5.M73

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์จากสารสกัดจากเมล็ดขนุน

Separation of Prebiotics and Phenolic Compounds from Extract of Jackfruit Seeds

คณะนักวิจัย

หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

ผู้ร่วมโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเภท งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554-2555

บทคัดย่อ

การใช้ประโยชน์จากเมล็ดขนุนซึ่งเป็นกากเหลือทิ้งสำหรับโรงงานแปรรูปขนุนโดยการนำมาสกัดและทำให้บริสุทธิ์เพื่อให้ได้สารฟีนอลิกส์ และสารที่คาดว่าเป็นสารพรีไบโอติกส์ เป็นที่มาของงานวิจัยนี้ โดยงานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารพรีไบโอติกส์โดยวิธีการตกผลึก และแยกสารประกอบฟีนอลิกส์จากสารสกัดจากเมล็ดขนุนโดยวิธี Solid Phase Extraction ในการศึกษาการตกผลึกเป็นการนำสารสกัดจากเมล็ดขนุนมาตกผลึกในชุดตกผลึก 0.4 ลิตรเพื่อแยกสารที่คาดว่าเป็นพรีไบโอติกส์ ซึ่งพิจารณาจากน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ และการวิเคราะห์นำหนักโมเลกุลโดยวิธี Gel Permeation Chromatography และ Electrospray ionization-mass spectrometry โดยปัจจัยที่ศึกษา คือ ความเร็วรอบในการกวน (0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที) อุณหภูมิในการตกผลึก (55, 58, 61 และ 64 °C) อัตราการลดอุณหภูมิ (0.5, 1, 1.5 และ 2 °Cต่อนาที) โดยระยะเวลาในการตกผลึก 60 นาที จากการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกสารพรีไบโอติกส์ คือ ความเร็วรอบในการกวน 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการตกผลึก 58 °C อัตราการลดอุณหภูมิ 1 °C ต่อนาที และจากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลพบว่า ผลึกที่ได้เป็นสารโอลิโกแซคคาไรด์ ปัจจัยที่ได้จากการทดลองในชุดตกผลึก 0.4 ลิตรถูกนำไปออกแบบสร้างชุดตกผลึก 5 ลิตร และศึกษาประสิทธิภาพของชุดตกผลึก พบว่าให้ผลได้ 0.051 กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้งและความบริสุทธิ์สูงกว่าการตกผลึกด้วยชุดตกผลึก 0.4 ลิตร 2 เท่า

สำหรับแยกสารฟีนอลิกส์ (กรดแกลลิก) ให้บริสุทธิ์ได้ใช้สารสกัดจากเมล็ดขนุนและสารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่านการตกผลึกแล้วไปศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลลิก โดยศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการแยกกรดแกลลิกด้วย C18 Sep-Pak Cartridge ซึ่งใช้ที่ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของสารสกัดจากเมล็ดขนุน หลังจากนั้นใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการหาขนาดคอลัมน์ที่อัตราส่วนระหว่างความสูง C18 ต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง (L/D) ที่ 2.2:1, 15.3:1 และ 40.5:1 อัตราการไหลของสารสกัดจากเมล็ดขนุนผ่านคอลัมน์ที่อัตราการไหลของสาร 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อนาที จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ที่ความเข้มข้นสารสกัดจากเมล็ดขนุน 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร คอลัมน์ที่ใช้ต้องมีขนาด L/D เป็น 15.3 และอัตราการไหลของสารสกัดที่ 3 มิลลิลิตรต่อนาที โดยให้ค่าร้อยละผลได้ของกรดแกลลิกเป็น 90.22 และจากการศึกษาการนำ C18 Sep-Pak Cartridge กลับมาใช้ใหม่ พบว่าไม่มีความคุ้มค่าในการนำกลับมาใช้ใหม่ และส่วนสุดท้ายของงานวิจัยเป็นการศึกษาลำดับการแยกสาร พบว่าหากต้องการแยกทั้งสารแกลลิกและสารพรีไบโอติกส์ สามารถทำได้โดยแยกแกลลิกออกก่อน

Abstract

The usage of jackfruit seed from jackfruit industry by extraction and purification of phenolic compounds and prebiotics is the motivation of this work. The objective of this work is to determine the optimal condition for purifying prebiotics extracted from jackfruit seed by crystallization and the optimal condition for purifying phenolics (Gallic acid) by solid phase extraction. In crystallization part, firstly, 0.4 L crystallization tank was used to investigate the optimal condition by considering non reducing sugar and molecular weight analyzed by Gel Permeation Chromatography and Electrospray ionization-mass spectrometry methods. The studies parameter were speed of mixing (0, 50, 100 and 150 rpm), crystallize temperature (55, 58, 61 and 64 ^{o}C) and cooling rate (0.5, 1, 1.5 and 2 ^{o}C/min) with 60 minutes for crystallize time. The results shows that the optimal conditions is at 100 rpm with the crystallize temperature of 58 ^{o}C and cooling rate of 1 ^{o}C/min. After the optimal condition was found, this condition was used to design and construct 5 L- crystallization tank.. The results of this scale up shows that it provides yield of 0.051 $g_{crystal}/g_{dry\ extract}$ which is twice higher than yield from the operation in 0.4 L crystallization tank.

.............In addition, for phenolic (Gallic acid) purification from jackfruit extract and jackfruit extract which was already crystallized, the concentrations of the extract feeding to C18 Sep-Pak Cartridge were varied from 3 to 5 %wt./v. After the optimal concentration was obtained, the ratio between the height (L) of the C18 and column diameter (D) and the flow rate were studied. L/D were varied at 2.2:1, 15.3:1 and 40.5:1 and flow rates were varied from 2-5 mL/min. This part found that the optimum concentration of 4%wt/v with L/D of 15.3 and flow rate of 3 mL/min gives Gallic acid yield of 90.22%. Additional, it is uneconomic to reused C18. And the last, the order of separation was shown, if both phenolic and prebiotics were need, the purification of Gallic acid should be done first.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2554-2555 และผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาความเป็นเลิศวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับการใช้สถานที่ และครุภัณฑ์หลักในการทำวิจัย ขอบคุณสถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ คณะอุตสาหกรรมการเกษตร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการวิเคราะห์ ขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์ ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย การสกัดและแยกพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์จากเมล็ดขนุน และการผลิตเอทานอลจากกากเมล็ดขนุน

คำนำ

รายงานฉบับนี้เป็นผลการดำเนินงานวิจัยเรื่องการแยกพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์จากสารสกัดจากเมล็ดขนุน โดยได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2554-2555 ซึ่งผู้วิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารและออกแบบสร้างเครื่องมือ พร้อมทั้งระบุปัญหาที่เกิดขึ้นในการทำวิจัยและการแก้ไข ทางผู้วิจัยหวังว่ารายงานฉบับนี้สามารถใช้เป็นแหล่งอ้างอิงแก่ผู้ที่สนใจได้

กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์

สารบัญ

บทคัดย่อ i
Abstract ii
กิตติกรรมประกาศ iii
คำนำ iv
รายการตาราง vii
รายการภาพประกอบ viii
1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2
2. ระเบียบวิธีวิจัย 3
2.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ 3
2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 3
2.3 วิธีการดำเนินการวิจัย 4
2.3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกสารพรีไบโอติกส์พร้อมออกแบบและสร้างเครื่องตกผลึกขนาดความจุ 5 ลิตร 4
2.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารฟีนอลิกส์โดยใช้เทคนิค SPE 6
2.3.3 การทำให้กรดแกลลิกมีความบริสุทธิ์ขึ้น 8
2.3.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของขั้นตอนในการแยกสารพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์ 9
2.4 วิธีการวิเคราะห์ 9
2.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugars) 9
2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugars) 10
2.4.3 การหาปริมาณน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (Non-Reducing Sugars) 10
2.4.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) 10
2.4.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) 11
2.4.6 การวิเคราะห์หาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกส์โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 11
2.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูล 11
3. ผลและอภิปรายผล 12
3.1 ผลการออกแบบชุดอุปกรณ์ในการทดลอง 12
3.1.1 ผลการออกแบบชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร 12
3.1.2 ผล calibration curve สำหรับหาอัตราการลดอุณหภูมิในชุดตกผลึกขนาด5 ลิตร 14
3.1.3 ผลการออกแบบชุดคอลัมน์แยกสารประกอบฟีนอลิกส์ 14
3.2 ผลการแยกสารพรีไบโอติกส์โดยชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตร 15

3.2.1 ผลการวิเคราะห์อุณหภูมิในการตกผลึกของสารพรีไบโอติกส์ 15
3.2.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตร 16
3.2.3 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของผลึกด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) 19
3.2.4 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดหลังตกผลึกโดยใช้วิธี Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) 21
3.2.5 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตกผลึกขนาดเล็กกับชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร.21
3.2.6 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลสารสกัดหลังตกผลึกด้วยชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร ด้วยวิธี Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) 22
3.3 ผลการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์ 23
3.3.1 ผลการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์โดยใช้ C18 Sep-Pak Cartridges 24
3.3.2 ผลการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์โดยใช้คอลัมน์ C18 column 26
3.3.2.2 ผลการศึกษาชนิดของ C18 column 27
3.4 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของขั้นตอนในการแยกสารพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์ 28
4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 30
4.1 สรุปผลการวิจัย 30
4.2 ข้อเสนอแนะ 30
บรรณานุกรม 32
ภาคผนวก 35
Poster 35
Proceeding 36

รายการตาราง

ตาราง 3.1 ผลของความเร็วรอบในการกวนเบื้องต้นต่อผลได้ผลึกและน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ 16

ตาราง 3.2 ผลของอุณหภูมิในการตกผลึกต่อผลได้ผลึกและน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ 17

ตาราง 3.3 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อผลได้ผลึกและน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ 18

ตาราง 3.4 ผลของความเร็วรอบต่อผลได้ผลึกและน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ 19

ตาราง 3.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตร กับชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร 22

ตาราง 3.6 ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแกลลิกและร้อยละผลได้กรดแกลลิก โดยศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร 25

ตาราง 3.7 ค่าเฉลี่ยของปริมาณเนื้อแกลลิก (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) 26

ตาราง 3.8 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์และปริมาณกรดแกลลิกจากขั้นตอนในการแยกสารพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์ 29

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ 2.1 ชุดตกผลึกสารพรีไบโอติกส์ขนาด 0.4 ลิตร 5

ภาพประกอบ 2.2 อุปกรณ์แยกสารประกอบฟีนอลิกส์ชนิด C18 Sep-Pak Cartridges 6

ภาพประกอบ 2.3 กระบวนการกำจัดสิ่งเจือปน (น้ำตาล กรดอินทรีย์ และสิ่งเจือปนอื่น ๆ) ออกจากสารสกัดโดยใช้ C18 Sep-Pak Cartridges เพื่อให้ได้สารประกอบฟีนอลิกส์บริสุทธิ์ 6

ภาพประกอบ 2.4 ชุดคอลัมน์แยกสารประกอบฟีนอลิกส์ 7

ภาพประกอบ 3.1 แผนภาพถังตกผลึกขนาด 5 ลิตร 12

ภาพประกอบ 3.2 ชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร (a) และส่วนประกอบต่างๆ (b) แผงระบายความร้อน (c) ช่องใส่สารและปล่อยสารเคมี (d) ตัวให้ความร้อนภายในถังตกผลึก และ (e) ชุดควบคุม 12-13

ภาพประกอบ 3.3 Calibration curve สำหรับหาอัตราการลดอุณหภูมิในชุดตกผลึก 5 ลิตร 14

ภาพประกอบ 3.4 ชุดคอลัมน์แยกสารประกอบฟีนอลิกส์ 15

ภาพประกอบ 3.5 ผลการวิเคราะห์อุณหภูมิตกผลึก โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter 15

ภาพประกอบ 3.6 โครมาโตแกรมของสารสกัดเมล็ดขนุนโดยเทคนิควิเคราะห์ GPC 20

ภาพประกอบ 3.7 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดขนุนหลังการผลึกตัวอย่างที่ได้โดยเทคนิค GPC 20

ภาพประกอบ 3.8 โครมาโตแกรมของผลึกตัวอย่างที่ได้โดยเทคนิค GPC 21

ภาพประกอบ 3.9 โครมาโตแกรมของสารสกัดหลังตกผลึกตัวอย่างจากชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตรโดยเทคนิควิเคราะห์ ESI-MS 21

ภาพประกอบ 3.10 โครมาโตแกรมของสารสกัดหลังตกผลึกตัวอย่างจากชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตรโดยเทคนิควิเคราะห์ ESI-MS 22

ภาพประกอบ 3.11 โครมาโทรแกรมของสารประกอบฟีนอลิกส์ของสารสกัดเมล็ดขนุน (a) ก่อนผ่าน C18 Sep-Pak Cartridge และ (b) หลังจากผ่าน C18 Sep-Pak Cartridge 23

ภาพประกอบ 3.12 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละผลได้ของกรดแกลลิกกับความเข้มข้นสารสกัดจากเมล็ดขนุน 25

ภาพประกอบ 3.13 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละผลได้กรดแกลลิกกับอัตราการไหลสารสกัดจากเมล็ดขนุน 27

ภาพประกอบ 3.14 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละผลได้กรดแกลลิกกับคอลัมน์ขนาดต่างๆ ที่อัตราการไหลสารสกัดจากเมล็ดขนุน 3 มิลลิลิตรต่อนาที 28

1 บทนำ

1.1 ความเป็นมา

ตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของประเทศไทย ฉบับที่ 6 ระบุว่าประเทศไทยจะต้องเปลี่ยนแผนจากประเทศเกษตรกรรมเป็นประเทศอุตสาหกรรมจึงจะสามารถอยู่รอดและมีการพัฒนาประเทศได้ แต่เนื่องจากสภาพภูมิประเทศและดินฟ้าอากาศของประเทศไทยเหมาะในการเพาะปลูกจึงมีผลผลิตทางการเกษตรและของเหลือทิ้งทางการเกษตรมากมาย การพัฒนาอุตสาหกรรมจึงได้มุ่งเน้นไปทางด้านอุตสาหกรรมเกษตร อุตสาหกรรมอาหารเพื่อแปรรูปวัสดุเกษตรให้เป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมและส่งออกเป็นการเพิ่มมูลค่าให้สูงขึ้น นอกจากนี้ยังมีการนำเทคโนโลยีที่เหมาะสมมาใช้ในการแยกสารอินทรีย์จากของเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เป็นสารอินทรีย์ที่มีคุณค่าสูงขึ้น (บุญส่ง คงเจริญ และคณะ, 2553) สำหรับอุตสาหกรรมอาหารได้ให้ความสนใจกับความคิดเรื่อง “ฟังก์ชันแนลฟูดส์ (Functional foods)”เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะฟังก์ชันแนลฟูดส์ที่ได้จากการสกัดส่วนต่างๆ ของพืช ตัวอย่างฟังก์ชันแนลฟูดส์ที่เป็นที่สนใจและมีการพัฒนาในการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้แก่ พรีไบโอติกส์ (Prebiotics) (ความก้าวหน้าของอาหารสุขภาพเพื่อระบบการย่อยอาหารที่ดี, 2008) และสารประกอบฟีนอลิกส์

พรีไบโอติกส์ คือคาร์โบไฮเดรตที่มีกลุ่มโมโนแซคคาไรด์ตั้งแต่ 3 หน่วยขึ้นไป ได้แก่ โอลิโกแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ พรีไบโอติกส์ในเชิงพาณิชย์ที่สำคัญประกอบด้วยฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์และอินนูลิน พรีไบโอติกส์เป็นสารอาหารที่ไม่ถูกย่อยหรือดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแต่เป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียโปรไบโอติกส์หรือจุลินทรีย์ที่ดีที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ โปรไบโอติกส์มีประโยชน์ คือ ช่วยป้องกันและลดอาการท้องเสียที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งลำไส้และช่วยลดคอเลสเตอรอลชนิด Low Density Lipoprotein (LDL) พรีไบโอติกส์บางชนิดสามารถจับกับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้อย่างจำเพาะเจาะจง เช่น เชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella*) และ อีโคไล (*E. coli*) บางชนิดอาจจะไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ เช่น เชื้อไบฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacteria*) และ แลคโตบาซิลไล (*Lactobacilli*) ทำให้ลำไส้เกิดความสมดุล และช่วยเพิ่มการนำสารอาหารไปใช้ด้วยซึ่ง เป็นการทำให้ร่างกายมีภูมิต้านทานตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังทำให้ท้องไม่ผูก(http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2, 2008, http://learners.in.th/blog/, 2008, Grajek et al, 2005)

สารประกอบฟีนอลิกส์เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านปฏิกิริยาที่เกี่ยวกับออกซิเจน ไนโตรเจน และกระบวนการที่เกี่ยวกับเมตาบอลิซึมหรือการบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกาย รวมทั้งสามารถต่อต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุแห่งความชราโรคอ้วน โรคหัวใจ ภูมิแพ้ มะเร็ง ฯลฯ สารประกอบฟีนอลิกส์พบอยู่ในผักและผลไม้ โดยพบว่าส่วนของผักผลไม้ที่รับประทานได้มีปริมาณฟีนอลิกส์น้อยกว่าส่วนที่รับประทานไม่ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการสกัดสารฟีนอลิกส์ออกจากส่วนที่รับประทานไม่ได้ของผักและผลไม้ก่อนนำเอาสารที่สกัดได้นั้นไปใช้เป็นส่วนประกอบของยา อาหารเสริม เครื่องสำอางและเวชภัณฑ์อื่นๆ

ขนุนเป็นพืชที่ปลูกมากในประเทศไทยรวมทั้งมีอุตสาหกรรมการแปรรูปขนุนทำให้มีเมล็ดเหลือทิ้งจำนวนมาก และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าในเมล็ดขนุนมีสารประเภทพรีไบโอติกส์ สารประกอบฟีนอลิกส์ อีกด้วย (สุพจน์ นวลละออง, 2552 และ สุพรรณษา ไพศาล, 2554)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะแยกสารพรีไบโอติกส์และสารฟีนอลิกส์ให้บริสุทธิ์ขึ้นเพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป เนื่องจากพรีไบโอติกส์เป็นน้ำตาลเชิงซ้อนการแยกสารดังกล่าวสามารถทำได้โดยวิธีการตกผลึกออกจากสารสกัดชนิดอื่นๆ รวมทั้งเทคนิคการตกผลึกสามารถนำมาขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ ส่วนการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์สามารถทำได้โดยการใช้หลักการดูดซับซึ่งวิธีที่ศึกษาคือการใช้เทคนิกการแยกสารแบบ solid phase extraction (SPE) โดยจะบรรจุของผงดูดซับสำหรับสกัดสารออกจากสารละลายภายในคอลัมน์ เมื่อสารถูกสกัดออกแล้วจะเป็นขั้นตอนของการชะสารสกัดออกจากของแข็งดังกล่าว

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนากระบวนการแยกพรีไบโอติกส์จากสารสกัดจากเมล็ดขนุนด้วยการตกผลึก
2. เพื่อพัฒนากระบวนการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์จากสารสกัดจากเมล็ดขนุนด้วยเทคนิค Solid Phase Extraction

2. ระเบียบวิธีวิจัย

การดำเนินการวิจัยจะแบ่งเป็น 2 ส่วนหลัก คือส่วนแรกเป็นส่วนของและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกสารพรีไบโอติกส์พร้อมออกแบบและสร้างเครื่องตกผลึกขนาดความจุ 5 ลิตร โดยพิจารณาผลจากน้ำหนักโมเลกุลน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ (DP: 3-10) และปริมาณน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ซึ่งคาดว่าจะเป็นสารพรีไบโอติกส์ ปัจจัยที่ทำการศึกษาประกอบด้วยช่วงอุณหภูมิในการตกผลึกที่เหมาะสม ความเร็วรอบในการกวนสารเพื่อตกผลึก อัตราการลดอุณหภูมิสำหรับการตกผลึก

ส่วนที่สองเป็นส่วนของการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารฟีนอลิกส์โดยใช้เทคนิค Solid phase extraction (SPE) โดยพิจารณาผลของความเข้มข้นของสารสกัด อัตราการป้อนสารสกัดเข้าสู่คอลัมน์แยกและสัดส่วนของคอลัมน์แยกที่มีต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลิก

2.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้

ในการวิจัยทั้งสองส่วนได้สารสกัดจากเมล็ดขนุนพันธุ์ทองประเสริฐ โดยใช้ตัวทำลายเป็นน้ำผสมกับเอทานอล (95%) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และใช้เมล็ดขนุนบด (ขนาด 1.0-2.0 mm) 1 กิโลกรัม ต่อตัวทำละลาย 20 ลิตร ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปกรองการเมล็ดขนุนออกก่อนนำไประเหยตัวทำละลาย จนได้สารสกัดที่มีความหนืดในช่วง 15-16 centistokes และหากนำสารสกัดไปอบแห้งพบว่ามีน้ำหนักของสารสกัดแห้งคิดเป็น 6 กรัมต่อกิโลกรัมของเมล็ดขนุนบด

ส่วนสารเคมีแลอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัยมีดังนี้

สารเคมีที่ใช้

(1) น้ำกลั่น

(2) 95% Ethanol (Commercial Grade, Sigma-Aldrich)

(3) Phenol (Laboratory Grade, Fisher Scientific)

(4) 98% Conc. Sulfuric Acid (Laboratory Grade, Merck)

(5) Sodium Sulfite (Laboratory Grade, Merck)

(6) Sodium Hydroxide (Laboratory Grade, Merck)

(7) Sodium Potassium Tartrate (Laboratory Grade, Merck)

(8) Glucose (Laboratory Grade, Ajex Finechem)

(9) Folin Ciocalteu's Phenol Reagent (Laboratory Grade, R&M Chemicals)

(10) Sodium Carbonate Anhydrous (Laboratory Grade, R&M Chemicals)

(11) 98% Gallic Acid (HPLC Grade, Sigma)

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

(1) เครื่องปั่น (Blender) ยี่ห้อ Moulinex รุ่น Delicio ใช้สำหรับบดละเอียดวัตถุดิบ

(2) เครื่องชั่งละเอียด

(3) ตู้อบลมร้อน

(4) เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum Filter) ยี่ห้อ Sibata รุ่น WJ-20 ใช้สำหรับแยกกากวัตถุดิบกับสารสกัด

(5) เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator): ยี่ห้อ Buchi Rotavapor รุ่น V-700 ใช้สำหรับระเหยตัวทำละลาย

(6) เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze Dryer): ยี่ห้อ Dura รุ่น Flexi-Dry μP ใช้สำหรับทำแห้งสารสกัดจากเมล็ดขนุน

(7) กระบอกตวง ใช้สำหรับวัดปริมาตรตัวทำละลาย

(8) C18 Sep-Pak Cartridges ขนาดบรรจุ 300 มิลลิกรัม: Verti-Pak™

(9) C18 ขนาดบรรจุ 100 กรัม: Verti-Pak™

(10)ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 2-20 และ 20-200 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Labmate ใช้สำหรับปิเปตสารตัวอย่างและสารที่ใช้ในการวิเคราะห์

(11)มัลติเชลเนลปิเปต (Multichannel Pipette) ขนาด 2-20 และ 20-200 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Multimate ใช้สำหรับปิเปตสารตัวอย่างและสารที่ใช้ในการวิเคราะห์

(12) 96 Well Microtiter Plate: รุ่น U-Shapeใช้สำหรับใส่สารที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Microtiter plate reader

(13) Microtiter Plate Reader: ยี่ห้อ Biotex รุ่น Power Wave XS เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดค่าความดูดกลืนแสงของสาร ในช่วง 200-999 นาโนเมตร สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ตามต้องการ

สำหรับรายละเอียดของแต่ละการดำเนินงานเป็นดังนี้

2.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกสารพรีไบโอติกส์พร้อมออกแบบและสร้างเครื่องตกผลึกขนาดความจุ 5 ลิตร

ในเบื้องต้นได้ทำการตรวจสอบอุณหภูมิในการตกผลึกโดยนำผลึกที่ได้จากการตกผลึกที่อุณหภูมิ 66-77 °C (สายอุสาห์ อินเอก และอาทิตยา ลิ้มเจริญวงศ์. 2552) มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC) ได้ทำการทดลองในชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยถังทำด้วยสแตนเลส 2 ชั้น ชั้นในมีขนาดความจุ 400 มิลลิลิตร เป็นบริเวณสำหรับการตกผลึก ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนรอบตัวถังสำหรับช่วยในการควบคุมอุณหภูมิ ด้านบนขอบถังและด้านล่างขอบถังมีรูที่ต่อกับท่อให้น้ำหล่อเย็นไหลเวียนรอบถังตกผลึก มีตัวให้ความร้อนแบบแท่งขนาด 130 วัตต์ มีชุดมอเตอร์ใบพัดกวนแบบ anchor นอกจากนั้นยังมีชุดควบคุมอุณหภูมิอัตราการไหลของน้ำหล่อเย็น ดังแสดงภาพประกอบ 2.1 โดยทำการทดลองดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาความเร็วรอบที่ใช้ในการกวนเบื้องต้น (ดำเนินการวิจัยตามลำดับขั้นตอน ตัวแปรที่เหลือกำหนดให้คงที่ก่อน)

(1) อุ่นสารสกัดตัวอย่าง 400 มิลลิลิตร ให้มีอุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายนิวคลีไอเดิม

(2) ลดอุณหภูมิด้วยอัตรา 1 °C /min จนอุณหภูมิตกผลึกลดลงถึง 61 °C ขณะที่ลดอุณหภูมิต้องมีการกวนตลอดเวลาด้วยความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที

(3) เมื่ออุณหภูมิลดลงถึง 61 °C ให้รักษาอุณหภูมินี้ไว้ 60 นาที

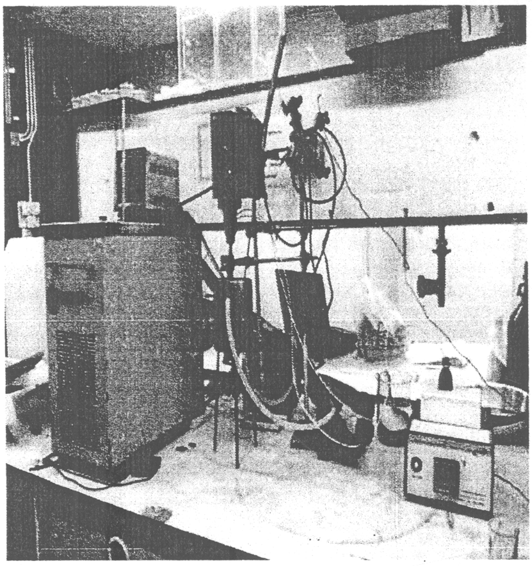
(4) นำสารสกัดตัวอย่างมากรองแยกผลึกออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ เป็นเวลา 5 นาที

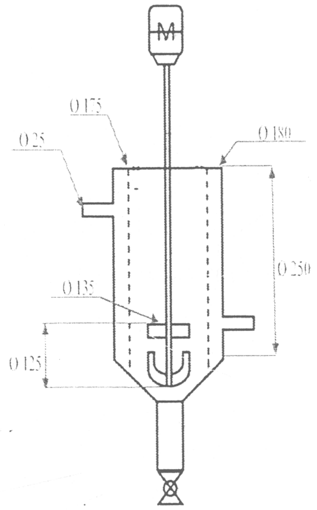
(5) ชั่งน้ำหนักผลึกเพื่อหาผลได้การตกผลึก แล้วหาค่าปริมาณน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์ซึ่งคาดว่าเป็นสารพรีไบโอติกส์

(6) ทำซ้ำข้อ 1-5 โดยเปลี่ยนความเร็วรอบเป็น 0, 50, 100, 150 รอบต่อนาที ตามลำดับ

(7) วิเคราะห์ผล

จากขั้นตอนที่ 1 จะได้ความเร็วรอบที่เหมาะสมเบื้องต้น เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป





ภาพประกอบ 2.1 ชุดตกผลึกสารพรีไบโอติกส์ขนาด 0.4 ลิตร

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกผลึก

ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 1 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิตกผลึกในข้อ 2 เป็น 55, 58, 61 และ 64 °C ตามลำดับ และใช้ความเร็วรอบที่ได้จากขั้นตอนที่ 1

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม

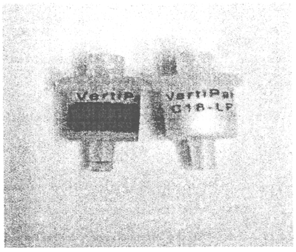
ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 1 แต่เปลี่ยนอัตราการลดลงของอุณหภูมิเป็น 0.5, 1, 1.5 และ 2 °C/min โดยใช้ความเร็วรอบที่ได้ในข้อ 1 อุณหภูมิในการตกผลึกที่ได้จากขั้นตอนที่ 2

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นแล้ว นำสารสกัดและสารสกัดหลังการตกผลึกที่ได้ตรวจสอบด้วยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) และ Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) เพื่อยืนยันผลโมเลกุลที่มีในผลึก หลังจากนั้นนำสภาวะดังกล่าวไปใช้ในการออกแบบและสร้างเครื่องตกผลึกขนาดความจุ 5 ลิตร และหาสภาวะที่เหมาะสมอีกครั้งหนึ่งสำหรับการดำเนินการตกผลึกในเครื่องตกผลึกขนาด 5 ลิตร

2.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารฟีนอลิกส์โดยใช้เทคนิค SPE

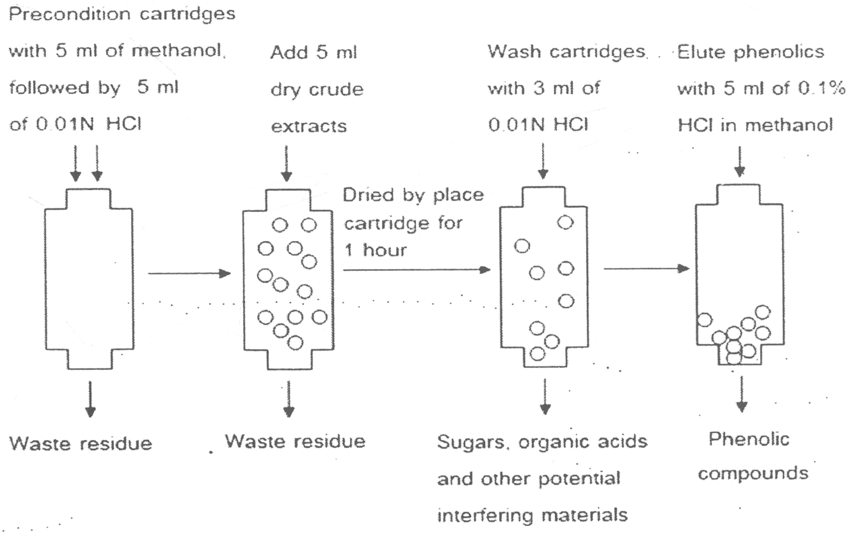
การทดลองที่ 1 หาความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมในการแยก

โดยใช้คอลัมน์พลาสติกขนาดเล็กที่บรรจุ C18 เป็นตัวดูดซับสารประกอบฟีนอลิกส์ (C18 Sep-Pak Cartridges: Verti-Pak™ Cartridge 300 มิลลิกรัม, Vertical Chromatography Associates Co., Ltd, Jatujak, Bangkok, Thailand) ดังภาพประกอบ 2.2



ภาพประกอบ 2.2 อุปกรณ์แยกสารประกอบฟีนอลิกส์ชนิด C18 Sep-Pak Cartridges

สารสกัดตัวอย่างเป็นสารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่านการระเหยแล้วและนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็งจากนั้นทำการศึกษาการสกัดโดยแสดงขั้นตอนในการดำเนินการทดลองดังภาพประกอบ 2.3



ภาพประกอบ 2.3 กระบวนการกำจัดสิ่งเจือปน (น้ำตาล กรดอินทรีย์ และสิ่งเจือปนอื่น ๆ) ออกจากสารสกัดโดยใช้ C18 Sep-Pak Cartridges เพื่อให้ได้สารประกอบฟีนอลิกส์บริสุทธิ์ (Kim *et al.*, 2002)

ขั้นตอนในการหาความเข้มข้นเบื้องต้นของสารสกัดจากเมล็ดขนุน ก่อนผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges มีดังนี้

(1) การเตรียมเฟสของแข็ง ด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร และ 0.01 N ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในน้ำ 5 มิลลิลิตร

(2) ผ่านสารสกัดจากเมล็ดขนุน โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรในน้ำจำนวน 5 มิลลิลิตร และตั้ง Sep-Pak ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ ตัวดูดซับภายใน Sep-Pak แห้งตัว

(3) ผ่าน 0.01 N ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในน้ำ 3 มิลลิลิตร เพื่อล้างสิ่งเจือปน ซึ่งได้แก่น้ำตาล กรดอินทรีย์ และสารประกอบอื่น ๆ ออกจากสารสกัด

(4) ชะสารประกอบฟีนอลิกส์ออกด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ของสารสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในเมทานอล 5 มิลลิลิตร

(5) หาค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์

(6) ทำการทดลองซ้ำข้อ 1-5 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ

(7) วิเคราะห์ผล

การทดลองที่ 2 หาความเข้มข้นเบื้องต้นของสารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่านการตกผลึกแล้วก่อนผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges

(1) การเตรียมเฟสของแข็งด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร และ 0.01 N ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในน้ำ 5 มิลลิลิตร

(2) ผ่านสารสกัดจากเมล็ดขนุน เตรียมที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรในน้ำจำนวน 5 มิลลิลิตร และตั้ง Sep-Pak ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวดูดซับภายในแห้งตัว

(3) ผ่าน 0.01 N ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในน้ำ 3 มิลลิลิตร เพื่อล้างสิ่งเจือปน ซึ่งได้แก่น้ำตาล กรดอินทรีย์ และสารประกอบอื่น ๆ ออกจากสารสกัด

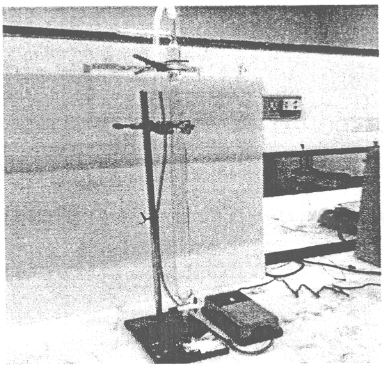
(4) ชะสารประกอบฟีนอลิกส์ออกด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ของสารสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในเมทานอล 5 มิลลิลิตร

(5) หาค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์

(6) ทำการทดลองซ้ำข้อ 1-5 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ

7) วิเคราะห์ผล

การทดลองที่ 3 หาอัตราการไหลที่เหมาะสมในการทำให้ได้สารฟีนอลิกส์บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แก้วขนาด 200 มิลลิลิตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร และความสูงคอลัมน์ 500 มิลลิเมตร ดังภาพประกอบที่ 2.4



ภาพประกอบ 2.4 ชุดคอลัมน์แยกสารประกอบฟีนอลิกส์

ใช้ C18 ปริมาณ 12 กรัม บรรจุในคอลัมน์สูง 55 มิลลิเมตร เป็นตัวจับสารฟีนอลิกส์ โดยขั้นตอนนี้จะใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 เพื่อหาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารสกัดจากเมล็ดขนุนผ่านคอลัมน์ โดยทำการศึกษาที่อัตราการไหล 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อนาที และดำเนินการทดลองดังนี้

(1) เตรียมเฟสของแข็งด้วยเมทานอล 200 มิลลิลิตร และ 0.01 N ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในน้ำ 200 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที

(2) ผ่านสารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรในน้ำ 200 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหลของสาร 2 มิลลิลิตรต่อนาที และตั้งคอลัมน์ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวดูดซับภายในคอลัมน์แห้งตัว

(3) ผ่าน 0.01 N ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในน้ำ 120 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหล 3 มิลลิลิตรต่อนาทีเพื่อล้างสิ่งเจือปน ซึ่งได้แก่น้ำตาล กรดอินทรีย์ และสารประกอบอื่น ๆ ออกจากสารสกัด

(4) ชะสารประกอบฟีนอลิกส์ออกด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ของสารสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในเมทานอล 200 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที

(5) หาค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์

(6) ทำการทดลองซ้ำข้อ 1-5 แต่เปลี่ยนอัตราการไหลของสารสกัดผ่านคอลัมน์เป็น 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อนาที

(7) วิเคราะห์ผล

การทดลองที่ 4 ศึกษาการแยกและทำให้ได้สารฟีนอลิกส์บริสุทธิ์โดยศึกษาในคอลัมน์แก้วขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร

ใช้คอลัมน์แก้ว ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยมีสัดส่วนของความสูง (L) ของ C18 ในคอลัมน์ต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง (D) เป็น 40.5 ซึ่งใช้ C18 ปริมาณ 12 กรัม บรรจุในคอลัมน์จนได้ความสูง 405 มิลลิเมตร และคอลัมน์แก้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร (L/D เป็น 15.3) ใช้ C18 ปริมาณ 12 กรัม บรรจุอยู่ในคอลัมน์สูง 230 มิลลิเมตร เป็นตัวจับสารฟีนอลิกส์ ในการทดลองนี้ ทำตามขั้นตอนในการทดลองที่ 3 แต่ใช้ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราการไหลของสารสกัดจากเมล็ดขนุนผ่านคอลัมน์ที่ 3 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งทำการศึกษาในคอลัมน์ 2 ขนาดดังที่กล่าวมาแล้ว

การทดลองที่ 5 ศึกษาการนำ C18 กลับมาใช้ซ้ำในคอลัมน์แก้วขนาด 50 มิลลิลิตร

ดำเนินการทดลองตามการทดลองที่ 4 แต่นำ C18 ที่ผ่านการใช้และล้างแล้วมาใช้ใหม่

2.3.3 การทำให้กรดแกลลิกมีความบริสุทธิ์ขึ้น

เนื่องจากในการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์โดยใช้ C18 ในขั้นตอนของการชะสารประกอบฟีนอลิกส์ออกมาจะมีเจือปนของกรดอยู่บ้าง ซึ่งต้องมีการสะเทินด้วยเบสเพื่อที่จะกำจัดกรดออกไป โดยการเตรียมสารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่านการแยกกรดแกลลิกโดยใช้ C18 sep-pak cartridge ที่สภาวะที่ดีที่สุด ใช้สารสกัดการทดลองละ 1 มิลลิลิตร โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 สารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่าน C18 Sep-Pak Cartrigdes ไประเหย MeOH ออกด้วยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปสะเทินกับเบส (0.1%w/v NaOH) จำนวน 1 มิลลิลิตร

การทดลองที่ 2 สารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่านการ C18 Sep-Pak Cartridges จากนั้นนำไปประเหย MeOH ออกด้วยการอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสะเทินกับเบส (0.1%w/v NaOH) จำนวน 1 มิลลิลิตร

การทดลองที่ 3 สารสกัดที่ผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges จำนวน 1 มิลลิลิตร ไปผสมกับ 0.1%w/v NaOH จำนวน 1 มิลลิลิตร

การทดลองที่ 1-3 เมื่อทำการทดลองเสร็จสิ้น จะนำสารตัวอย่างไปวัดค่าหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลลิก จากนั้นนำผลการทดลองที่ 2-4 มาเปรียบเทียบกับ สารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges เพื่อดูความบริสุทธิ์ของสารประกอบฟีนอลิกส์

2.3.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของขั้นตอนในการแยกสารพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์

เป็นการศึกษาลำดับขั้นตอนระหว่างการแยกพรีไบโอติกส์ออกก่อน กับการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์ออกก่อน โดยมีการดำเนินการคือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาการตกผลึกสารพรีไบโอติกส์ก่อนการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์

ทดลองโดยตกผลึกสารพรีไบโอติกส์ด้วยชุดตกผลึกขนาดเล็ก (0.4 มิลลิลิตร) ในสภาวะที่เหมาะสม และนำตัวอย่างผลึกที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลอง จากนั้นนำสารสกัดจากเมล็ดขนุนหลังจากผ่านการตกผลึกไปทำการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์โดยใช้ C18 column ขนาด L/D เป็น 15.3 โดยเตรียมความเข้มข้นสารสกัดหลังผ่านการตกผลึกที่ 4 %w/v และอัตราการไหลสารสกัดผ่านคอลัมน์ที่ 3 มิลลิลิตรต่อนาที และนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง

การทดลองที่ 2 ศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์ก่อนการตกผลึกสารพรีไบโอติกส์

ใช้สภาวะที่ดีที่สุดจากการทดลองแยกสารประกอบฟีนอลิกส์มาทำการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์ออกจากสารสกัดจากเมล็ดขนุนพร้อมนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ เมื่อแยกสารประกอบฟีนอลิกส์เสร็จสิ้น นำสารที่เหลือทิ้งจากการแยกมาทำการตกผลึกสารพรีไบโอติกส์ โดยใช้สภาวะที่ดีที่สุดในการตกผลึกโดยชุดทดลองขนาดเล็ก (0.4 มิลลิลิตร) จากนั้นนำตัวอย่างผลึกที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลอง

2.4 วิธีการวิเคราะห์

2.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugars)

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugars) ซึ่งได้แก่ โมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ โอลิโกแซคคาไรด์ และโพลีแซคคาไรด์ ตามวิธี Modified Phenol Sulfuric Method (Dubois *et al.*, 1956) โดยเตรียมตัวอย่างผลึกที่ความเข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร 29 ไมโครลิตร ใส่ใน ไมโครเพลท 96 หลุม เติมสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ ฟีนอล ปริมาตร 29 ไมโครลิตร เขย่าไมโครเพลท เบาๆ เพื่อให้สารผสมกันประมาณ 30 วินาที เติม Conc. Sulfuric Acid ปริมาตร 143 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าเบาๆ เพื่อให้สารผสมกันประมาณ 30 วินาที แล้วปิดไมโครเพลท ด้วยฟิล์มใสและปิดทับด้วยถุงซิปล็อค นำไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโน

เมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานและคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างผลึกในหน่วยมิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก จากนั้นนำผลที่ได้ไปคูณกับ yield ของผลึก ก็จะได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัด

2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugars)

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugars) ซึ่งได้แก่น้ำตาลในกลุ่มโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ตามวิธี Modified Dinitrosalicylic Acid Method (Miller, 1959) โดยเตรียมตัวอย่างผลึกความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม เติมสารละลาย Dinitrosalicylic Acid ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าไมโครเพลทเบาๆ เพื่อให้สารผสมกันประมาณ 30 วินาที ปิดไมโครเพลท ด้วยฟิล์มใสและปิดทับด้วยถุงซิปล็อค นำไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องและนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานและคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างผลึกในหน่วยมิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัด

2.4.3 การหาปริมาณน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (Non-Reducing Sugars)

คำนวณหาปริมาณน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (Non-Reducing Sugars) ซึ่งได้แก่น้ำตาลในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นกลุ่มของพรีไบโอติกส์ โดยนำปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหักลบด้วยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ดังสมการที่ 1

$$\textit{Non-Reducing Sugars} = \textit{Total Sugars} - \textit{Reducing Sugars} \qquad (1)$$

2.4.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC)

เจลเพอร์มีเอชันโครมาโตกราฟี (Gel Permeation Chromatography) เป็นเทคนิคศึกษาการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์สังเคราะห์หรือพอลิเมอร์ชีวภาพ ซึ่งเป็นวิธีการแยกโดยอาศัยขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ การแยกเกิดขึ้นในคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุเม็ดของแข็งที่มีรูพรุนหรือเจล (gel) โดยทั่วไปมักใช้เม็ดพอลิสไตรีน ที่ผ่านการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุล และมีรูพรุนหรือแก้วที่เป็นรูพรุน โดยตัวอย่างของสารละลายพอลิเมอร์เจือจางจะถูกใส่ลงไปในคอลัมน์ และชะด้วยกระแสของตัวทำละลาย โมเลกุลพอลิเมอร์จะผ่านเม็ดรูพรุนและสามารถแพร่เข้าไปในรู ซึ่งลักษณะการแพร่นี้ขึ้นกับขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์และขนาดของรูพรุน โมเลกุลขนาดต่างๆ จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับขนาด โมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนได้จะผ่านคอลัมน์ออกมาก่อนเป็นอันดับแรก ส่วนโมเลกุลขนาดเล็กจะติดอยู่ในรูพรุนของเจลและใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นานกว่าและถูกชะออกมาภายหลัง

2.4.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS)

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของผลึกพรีไบโอติกส์ โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ด้วยวิธี Mass spectrometry ที่ใช้ตรวจวัด (detector) ชนิด Electrospray ionization (Hernandez *et al.*, 2009)

2.4.6 การวิเคราะห์หาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกส์โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

สารสกัดเมล็ดจากขนุนก่อนและหลังจากการทำให้ได้สารประกอบฟีนอลิกส์บริสุทธิ์ด้วย C18 Sep-Pak ถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลลิก (Gallic Acid) ด้วยเครื่อง Agilent 1100 Series HPLC (Vichapong *et al.*, 2010) ใช้เทคนิค Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography โดยใช้ Zorbax Eclipse XDB C8 Column (4.6 x 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน) และ Variable Wavelength Detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ใช้ Mobile Phase คือ อะซิโทไนไตรท์ : 1 เปอร์เซ็นของกรดอะซิติก

เวลาเริ่มต้นใช้ 7 เปอร์เซ็นต์อะซิโทไนไตรท์
เวลา 0-2 นาที ใช้ 15 เปอร์เซ็นต์อะซิโทไนไตรท์
เวลา 2-5 นาที ใช้ 35 เปอร์เซ็นต์อะซิโทไนไตรท์
เวลา (5-7 นาที) ใช้ 55 เปอร์เซ็นต์อะซีโทไนไตรท์

อัตราเร็วที่ใช้คือ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C ใช้ตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ดขนุนก่อนและหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย C18 Sep-Pak สารมาตรฐานแต่ละชนิดเตรียมที่ความเข้มข้น 30, 50, 70, 90, 100, 150, 200 และ 250 ppm ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

2.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

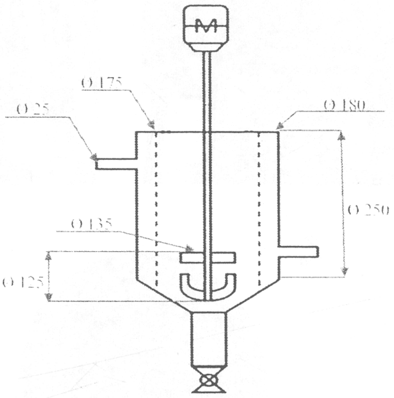
ในการวิเคราะห์ทางสถิติได้ใช้โปรแกรม One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test

3. ผลและอภิปรายผล

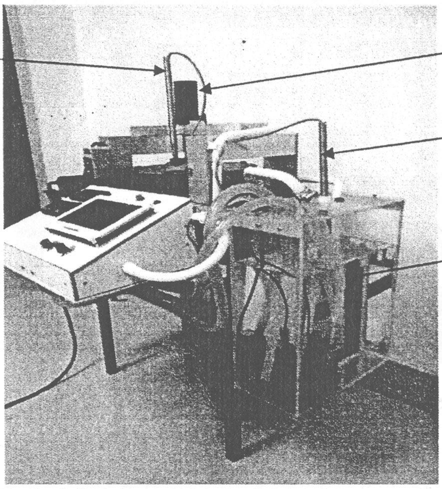
3.1 ผลการออกแบบชุดอุปกรณ์ในการทดลอง

3.1.1 ผลการออกแบบชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร

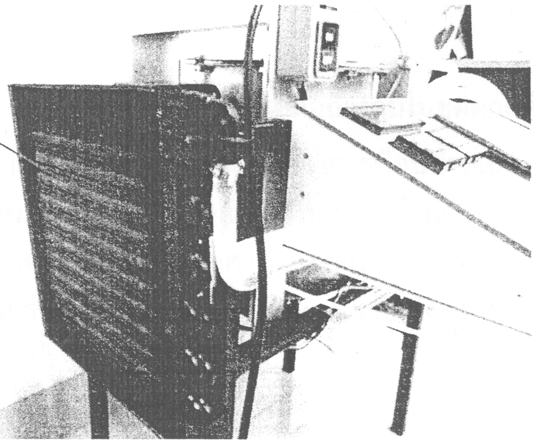
ชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร ที่จัดสร้างเป็นถังสองชั้นทำจากสแตนเลส ขนาดความจุ 5 ลิตร ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนรอบตัวถังสำหรับการลดอุณหภูมิ ส่วนชั้นในคือบริเวณสำหรับการตกผลึก ด้านบนขอบถังและด้านล่างขอบถังมีรูที่ต่อกับท่อให้น้ำหล่อเย็นไหลเวียนรอบถังตกผลึก ออกแบบโดยทำการปรับสัดส่วนขนาดความสูงของถัง (L) และเส้นผ่านศูนย์กลาง (D) เพิ่มเป็น 2.5 เท่าของชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตร โดยส่วนประกอบของเครื่องตกผลึกพรีไบโอติกส์ขนาด 5 ลิตร ประกอบด้วย ถังตกผลึก ชุดระบายความร้อน ถังน้ำหล่อเย็น ชุดมอเตอร์ใบพัดกวนแบบ anchor ชุดควบคุมระบบทั้งหมด ดังแสดงภาพประกอบ 3.1 และ 3.2

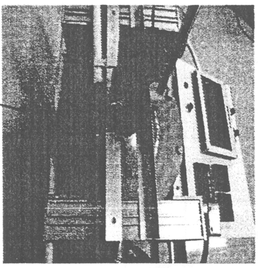


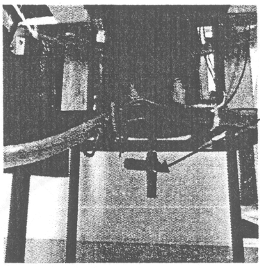
ภาพประกอบ 3.1 แผนภาพถังตกผลึกขนาด 5 ลิตร

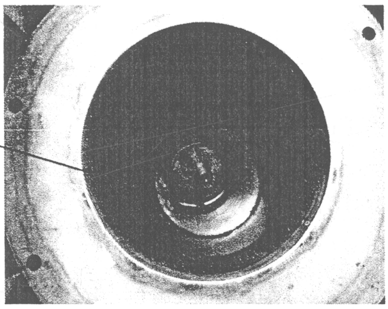


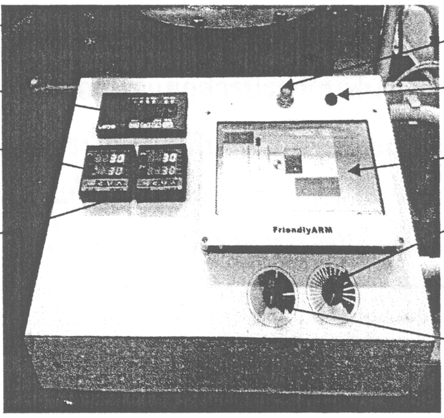
a ชุดตกผลึก
ขนาด 5 ลิตร







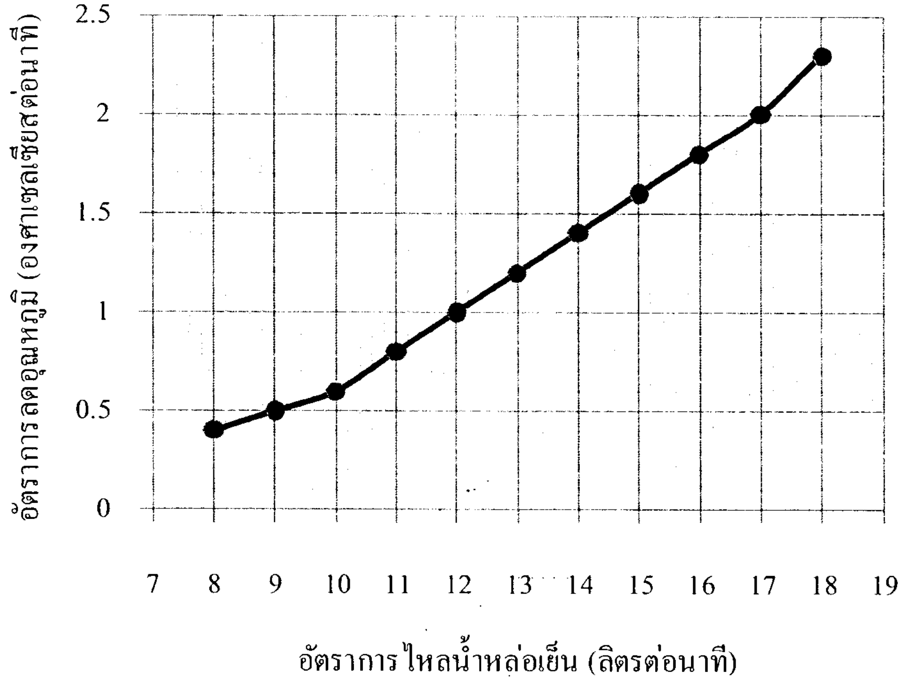




ภาพประกอบ 3.2 ชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร (a) และส่วนประกอบต่างๆ (b) แผงระบายความร้อน (c) ช่องใส่สารและปล่อยสารเคมี (d) ตัวให้ความร้อนภายในถังตกผลึก และ (e) ชุดควบคุม

3.1.2 ผล calibration curve สำหรับหาอัตราการลดอุณหภูมิในชุดตกผลึกขนาด5 ลิตร

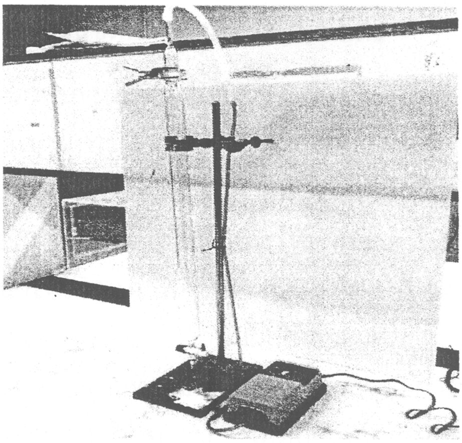
ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการอุณหภูมิกับอัตราการป้อนน้ำหล่อเย็น หาได้จากปรับเปลี่ยนอัตราการไหลของน้ำหล่อเย็นที่ค่าต่างๆ และเวลาที่ใช้ในการทำให้สารสกัดจากเมล็ดขนุนที่อุณหภูมิเริ่มต้น 85 องศาเซลเซียส ลดลงเหลือ 35 องศาเซลเซียสเพื่อนำมาคำนวณหาอัตราการลดลงของอุณหภูมิ ซึ่งข้อมูลความสัมพันธ์ที่ได้นำไปทำ calibration curve ดังภาพประกอบ 3.3



ภาพประกอบ 3.3 calibration curve สำหรับหาอัตราการลดอุณหภูมิในชุดตกผลึก 5 ลิตร

3.1.3 ผลการออกแบบชุดคอลัมน์แยกสารประกอบฟีนอลิกส์

ชุดคอลัมน์แยกสารประกอบฟีนอลิกส์ ส่วนประกอบของชุดคอลัมน์แยกสารประกอบฟีนอลิกส์ประกอบด้วยคอลัมน์แก้วขนาด 200 มิลลิลิตร โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ 25 มิลลิเมตร ความสูงคอลัมน์ 500 มิลลิเมตร และอัตราส่วนความสูง C18 ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (L/D เป็น 2.2) วาล์วควบคุมอัตราการไหลของอากาศ และปั๊มลม แสดงดังภาพประกอบ 3.4

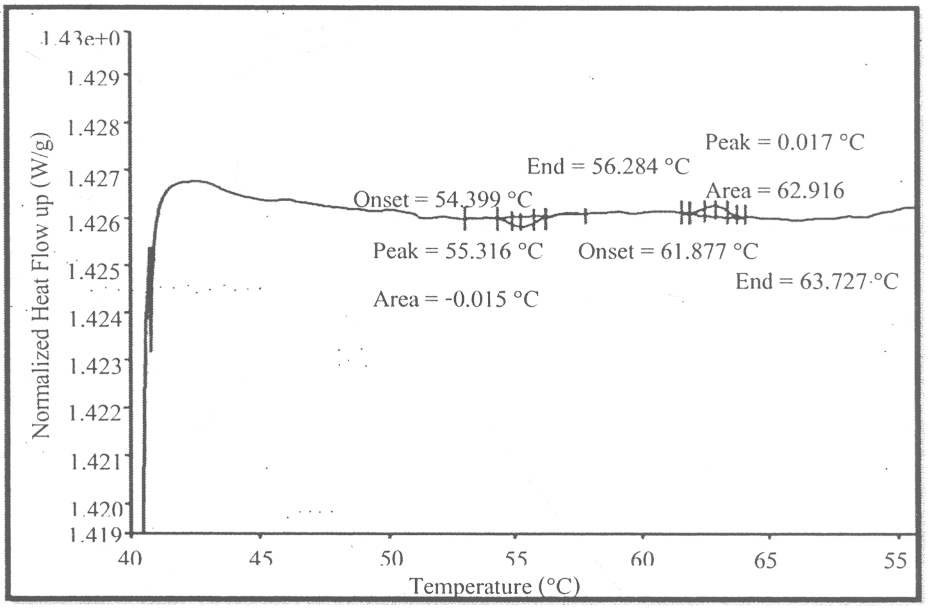


ภาพประกอบ 3.4 ชุดคอลัมน์แยกสารประกอบฟีนอลิกส์

3.2 ผลการแยกสารพรีไบโอติกส์โดยชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตร

3.2.1 ผลการวิเคราะห์อุณหภูมิในการตกผลึกของสารพรีไบโอติกส์

วิเคราะห์อุณหภูมิตกผลึกของสารสกัดโดยใช้เครื่องมือ Differential Scanning Calorimeter (DSC) พบว่าจุดหลอมเหลวและจุดตกผลึกของสารคือ 64 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับแสดงผลดังภาพประกอบ 3.5 ดังนั้นจึงทำการศึกษาการตกผลึกในช่วงอุณหภูมิ 55-64 องศาเซลเซียส



ภาพประกอบ 3.5 ผลการวิเคราะห์อุณหภูมิตกผลึก โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter

3.2.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตร

3.2.2.1 ผลการหาความเร็วรอบในการกวนเบื้องต้น

จากตาราง 3.1 โดยการใช้โปรแกรม One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test ทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าผลได้ของผลึกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้นจนถึง 100 รอบต่อนาที และให้ค่าสูงสุดที่ 100 รอบต่อนาที ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการกวนจะช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดสภาพการเกิดนิวเคลียสได้ จึงทำให้การเติบโตของผลึกเกิดขึ้นได้ดี (Berger, 1977 and Taylor, 1973) จากนั้นผลได้ของผลึกลดลงเมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้นเป็น 150 รอบต่อนาที เนื่องจากความเร็วรอบที่เพิ่มขึ้นทำให้มีการกวนอย่างรุนแรงจนทำให้นิวคลีไอที่กำลังจัดเรียงตัวในโครงผลึกหลุดออกมาทำให้สภาพการเกิดนิวเคลียสหยุดลง (Berger, 1977 and Taylor, 1973) ส่วนการทดลองที่ไม่มีการกวนทำให้ได้ผลได้น้อยเนื่องมาจากนิวคลีไอมีการกระจายตัวได้น้อยไม่ทั่วทั้งบริเวณที่ตกผลึก จึงทำให้การเติบโตของผลึกเกิดขึ้นได้ไม่ดี และเมื่อพิจารณาความบริสุทธิ์ของพรีไบโอติกส์โดยดูจากปริมาณน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์ พบว่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้น จนถึง 100 รอบต่อนาที ความบริสุทธิ์มีค่ามากสุดแล้วลดลงเมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้นจาก 100 ถึง 150 รอบต่อนาที ทั้งนี้เนื่องจากความเร็วรอบมีผลอย่างมากกับผลได้ของผลึกพรีไบโอติกส์ แต่ไม่มีผลต่อน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ ดังนั้นความเร็วรอบเบื้องต้นที่เหมาะสม คือ 100 รอบต่อนาที ซึ่งทำให้ผลได้ของผลึกพรีไบโอติกส์มีค่า 0.026 กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้ง และปริมาณน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์เฉลี่ย 12.51±0.48 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัดแห้ง

ตาราง 3.1 ผลของความเร็วรอบในการกวนเบื้องต้นต่อผลได้ผลึกและน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	0	50	100	150
ผลได้ผลึก (กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	0.019[a]	0.024[c]	0.026[d]	0.023[b]
น้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	863.83±1.04[a]	864.44±2.40[a]	865.00±1.92[a]	865.06±1.92[a]
น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	385.40±1.83[a]	386.8±2.62[a]	386.37±1.91[a]	387.97±1.47[a]
น้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	478.43±1.11[a]	477.64±1.09[a]	478.63±1.84[a]	477.09±1.68[a]
น้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคส ต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	9.21±0.21[a]	11.81±0.24[c]	12.51±0.48[d]	11.05±0.04[b]

ค่าดังปรากฏ คือ ค่าเฉลี่ย (n=3) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

อักษรยกที่เหมือนกันในแต่ละแถว หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

3.2.2.2 ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกผลึก

เมื่อพิจารณาผลได้ของผลึกที่คาดว่าเป็นสารพรีไบโอติกส์จากตาราง 3.2 พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อผลได้ของผลึกเพียงเล็กน้อยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่อุณหภูมิในการตกผลึก 55 องศาเซลเซียสมีผลได้ต่ำ เนื่องด้วยองศาการเกิดสภาพเย็นยวดยิ่งมากเกินไปจะทำให้สารละลายมีความหนืดสูงมีผลทำให้อัตราการเติบโตผลึกลดลง (Berger, 1977) และหากใช้องศาการเกิดสภาพเย็นยวดยิ่งปานกลางจะเกิดนิวคลีไอ เล็กน้อยจึงส่งผลให้ผลได้ก็จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้น แต่เมื่อพิจารณาความบริสุทธิ์ของสารที่คาดว่าเป็นพรีไบโอติกส์ จากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย แต่น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่อเนื่อง ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นตัวทำละลายสามารถละลายน้ำตาลได้ดีกว่ากว่าที่อุณหภูมิต่ำ (Treybal, 1980) ดังนั้นการใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจทำให้ละลายน้ำตาลโมเลกุลเล็กออกมาในปริมาณที่มากด้วย ดังจะเห็นได้จากตาราง 3-2 ว่า ผลึกมีน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กน้อยลง เนื่องจากน้ำตาลส่วนหนึ่งได้ละลายกลับสู่ mother liquor

ฉะนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกผลึก คือ 58 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ผลได้ของผลึกที่ 0.026 กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้ง และปริมาณน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์อยู่ที่ 12.73±0.68 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัดแห้ง

ตาราง 3.2 ผลของอุณหภูมิในการตกผลึกต่อผลได้ผลึกและน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์

อุณหภูมิในการตกผลึก (องศาเซลเซียส)	55	58	61	64
ผลได้ผลึก (กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	0.025^{ab}	0.026^{c}	0.025^{bc}	0.024^{a}
น้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	881.88 ± 0.58^{ab}	873.83 ± 1.58^{c}	860.83 ± 1.52^{bc}	846.61 ± 3.10^{a}
น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	383.63 ± 1.19^{d}	379.63 ± 0.66^{c}	377.46 ± 1.45^{b}	372.40 ± 1.31^{a}
น้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	498.25 ± 1.31^{c}	494.2 ± 1.99^{b}	483.36 ± 2.90^{b}	474.21 ± 4.35^{a}
น้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคส ต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	12.50 ± 0.26^{bc}	12.73 ± 0.68^{c}	12.33 ± 0.74^{b}	11.8 ± 0.02^{a}

ค่าดังปรากฏ คือ ค่าเฉลี่ย (n=3) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

อักษรยกที่เหมือนกันในแต่ละแถว หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

5.2.2.3 ผลการหาอัตราการลดอุณหภูมิในการตกผลึก

เมื่อพิจารณาผลได้ของผลึกจากตาราง 3.3 พบว่า ผลได้เพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการลดอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 1 ถึง 1.5 องศาเซลเซียสต่อนาที ทั้งนี้

เนื่องจากตัวถูกละลายที่หลอมอยู่มีเวลามากพอที่จะทำให้เกิดผลึกได้มากในแต่ละช่วงของการเปลี่ยนแปลง ในทางกลับกันผลได้กลับลดลงอย่างมาก เมื่ออัตราการลดอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 2 องศาเซลเซียสต่อนาที เนื่องจากเมื่อลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิสูงๆจะมีการตกผลึกในช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่าแต่มีช่วงเวลาในการตกผลึกที่สั้นกว่า จึงทำให้ตัวถูกละลายที่หลอมอยู่มีเวลาน้อยเกินไปที่จะเกิดการตกผลึกออกมา (Giulietti *et al.*, 2007) แสดงว่าหากต้องการผลได้ของผลึกสูงสุดสามารถใช้อัตราการลดอุณหภูมิในช่วง 1-1.5 องศาเซลเซียสต่อนาที และเมื่อพิจารณาความบริสุทธิ์ของพรีไบโอติกส์ซึ่งดูจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ จากทุกจุดที่ทำการทดลองไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ให้ค่าปริมาณน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์สูงสุดที่อัตราการลดอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียสต่อนาที และต่ำสุดเมื่ออัตราการลดอุณหภูมิเป็น 1.5-2.0 องศาเซลเซียสต่อนาที ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากอัตราการลดอุณหภูมิมีผลอย่างมากกับผลได้ของผลึก จึงทำให้ความบริสุทธิ์ของพรีไบโอติกส์โดยดูจากน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเหมือนกับค่าผลได้ของผลึกพรีไบโอติกส์ด้วย

ดังนั้นอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 1 องศาเซลเซียสต่อนาที เพราะทำให้ได้ผลได้ของผลึกพรีไบโอติกส์และความบริสุทธิ์ของพรีไบโอติกส์มีค่าสูงสุด โดยมีผลได้อยู่ที่ 0.027 กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้ง และปริมาณน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์อยู่ที่ 13.74±0.01 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัดแห้ง

ตาราง 3.3 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อผลได้ผลึกและน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์

อัตราการลดอุณหภูมิ (องศาเซลเซียสต่อนาที)	0.5	1	1.5	2
ผลได้ผลึก (กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	0.024[b]	0.027[d]	0.026[c]	0.022[a]
น้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	875.55±0.67[a]	875.55±0.82[a]	875.38±0.42[a]	876.44±0.91[a]
น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	378.03±0.25[b]	374.53±0.41[a]	375.73±2.34[ab]	376.2±0.26[ab]
น้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	497.52±0.86[a]	501.03±0.45[b]	499.65±2.23[ab]	500.24±0.72[b]
น้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคส ต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	12.18±0.18[b]	13.74±0.01[d]	12.98±0.13[c]	10.88±0.10[a]

ค่าดังปรากฏ คือ ค่าเฉลี่ย (n=3) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

อักษรยกที่เหมือนกันในแต่ละแถว หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

3.2.2.4 ผลการหาความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมในการตกผลึก

การทดลองนี้ เป็นการทำซ้ำการทดลองขั้นตอนที่ 1 ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่าง ผลได้กับความเร็วรอบและปริมาณน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์กับความเร็วรอบที่ได้คล้ายกับผลที่ได้จากการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 เมื่อพิจารณาผลได้ของผลึกพรีไบโอติกส์จากตาราง 3.4 พบว่า ความเร็วรอบเพิ่มขึ้น ผลได้ก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงจุดสูงสุดที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที จากนั้นผลได้ลดลงอย่างช้าๆ เมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้นจาก 100-150 รอบต่อนาที และเมื่อพิจารณาความบริสุทธิ์ของพรีไบโอติกส์ พบว่าเมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้น ความบริสุทธิ์ก็เพิ่มขึ้นจนถึง 100 รอบต่อนาที ความบริสุทธิ์ของผลึกเริ่มคงที่ และจากนั้นเมื่อความเร็วรอบเพิ่มเป็น 150 รอบต่อนาที ความบริสุทธิ์ของผลึกจะลดลง นั่นคือความเร็วรอบที่เหมาะสมควรจะเป็น 100 รอบต่อนาที เพราะให้ผลได้ของผลึกพรีไบโอติกส์อยู่ที่ 0.028 กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้ง และความบริสุทธิ์ของพรีไบโอติกส์สูงคือ มีปริมาณน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์อยู่ที่ 14.05±0.09 มิลลิกรัมกลูโคส/กรัมสารสกัดแห้ง ซึ่งเป็นค่าผลได้และความบริสุทธิ์ที่ให้ค่ามากที่สุดที่ได้ทำการศึกษาในการทดลองนี้

ตาราง 3.4 ผลของความเร็วรอบต่อผลได้ผลึกและน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	0	50	100	150
ผลได้ผลึก (กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	0.022[a]	0.026[c]	0.028[d]	0.024[b]
น้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	874.44±1.25[a]	874.45±1.41[a]	875.55±0.67[a]	874.40±1.08[a]
น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	374.73±0.83[a]	373.23±1.79[a]	373.2±0.65[a]	373.56±1.19[a]
น้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	499.71±1.35[a]	501.21±3.16[a]	502.35±0.81[a]	500.87±1.54[a]
น้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคส ต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	11.26±0.74[a]	13.19±0.17[c]	14.05±0.09[d]	12.14±0.15[b]

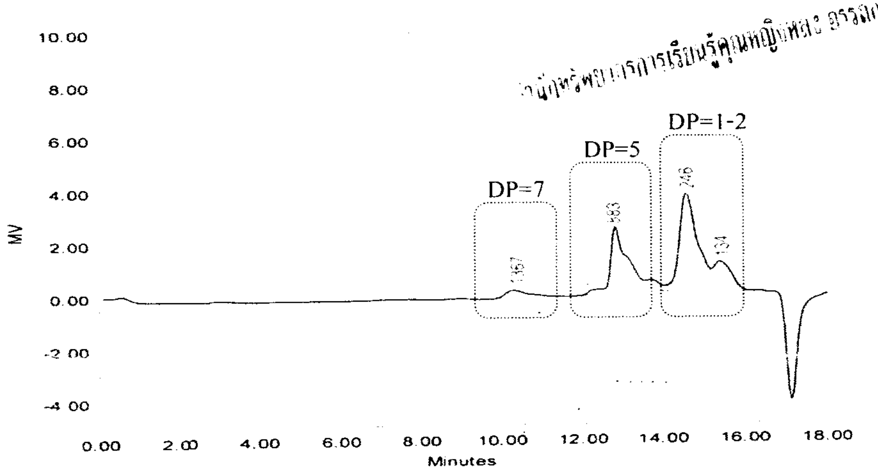
ค่าดังปรากฏ คือ ค่าเฉลี่ย (n=3) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

อักษรยกที่เหมือนกันในแต่ละแถว หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

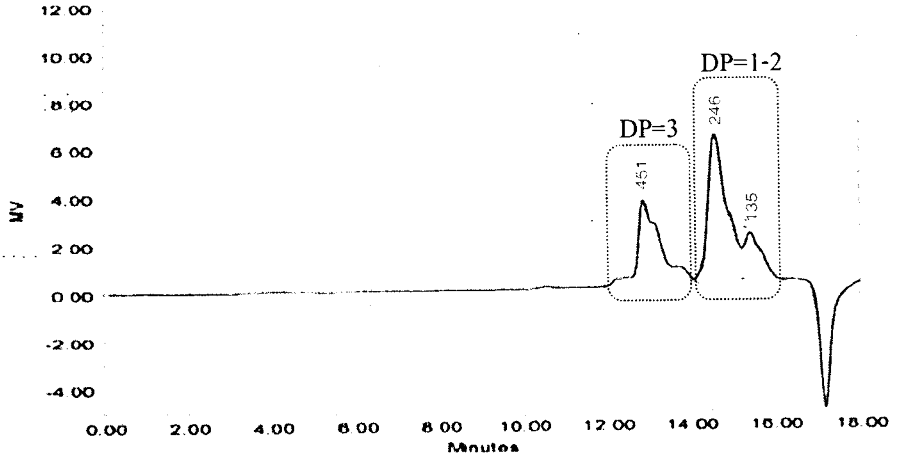
3.2.3 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของผลึกด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC)

น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดจากเมล็ดขนุนจากการสกัดจากเมล็ดขนุนด้วย 50% เอทานอล ก่อนผ่านการตกผลึก พบว่าสารสกัดที่ได้ มีน้ำตาลน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 246 ดาลตัน (มีค่า DP เท่ากับ 1-2) 883 ดาลตัน (มีค่า DP เท่ากับ 5) และมีน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ 1367 ดาลตัน ซึ่งมีค่า DP เท่ากับ 7 ดังแสดงในภาพประกอบ 3.6 แต่หลังจากการตกผลึกและนำสารสกัดที่ผ่านการตกผลึกแล้วมาวิเคราะห์พบว่ามีค่า DP 1-3 ดังภาพประกอบ 3.7 และเมื่อตรวจสอบผลึกพบว่ามี น้ำหนักโมเลกุลปานกลางประมาณ 1367 ดาลตัน หรือมีค่า DP เท่ากับ 7 ดัง

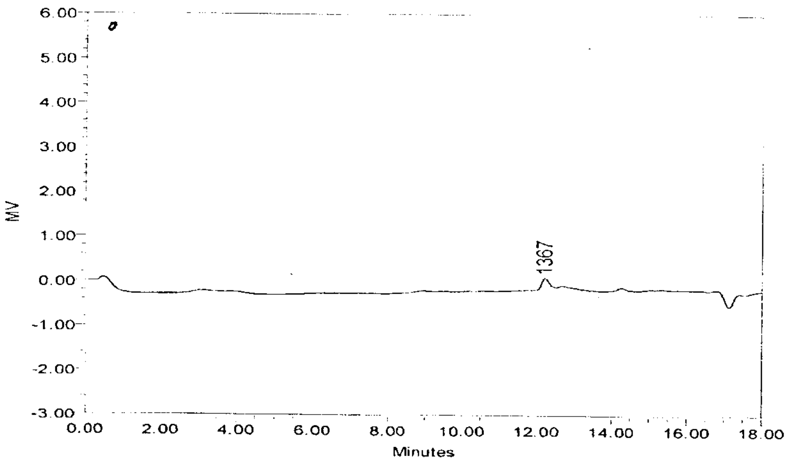
ภาพประกอบ 3.8แสดงว่าส่วนของน้ำหนักโมเลกุลที่มี DP 5 อาจเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลลดลง (DP 3) ในขั้นตอนการกวนให้ความร้อนระหว่างการตกผลึก ค่า DP ของผลึกอยู่ในช่วงของโอลิโกแซคคาไรด์ โดยมีค่าใกล้เคียงกับ fructooligosaccharide ซึ่งประกอบไปด้วย 1-ketose, 6-ketose และ neoketose (ประกอบด้วยกลูโคส 1 โมเลกุลและฟรุกโตส 2 โมเลกุล) หรือ starchyrose ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 3 โมเลกุลและฟรุกโตส 2 โมเลกุล (Wichienchot *et al.*, 2010) พืชหลายๆ ชนิดมีโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นสารประกอบพรีไบโอติกส์เป็นองค์ประกอบ เช่น กระเทียม, หัวหอม, หน่อไม้ฝรั่ง, ถั่วเหลือง, ถั่วเขียวและแก้วมังกร เป็นต้น (Wichienchot *et al.*, 2010) โดยโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากถั่วเหลือง ถั่วเขียว และแก้วมังกรมีช่วงของน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการตกผลึกสารสกัดจากเมล็ดขนุน แต่โอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากหัวอาทิโชค (artichoke) และชิโกรี่ (chicory) มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากตัวอย่างผลึกที่ได้จากการตกผลึกสารสกัดจากเมล็ดขนุน (Wichienchot *et al.*, 2010)



ภาพประกอบ 3.6 โครมาโตแกรมของสารสกัดเมล็ดขนุน โดยเทคนิคการวิเคราะห์ GPC



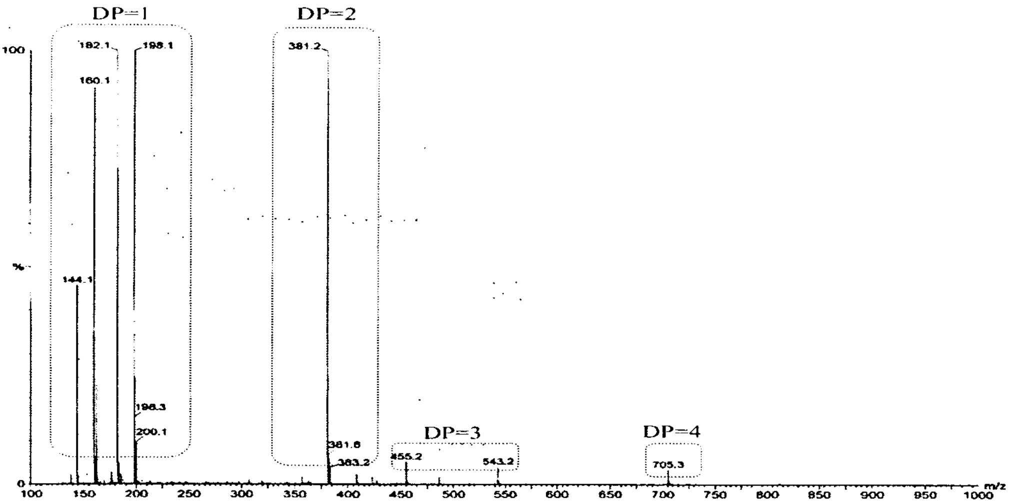
ภาพประกอบ 3.7 โครมาโตแกรมของสารสกัดเมล็ดขนุนหลังตกผลึกตัวอย่างโดยเทคนิค GPC



ภาพประกอบ 3.8 โครมาโตแกรมของผลึกตัวอย่างที่ได้โดยเทคนิค GPC

3.2.4 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดหลังตกผลึกโดยใช้วิธี Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS)

ผลการยืนยันน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างหลังตกผลึกผลึกโดยใช้วิธี ESI-MS พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 144.1-705.3 ดาลตันหรือ DP ตั้งแต่ 1-4 (ภาพประกอบ 3.9) ซึ่งพบว่าน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหลังตกผลึกมีทั้งมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่รวมอยู่ด้วย ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองจากวิธี GPC ก่อนหน้า จากผลการทดลองพบว่าการตกผลึกสามารถแยกเอาน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ออกจากผลึกตัวอย่างได้



ภาพประกอบ 3.9 โครมาโตแกรมของสารสกัดหลังตกผลึกตัวอย่างจากชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตรโดยเทคนิควิเคราะห์ ESI-MS

3.2.5 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตกผลึกขนาดเล็กกับชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร

จากการทดลองด้วยชุดตกผลึกขนาดเล็กทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิการตกผลึกที่ 58 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที ความเร็วรอบในการกวนสาร 100 รอบต่อนาที อัตราการลด

อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมจากชุดตกผลึกขนาดเล็กมาตกผลึกด้วยชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร เพื่อดูประสิทธิภาพของชุดตกผลึก แสดงดังตาราง 3.5

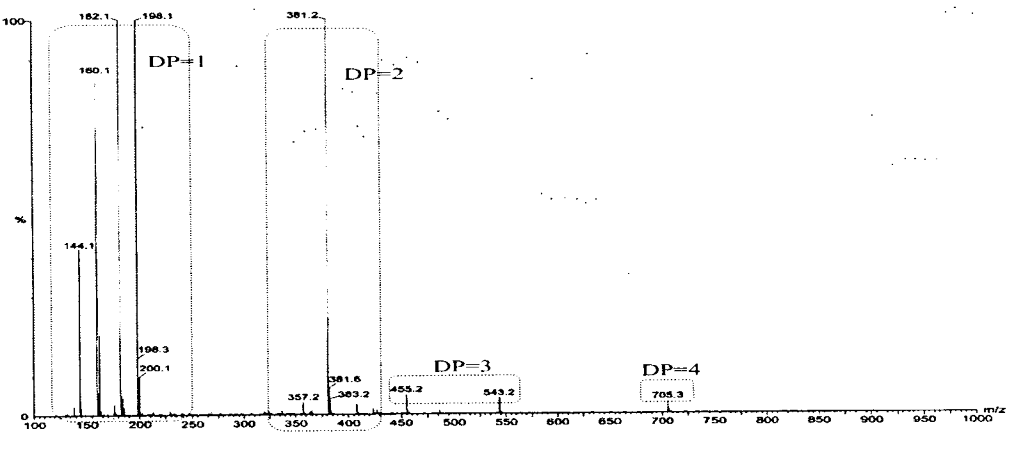
ตาราง 3.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตร กับชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร

ชุดตกผลึก	ผลได้ของผลึกพรีไบโอติกส์ (กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	ปริมาณน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัดแห้ง)
ขนาด 0.4 ลิตร	0.028	14.05±0.09
ขนาด 5 ลิตร	0.051	30.85±0.986

จากตาราง 3.5 พบว่าประสิทธิภาพของชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตรนั้นมีประสิทธิภาพสูงกว่าชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตรถึง 2 เท่า ซึ่งดูได้จากค่าผลได้และปริมาณน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์ ด้วยเหตุผลเพราะว่าในชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตรมีชุดให้ความร้อนแบบก้นหอย และมีใบพัดขนาดใหญ่ที่มีความกว้างของใบพัดกินไปถึงขอบของถังตกผลึก ซึ่งแตกต่างกับในชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตรมีตัวให้ความร้อนแบบแท่งจุ่ม ทำให้ใบพัดกวนต้องมีขนาดความกว้างของใบพัดแคบลงเพื่อป้องกันไม่ให้ใบพัดกวนทำความเสียหายกับตัวให้ความร้อนได้ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตรมีประสิทธิภาพมากกว่าชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตร ซึ่งปัจจัยนี้ทำให้สารพรีไบโอติกส์ที่เราต้องการมีโอกาสสัมผัสกับสารที่กำลังตกผลึกได้มากกว่าชุดตกผลึกขนาด 0.4 ลิตร

3.2.6 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลสารสกัดหลังตกผลึกด้วยชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร ด้วยวิธี Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS)

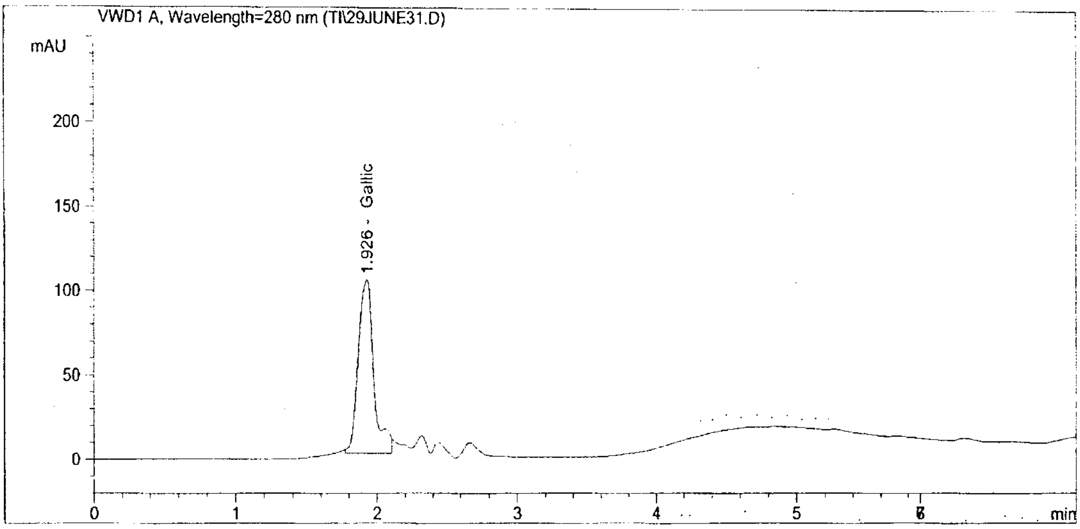
ผลการยืนยันน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดหลังจากจกผลึกด้วยชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร โดยวิธี ESI-MS พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลลักษณะเดียวกันกับผลการทดลองในชุดตกผลึกขนาดเล็ก คือ ตั้งแต่ 144.1-705.3 ดาลตันหรือ DP ตั้งแต่ 1-4 (ภาพประกอบ 3.10) ในสารสกัดหลังการตกผลึก ดังนั้นจากผลการทดลองจึงกล่าวได้ว่าวิธีการแยกสารพรีไบโอติกส์ด้วยวิธีการตกผลึกนั้น พอที่จะแยกน้ำตาลที่คาดว่าเป็นพรีไบโอติกส์ออกจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ได้



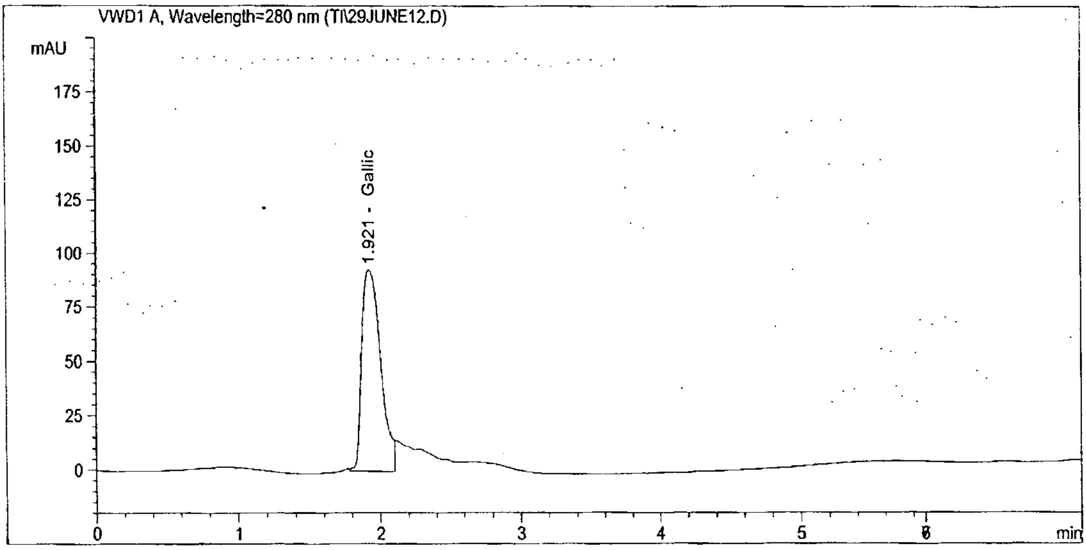
ภาพประกอบ 3.10 โครมาโตแกรมของสารสกัดหลังตกผลึกตัวอย่างจากชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร โดยเทคนิควิเคราะห์ ESI-MS

3.3 ผลการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์

เมื่อนำสารสกัดจากเมล็ดขนุนมาวิเคราะห์หาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกส์ ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแคฟเฟอิกและกรดเฟอรูลิก ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) จะได้ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกส์ที่พบในสารสกัดแห้งจากเมล็ดขนุน คือกรดแกลลิกเพียงชนิดเดียว (วรรณพิชญ์ จุลกัลป์และคณะ, 2553) และตัวอย่างผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงในภาพประกอบที่ 3.11 ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลลิก จากการทดลองได้ผลดังนี้



a



b

ภาพประกอบ 3.11 โครมาโทรแกรมของสารประกอบฟีนอลิกส์ของสารสกัดเมล็ดขนุน (a) ก่อนผ่าน C18 Sep-Pak Cartridge และ (b) หลังจากผ่าน C18 Sep-Pak Cartridge

3.3.1 ผลการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์โดยใช้ C18 Sep-Pak Cartridges

3.3.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นสารสกัดจากเมล็ดขนุน

ทำการแยกสารโดยใช้ความเข้มข้นสารสกัดจากเมล็ดขนุนก่อนผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges ที่ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร จากตารางที่ 3.6 พบว่า เมื่อคำนวณปริมาณกรดแกลลิกในสารสกัดดิบให้อยู่ในรูปน้ำหนักกรดแกลลิกต่อน้ำหนักวัตถุดิบสารสกัดแห้งจากเมล็ดขนุน จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากเมล็ดขนุนหลังผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges มีปริมาณกรดแกลลิกอยู่ในช่วง 1.64±1.12 ถึง 1.86±1.31 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัดแห้ง และให้ค่าร้อยละกรดแกลลิกสูงสุดที่ 86.49 คือสารสกัดจากเมล็ดขนุนหลังผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งพบว่าเป็นค่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่ใช้แยกสารประกอบฟีนอลิกส์โดยใช้ C18 Sep-Pak Cartridges และถ้าใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดจากเมล็ดขนุนก่อนผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges ที่ความเข้มข้นต่ำกว่านี้ทำให้มีร้อยละกรดแกลลิกต่ำ อาจเป็นเพราะว่าสารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ป้อนเข้าสู่ C18 Sep-Pak Cartridges มีความเข้มข้นน้อยทำให้อัตราการดูดซับเกิดขึ้นเร็วหรือสมดุลดูดซับมีค่าสูง สารถูกดูดซับส่วนใหญ่จะแพร่เข้าสู่โพรงตัวดูดซับ ความเข้มข้นของสารถูกดูดซับส่วนที่เหลือจึงลดลงอย่างรวดเร็ว (การดูดซับ, 2552) ทำให้เกิดการไหลของสารผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges ซึ่งเป็นตัวดูดซับเร็วขึ้นจึงทำให้ C18 Sep-Pak Cartridges มีความสามารถจับกรดแกลลิกได้ไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร และนอกจากนี้ถ้าใช้ความเข้มข้นสารสกัดจากเมล็ดขนุนก่อนผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges ที่ค่าสูงกว่านี้ จะทำให้ C18 Sep-Pak Cartridges มีความสามารถในการจับกรดแกลลิกลดน้อยลงด้วยเช่นกัน เนื่องจากปริมาณ C18 ใน C18 Sep-Pak Cartridges กับปริมาณสารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ใส่เข้าไปใน C18 Sep-Pak Cartridges มีปริมาณไม่สมดุลกัน จึงทำให้ได้ค่าร้อยละกรดแกลลิกลดต่ำลง

3.3.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นสารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่านการตกผลึกแล้ว

ผลการแยกกรดแกลลิกโดยใช้สารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่านการตกผลึกแล้วมาทำการทดลองที่สภาวะความเข้มข้นเดียวกันกับหัวข้อ 3.3.1.1 จากตาราง 3.6 ผลการทดลองที่ได้ปรากฏว่ามีลักษณะเดียวกัน คือ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ให้กรดแกลลิกมีค่าสูงสุด แต่ที่ต่างกัน คือ ปริมาณแกลลิกก่อนผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges มีปริมาณน้อยกว่าการทดลองหัวข้อที่แล้วเล็กน้อยเนื่องจากสารที่นำมาทดลองเป็นสารสกัดที่ผ่านการตกผลึกมาแล้ว อาจเกิดการสูญเสียปริมาณแกลลิกในการทดลอง เช่น สูญเสียไปกับเนื้อผลึกพรีไบโอติกส์ หรืออาจสูญเสียไปในระหว่างกรองผลึกก็เป็นไปได้ อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองจากหัวข้อ 3.2.1.1 และ 3.2.1.2 ซึ่งเมื่อใช้โปรแกรม One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test ทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นจากการทดลองความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 4 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร

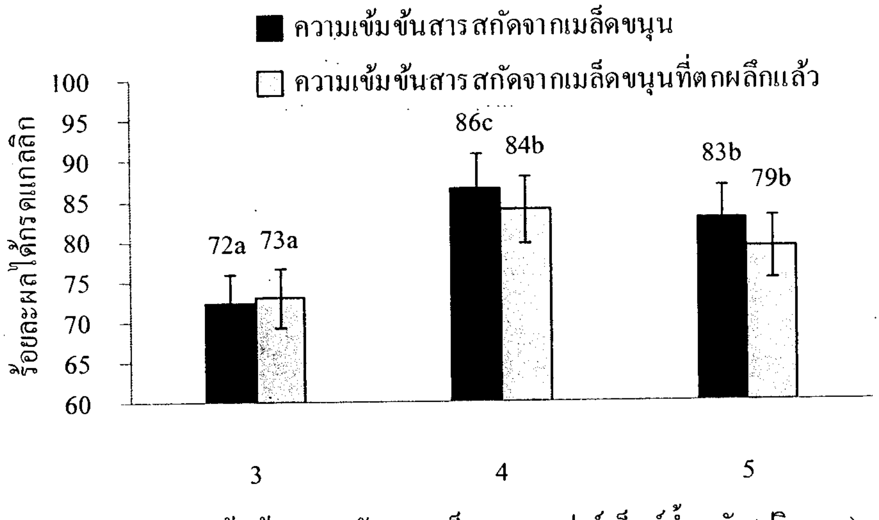
ตารางที่ 3.6 ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแกลลิกและร้อยละผลได้กรดแกลลิก โดยศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร

ชนิดของสารสกัด		ปริมาณกรดแกลลิก (มิลลิกรัมแกลลิก / กรัมสารสกัดแห้ง)		ร้อยละผลได้
		ก่อนผ่าน C18	หลังผ่าน C18	
สารสกัดจากเมล็ดขนุน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนัก / ปริมาตร)	3	2.26±0.03[d]	1.63±0.02[a]	72.46[a]
	4	2.22±0.01[d]	1.92±0.03[c]	86.49[c]
	5	2.24±0.02[d]	1.85±0.01[b]	82.79[b]
สารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่านการตกผลึกแล้ว (เปอร์เซ็นต์น้ำหนัก / ปริมาตร)	3	1.80±0.03[d]	1.32±0.03[a]	73.06[a]
	4	1.79±0.02[d]	1.44±0.02[c]	83.93[b]
	5	1.82±0.02[d]	1.51±0.03[b]	79.21[b]

ค่าดังปรากฏ คือ ค่าเฉลี่ย (n=3) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

อักษรยกที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

และจากภาพประกอบ 3.12 แสดงให้เห็นว่าการทดลองทั้ง 2 หัวข้อที่กล่าวมาแล้วนั้นให้ค่าการแยกกรดแกลลิกไปในทางเดียวกัน คือ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 4 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรจะให้ร้อยละกรดแกลลิกได้มากที่สุด



อักษรที่เหมือนกันในแต่ละแท่งกราฟ หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

ภาพประกอบ 3.12 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละผลได้ของกรดแกลลิกกับความเข้มข้นสารสกัดจากเมล็ดขนุน

3.3.1.3 ผลการศึกษาการทำให้สารประกอบฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลลิกมีความบริสุทธิ์

ตาราง 3.7 ค่าเฉลี่ยของปริมาณเนื้อแกลลิก (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ตัวอย่าง	ปริมาณกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณเนื้อแกลลิก (มิลลิกรัม)
A	82.73±0.87[b]	0.082[b]
B	81.05±0.10[b]	0.081[b]
C	62.21±0.18[a]	0.062[a]
D	80.31±2.39[b]	0.080[b]

อักษรยกที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

Note: A คือ สารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges

B คือ สารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่านการ C18 Sep-Pak Cartridges และระเหย MeOH ออกที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปสะเทินกับ0.1%w/v NaOH

C คือ สารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่านการ C18 Sep-Pak Cartridges ที่ระเหย MeOH ออกที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปสะเทินกับ0.1%w/v NaOH

D คือ สารสกัดที่ผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges สะเทินด้วย 0.1%w/v NaOH

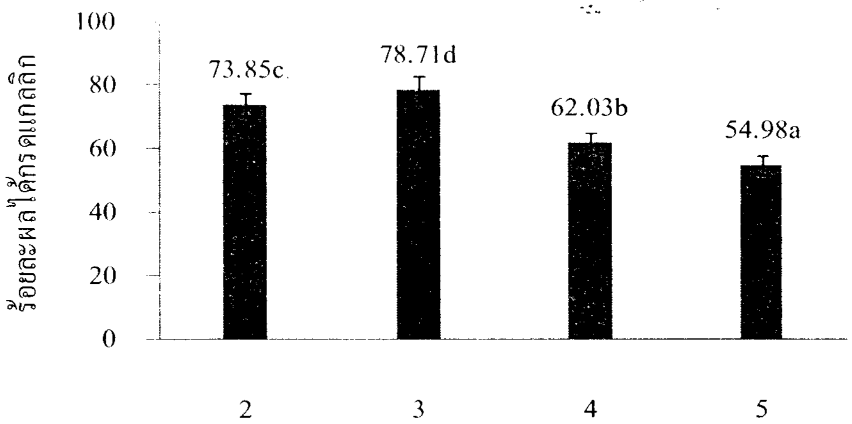
สารสกัดจากเมล็ดขนุนหลังผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges จะมีกรดและเมทานอลเหลืออยู่ ซึ่งต้องกำจัดออกโดยนำไปสะเทินกับ 0.1%w/v NaOH และระเหยเมทานอล ซึ่งสภาวะในการดำเนินการที่ต่างกันทำให้ได้ปริมาณกรดแกลลิกและเนื้อแกลลิกต่างกันดังตารางที่ 3.7 จากตัวอย่าง B และ D พบว่าได้ปริมาณเนื้อแกลลิกใกล้เคียงกับตัวอย่าง A ซึ่งเป็นสารสกัดที่ผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges อย่างเดียว แสดงว่าการสะเทินกรดที่ปนอยู่ในตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ดขนุนหลังผ่าน C18 Sep-Pak Cartridges ด้วยเบสไม่มีผลต่อปริมาณเนื้อแกลลิก แต่ในตัวอย่าง C ปริมาณเนื้อแกลลิกมีค่าน้อยลงอันเนื่องมาจากความร้อนในการอบสารทำให้กรดแกลลิกเสื่อมสลายบางส่วน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีการที่ทำให้กรดแกลลิก บริสุทธิ์ขึ้นในเบื้องต้นคือ ทำการทดลองตามขั้นตอนในตัวอย่าง B ซึ่งจะให้ค่าปริมาณเนื้อแกลลิกสูงสุด

3.3.2 ผลการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์โดยใช้คอลัมน์ C18 column

3.3.2.1 ผลการศึกษาอัตราการไหลของสารสกัดผ่าน C18 column

การทดลองแยกสารประกอบฟีนอลิกส์โดยคอลัมน์ในเบื้องต้นนั้น ได้ทำการออกแบบคอลัมน์แก้วขนาดบรรจุ 200 มิลลิลิตร โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ 25 มิลลิเมตร และความสูงคอลัมน์ 500 มิลลิเมตร ทำการทดลองแยกสารประกอบฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลลิกโดยใช้สภาวะที่ดีที่สุดจากการทดลองใน C18 Sep-Pak Cartridges คือ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 4 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร โดยทำการศึกษาปัจจัยของอัตราการไหลของสารสกัดจากเมล็ดขนุนผ่านคอลัมน์ จากภาพประกอบ 3.13 พบว่าที่อัตราการไหลสารสกัดในช่วง 2-3 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ค่าร้อยละผลได้แกลลิกที่เพิ่มขึ้น และให้ค่าสูงสุดที่อัตราการไหล 3 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ค่าร้อยละ 78.71 หลังจากนั้นที่อัตราการไหลสารสกัดในช่วง 3-5 มิลลิลิตรต่อนาที ร้อยละผลได้แกลลิกลดลงอย่างมากเนื่องจาก เมื่อ

ของไหลเคลื่อนที่เร็วมากขึ้น ความหนาของชั้นของไหลรอบตัวดูดซับจะบางลง ทำให้อัตราการดูดซับเกิดขึ้นช้า ดังนั้นสารถูกดูดซับส่วนใหญ่จึงไม่แพร่เข้าสู่โพรงของตัวดูดซับ แต่เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์อย่างรวดเร็ว (การดูดซับ, 2552)



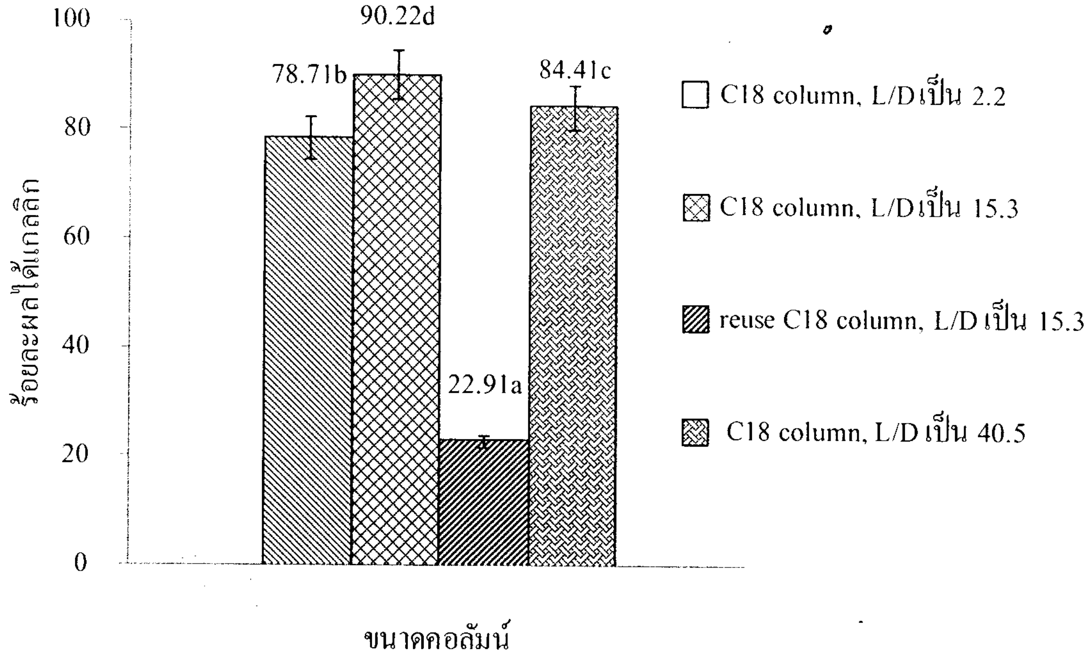
อักษรที่เหมือนกันในแต่ละแท่งกราฟ หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

ภาพประกอบ 3.13 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละผลได้กรดแกลลิกกับอัตราการไหลสารสกัดจากเมล็ดขนุน

3.3.2.2 ผลการศึกษาชนิดของ C18 column

จากภาพประกอบ 3.14 พบว่า คอลัมน์ C18 ที่มีสัดส่วนความสูงของ C18 ต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง (L/D) ที่ 40.5 ขนาด 25 มิลลิลิตร และ คอลัมน์ C18 ที่มี L/D เป็น 15.3 ขนาด 50 มิลลิลิตร ให้ค่าร้อยละกรดแกลลิกสูงกว่าการทดลองในหัวข้อ 5.4.2.1 เนื่องมาจากคอลัมน์ C18 ที่มี L/D เป็น 2.2 ขนาด 200 มิลลิลิตร มีการบรรจุตัวดูดซับไม่สูงมากเพราะคอลัมน์มีขนาดกว้าง ทำให้ระยะทางที่สารผ่านตัวดูดซับ C18 สั้น ทำให้ตัวดูดซับ C18 จับกรดแกลลิกได้น้อยลง ส่วนคอลัมน์ขนาด 25 มิลลิลิตร เป็นคอลัมน์ที่แคบและมีความสูงของตัวดูดซับที่สูงกว่าคอลัมน์อื่นๆ จึงทำให้สารเคลื่อนตัวผ่านตัวดูดซับได้ช้า ดังนั้นจากการศึกษาพบว่าขนาดของคอลัมน์ที่เหมาะสมคือที่ C18 ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยให้ร้อยละผลได้แกลลิกที่ 90.22 ซึ่งมีค่าร้อยละผลได้สูงสุด เพราะอัตราการดูดซับเกิดขึ้นเร็วมาก สารถูกดูดซับส่วนใหญ่จะแพร่เข้าสู่โพรงตัวดูดซับอย่างรวดเร็ว ความเข้มข้นของสารถูกดูดซับส่วนที่เหลือจึงลดลงอย่างรวดเร็ว มีผลทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสารถูกดูดซับในแนวทิศทางเดียวกับทิศของการเคลื่อนที่ด้วย (การดูดซับ, 2552)

ส่วนการศึกษาการนำตัวดูดซับ C18 นำกลับมาใช้ใหม่นั้นจากผลการทดลองพบว่าไม่เหมาะที่จะนำกลับมาใช้ใหม่เพราะให้ค่าร้อยละผลได้แกลลิกในปริมาณที่น้อยมาก คือ ที่ร้อยละผลได้แกลลิก 22.91



อักษรที่เหมือนกันในแต่ละแท่งกราฟ หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี One-Way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

ภาพประกอบ 3.14 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละผลได้กรดแกลลิกกับคอลัมน์ขนาดต่างๆ ที่อัตราการไหลสารสกัดจากเมล็ดขนุน 3 มิลลิลิตรต่อนาที

3.4 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของขั้นตอนในการแยกสารพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์

ตาราง 3.8 แสดงผลของลำดับในการแยกสารพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์ ถ้าให้ความสำคัญกับการแยกสารพรีไบโอติกส์เป็นหลัก และผลของแกลลิกเป็นรอง ขั้นตอนที่ทำให้ได้ผลดีที่สุดคือ ต้องทำโดยการตกผลึกเพื่อแยกผลึกพรีไบโอติกส์ออกก่อน จากนั้นจึงนำสารสกัดที่ได้จากการกรองผลึกพรีไบโอติกส์แล้วไปแยกสารประกอบฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลลิกออกมา แต่ถ้าให้ความสำคัญกับผลของแกลลิกมากกว่า ต้องทำการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์ออกมาก่อน หลังจากนั้นจึงนำสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์นำมาตกผลึก เพื่อให้ได้ผลึกพรีไบโอติกส์ที่ต้องการ ทั้งนี้ทั้งนั้นจากการทดลองจึงพบว่าไม่ว่าจะทำการทดลองโดยขั้นตอนไหนก็สามารถแยกสารสำคัญทั้งสองออกมาได้เช่นกันขึ้นอยู่กับการเลือกใช้งาน หรือความต้องการในขณะนั้น แต่ถ้าต้องการสาระสำคัญทั้งสองออกมาเหมือนกัน ก็ให้เลือกนำสารสกัดจากเมล็ดขนุนมาทดลองโดยแยกสารฟีนอลิกส์ออกด้วยคอลัมน์ก่อนการตกผลึก เพราะว่าราคาสารฟีนอลิกส์ต่อหน่วยมีราคาสูงกว่าสารพรีไบโอติกส์ ซึ่งราคาขายพรีไบโอติกส์ชนิดฟรุกโตโอลิโกแซคาไรด์เกรดอุตสาหกรรมในรูปผงที่ขายอยู่ในท้องตลาดมีประมาณ 300 บาทต่อกิโลกรัม (http://www.alibaba.com/showroom/fructooligosaccharide-powder.html, 2012) และสารประกอบฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลลิกเกรดอุตสาหกรรมในรูปผงมีราคา

ขายประมาณ 900 บาทต่อกิโลกรัม (http://www.alibaba.com/countrysearch/CN/gallic-acid.html, 2012) ตามลำดับ

ตาราง 3.8 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์และปริมาณกรดแกลลิกจากขั้นตอนในการแยกสารพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์

ปริมาณ	ขั้นตอนในการแยกสาร	
	ตกผลึกก่อนผ่าน C18	ผ่าน C18 ก่อนตกผลึก
ผลได้ผลึก (กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	0.028	0.027
น้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	875.55±0.67	861.27±1.05
น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	373.2±0.65	362.9±2.08
น้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมผลึก)	502.35±0.81	484.15±2.64
น้ำตาลไม่ถูกรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	14.05±0.09	13.36±0.19
ปริมาณแกลลิก (มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัดแห้ง)	1.55±0.01	2.21±0.02

4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยได้ข้อสรุปดังนี้

1. สภาวะที่ดีที่สุดในการตกผลึกด้วยเครื่องตกผลึกขนาด 5 ลิตร ที่ให้ผลึกที่คาดว่าเป็นสารประกอบพรีไบโอติกส์คือการดำเนินการตกผลึกที่อุณหภูมิ 58 °C ความเร็วรอบในการกวน 10 รอบต่อนาที และใช้อัตราการลดลงของอุณหภูมิเป็น 1°C ต่อนาที โดยให้ผลได้ 0.051 กรัมผลึกต่อกรัมสารสกัดแห้ง ซึ่งมากกว่าการตกผลึกในเครื่องตกผลึกขนาด 0.4 ลิตร ประมาณ 2เท่า
2. การตกผลึกสารสามารถแยกสารที่คาดว่าเป็นสารพรีไบโอติกส์ออกจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลดมเลกุลคู่ได้
3. สำหรับการแยกสารฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลลิก พบว่าการดำเนินการในคอลัมน์ที่บรรจุ C18 ในอัตราส่วนระหว่างความสูงและเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์เป็น 15.3:1 อัตราการป้อนสารที่ 3 มิลลิลิตรต่อนาที และความเข้มข้นของสารสกัดที่ป้อนเข้าคอลัมน์เป็น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ค่าร้อยละผลได้ของกรดแกลลิกเป็น 90.22 และไม่มีความคุ้มค่าในการนำ C18 กลับมาใช้ใหม่
4. การทำให้สารประกอบฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลลิกมีความบริสุทธิ์ในเบื้องต้น พบว่าการสะเทินกรดที่ปนอยู่ในตัวอย่างสารประกอบฟีนอลิกส์ชนิดกรดแกลลิกด้วยเบส ไม่มีผลต่อเนื้อปริมาณแกลลิก ส่วนการระเหยเมทานอลที่เป็นตัวชะออกจากกรดแกลลิกไม่ควรทำที่อุณหภูมิสูงเพราะจะทำให้ปริมาณเนื้อกรดแกลลิกลด สภาวะที่ดีที่สุดในการสะเทินและระเหยเมทานอลออกจากกรดแกลลิกคือ นำสารสกัดจากเมล็ดขนุนที่ผ่านคอลัมน์ C18 มาระเหยเมทานอลออกโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปสะเทินกับเบส (0.1%w/v NaOH) จะให้ปริมาณเนื้อแกลลิกสูงสุด
5. ในกรณีที่ต้องการสารใดมากที่สุดให้ทำการแยกสารนั้นๆ ออกก่อน ส่วนหากต้องการทั้งสารที่คาดว่าเป็นสารพรีไบโอติกส์และฟีนอลิกส์เท่าๆกัน ควรแยกสารฟีนอลิกส์ออกก่อน

4.2 ข้อเสนอแนะ

1 จากปัญหาในการวิเคราะห์สารพรีไบโอติกส์ เนื่องจากผู้วิจัยไม่สามารถหาสภาวะในการทดสอบพรีไบโอติกส์ด้วยเทคนิก HPLC ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้วิธีการการหาปริมาณน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์ ร่วมกับตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Gel permeation chromatography (GPC) และ Electrospray ionization-mass spectrometry (EI-MS) ซึ่งการพิจารณาผลน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์ในการหาสภาวะที่เหมาะสมก่อนสามารถลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบได้

2 เพื่อเป็นการยืนยันความเป็นพรีไบโอติกส์ ควรมีการตรวสอบความเป็นพรีไบโอติกส์โดยการจำลองในระบบย่อยเทียม

3. เนื่องจากผลึกที่คาดว่าเป็นสารพรีไบโอติกส์ที่ได้ออกมามีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสารสกัดแห้งหรือปริมาณเมล็ดขนุนที่ใช้ จึงไม่มีความคุ้มค่าในการที่จะลงทุนเพื่อผลิตผลึกสารพรีไบโอติกส์จาก

เมล็ดขนุน นอกจากหาสารตัวอื่นๆที่มีอยู่ในเมล็ดขนุนและสกัดออกมาร่วมกับการตกผลึกพรีไบโอติกส์

บรรณานุกรม

บุญส่ง คงเจริญ และคณะ. 2553. การนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตรมาเปลี่ยนเป็นยาคุมกำเนิดและยาสเตอรอยด์, ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรณพิชญ์ จุลกัลป์. 2553. การศึกษาการสกัดพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์จากเมล็ดขนุน. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต,สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สายอุสาห์ อินเอก และอาทิตยา ลิ่มเจริญวงศ์. 2552. ศึกษาการแยกพรีไบโอติกส์ให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึก. โครงงานนักศึกษา ระดับปริญญาตรี, ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุพจน์ นวลละออง. 2552. การสกัดสารพรีไบโอติกส์จากพืชเกษตร. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต,สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์,มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุพรรณษา ไพศาล. 2554. การสกัดพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์จากเมล็ดขนุนในระดับโรงงานจำลอง. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต,สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์,มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Berger, K. 1977. Some Theoretical and Practical.Aspects of Fractionation of Palm Oil. Oil Palm News, Volumn 22: 10-18.

Blanshard, J.M., Muhr, A.H., Gough, A. 2006. Crystallization from concentrated sucrose solutions. Department of Applied Biochemistry and Food Science, Nottingham, U.K.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y. 2007. Optimization of Extraction Conditions of Antioxidant Phenolic Compounds from Mashua (Tropaeolum Tuberosum Ru´ız & Pav´on) Tubers. Separation and Purification Technology, Volumn 55: 217-225.

Chrzanowski, G., Sempruch, C. and Sprawka, I. 2007. Investigation of Phenolic Acids in Leaves of Blackcurrant (Ribes Nigrum L.) and Sour Cherry (Prunus Cerasus L.). Journal of Polish Agricultural Universities (EJPAU), 10(4): 42.

Derenzo, S.,Giulietti, M., Mart´ınez, E., Silva, J. 2007. Kinetics of the xylitol crystallization in hydro-alcoholic solution. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, Volumn 47: 2157-2162.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Journal of Analytical Chemistry, Volumn 28: 350-356.

Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. Journal of Nutrition, Volumn 125: 1401-1412.

Grajek, W., Olejnik, A. and Sip, A. 2005. Probiotics, Prebiotics and Antioxidants as Functional Foods. Journal of Acta Biochimica Polonica, Volumn 52: 665-671.

Harborne, J. B. 1980. Plant Phenolics in "Secondary Plant Products" Bell, E. A. and Charlwood, B. V. (eds) Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, Volumn 8: 329-402.

Hernandez, O., Ruiz-Matute, I., Olano, A., Moreno, and F.Javier. 2009. Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. International Dairy Journal, Volumn 19: 531-536.

Herodez, S., Hadolin, M., Skerget, M. and Knez, Z. 2003. Solvent Extraction Study of Antioxidant from Balm (Melissa officinalis L.) Leaves. Journal of Food Chemistry, Volumn 80: 275-282.

Kim, D., Lee, C. Y., Wrolstad, R.E., Acree, T.E. An., H. Decker, E. A., Penner, M. H. Reid, D. S., Sporns, P., Schwartz, S. J. and Shoemaker, C.F. (Eds.). 2002. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York: John Wiley & Sons Inc.

Korakli, M. and Vogel, R. F. 2006. Structure/Function of Homopolysaccharide Producing Glycansucrase and Therapeutic Potential of Their Synthesized Glycans. Journal of microbiol biotechnology, Volumn 71: 760-803.

Lam, Ng., Wee, Oh., Flingoh, C.H. and Yin, Ng, Choon. 1983. Induction Period and Cooling Curve Measurements as Possible Means of Detecting Stearin Adulteration in palm Oil. In the palm Oil Product Technology

Li, B.B., Smith, B., Hossain, Md. M. 2006. Extraction of Phenolics from Citrus Peels I. Solvent Extraction Method. Separation and Purification Technology, Volumn 48:182-188.

Markus ,T., Michael, G, Gänzle. 2005. Exopolysaccharides from cereal-associated Lactobacilli Trends in Food Science & Technology, Volumn 16: 79-84.

Miller, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, Volume 31: 426-428.

Oh, Flingoh C.H. and Berger, K.G. 1981. Physical Properties of Palm Oil in Relation to food use. Journal of Renewable Energy, Volumn 2: 13-14.

Proestos, C., Sereli, D., komaitis, M. 2006. Determination of Phenolic Compounds in Aromatic Plants by RP-HPLC and GC-MS. Journal of Food Chemistry, Volumn 95: 44-52.

Taylor, A.M. 1973. Palm Oil Crystallization and Fractionation. Oil Palm News. Volumn 15: 18-23

Treybal, R.E. 1980. Mass-transfer operation.3rd ed.McGraw-Hill Book Company.

Tyihak, E., Mincsovics, E. and Kalász, H. 1979. New Planar Liquid Chromatographic Technique: Overpressured Thin-Layer Chromatography. Journal of Chromatography A, Volumn174: 75-81.

Vichapong, J., Sookserm, M., Srijesdaruk, V., Swatsitang, P., Srijaranai, S. 2010. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. LWT - Food Science and Technology, Volumn 43: 1325-1330.

Watanabe, M., Nishimura, S., Watanabe, N., Crystallizer. 1987. United State Patent 4678646, Jul 7.

Waterhouse, A. L., Wrolstad, R. E., Acree, T.E., An, H., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Sporns, P., Schwartz, S.J. and Shoemaker, C.F. (Eds.). 2002. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York: John Wiley & Sons Inc.

Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., Rastall, R.A. 2010. Oligosaccarides of pitaya (Dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. Journal of Food Chemistry, Volumn120, Issues 3: 850-857.

Xiaoli, X., Liti, Y., Shuang, H., Wei, L., Yi, S., Hao, M., Jusong, Z. and Xiaoxiong, Z. 2008. Determination of Oligosaccharide Contents in 19 Cultivars of Chickpea (Cicer arietinum L) Seed by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Food Chemistry,Volumn 111: 215-219.

ตัวอย่างของพรีไบโอติกส์ประเภทโอลิโกแซคคาไรด์ ที่มีจำหน่ายอยู่ในตลาดโลก. 2555. http://th. wikipedia.org/wiki/. (สืบค้นเมื่อ 28 สิงหาคม 2555).

บทบาทหลักของจุลชีพในลำไส้. http://www.be-v.net/index.php?lay=show&ac=article&Ntype=12 (สืบค้นเมื่อ 18 มีนาคม 2553).

รูปขนุน. 2555. http://www.doae.go.th/library/html/detail/fruit2/jack_fr1.htm. (สืบค้นเมื่อ 20 สิงหาคม 2555).

Solid Phase Extraction. 2009. http://www.sithiphorn.com/newweb/newsletter/31-3-2005-1112256782.pdf. (Accessed March 18, 2009).

Price of gallic acid per kg. 2012. http://www.alibaba.com/countrysearch/CN/gallic-acid.html. (Accessed October 22, 2012)

Price of fructooligosaccarides per kg. 2012. http://www.alibaba.com/showroom/fructooligo saccharide-powder.html. (Accessed October 22, 2012).

ภาคผนวก

Poster

การแยกพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์จากสารสกัดจากเมล็ดขนุน สำหรับแสดงในงาน มอ วิชาการ

PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY, THAILAND — www.psu.ac.th

การแยกพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์จากสารสกัดจากเมล็ดขนุน

ฐิติพงษ์ รักษ์วงศ์ กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์ ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์

E-mail : kulchanat.k@psu.ac.th

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

พรีไบโอติกส์เป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีกลุ่มโมโนแซคคาไรด์ตั้งแต่ 3 หน่วยขึ้นไป (Oligosaccharides) มีส่วนช่วยในการทำงานของระบบ ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ ตัวอย่างสารพรีไบโอติกส์ เช่น Inulin และ Fructooligo- saccharide

สารประกอบฟีนอลิกส์เป็นอนุพันธ์ของเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหลัก เป็นสารที่มีประโยชน์ในการปกป้องร่างกาย โดยต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และช่วยในกระบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกาย

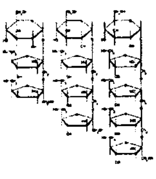
เนื่องจากสารทั้งสองเป็นสารที่พบได้ในพืช และได้พบว่าสารทั้งสองมีในเมล็ดขนุน ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ศึกษากระบวนการแยกพรีไบโอติกส์และทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกผลึก เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้ในการขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ ส่วนการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์สามารถทำได้โดยเทคนิค Solid phase extraction (SPE) โดยใช้ C18 เป็นตัวดูดซับสารฟีนอลิกส์ที่ต้องการ ดังนั้นผลจากงานวิจัยนี้จึงช่วยเพิ่มมูลค่าของเมล็ดขนุน และพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารเสริมสุขภาพในประเทศไทยต่อไป

จุดประสงค์ของการวิจัย

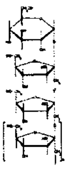
1. พัฒนาการตกผลึกเพื่อแยกพรีไบโอติกส์จากสารสกัดจากเมล็ดขนุน
2. พัฒนาการแยกสารประกอบฟีนอลิกส์จากสารสกัดด้วยวิธี SPE

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการแยกพรีไบโอติกส์และฟีนอลิกส์จากสารสกัดจากเมล็ดขนุน
2. สามารถนำสภาวะที่เหมาะสมไปออกแบบเครื่องมือในการตกผลึกสารพรีไบโอติกส์และออกแบบสร้างคอลัมน์แยกสารประกอบฟีนอลิกส์



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้าง (a) Fructooligo-saccharide และ (b) Inulin



รูปที่ 2 แสดงองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกส์

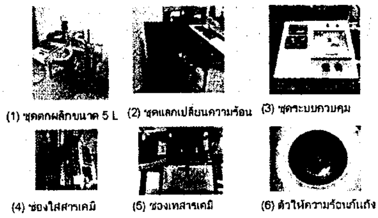
วิธีการดำเนินการ

กิจกรรมที่ 1 เตรียมสารสกัดโดยนำเมล็ดขนุนบดขนาด 1.0-2.0 mm ปริมาณ 3 kg ทำการสกัดโดยใช้เอทานอล 50% เป็นตัวทำละลาย ใช้สัดส่วนเมล็ดขนุนต่อตัวทำละลาย 1:20 น้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิในการสกัด 90 °C และเวลาในการสกัด 30 นาที หลังจากนั้นเตรียมสารสกัดให้เข้มข้น และมีความหนืดประมาณ 15-16 cp

กิจกรรมที่ 2 หาอัตราการลดอุณหภูมิ อุณหภูมิในการตกผลึก และความเร็วรอบในการกวน ที่เหมาะสมในการตกผลึกพรีไบโอติกส์ โดยตรวจสอบจากปริมาณน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์ และปริมาณผลึก

กิจกรรมที่ 3 หาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกสารฟีนอลิกส์ชนิด Gallic acid โดยใช้ คอลัมน์ขนาดเล็ก หรือ Sep-Pak C18 ดังรูปที่ 4

กิจกรรมที่ 4 หาอัตราการป้อน และอัตราส่วนของความสูงของตัวดูดซับกับเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์ที่เหมาะสมในการแยกสารฟีนอลิกส์ ชนิด Gallic acid โดย C18 packed column



รูปที่ 3 แสดงส่วนประกอบของชุดตกผลึกขนาด 5 ลิตร

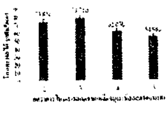
รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนการใช้ Sep-Pak C18 Cartridge ในการทำสารตัวอย่างให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการใช้ SPE

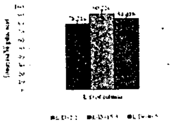
1. นำสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ SPE โดยสารตัวอย่างละลายใน Weak solvent (ตัวทำละลายที่ทำให้สารตัวอย่างจับกับตัวดูดซับ และไม่นำสารดังกล่าวหลุดออกมา)
2. ใช้ Intermediate Solvent ผ่านคอลัมน์ SPE เพื่อชะสารที่ไม่ต้องการออกจากคอลัมน์ หรือเพื่อแยกชนิดของสารตัวอย่าง
3. ใช้ Strong Solvent เพื่อชะสารตัวอย่างที่เราสนใจออกจากคอลัมน์ หรือเพื่อไล่สารที่ตกค้างในคอลัมน์ ออก

สรุปผลการทดลอง

1. สภาวะในการตกผลึกสารพรีไบโอติกส์ที่เหมาะสมคือ ที่ 58 °C ความเร็วรอบในการกวน 100 rpm อัตราการลดอุณหภูมิ 1 °C/min และใช้เวลาในการตกผลึกนาน 60 นาที
2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกสารฟีนอลิกส์โดย Sep-Pak C18 คือ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 4%w/v
3. สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารฟีนอลิกส์โดย C18 packed column คือ ที่อัตราการไหลสารสกัด 3 มิลลิลิตรต่อนาทีแสดงในรูปที่ 5 และขนาดความสูง C18 ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ (L/D) เป็น 15.3 ทำให้ได้ค่าร้อยละผลได้ Gallic acid สูงสุดดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 5 ผลของอัตราการไหลสารสกัดต่อร้อยละผลได้ Gallic acid



รูปที่ 6 ผลของ L/D ของ Packed column ต่อร้อยละผลได้ Gallic acid

เอกสารอ้างอิง

Xiaoli, X. Liti, Y. Shuang, H. Wei, L. Yi, S. Hao, M. Jusong, Z. and Xiaoxiong, Z. 2008. Determination of Oligosaccharide Contents in 19 Cultivars of Chickpea (Cicer arietinum L) Seed by High Performance Liquid Chromatography. Food Chemistry, 111: 215-219.

กิตติกรรมประกาศ ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2554-2555, สาขาความเป็นเลิศด้านวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Multi-cultural National Research Univ Innovation-driven Technology Provider

Proceeding

Rugwong, T., Chetpattananondh, P., Prasertsit, K., 2011, Separation of Prebiotics Compounds from Extract of Jackfruit: TIChE International Conference 2011, The 60th Anniversary of His Majesty the King's Accession to the Throne International Convention Center , Hatyai, Songkhla, November 10 - 11, 2011

Paper Code: sp004

Separation of Prebiotics Compounds From Extract of Jackfruit

Thitipong Rugwong[1*], Pakamas Chetpattananondh[1], Kulchanat Prasertsit[1]

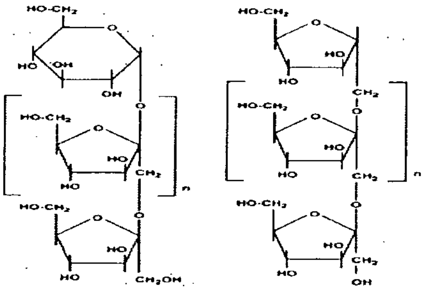
[1] Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering,
Prince of Songkhla University, Songkhla, 90112, Thailand
*e-mail: 5210120070@email.psu.ac.th

Abstract – Purification of prebiotics by crystallization is an accessible and low cost. That is able to extend to the higher production level. Therefore, should be the aim of this research is to separate prebiotics from extract of jackfruit seed using crystallization method. Evaporated extract of jackfruit seed was crystallized in laboratory scale in order to study the effects of crystallizing temperatures and mixing speed on crystallizing yield. The work found that range of crystallizing temperature of prebiotics is 55-64 °C (by using Differential Scanning Calorimeter) and the best temperature to obtain the highest percent non-reducing sugar is 58 °C. Moreover, percentage of non-reducing sugar increases with increasing mixing speed and the best of mixing speed is 100 rpm. For higher than 150 mixing speed show lower amount of non-reducing sugar.

***Keyword**: Prebiotics, Crystallization, Jackfruit seed, Differential Scanning Calorimeter (DSC), Gel Permeation Chromatography (GPC)*

1. Introduction

The jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) is a species of tree in family *Moraceae*. It is native to India and grown wildly many parts of Southern and Southeast Asia, such as Bangladesh, Burma, Sri Lanka, Malasia, Indonesia, Phillippines and Thailand [1] including Brazil and other countries that there are humid tropical and near-tropical climates. In Thailand, we can find jackfruit all year round and the best time to find it is around the end of rainy season in October or November. The green fruit is cooked as a vegetable. Additionally, the ripe fruits are normally eaten fresh or used in ice cream and also processing into canned and snacks products [2]. The residual seeds are mostly discarded. Previous research found that the jackfruit seeds contained phenolic compounds [3] and about 6.03 mg/g extracted non-reducing sugar [4] that is Prebiotics. Prebiotics are non-digestible food ingredients. It is a part of oligosaccharide and non reducing sugar that stimulate the growth and activity of bacteria in the digestive system that beneficially affect the host by improving its intestinal microbial balance. Prebiotics are carbohydrate. The composition of food classified as prebiotics include oligosaccharides and polysaccharides, such as fructo-oligosaccharide (FOS), galacto-oligosaccharide (GOS), inulin and xylo-oligosaccharide, which are non-reducing sugar. The structure of inulin and FOS are shown in Fig. 1.



(a) (b)

Fig. 1. *Structure of inulin (a) and FOS (b)*

Prebiotics can be obtained by extraction from plant or synthesis. However, verifying prebiotics is more complicated, non-reducing sugar and molecular weight of oligosaccharide have been considered instead in this work.

Should be considering only non-reducing sugar, previous work [5] found that the optimum condition for maximizing the crystal of prebiotics from an extract jackfruit seed was at crystallizing temperature of 77 °C for 60 minutes without mixing process.

In our work, the investigation of effect of crystallizing temperature, mixing speed and rate of cooling on the crystallization by consider amount of non reducing sugar and molecular weight have been studied.

2. Materials and methods

2.1 Materials and chemicals

Tongprasert-jackfruit seeds were used in the experiment. Fresh seeds were cleaned with water and grinding before sizing by sieve shaker. 95% Ethanol, sodium hydroxide and concentrate sulfuric acid were purchased from lab-scan analytical science (laboratory grade, Thailand). Sodium potassium tatrate and sodium carbonate were purchased from Ajax Finechem Pty Ltd. (NSW, Australia). D-glucose anhydrous and gallic acid were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Sodium sulfite and Folin-Ciocateu reagent were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). 3,5-dinitrosalicylic acid was from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). Phenol was from Fisher Sciencetific (Loughborough, UK).

2.2 Method extraction of prebiotics

Fresh seeds were cleaned with water and grinding by blender to size of 1-2 mm. The seeds were extracted with 50% ethanol using batch extractor. To concentrate the extract solution was filtered by vacuum filter (SIBATA: Circulating Aspirator WJ-20) and then was evaporated by rotary vacuum evaporator (Buchi: Vacuum pump V-700).

2.3 Crystallizing procedure and conditions

The concentrated solution was heated to 80 °C for 10 minutes and then decreased this temperature to the desired temperatures with cooling rate 1 °C/min at mixing speeds (0, 50, 100 and 150 rpm). The concentrated solution was crystallized for analyzing prebiotics.

2.4 Analytical techniques of prebiotics

The previous related research about analysis melting point and crystallizing point by DSC has an indistinct result. Therefore, this research study is performed the laboratory in new temperature range. Sample of crystal is prepared by crystallizing the concentrated extract solution at 61 °C, next the sampled was analyzed by DSC to verify the melting point and crystallizing temperature. The result showed the obvious range of crystallizing temperature graph. Consequently, this research has extended for new range of crystallizing temperature. GPC method has been test to verify the molecular weight. And non reducing sugar (NRS) have been tested for total sugar (TS) and reducing sugar (RS) by Modified phenol sulfuric method [6] and Modified dinitrosalicylic acid (DNS) method [7], respectively.

Table. 1. Show the weight of crystal with mixing speed And temperature

Temperature (°C)	Mixing speed (rpm)			
	0	50	100	150
55	0.140	0.104	0.194	0.144
58	0.220	0.118	0.264	0.153
61	0.125	0.152	0.121	0.182
63	0.197	0.090	0.117	0.235
Crystal weight (g)	0.682	0.464	0.696	0.714
Total solid (g)	30	25.6	28.4	31.2
Crystal weight/ Total solid	0.022	0.018	0.024	0.022

3.4 Effect of operating parameter to weight of crystal

Studying about operating parameters including mixing speed and temperature was shown in Table. 1. It express the ratio of crystal weight to total solid which explain how much crystal generate per total solid. The result shows that crystal weight/total solid the maximum is 0.024 at 100 rpm then we can conclude that this mixing speed can create the most amount of crystal.

3.5 Molecular weight of prebiotics

From GPC, Fig.4 the shows that the molecular weight of crystal sample is about 1367 which is in the same range of oligosaccharide [8].

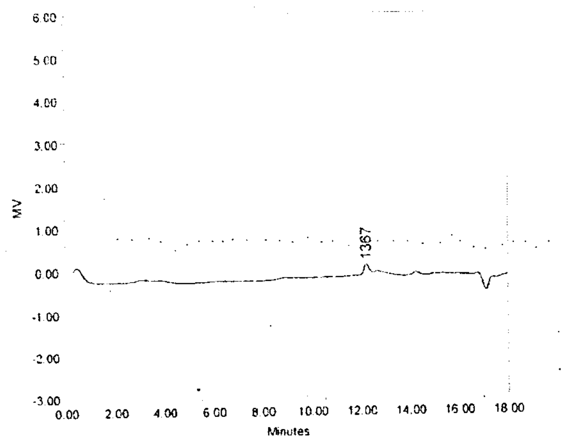


Fig. 4. Analysis of molecular weight by GPC.

4. Conclusion

The purification of prebiotics by crystallization process was investigated. The two factors affected crystallization were temperature and mixing speed. According to this study, the highest percent non-reducing sugar was obtained when using the mixing speed of 100 rpm at 58°C.

5. Acknowledgment

This research has been financially supported by Prince of Songkla University and the National Research Council of Thailand (NRCT). The Graduate School at Prince of Songkla University has provided partial funding. The Department of Chemical Engineering and the Faculty of Engineering, Prince of Songkla University are gratefully acknowledged for other supports.

Reference

[1] B. T. Ong, S.A. H Nazimah, A. Osman, S. Y. Quek, Y. Y. Voon, D. Mat Hashim, P. M. Chew, and Y. W. Kong, Chemical and Flavour Changes in Jackfruit *(Artocarpus heterophyllus* Lam.) Cultivar J3 during Ripening, *J. of Postharvest. Bioacoustics-the international journal of animal sound and its recording,* 40 (2006) 279-286.

[2] C. K. Pua, N. S. A. Hamid, C. P. Tan, H. Mirhosseini, R. B. A. Rahman, and G. Rusul, Optimization of Drum Drying Processing Parameters for Production of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Powder using Response Surface Methodology, *J. of food science and technology series.,* 43 (2010) 343-349.

[3] Y. Y. Soong, and J. Philip Barlow, Antioxidant Activity and Phenolic Content of Selected Fruit Seeds, *J. of agricultural and food science. Chem., 88 (2004) 411-417.*

[4] S. Nualla-ong, P. Chetpattananondh, and R. Yamsaengsung, Extraction of Prebiotics from Jackfruit Seeds, *J. of Eng., 36 (2009) 213-220.*

[5] K. Prasertsit, S. Ineak, and A. Limjareonwong, Purification of Prebiotics by Crystallization, *The 8 th PSU-Engineering Conference. Prince of Songkla University, Thailand, April 22-23 (2010).*

[6] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *J. of analytical chemistry associated with the destruction of chemical weapons., 28 (1956) 350-356.*

[7] G. L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *J. of analytical chemistry associated with the destruction of chemical weapons., 31 (1959) 426-428.*

[8] S. Wichienchot, M. Jatupornpipat, Extracttion and purification of prebiotics oligosaccharides, *35th Congress on Science and Technology of Thailand. Burapha University, Thailand, October 15-17 (2009).*