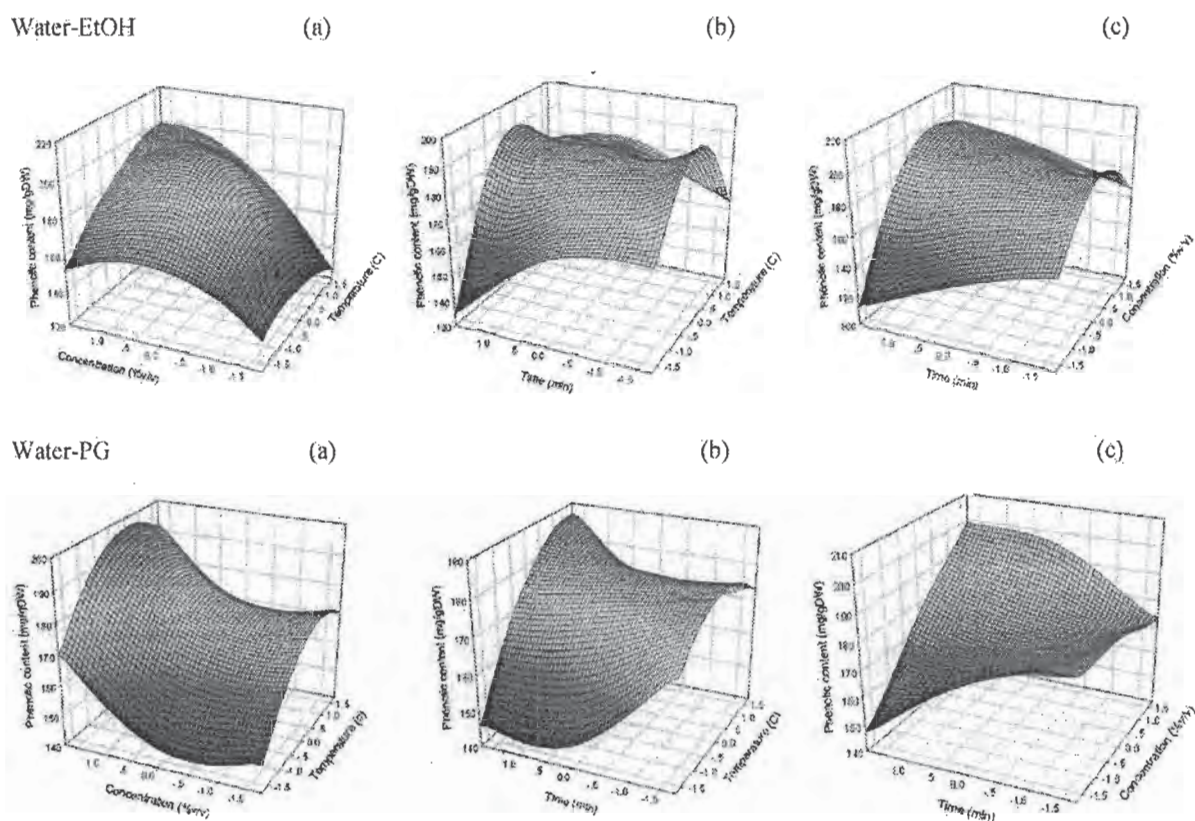


Fig. 2. Response surfaces of total phenolic compounds yield for water–EtOH and water–PG extraction as a function of (a) temperature and concentration, (b) temperature and time, and (c) concentration and time.

Table 6

GA and EA yields from *T. chebula* with water–EtOH extraction, water–PG extraction and SWE.

Extraction methods	Temperature (°C)	Extraction time (min)	Yield of total phenolic compounds (mg GAE/gDW)	Component content (mg/gDW)	
				GA	EA
EtOH–Water	70	60	218.4	11.0 ± 0.0	9.1 ± 0.1
PG–Water	70	60	205.6	9.8 ± 0.1	5.9 ± 0.1
Subcritical water extraction*	120	37.5	172.7	7.4 ± 0.5	2.4 ± 0.1
	180	37.5	116.2	14.7 ± 0.2	5.4 ± 0.2

* Ref. [3].

3.2.1. Effect of glucose concentration on phase ratio

As shown in Fig. 3, glucose addition into *T. chebula* extracts in water–EtOH or water–PG was found to give rise to the separation of the mixtures into two phases. The top phase is EtOH (or PG) rich phase, into which the phenolic compounds are concentrated (as indicated by the dark color) and the bottom is glucose rich aqueous phase. The phase separation by sugaring-out concentration occurred as the added glucose formed relatively strong hydrogen bonding with water, pushing away EtOH and PG molecules into the top phase, while glucose which was dissolved in water, remained in the bottom phase. The phase ratios (*R*) of

the extract for various glucose concentrations were determined and plotted in Fig. 4. The decrease in *R* with increasing glucose concentration indicated that as the amount of the added glucose increased, more water was separated into the bottom phase. The smallest phase ratios were achieved at 200 g/L glucose concentration, which were, 1.94 and 1.85 for water–EtOH and water–PG systems, respectively. Additional glucose greater than 200 g/L did not further decrease the phase ratios. The glucose concentration of 200 g/L was therefore used for subsequent sugaring-out concentration experiments to determine the efficiency of phenolic compounds concentration.

Table 7

Distribution coefficients and enriched factors of TP, GA and EA.

Extraction solvent	D_i			E_i		
	Total phenolic	GA	EA	Total phenolic	GA	EA
Water–EtOH	1.98	4.89	3.52	1.10	0.98	1.00
Water–PG	1.98	4.34	3.22	1.11	0.93	1.13

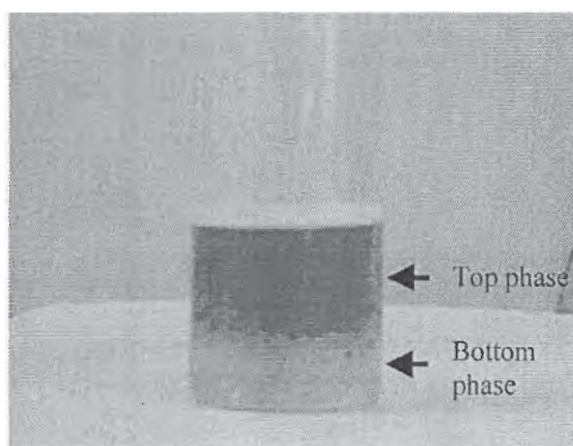


Fig. 3. Sugaring-out phase separation.

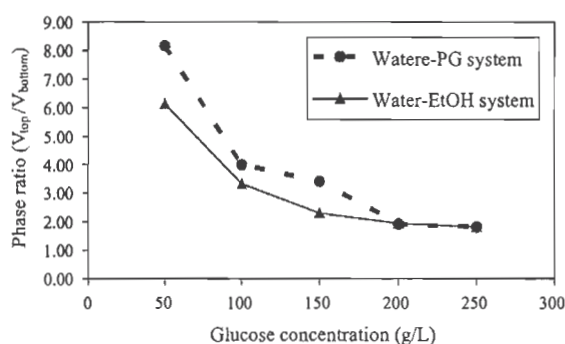


Fig. 4. Phase ratios of extracts at different glucose concentration.

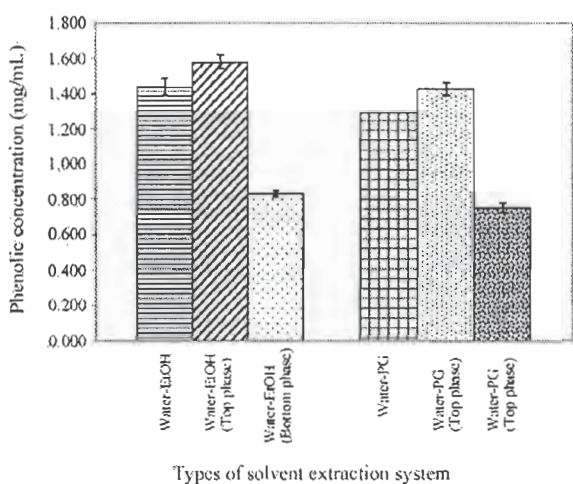


Fig. 5. Concentrations of phenolic compounds of the original extracts and the top and bottom phases obtained after sugaring out concentration.

3.2.2. Evaluation of concentration efficiency

Fig. 5 shows the concentrations of total phenolics in the concentrated top phase compared with that of the original samples, which increased from 1.44 to 1.58 mg/mL for water–EtOH system, and from 1.29 to 1.43 mg/mL for water–PG system. These correspond to 10% and 11% enrichment of total phenolics in the two systems, respectively. Since the top phases were rich in organic EtOH (or PG), concentration of phenolics took place as these compounds are more soluble in EtOH and PG than in water, which remained mostly in the

Table 8
PI and IC₅₀ of original and concentrated extracts.

Sample		IP (%)	IC ₅₀ (μg/L)
Water–EtOH	Original	49.89 ± 0.96	5.31 ± 0.17
	Top phase	56.50 ± 0.10	5.01 ± 0.06
Water–PG	Original	51.96 ± 1.46	4.67 ± 0.30
	Top phase	53.82 ± 0.05	4.63 ± 0.29

bottom phase. The values for distribution coefficients and enriched factors for total phenolics, GA and EA are summarized in Table 7.

3.2.2.1. Distribution coefficients. In a typical two-phase concentration process, the distribution coefficient (D) is a key parameter determining the process efficiency. The distribution coefficients of the total phenolics, GA and EA were determined for the process carried out at glucose concentration of 200 g/L, and were found to be greater than 1 in all cases. These results suggest potential application of the process for concentrating the phenolic compounds in these solvent systems.

3.2.2.2. Enriched factor. Determined based on Eq. (5), the enriched factors of total phenolic compounds were 1.10 and 1.11 for both water–EtOH and water–PG systems, which correspond to 10 and 11% enrichment as previously discussed. The rather small enrichment was due to the fact that the equilibrium concentration of the total phenolics remained relatively high in the bottom phase. On a similar note, the enriched factors of GA and EA were also relatively low, despite the high distribution coefficient. This indicated the occurrence of the compound degradation since heating was required during the concentration process. The mass balance calculation suggested that approximately 10–27% loss of GA and EA was observed during the process (data not shown). Further investigation of suitable conditions such as solvent systems, type of sugars, as well as process conditions would further be necessary in order to minimize this loss, and thus improve the product enrichment. Nevertheless, the high distribution coefficients of GA and EA convincingly suggest the possibility for sugaring-out concentration as an effective technique to concentrate and partition the compounds.

3.2.3. Antioxidant activity evaluation

Antioxidant activity of the extracts measured in terms of % PI and IC₅₀ are summarized in Table 8. The PI values of the concentrated extracts for both water–EtOH water–PG systems were expected to increase as the concentrations of total phenolics increased, compared with the original extracts (Fig. 5). In addition to the PI values, the IC₅₀ values which indicated the antioxidant quality of the extracts were also compared. The concentrated top phase of water–EtOH was found to have lower IC₅₀ values than the original extract (IC_{50, top phase} = 5.01 μg/mL versus IC_{50, original} = 5.31 μg/mL), while the IC₅₀ values of water–PG extract and the concentrated phase were approximately the same, which are 4.67 and 4.63 μg/mL, respectively. It should also be noted that water–PG extracts show greater antioxidant activity in terms of IC₅₀ (lower IC₅₀ values) than those of the water–EtOH extracts. This was possibly due to the ability of PG to stop growth of microorganisms, making it suitable for use as preservative. Thus, this system has great potential for future application in food and pharmaceutical industries.

4. Conclusions

Phenolic compounds from *T. chebula* can be effectively extracted using water–EtOH and water–PG solvent systems. In comparison with SWE, water–cosolvent extraction is less complicated, and the results of this study suggested that extraction with water–EtOH

and water–PG system requires considerably lower temperature, allowing the reduction in the compound degradation. Furthermore, concentration of these extracts could be achieved by glucose addition to induce phase separation. The high distribution coefficients of total phenolics, GA and EA supported the possibility of sugaring-out concentration as an alternative method for concentration and separation of natural compounds from water–organic cosolvent systems. For industrial scale application of the process, issues concerning the separation of the key compounds from the solvent (EtOH or PG) rich phase, the solvent recyclability, and the stability of the bioactive compounds during the process with solvent recycling, must be addressed. For water–EtOH system, EtOH could be separated by distillation. On the other hand water–PG system would represent the system in which the separation of PG is not necessary since PG is safe for human consumption. In addition, as previously mentioned, PG present in the extracts would act as a preservative. The results in which the concentrated extract in water–PG system was found to show higher antioxidant activity (the lowest IC₅₀) than those of water and water–EtOH and water–EtOH concentrated extracts support this claim. Despite the positive results in the small scale study nevertheless, an industrial scale application of process requires further detailed study to optimize the process system and conditions.

Acknowledgments

This project was supported by Thailand National University Project of the Office of the Higher Education Commission (FW644A), the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (FW014A) and the Thailand Research Fund. We also thank Dr. Nuchanart Rankadilok from CRI for suggesting the use of PG as a cosolvent and for providing the *T. chebula* sample.

References

- [1] A. Saleem, M. Husheem, P. Horkonen, K. Pihlaja, Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. Fruit, J. Ethnopharmacol. 81 (2002) 327–336.
- [2] N.K. Rao, S. Nammi, Antidiabetic and renoprotective effects of the chloroform extract of *Terminalia chebula* Retz. seeds in streptozotocin-induced diabetic rats, BMC Complement Altern. Med. 6 (2006).
- [3] P. Rangsrivong, N. Rangkadilok, J. Satayavivad, M. Goto, A. Shotipruk, Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. Fruits, Sep. Purif. Technol. 66 (2009) 51–56.
- [4] S. Kaur, I.S. Grover, M. Singh, S. Kaur, Antimutagenicity of hydrolyzable tannins from *Terminalia chebula* in *Salmonella typhimurium*, Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 419 (1998) 169–179.
- [5] G.H. Naik, K.I. Priyadarsinia, D.B. Naik, R. Gangabhairathib, H. Mohan, Studies on the aqueous extract of *Terminalia chebula* as a potent antioxidant and a probable radioprotector, J. Phytomed. 11 (2004) 530–538.
- [6] H. Gao, Y.N. Huang, P.Y. Xu, J. Kawabata, Inhibitory effect on α -glucosidase by the fruits of *Terminalia chebula* Retz, Food Chem. 105 (2007) 628–634.
- [7] S. Bhattacharya, J.P. Kamat, S.K. Bandyopadhyay, S. Chattopadhyay, Comparative inhibitory properties of some Indian medicinal plant extracts against photosensitization-induced lipid damage, Food Chem. 113 (2009) 975–979.
- [8] M.D. Luque de Castro, M.M. Jimenez-Carmona, V. Fernandez-Perez, Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants, Trends Anal. Chem. 18 (2000) 708–716.
- [9] L. Gamiz-Gracia, M.D. Luque de Castro, Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques, Talanta 51 (2000) 1179–1185.
- [10] S.C. Lin, C.M.J. Chang, T.S. Deng, Enzymatic hot pressurized fluids extraction of polyphenolics from *Pinus taiwanensis* and *Pinus morrisonicola*, J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 40 (2009) 136–142.
- [11] Y.C. Yang, J. Li, Y.G. Zu, Y.J. Fu, M. Luo, N. Wu, X.L. Liu, Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of corilagin and geraniin from *Geranium sibiricum* Linne and evaluation of antioxidant activity, Food Chem. 122 (2010) 373–380.
- [12] U.D. Chavana, F. Shahidia, M. Naczkb, Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents, Food Chem. 75 (2001) 509–512.
- [13] B.B. Li, B. Smith, M. Md Hossain, Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method, Sep. Purif. Technol. 48 (2006) 182–188.
- [14] S.Y. Cho, Y.N. Lee, H.J. Park, Optimization of ethanol extraction and further purification of isoflavones from soybean sprout cotyledon, Food Chem. 117 (2009) 312–317.
- [15] K. Kiathevest, M. Goto, M. Sasakib, P. Pavasant, A. Shotipruk, Extraction and concentration of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by non-ionic surfactant solution, Sep. Purif. Technol. 66 (2009) 111–117.
- [16] N.E. Durling, O.J. Catchpole, J.B. Grey, R.F. Webby, K.A. Mitchell, L.Y. Foo, N.B. Perry, Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures, Food Chem. 101 (2007) 1417–1424.
- [17] C. Liu, K.G.H. Desai, X. Chen, X. Tang, Solubility of valdecoxib in the presence of glycerol, propylene glycol, and poly(ethylene glycol) 400 at (298.15, 303.15, and 308.15) K, Chem. Eng. Data 50 (2005) 1736–1739.
- [18] A. Jouyban, H.K. Chan, N.Y.K. Chew, M. Khoubnasabjafar Jr, W.E. Acree, Solubility prediction of paracetamol in binary and ternary solvent mixtures using Jouyban–Acree model, J. Chem. Pharm. Bull. 54 (2006) 428–431.
- [19] B. Jiang, Z.G. Li, J.Y. Dai, D.J. Zhang, L.Z. Xiu, Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/phosphate system, J. Process Biochem. 44 (2009) 112–117.
- [20] L.H. Sun, B. Jiang, Z.L. Xiu, Aqueous two-phase extraction 2,3 butanediol from fermentation broths by isopropanol/ammonium sulfate system, J. Biotechnol. Lett. 31 (2009) 371–376.
- [21] B. Wang, T. Ezejias, H. Feng, H. Blaschek, Sugaring-out: a novel phase separation and extraction system, J. Chem. Eng. Sci. 63 (2008) 2595–2600.
- [22] I. Rodríguez-Meizoso, F.R. Marin, M. Herrero, F.J. Senorans, G. Reglero, A. Cifuentes, E. Ibanez, Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization, Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 1560–1565.
- [23] R. Re, N. Pellegrini, A.S. Protenete, A. Pannala, M. Yang, C.A. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radic. Biol. Med. 26 (1999) 1231–1237.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อหัวหน้าโครงการ
(ภาษาไทย) โครงการ นางสาวอาทิวรรณ โชติพิฤกษ์ ตำแหน่ง ทาวิชาการ รองศาสตราจารย์
(ภาษาอังกฤษ) Artiwan Shotipruk
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100100454830
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะ/สถาบัน คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-218-6868 โทรสาร 02-218-6877 E-mail artiwana.sh@chula.ac.th
ที่อยู่ปัจจุบัน 785 ซอยอิสรภาพ 33 ถ.อิสรภาพ แขวงวัดอรุณ เขตบางกอกใหญ่ กท. 10600 โทรศัพท์ 02-690-7131

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
The Johns Hopkins University	ปริญญาตรี	วิศวกรรมเคมี	2538
The University of Michigan	ปริญญาโท	วิศวกรรมเคมี	2540
The University of Michigan	ปริญญาเอก	วิศวกรรมเคมี	2544

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เทคโนโลยีของไหลวิกฤตยวดยิ่ง
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย
 - 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อ โครงการวิจัย (เฉพาะที่เป็นหัวหน้าโครงการและดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน)
 - 7.1.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มจากสมุนไพรไทยโดยการสกัดและทำปฏิกิริยาในน้ำกึ่งวิกฤต ทูนเพิ่มขีดความสามารถในการทำวิจัยของนักวิจัยรุ่นกลาง สกว.
 - 7.1.3 การสกัดสารลูทีนจากดอกดาวเรืองและการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี บริษัท ปตท. เคมีคอล จำกัด (มหาชน)
 - 7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)
 - 7.2.1 การสกัดสารแอนทราควิโนนส์จากรากของต้นข่อยด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ทูนพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์และนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. ประจำปี พ.ศ. 2549 (เป็นหัวหน้าโครงการ)

- 7.2.2 โครงการการสกัดสารต้านมะเร็งจากรากของต้นข่อยด้วยน้ำกึ่งวิกฤตและแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์และนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. ประจำปี พ.ศ. 2551 (เป็นหัวหน้าโครงการ)
- 7.2.3 การพัฒนากระบวนการทางชีวภาพเพื่อการผลิตและการแยก 1,3-โพเพนไดออกซอลจากกลีเซอรอลที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซล ใ้ได้รับทุนวิจัยจากบริษัท ปตท.เคมีคอล จำกัด (มหาชน) พ.ศ. 2550-2552 (เป็นผู้ร่วมโครงการ)
- 7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด
- 7.3.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มจากสมุนไพรไทยโดยการสกัดและการทำปฏิกิริยาในน้ำกึ่งวิกฤต ได้รับการสนับสนุนทุนพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของนักวิจัยรุ่นกลาง จากสกว. ได้ดำเนินการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 80 และมีกำหนดสิ้นสุดโครงการเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2554 (เป็นหัวหน้าโครงการ)
- 7.3.2 การสกัดสารลูทีนจากดอกดาวเรืองและการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี ได้รับการสนับสนุนทุนจากบริษัทปตท.เคมีคอล ได้ดำเนินการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 70 และมีกำหนดเสร็จสิ้นโครงการเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2553 (เป็นหัวหน้าโครงการ)
- 7.3.3 การพัฒนากระบวนการที่ยั่งยืนสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพไร้ของเสียจากวัตถุดิบท้องถิ่น ได้รับ องค์กรความรู้ใหม่ จาก สกว. ได้ดำเนินการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณ 40% มีกำหนดเสร็จสิ้นเดือน พฤษภาคม 2555 (เป็นผู้ร่วมโครงการ)
- 7.3.4 การพัฒนากระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลจากคลอสทริเดียมโดยใช้กลูโคสและน้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบ ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) ได้ดำเนินการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณ 60% และมีกำหนดเสร็จสิ้นโครงการเดือน เมษายน พ.ศ. 2554 (เป็นผู้ร่วมโครงการ)
- 7.3.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนและการประยุกต์ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตัวรองรับของตัวเร่งปฏิกิริยา และสารเติมสำหรับพอลิเมอร์นาโนคอมโพสิต ได้รับการสนับสนุนทุน Strategic Targeted Advanced Research (STAR) จากสกว. ได้ดำเนินการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณ 30% และมีกำหนดเสร็จสิ้นโครงการ เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2555 (เป็นผู้ร่วมโครงการ)
- 7.3.6 การสกัดไขมันจากจุลสารหอยเพื่อใช้เป็นพลังงานทางเลือก ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย จากบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) ได้ดำเนินการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณ 80% และมีกำหนดเสร็จสิ้นโครงการเดือนธันวาคม พ.ศ. 2553 (เป็นผู้ร่วมโครงการ)

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (จากโครงการที่ทำเสร็จแล้วหรือกำลังดำเนินการ)

1. Boonnoun P., Laosiripojana N., Jongsomjit B., Panpranot J., Mekasuwandumrong O., Muangnapoh C., **Shotipruk A.** Application of Sulfonated Carbon-Based Catalyst for Reactive Extraction of 1,3-Propanediol from Model Fermentation Mixture, Submitted to Industrial & Engineering Chemistry Research, Accepted. (ทุน STAR สกว.)
2. Palumpitag W., Prasitchoke P., Goto M., **Shotipruk A.** Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Marigold Lutein Fatty Acid Esters: Effects of Cosolvents and Saponification Conditions, Separation Science and Technology, Accepted. (ทุนนักวิจัยรุ่นกลาง สกว. พ.ศ. 2551)
3. Chareonlimkun A., Champreda V., **Shotipruk A.**, Laosiripojana N. Reactions of C5 and C6-sugars, cellulose, and lignocelluloses under hot compressed water (HCW) in the presence of heterogeneous acid catalysts. Fuel, In press. (ทุนสกว.องค์ความรู้ใหม่ สกว. พ.ศ. 2552)
4. Ruen-ngam D., **Shotipruk A.**, and Pavasant P. Comparison of Extraction Methods for Recovery of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, Separation Science and Technolgy, In press. (ทุนนักวิจัยรุ่นกลาง สกว. พ.ศ. 2551)
5. Owpradit W., Mekasuwandumrong O., Panpranot J., **Shotipruk A.**, Jongsomjit B. Synthesis of LLDPE/TiO₂ nanocomposites by in situ polymerization with zirconocene/dMMAO catalyst: Effect of [Al]/[Zr] ratios and TiO₂ phases, Polymer Bulletin, 2010, 1-12. (ทุน STAR สกว. พ.ศ. 2552)
6. Mekasuwandumrong O., Phothakwanpracha S., Jongsomjit B., **Shotipruk A.**, Panpranot J., Liquid-Phase Selective Hydrogenation of 1-Heptyne over Pd/TiO₂ Catalyst Synthesized by One-Step Flame Spray Pyrolysis, Catalysis Letters 136 (1-2), 2010, 164-170. (ทุน STAR สกว. พ.ศ. 2552)
7. Chareonlimkun A., Champreda V., **Shotipruk A.**, Laosiripojana N. Catalytic conversion of sugarcane bagasse, rice husk and corncob in the presence of TiO₂, ZrO₂ and mixed-oxide TiO₂-ZrO₂ under hot compressed water (HCW) condition, Bioresource Technology 101 (11), 2010, 4179-4186. (ทุนสกว.องค์ความรู้ใหม่ สกว. พ.ศ. 2552)
8. Petchmala A., Laosiripojana N., Jongsomjit B., Goto M., Panpranot J., Mekasuwandumrong O., **Shotipruk A.** Transesterification of Palm Oil and Esterification of Palm Fatty Acid in Near- and Super-critical Methanol with SO₄-ZrO₂ Catalysts, Fuel 89 (9), 2010, 2387-2392. (ทุน STAR สกว. พ.ศ. 2552)
9. Kaewboonnum, Santiwattana P, and **Shotipruk A.**, Recovery of γ -Oryzanol from Rice Bran Oil Soapstock, Separation and Purification Technology 45 (9), 2010, 1186-1195. (ทุนนักวิจัยรุ่นกลาง สกว. พ.ศ. 2551)

10. Boonsongsawat T., **Shotpruk A.**, Tantayakom V., Prasitchoke P., Chandavasu C., Muangnapoh C. Solvent Extraction of Biologically Derived 1,3-Propanediol with Ethanol Cosolvent, *Separation Science and Technology* 45 (4), 2010, 541-547. (ทุน 1, 3 PDO บริษัทปตท. เคมิคอล พ.ศ. 2550)
11. Luerruk W., **Shotpruk A.**, Tantayakom V., Prasitchoke P., Muangnapoh C. Adsorption of 1,3-propanediol from synthetic mixture using polymeric resin as adsorbents *Frontiers of Chemical Engineering in China* 3 (1 SPEC. ISS.), 2009, pp. 52-57. (ทุน 1, 3 PDO บริษัทปตท. เคมิคอล พ.ศ. 2551)
12. Wattanasintana W., **Shotpruk A.**, Recovery of Anti-cancer Damnacanthol from Roots of *Morinda citrifolia* by Microwave-Assisted Extraction, *Separation Science and Technology*, 44 (12), 2009, 2942-2955. (ทุนนักวิจัยรุ่นกลาง สกว. พ.ศ. 2551)
13. Yothipitak W., Goto M., Tonanon N., Panatpong B., **Shotpruk A.**, Response Surface Methodology to supercritical carbondioxide extraction of essential oil from amormum krevanh Pierre., Accepted manuscript, *Separation Science and Technology* 44 (16), 2009, 541-547. (ทุนนักวิจัยรุ่นกลาง สกว. พ.ศ. 2551)
14. Yujaroen D., Goto M., Sasaki M., **Shotpruk A.**, Esterification of palm fatty acid distillate (PFAD) in supercritical methanol: Effect of hydrolysis on reaction ractivity, *Fuel*, 88, 2009, 2011-2016 (ทุนนักวิจัยรุ่นกลาง สกว. พ.ศ. 2551)
15. Rangsiwong P., Rangkadilok N., Satayavivad J., Goto M., **Shotpruk A.** Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. fruits, *Separation and Purification Technology*, 66(1), 2009, 51-56. (ทุนนักวิจัยรุ่นกลาง สกว. พ.ศ. 2551)
16. Kiathevest K., Goto M., Sasaki M., Pavasant P., **Shotpruk A.** Extraction and concentration of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by non-ionic surfactant solution, *Separation and Purification Technology*, 66(1), 2009, 111-117. (ทุนนักวิจัยรุ่นกลาง สกว. พ.ศ. 2551)
17. Budrat P., **Shotpruk A.** Enhanced recovery of phenolic compounds from bitter melon (*Momordica charantia*) by subcritical water extraction, *Separation and Purification Technology*, 66(1), 2009, 125-129. (ทุนนักวิจัยรุ่นกลาง สกว. พ.ศ. 2551)
18. **A. Shotpruk**, S. Assabumrungrat, P. Pavasant, N. Laosiripojana, Reactivity of CeO₂ and Ce-ZrO₂ toward steam reforming of palm fatty acid distilled (PFAD) with co-fed oxygen and hydrogen *Chemical Engineering Science*, 64 (3), 2009, 459-466. (ทุนองค์ความรู้ใหม่ สกว. พ.ศ. 2552)

19. Lamoolphak W., De-Eknamkul W., Shotipruk A. Hydrothermal Production and Characterization of Protein and Amino Acids from Silk Waste, *Bioresource Technology* 99 (16), 2008,7678-7685. (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. พ.ศ. 2549)
20. Prommuak C., De-Eknamkul W., Shotipruk A. Extraction of Flavonoids and Carotenoids from Thai Silk Waste and Antioxidant Activity of Extracts, *Separation and Purification Technology*, 62 (2), 2008, 445-448. (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. พ.ศ. 2549)

Science Direct Top 25 Hottest Articles (July-September) 2008 Rank 8th

21. Watchararuji K., Goto M., Sasaki M., Shotipruk A. Value-Added Subcritical Water Hydrolysate from Rice Bran and Soybean Meal, *Bioresource Technology*, 99(14), 2008, 6207-6213. (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. พ.ศ. 2549)
22. Krichnavaruk S., Shotipruk A., Goto M., Pavasant, P Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with Vegetable Oil as Co-solvent *Bioresource Technology*, 99(13), 2008, 5556-5560. (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. พ.ศ. 2549)
23. Thana P., Machmudah S., Goto M., Sasaki M., Pavasant P., Shotipruk A. Response Surface Methodology to Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, *Bioresource Technology*, 99 (8), 2008, 3110-3115. (ทุนบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาฯ)
24. Kittikaiwan P., Powthongsook S., Pavasant P., Shotipruk A. Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using Chitosan for Astaxanthin Stability Enhancement. *Carbohydrate Polymers*, 70, 2007, 378-385. (IF-2007: 1.782) (ทุนบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาฯ)

Science Direct Top 25 Hottest Articles (October-December 2007) Rank 14th

25. Anekpankul T. Goto M., Sasaki M., Pavasant P., Shotipruk A. Extraction of Anti-Cancer Damnacathal from Roots of *Morinda citrifolia* by Subcritical Water, *Separation and Purification Technology*, 55 (3), 343-349. (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. พ.ศ. 2549)

Science Direct Top 25 Hottest Articles July-September 2007 Rank 17th

26. Sereewatthanawut, I., Prapintip S., Watchiraruji, K., Goto M., Sasaki M., Shotipruk A. Extraction of Protein and Amino Acids from Deoiled Rice Bran by Subcritical Water Hydrolysis, *Bioresource Technology* 99 (3), 555-561. (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. พ.ศ. 2549)
27. Hemwimol S., Pavasant P., Shotipruk A. Microwave-Assisted Extraction of Antioxidative Antraquinones from Roots of *Morinda citrifolia* *Separation and Purification Technology* 57, 44-50. (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. พ.ศ. 2547)

Science Direct Top 25 Hottest Articles (January-March 2007) Rank 11th

28. Pitipanapong J., Chitprasert S., Goto M., Jiratchariyakul W., Sasaki M., **Shotipruk A.** New Approach for Extraction of Charantin from *Momordica charantia* with Pressurized Liquid Extraction, Separation and Purification Technology 52 (3), pp. 416-422. (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. 2551)

Science Direct Top 25 Hottest Articles (October-December 2007), Rank 14th

29. Kaewpintong, K., **Shotipruk, A.**, Powtongsook, S., Pavasant, P. Photoautotrophic High-Density Cultivation of Vegetative Cells of *Haematococcus pluvialis* in Airlift Bioreactor, Bioresource Technology, 2007, 98, 288-295. (ทุนมหาบัณฑิต สกว.)
30. Lamoolphak W., Goto M., Sasaki M., Suphantharika M., Muangnapoh C., **Shotipruk A.**, Prommuak C., Hydrothermal Decomposition of Yeast Cells for Production of Proteins and Amino Acids, Journal of Hazardous Materials, 2006, B137, 1643-1648. (ทุน TJTTP-OECF)
31. Hemwimol S., Pavasant P., **Shotipruk A.** Ultrasound-Assisted Extraction of Anthraquinones from Roots of *Morinda citrifolia*, *Ultrasonics sonochemistry*, 2006, 13, 543-548. (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. พ.ศ. 2547)

Science Direct Top 25 Hottest Articles (July-September, 2006) Rank 11th

32. Powtongsook S., Kaewpintong K., Pavasant P., **Shotipruk A.** Effect of Superficial Gas Velocity on Growth of *Haematococcus pluvialis* in Airlift Bioreactor, Studies of surface science and catalysis, 2006, 159, 481-484. (ทุนมหาบัณฑิต สกว.)
33. Machmudah, S., **Shotipruk, A.**, Goto M., Sasaki M., Hirose T. Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using Supercritical CO₂ and Ethanol as Entrainer, Industrial&Engineering Chemistry Research, 2006, 45, 3652-3657. (ทุน TJTTP-OECF)
34. Pongnaravane B., Goto M., Sasaki M., Anekpankul T., Pavasant P., **Shotipruk A.** Extraction of Anthraquinones from Roots of *Morinda citrifolia* by Pressurized Hot Water: Antioxidant Activity of Extracts, Journal of Supercritical Fluids, 2006, 37, 390-396. (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. พ.ศ. 2547)

Science Direct Top 25 Hottest Articles (July-September, 2006) Rank 13th

35. **Shotipruk, A.**, Kiatsongserm J., Pavasant P., Motonobu G., Mitsuru S., Pressurized Hot Water Extraction of Anthraquinones from the Roots of *Morinda citrifolia*, *Biotechnology Progress*, 2004, 20, 1872-1875. (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. พ.ศ. 2547)

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อผู้ร่วมโครงการ
(ภาษาไทย) นายประเสริฐ ภูวสันต์ ตำแหน่งทนายวิชาการ รองศาสตราจารย์
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Prasert Pavasant
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100400739473
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชา วิศวกรรมเคมี คณะ/สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-2186870 โทรสาร 02-2186877 E-mail: prasert.p@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ตรี	วิศวกรรมเคมี	2535
University of London (Imperial)	โท	วิศวกรรมเคมี	2536
University of London (Imperial)	เอก	วิศวกรรมเคมี	2540

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Bioreactor Design, Biotechnology: Algal cultivation, Extraction of bioactive compounds,
Environmental engineering: Life cycle assessment and clean technology
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย
 - 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย (เฉพาะที่เป็นหัวหน้าโครงการและดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน)
 - 7.1.1 การพัฒนาระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกเพื่อการผลิตจุลสาหร่ายในระดับอุตสาหกรรมและการลดปัญหาโลกร้อน
 - 7.1.2 การสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายเพื่อใช้เป็นพลังงานทางเลือก
 - 7.1.3 การพัฒนากระบวนการผลิตตัวดูดซับจำพวก “โมเลกุลาร์ซีฟ” จากเถ้าลอยของโรงไฟฟ้าเพื่อใช้ประโยชน์ในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอลสำหรับกระบวนการผลิตแก๊สโซฮอล์

- 7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง) (เฉพาะที่เป็นหัวหน้าโครงการในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา)
- 7.2.1 การพัฒนาระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อใช้เป็นพลังงานทางเลือก ปี 2553 (รายงานวิจัย) ทุนวิจัยบริษัท ปตท จำกัด (มหาชน) (ได้ต้นแบบระบบเพาะเลี้ยงระดับกึ่งอุตสาหกรรม)
- 7.2.2 การประเมินวัฏจักรชีวิตของโรงไฟฟ้าพลังงานนิวเคลียร์สำหรับประเทศไทย ปี 2552 และ 2553 (รายงานวิจัย) ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (อยู่ในช่วงการเขียนบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ)
- 7.2.3 การพัฒนาระบบผลิตสารสี astaxanthin จากสาหร่ายเซลล์เดียว *Haematococcus pluvialis* โดยการผลิตมวลชีวภาพสาหร่ายในถังปฏิกรณ์และการกระตุ้นให้เกิดสารสีในบ่อกลางแจ้ง ปี 2553 ทุนวิจัยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (รายงานวิจัย) (ได้ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 2 เรื่อง และได้ต้นแบบระบบเพาะเลี้ยงที่ยั่งยืนฉบับสมบูรณ์แล้ว 1 เรื่อง)
- 7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยถูกลงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด
- 7.3.1 การพัฒนาระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกเพื่อการผลิตจุลสาหร่ายในระดับอุตสาหกรรมและการลดปัญหาโลกร้อน สนับสนุนโดยสภาวิจัยแห่งชาติ เป็นโครงการขยายผลการวิจัย (2V) ดำเนินการแล้ว 80% (กำหนดเสร็จสิ้นโครงการเดือนพฤศจิกายน 2553)
- 7.3.2 การสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายเพื่อใช้เป็นพลังงานทางเลือก สนับสนุนโดยบริษัท ปตท จำกัด (มหาชน) เพื่อสร้างต้นแบบระบบการสกัดสารสำคัญจากจุลสาหร่ายบางประเภท ดำเนินการแล้ว 80% (กำหนดเสร็จสิ้นโครงการเดือนธันวาคม 2553)
- 7.3.3 การพัฒนากระบวนการผลิตตัวดูดซับจำพวก “โมเลกุลาร์ซีฟ” จากเถ้าลอยของโรงไฟฟ้าเพื่อใช้ประโยชน์ในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอลสำหรับกระบวนการผลิตแก๊สโซฮอล์ สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยร่วมกับบริษัทอินเตอร์แปซิฟิกเปเปอร์จำกัด เพื่อสร้างต้นแบบระบบการผลิตซีโอไลต์จากเถ้าลอย ดำเนินการแล้ว 50% (กำหนดเสร็จสิ้นโครงการเดือน ตุลาคม 2554)

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์ 5 ปีย้อนหลัง)

1. Characterization of brewery wastewater with spectrofluorometry analysis *T. Janhom, S. Wattanachira, P. Pavasant, J. of Environmental Management 90(2), February 2009, 1184-1190.*
2. Reactivity of CeO_2 and $Ce - ZrO_2$ toward steam reforming of palm fatty acid distilled (PFAD) with co-fed oxygen and hydrogen” *Artiwan Shotipruk, Suttichai Assabumrungrat, Prasert*

- Pavasant, Navadol Laosiripojana*, Chemical Engineering Science, 64(3), February 2009, 459-466
3. Life Cycle Assessment of Bagasse Waste Management Options” *Worapon Kiatkittipong, Porntip Wongsuchoto, Prasert Pavasant*, Waste Management 29(5), May 2009, 1628–1633
 4. Used lubricating oil management options based on life cycle thinking” *Vorapot Kanokkantapong, Worapon Kiatkittipong, Bunyarit Panyapinyopol, Porntip Wongsuchoto and Prasert Pavasant*, Resources, Conservation and Recycling 53(5), March 2009, 294–299
 5. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*” *Kerati Issarapayup, Sorawit Powtongsook, and Prasert Pavasant*, Journal of Biotechnology 142(3-4), July 2009, 227–232
 6. Extraction and concentration of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by non-ionic surfactant solution” *K. Kiathevest, M.B. Goto, M.B. Sasaki, P. Pavasant, A. Shotipruk*, Separation and Purification Technology 66(1), April 2009, 111-117
 7. Quantitative measurement techniques for binary dye mixtures: a case study in an adsorption system” *K.Meevasana and P.Pavasant*, Science Asia 34(4), December 2008, 390-394
 8. Binary component sorption of Cu(II) and Pb(II) with activated carbon from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn bark” *Apipreeya Kongsuwan, Phussadee Patnukao, Prasert Pavasant*, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 15(4), 25 July 2009, Pages 465-470
 9. Zeolite formation from coal fly ash and its adsorption potential” *D. Ruen-ngam, D. Rungsuk, R. Apiratikul, P. Pavasant*, Journal of the Air and Waste Management Association, 59(10), 10 Oct 2009, Pages 1140-1147
 10. “Development of polyelectrolyte multilayer-coated electrospun cellulose acetate fiber mat as composite membranes” *Watadta Ritcharoen, Pitt Supaphol, Prasert Pavasant*, European Polymer Journal 44(12), December 2008, 3963-3968
 11. “Sorption of Cu²⁺, Cd²⁺, and Pb²⁺ using modified zeolite from coal fly ash” *R.Apiratikul and P.Pavasant*, Chemical Engineering Journal 144(2), October 2008, 245-258
 12. “Batch studies of adsorption of copper and lead on activated carbon from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn bark” *Phussadee Patnukao, Apipreeya Kongsuwan, Prasert Pavasant*, Journal of Environmental Sciences 20(9), 2008, 1028–1034
 13. “Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oils as co-solvent” *Sontaya Krichnavaruk, Artiwan Shotipruk, Motonobu Goto, Prasert Pavasant*, Bioresource Technology, 99(13) September 2008, 5556–5560

14. "Batch and column studies of biosorption of heavy metals by *Caulerpa lentillifera*" Ronbanchob Apiratikul and Prasert Pavasant, *Bioresource Technology*, 99(8) May 2008, 2766-2777
15. "When to buy new electrical/electronic products?" Worapon Kiatkittipong, Porntip Wongsuchoto, Khanidtha Meevasana and Prasert Pavasant, *J. of Clean Production* 16 (13), September 2008, 1339-1345
16. "Influence of salinity on bubble size distribution and gas-liquid mass transfer in airlift contactors" Duangkamol Ruen-ngam, Porntip Wongsuchoto, Apiradee Limpanuphap, Tawatchai Charinpanitkul, Prasert Pavasant, *Chemical Engineering Journal* 141 (1-3), July 2008, 222-232
17. "Influence of Particle Size and Salinity on Adsorption of basic dyes by agricultural waste: dried seagrape (*Caulerpa lentillifera*)", Pimol Punjongharn, Khanidtha Meevasana, Prasert Pavasant, *Journal of Environmental Sciences*, 20(6), 2008, 760-768
18. "Activated carbon from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn bark using phosphoric acid activation" Phussadee Patnukao and Prasert Pavasant, *Bioresource Technology* 99(17), November 2008, 8540-8543
19. "Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*" Praiya Thana, Siti Machmudah, Motonobu Goto, Mitsuru Sasaki, Prasert Pavasant and Artiwan Shotipruk, *Bioresource Technology* 99(8), May 2008, 3110-3115
20. "Quantitative measurement techniques for binary dye mixtures: a case study in an adsorption system", Khanidtha Meevasana and Prasert Pavasant, *ScienceAsia* 34(4) (Dec 2008): 390-394
21. "Photoautotrophic High-Density Cultivation of Vegetative Cells of *Haematococcus pluvialis* in Airlift Bioreactor" K. Kaewpintong, A. Shotipruk, S. Powtongsook and P. Pavasant, *Bioresource Technology* 98(2), January 2007, 288-298
22. "Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement" Prachanart Kittikaiwan, Sorawit Powthongsook, Prasert Pavasant and Artiwan Shotipruk, *Carbohydrate Polymers*, 70(4), 378-385
23. "Extraction of anti-cancer damnacanthol from roots of *Morinda citrifolia* by subcritical water", Thitiporn Anekpankul, Motonobu Goto, Mitsuru Sasaki, Prasert Pavasant and Artiwan Shotipruk, *Separation and Purification Technology*, 55 (3), 1 July 2007, 343-349
24. "High Performance Biosorbent (*Caulerpa lentillifera*) for Basic Dye Removal" K. Marungrueng, P. Pavasant, *Bioresource Technology*, 98 (8), May 2007, 1567-1572
25. "Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*", Surasak Hemwimon, Prasert Pavasant and Artiwan Shotipruk, *Separation and Purification Technology*, 54 (1), 44-50

26. "Enhanced productivity of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactors" *Sontaya Krichnavaruk, Sorawit Powtongsook, Prasert Pavasant*, *Bioresource Technology*, 98(11) (August) 2123-2130
27. "Hydrodynamics and mass transfer behavior in multiple draft tube airlift contactors" *Nalinee Tunthikul, Porntip Wongsuchoto, Prasert Pavasant*, *Korean J. Chem. Eng.*, 23 (6), November 2006, 881-887
28. "Biosorption of Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , and Zn^{2+} using dried marine green macroalga *Caulerpa*" *Prasert Pavasant, Ronbanchob Apiratikul, Vimonrat Sungkhum, Prateep Suthiparinyanont, Suraphong Wattanachira and Taha F. Marhaba*, *Bioresource Technology*, 97(18), December 2006, 2321-2329
29. "Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*" *Surasak Hemwimol, Prasert Pavasant and Artiwan Shotipruk*, *Ultrasonics Sonochemistry*, 13 (6) 543-548
30. "FTIR evaluation of functional groups involved in the formation of haloacetic acids during the chlorination of raw water" *Vorapot Kanokkantapong, Taha F. Marhaba, Bunyarit Panyapinyophol, Prasert Pavasant*, *Journal of Hazardous Materials*, 136 (2) August 2006, 188-196
31. "Trihalomethanes formation potential of shrimp farm effluents" *Taha F. Marhaba, Aweewan Mangmeechai, Chaichana Chaiwatpongsakorn and Prasert Pavasant*, *Journal of Hazardous Materials*, 136(2), August 2006, 151-163
32. "Characterization of haloacetic acid precursors in source water" *Vorapot Kanokkantapong, Taha F. Marhaba, Prasert Pavasant and Bunyarit Panyapinyophol*, *J. of Environmental Management*, 80(3), August 2006, 214-221
33. "Effect of superficial gas velocity on growth of the green microalga *Haematococcus pluvialis* in airlift photobioreactor" *S. Powtongsook, K. Kaewpintong, A. Shotipruk, and P. Pavasant*, *Studies in Surface Science and Catalysis*, 159, 481-484
34. "Interaction between Organic Species in the Formation of Haloacetic Acids following Disinfection" *Vorapot Kanokkantapong, Taha F. Marhaba, Suraphong Wattanachira, Bunyarit Panyapinyophol, Prasert Pavasant*, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 41(6) July 2006, 1233 – 1248
35. "Sorption isotherm model for binary component sorption of Copper, Cadmium, and Lead ions using dried green macroalga, *Caulerpa lentillifera*", *Ronbanchob Apiratikul, Prasert Pavasant*, *Chemical Engineering Journal* 119 (2-3) , 15 June 2006, 135-145

36. "Removal of Basic Dye (Astrazon Blue FGRL) Using Macroalga *Caulerpa lentillifera*", K. Marungrueng, P. Pavasant, J. of Environmental Management 78 (3), 268-274 (Feb 2006)
37. "Pretreatment of *Caulerpa lentillifera* with NaOH for biosorption of Cu, Cd, Pb and Zn", Prateep Suthiparinyanont, Suraphong Wattanachira, Taha F. Marhaba, and Prasert Pavasant, Thai Environmental Engineering Journal, 20 (1), 11-23.
38. "Extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by pressurized hot water: Antioxidant activity of extracts", Boonchai Pongnaravane, Motonobu Goto, Mitsuru Sasaki, Thitiporn Anekpankul, Prasert Pavasant and Artiwan Shotipruk, *The Journal of Supercritical Fluids*, 37 (3), 390-396 (May 2006).
39. "Nitrogen compounds removal in a packed bed external loop airlift bioreactor" S.Silapakul, S.Powtongsook, P.Pavasant, Korean J. Chem. Eng., 22(3), May 2005, 393-398
40. "Characterization of precursors to trihalomethanes formation in Bangkok source water", Bunyarit Panyapinyopol, Taha F. Marhaba, Vorapot Kanokkantapong and Prasert Pavasant, *Journal of Hazardous Materials*, 120 (1-3), 229-236, (April 11, 2005)
41. "Kinetics of trihalomethane formation from organic contaminants in raw water of bangkhen Water Treatment Plant" B.Panyapinyopol, V.Kanokkantapong, T.F.Marhaba, S.Wattanachira and P.Pavasant, J. of Environmental Science and Health, Part A, Vol. 40(8), pp. 1543-1555, 2005
42. "Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactor" S.Krichnavaruk, W.Loataweesup, S.Powtongsook and P. Pavasant, *Chemical Engineering Journal*, Vol 105 (3), January 2005, pp. 91-98
43. "Reduction of organic matter and trihalomethane formation potential in reclaimed water from treated industrial estate wastewater by coagulation" Charongpun Musikavong, Suraphong Wattanachira, Taha F. Marhaba, and Prasert Pavasant, J. of Hazardous Materials, B127(103), December 2005, pp 48-57
44. "Mathematical model for the prediction of gas-liquid mass transfer in airlift contactors" P.Pavasant, P.Wongsuchoto, and V.Suksoir, *AJChE*, Vol 5(1), pp. 65-75, 2005 (June 2005)