

การรักษาสมบัติเชิงหน้าที่ของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น *Zanthoxylum limonella* Alston  
ในไมโครแคปซูลด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2561  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MAINTENANCE OF FUNCTIONALITIES OF MA-KWAEN *Zanthoxylum limonella* Alston  
ESSENTIAL OIL IN MICROCAPSULE BY COMPLEX COACERVATION



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Food Technology  
Department of Food Technology  
Faculty of Science  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2018  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การรักษาสสมบัติเชิงหน้าที่ของน้ำมันหอมระเหยจากมะ แขว่น <i>Zanthoxylum limonella</i> Alston ในไมโคร แคปซูลด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน
โดย	นายจิระภัทร บุญยิ่ง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.นินนาท ชินประหัตษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย อนุญาติให้นักศึกษา  
การศึกษิตตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลีตา บรมพิชัยชาติกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นินนาท ชินประหัตษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนจันท์ มหาวณิช)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุวรรณา สุภิมารส)

จิระภัทร บุญยิ่ง : การรักษาสสมบัติเชิงหน้าที่ของน้ำมันหอมระเหยจากมะ

แขวน *Zanthoxylum limonella* Alston ในไมโครแคปซูลด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน. (

MAINTENANCE OF FUNCTIONALITIES OF MA-

KWAEN *Zanthoxylum limonella* Alston ESSENTIAL OIL IN MICROCAPSULE BY COMPLEX COA-

CERVATION ) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.นินนาท ชินประหัชช, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.อินทาวุธ สรรพ

รสถิตย์

มะแขวน (*Zanthoxylum limonella* Alston) เป็นพืชพื้นเมืองที่พบในแถบภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย นิยมใช้เป็นเครื่องเทศชุกกลิ่นรสในอาหาร ช่วยให้อาหารมีกลิ่นหอมน่ารับประทาน สารระเหยหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากมะแขวนประกอบด้วย D-limonene, alpha-phellandrene และ alpha-pinene ซึ่งทำให้มีกลิ่นคล้ายส้ม และมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูง อย่างไรก็ตามสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยเหล่านี้ถูกทำลายได้โดย ความร้อน ความชื้น แสง และออกซิเจน ดังนั้นจึงควรปกป้องสารระเหยด้วยวิธีเ็นแคปซูลชัน ซึ่งคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน เป็นหนึ่งในวิธีการกักเก็บสารที่นิยมใช้ โดยเกิดขึ้นจากอันตรกิริยาระหว่างประจุที่แตกต่างกันของสารละลายพอลิเมอร์ โดยนิยมใช้โปรตีนเป็นสารให้ประจุบวก (polycation) และพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารให้ประจุลบ (polyanion) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขวนในไมโครแคปซูล และวิเคราะห์สมบัติทางเคมี และกายภาพของไมโครแคปซูลที่ได้ โดยสารเคลือบที่ใช้ศึกษาเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ 3 ชนิด ได้แก่ แอลจีเนต (ALG) กัมอะราบิก (GAB) และแซนแทนกัม (XTG) ร่วมกับโปรตีนเจลาติน (GEL) วิเคราะห์ร้อยละการผลิต (EY) ประสิทธิภาพในการกักเก็บ (EE) สมบัติการต้านออกซิเดชัน หมู่ฟังก์ชัน (ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี, FTIR) และโครงสร้างจุลภาค (ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด, SEM) ของไมโครแคปซูล พบว่าไมโครแคปซูลที่เตรียมโดยใช้สารเคลือบ GEL ร่วมกับ GAB ให้ผลที่ดีที่สุด นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ FTIR ยืนยันว่าเกิดอันตรกิริยาระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 3 ชนิดกับ GEL และสารเคลือบทั้งหมดไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำมันหอมระเหยที่กักเก็บภายใน จากนั้นศึกษาปัจจัยของ pH (3.20-4.20) อัตราส่วนของโปรตีนต่อพอลิแซ็กคาไรด์ (GEL:GAB; 1.00-2.00) และอัตราส่วนระหว่างสารเคลือบต่อน้ำมันหอมระเหย (wall:core; 1.00-5.00) ที่ส่งผลต่อค่า EY และ EE ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขวนมีดังนี้ pH เท่ากับ 4.00 GEL:GAB เท่ากับ 1.55 และ wall:core เท่ากับ 2.50 อีกทั้งไมโครแคปซูลที่เตรียมขึ้นโดยใช้ภาวะดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาสารระเหยดีมาก

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5872134423 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD: Antioxidant activity, Complex coacervation, Encapsulation, Flavor retention,  
Response surface, *Zanthoxylum limonella* Alston

Jirapat Boonying : MAINTENANCE OF FUNCTIONALITIES OF MA-KWAEN *Zanthoxylum limonella* Alston ESSENTIAL OIL IN MICROCAPSULE BY COMPLEX COACERVATION . Advisor: Assoc. Prof. Ninnart Chinprahast, Ph.D. Co-advisor: Asst. Prof. Inthawoot Suppavorasatit, Ph.D.

Ma-kwaen (*Zanthoxylum limonella* Alston) is widely spread in the Northern part of Thailand. Its fruit has been traditionally used in food and commercialized as a spice. D-limonene, alpha-phellandrene and alpha-pinene are the main compounds in ma-kwaen essential oil, which possesses smell of oranges and contributes a strong antioxidant activity. However, essential oils undergo undesirable deterioration by heat, humidity, light, and oxygen. Hence, it is beneficial to protect or prolong degradation of volatile ingredients by microencapsulation. Complex coacervation is a phase separation process resulted from electrostatic interactions. Protein (polycation) and polysaccharide (polyanion) are the most widely used wall materials. The objective of this study was to optimize the microencapsulation process of ma-kwaen essential oil by complex coacervation. Samples were prepared using three different types of polysaccharide (alginate; ALG, gum arabic; GAB, and xanthan gum; XTG) together with gelatin (GEL). The resultant microcapsules were measured and analyzed for their encapsulation yield (EY), encapsulation efficiency (EE), antioxidant activities, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis and scanning electron microscope (SEM) characteristics. The result showed that GEL-GAB combination formed the superior coacervate complex. Moreover, FTIR confirmed complexation between the protein-polysaccharide wall materials and no chemical reaction between wall materials and essential oil. Then, the process parameters affecting the EY and EE, such as pH (3.20-4.20), the ratio of GEL to GAB (1.00-2.00) and wall material to core material mixing ratio (wall:core; 1.00-5.00) were optimized using response surface methodology (RSM). Conclusively, the optimum conditions were as follows: pH of 4.00, GEL:GAB of 1.55 and wall:core of 2.50. Flavor profiles of GEL-GAB microcapsule prepared by using optimal conditions showed very good preservation of the volatile compounds.

Field of Study: Food Technology

Student's Signature .....

Academic Year: 2018

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และทุนอุดหนุนงานวิจัย “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช” และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นินนาท ชินประห์ษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูงที่ให้แนวคิดงานวิจัย และคำแนะนำในด้านวิชาการ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลิตา บรมพิชัยชาติกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวรรณฯ สุภิมารส ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังให้คำแนะนำ การตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวก และการให้คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ต่าง ๆ

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติผู้ใหญ่ทุกท่าน ที่คอยห่วงใย เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จิระภัทร บุญยิ่ง

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 มะแขว่น (ma-kwaen).....	3
2.1.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์.....	3
2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของมะแขว่น.....	5
2.1.3 สมบัติการต้านออกซิเดชันของมะแขว่น.....	7
2.2 เอ็นแคปซูลชัน (encapsulation).....	9
2.3 คอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน (complex coacervation).....	11
2.3.1 กลไกการเกิดคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน.....	12
2.3.2 อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์.....	13
2.4 สารเคลือบที่ใช้ในวิธีคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน.....	15
2.4.1 เจลาติน (gelatin).....	16
2.4.2 แอลจีเนต (alginate).....	18
2.4.3 กัมอะราบิก (gum arabic).....	19
2.4.4 แซนแทนกัม (xanthan gum).....	20

2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อวิธีคอมเพล็กซ์โคแอสอร์เวชัน .....	21
2.5.1 pH.....	22
2.5.2 ความแรงไอออน (ionic strength) .....	23
2.5.3 อัตราส่วนของโปรตีนต่อพอลิแซ็กคาไรด์ .....	23
2.5.4 อัตราส่วนระหว่างสารสำคัญต่อสารเคลือบ .....	24
2.5.5 วิธีการทำแห้ง .....	24
2.6 การหาภาวะที่เหมาะสม .....	26
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย .....	28
3.1 วัตถุประสงค์ สารเคมี และอุปกรณ์ .....	28
3.1.1 วัตถุประสงค์ .....	28
3.1.2 สารเคมี.....	28
3.1.3 วัสดุ และอุปกรณ์.....	29
3.2 ขั้นตอน และวิธีการดำเนินงานวิจัย .....	31
3.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผลมะแขว่น.....	31
3.2.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น .....	31
3.2.3 การศึกษาชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะ แขว่น .....	32
3.2.3.1 การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของสารเคลือบ .....	32
3.2.3.2 การเตรียมไมโครแคปซูล .....	33
3.2.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น.....	34
บทที่ 4 ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง.....	38
4.1 องค์ประกอบโดยประมาณของผลมะแขว่นแห้ง .....	38
4.2 สารระเหย และสมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น.....	38
4.3 การศึกษาชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น .....	41



4.3.1 ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของสารเคลือบ .....	41
4.3.2 ผลของชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อร้อยละการผลิต และประสิทธิภาพในการกักเก็บ น้ำมันหอมระเหยของไมโครแคปซูล .....	43
4.3.3 ผลของชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยใน ไมโครแคปซูล.....	44
4.3.4 ผลของชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อหมู่ฟังก์ชันของไมโครแคปซูล .....	45
4.3.5 ผลของชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อโครงสร้างของไมโครแคปซูล.....	50
4.4 ภาวะที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น.....	52
4.5 สมบัติทางเคมี และกายภาพของไมโครแคปซูลที่เตรียมจากภาวะที่เหมาะสม.....	56
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	60
5.1 สรุปผลการทดลอง .....	60
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	61
บรรณานุกรม.....	62
ภาคผนวก.....	72
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ .....	73
ภาคผนวก ข ข้อมูลการทดลองเพิ่มเติม .....	93
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....	96
ประวัติผู้เขียน.....	102

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในมะแขว่น.....	6
ตารางที่ 2.2 ลักษณะไมโครแคปซูลที่เตรียมโดยเทคนิคเอ็นแคปซูลชันแบบต่าง ๆ .....	11
ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาตินจากหนังหมู.....	17
ตารางที่ 3.1 ภาวะที่ใช้เตรียมไมโครแคปซูล .....	34
ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น ..	35
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบโดยประมาณของผลมะแขว่นแห้ง.....	38
ตารางที่ 4.2 สารระเหยที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น.....	39
ตารางที่ 4.3 สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น .....	40
ตารางที่ 4.4 ค่า encapsulation yield (EY) และ encapsulation efficiency (EE) ของไมโครแคปซูล ที่เตรียมจากภาวะต่างกัน .....	53
ตารางที่ 4.5 p-value ของปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อ encapsulation yield (EY) และ encapsulation efficiency (EE) .....	54
ตารางที่ 4.6 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของไมโครแคปซูล GEL-GAB ที่ภาวะที่เหมาะสม.....	57
ตารางที่ 4.7 สารระเหยที่พบในน้ำมันหอมระเหยตั้งต้น (essential oil) และน้ำมันหอมระเหยที่กักเก็บในไมโครแคปซูล (encapsulated oil) .....	59
ตารางที่ ก.1 ค่า %inhibition ของ BHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ .....	84
ตารางที่ ข.1 ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของสารเคลือบ .....	93
ตารางที่ ข.2 ค่า encapsulation yield (EY) และ encapsulation efficiency (EE) ของไมโครแคปซูล .....	93
ตารางที่ ข.3 สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยในไมโครแคปซูลชนิดต่าง ๆ .....	93
ตารางที่ ค.1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับค่า EY.....	96
ตารางที่ ค.2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับค่า EE.....	96

ตารางที่ ค.3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับค่า DPPH .....	97
ตารางที่ ค.4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับค่า FRAP .....	97
ตารางที่ ค.5 ผลการวิเคราะห์ response surface regression ของค่า EY.....	97
ตารางที่ ค.6 ผลการวิเคราะห์ response surface regression ของค่า EE.....	99



## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 ต้นมะแขว่น.....	4
รูปที่ 2.2 ผล และเมล็ดของมะแขว่นแห้ง.....	4
รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารระเหย 10 ชนิดที่พบในมะแขว่น.....	7
รูปที่ 2.4 องค์ประกอบของไมโครแคปซูล.....	10
รูปที่ 2.5 รูปร่างของไมโครแคปซูล.....	11
รูปที่ 2.6 กลไกการเกิด complex coacervation.....	13
รูปที่ 2.7 พฤติกรรมของสารละลายผสม โปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์.....	13
รูปที่ 2.8 การเปลี่ยนแปลงประจุบนโปรตีน และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ pH ต่างกัน.....	14
รูปที่ 2.9 electrostatic interaction ระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์.....	15
รูปที่ 2.10 โครงสร้างของเจลาติน.....	16
รูปที่ 2.11 โครงสร้างของแอลจินตแบบต่าง ๆ.....	18
รูปที่ 2.12 โครงสร้างของกัมอะราบิก.....	20
รูปที่ 2.13 โครงสร้างของแซนแทนกัม.....	21
รูปที่ 2.14 โครงสร้างของไมโครแคปซูล nisin ผสมกับสารสกัดจาก avocado ที่ได้จากการทำแห้ง โดยใช้ freeze drying (a) และ spray drying (b).....	25
รูปที่ 2.15 โครงสร้างของไมโครแคปซูล paprika oleoresin ที่ได้จากการทำแห้งโดยใช้ freeze drying (a) และ spray drying (b).....	26
รูปที่ 4.1 ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของสารเคลือบ.....	42
รูปที่ 4.2 ค่า encapsulation yield (EY) และ encapsulation efficiency (EE) ของไมโครแคปซูล .....	43
รูปที่ 4.3 สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นในไมโครแคปซูล โดยวิธี DPPH radical scavenging activity (a) และ วิธี FRAP (b).....	44

รูปที่ 4.4 อินฟราเรดสเปกตรัมของ GEL (a), ALG (b), GEL-ALG (c), น้ำมันหอมระเหยตั้งต้น (d) และ น้ำมันหอมระเหยในไมโครแคปซูล (e).....	47
รูปที่ 4.5 อินฟราเรดสเปกตรัมของ GEL (a), GAB (b), GEL-GAB (c), น้ำมันหอมระเหยตั้งต้น (d) และ น้ำมันหอมระเหยในไมโครแคปซูล (e).....	48
รูปที่ 4.6 อินฟราเรดสเปกตรัมของ GEL (a), XTG (b), GEL-XTG (c), น้ำมันหอมระเหยตั้งต้น (d) และ น้ำมันหอมระเหยในไมโครแคปซูล (e).....	49
รูปที่ 4.7 โครงสร้างของไมโครแคปซูล GEL-ALG (x400; a และ x1,000; b), GEL-GAB (x1,000; c และ x2,500; d) และ GEL-XTG (x150; e และ x500; f).....	51
รูปที่ 4.8 surface (a) และ contour plot (b) จากสมการ encapsulation yield (GEL:GAB = 1.55).....	55
รูปที่ 4.9 surface (a) และ contour plot (b) จากสมการ encapsulation efficiency (GEL:GAB = 1.55).....	55
รูปที่ 4.10 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยต่อ encapsulation yield และ efficiency.....	56
รูปที่ 4.11 โครงสร้างของไมโครแคปซูล GEL-GAB ที่ภาวะที่เหมาะสม (pH=4.00, GEL:GAB=1.55 และ wall:core=2.50) ที่กำลังขยายของ SEM เท่ากับ x100 (a), x400 (b), x1,000 (c) และ x1,500 (d).....	57
รูปที่ ก.1 กราฟ %inhibition ของสารละลาย BHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	85
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP.....	87
รูปที่ ก.3 ตัวอย่างผลการทดลองที่ได้จากเครื่อง zetasizer.....	89
รูปที่ ข.1 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน n-alkanes.....	94
รูปที่ ข.2 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นตั้งต้น.....	94
รูปที่ ข.3 ภาพขยายของโครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นตั้งต้น.....	94
รูปที่ ข.4 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นในไมโครแคปซูล GEL-GAB.....	95
รูปที่ ข.5 ภาพขยายของโครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นในไมโครแคปซูล GEL-GAB.....	95
รูปที่ ค.1 กราฟการแจกแจงความน่าจะเป็นแบบปกติของค่า EY.....	101

รูปที่ ค.2 กราฟการแจกแจงความน่าจะเป็นแบบปกติของค่า EE..... 101



# บทที่ 1

## บทนำ

มะแขว่น (ma-kwaen) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zanthoxylum limonella* Alston พบกระจายอยู่ในประเทศไทยโดยเฉพาะในภาคเหนือ นิยมใช้เป็นเครื่องเทศชุกกลิ่นรสในอาหารพื้นเมือง เช่น ลาบ ยำ และแกงต่าง ๆ เพื่อช่วยให้อาหารมีกลิ่นหอมน่ารับประทาน สามารถใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรค เช่น ฟันผุ โรคหัวใจ โรคทางเดินหายใจ โรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร และโรคปวดข้อ (Supabphol และ Tangjitjaroenkun, 2014) D-limonene เป็นสารประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น มีกลิ่นคล้ายส้ม และยังมีสมบัติการต้านออกซิเดชันของไขมันอีกด้วย (Charoensup และคณะ, 2016) อย่างไรก็ตามสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั่วไปถูกทำลายได้โดย ความร้อน ความชื้น แสง และออกซิเจน (Edris และ Bergnstahl, 2001) จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่า เอ็นแคปซูลเลชัน (encapsulation) ด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน (complex coacervation) น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมในการป้องกันน้ำมันหอมระเหยจากการถูกทำลายโดยปัจจัยภายนอกต่าง ๆ ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการปกป้องสารสำคัญเหล่านี้

เอ็นแคปซูลเลชัน เป็นกระบวนการของการกักเก็บที่สารสำคัญถูกเคลือบหรือห่อหุ้มด้วยสารชนิดอื่น โดยสารที่ถูกเคลือบ (coated) หรือ ถูกยึดจับไว้ (entrapped) ส่วนใหญ่จะเป็นของเหลว แต่บางครั้งอาจเป็นอนุภาคของแข็ง หรือแก๊ส เรียกชื่อว่า core material หรือ internal phase ส่วนสารที่นำมาเคลือบหรือใช้ห่อหุ้มจะเรียกว่า wall material, carrier, membrane, shell หรือ coating (Madene และคณะ, 2006) ซึ่งวิธีนี้มักใช้กักเก็บ กรดอะมิโน วิตามิน แร่ธาตุ สารต้านออกซิเดชัน สารให้สี สารปรุงแต่งกลิ่นรส เอนไซม์ และน้ำมันหอมระเหย เพื่อลดการสูญเสียในระหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร (Deladino และคณะ, 2008)

วิธีคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน เป็นหนึ่งในวิธีการกักเก็บสารที่นิยมใช้ โดยเกิดขึ้นผ่านอันตรกิริยาระหว่างประจุที่แตกต่างกันของสารละลายพอลิเมอร์ ส่งผลให้เกิดชั้นที่แยกออกจากกัน 2 ชั้น ได้แก่ ชั้น polymer-poor continuous phase และชั้น polymer-rich dense phase (coacervate phase) ซึ่งเป็นชั้นของสารเคลือบ ทั้งนี้นิยมใช้โปรตีน และพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นสารเคลือบเนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักในอาหาร ช่วยให้โครงสร้าง เนื้อสัมผัส และเสถียรภาพกับอาหาร จึงเอื้อต่อการนำไมโครแคปซูลไปประยุกต์ใช้ด้วยกัน ในการทำคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชันนั้น จะใช้โปรตีน เช่น เจลาติน โปรตีนถั่วเหลือง เคซีน เวย์โปรตีน และแอลบูมิน เป็นสารให้ประจุบวก

(polycation) และใช้พอลิแซ็กคาไรด์ เช่น กัมอะราบิก เพกทิน แอลจินेट คาราจีแนน และกัวร์กัม เป็นสารให้ประจุลบ (polyanion) (Yan และ Zhang, 2014)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจาก มะแขว่นในไมโครแคปซูล และวิเคราะห์สมบัติทางเคมี และกายภาพของไมโครแคปซูลที่ได้





## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

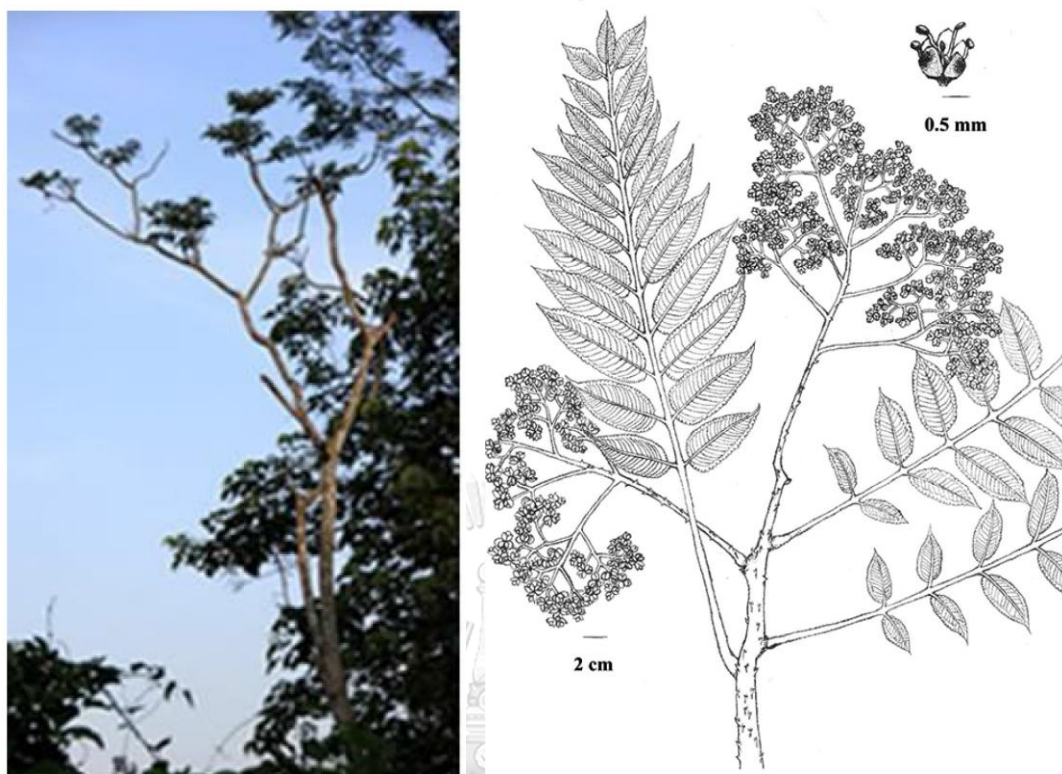
#### 2.1 มะแขว่น (ma-kwaen)

##### 2.1.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

อนุกรมวิธานของมะแขว่น (taxonomy of ma-kwaen) (Arun และ Paridhavi, 2011) มีข้อมูลดังนี้

Domain:	Eukaryota
Kingdom:	Plantae
Subkingdom:	Viridaeplantae
Phylum:	Tracheophyta
Subphylum:	Euphyllophytina
Infraphylum:	Radiatopses
Class:	Magnoliopsida
Subclass:	Rosidae
Superorder:	Rutanae
Order:	Rutales
Suborder:	Rutineae
Family:	Rutaceae
Genus:	<i>Zanthoxylum</i>
Specific epithet:	<i>limonella</i> (Dennst.) Alston
Botanical name:	<i>Zanthoxylum limonella</i> (Dennst.) Alston

มะแขว่นมีชื่อท้องถิ่นว่าพริกหอม เป็นไม้ผลยืนต้นไม่ผลัดใบ (evergreen tree) ขนาดใหญ่ สูงประมาณ 35-50 เมตร มีหนามตามลำต้นขนาด 2-3 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1) ใบมีลักษณะยาวเรียว ปลายใบแหลม ก้านดอกยาว ดอกมีสีขาวขนาดเล็ก เป็นดอกไม้สมบูรณ์เพศ โดยดอกตัวผู้ และดอกตัวเมียจะอยู่คนละต้นกัน ออกดอกประมาณเดือนมีนาคม ผลมีลักษณะกลม เป็นผลเดี่ยว (hesperidium, รูปที่ 2.2) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เมื่อแก่ผลจะแตกจนเห็นเมล็ดสีดำกลม ผิวเรียบเป็นมัน มีกลิ่นหอม (Charoensup และคณะ, 2016)



รูปที่ 2.1 ต้นมะแขว่น

ที่มา: Supabphol และ Tangitjaroenkun (2014) และ Charoensup และคณะ (2016)



รูปที่ 2.2 ผล และเมล็ดของมะแขว่นแห้ง

ที่มา: Charoensup และคณะ (2016)

มะแขว่นเป็นพืชที่พบในแถบจังหวัดภาคเหนือตอนบน ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง ลำพูน พะเยา แพร่ รวมทั้งในเขตพื้นที่จังหวัดน่าน ซึ่งพบมากในอำเภอสองแคว อำเภอปัว และอำเภอนาหมื่น ฤดูกาลเก็บจะเริ่มในช่วงต้นเดือนพฤศจิกายน และจะสิ้นสุดช่วงต้นเดือนธันวาคมของทุกปี โดยปกติทางภาคเหนือนิยมใช้มะแขว่นเป็นเครื่องเทศชุกกลิ่นรสในอาหารพื้นเมือง เช่น ลาบ ยำ และแกงต่าง ๆ เพื่อช่วยให้อาหารมีกลิ่นหอมน่ารับประทาน (Wongsrissom และคณะ, 2014) สามารถใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรค เช่น ฟันผุ โรคหัวใจ โรคทางเดินหายใจ โรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร และโรคปวดข้อ (Supabphol และ Tangjitjaroenkun, 2014)

### 2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของมะแขว่น

มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่าง ๆ ของมะแขว่น แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของสารเคมีที่พบ เช่น secondary metabolites, alkaloids, aromatic amides, aliphatic amides, terpenes, sterols, phenylpropanoid-lignans และ coumarins ดังแสดงในตารางที่ 2.1

Tangjitjaroenkun และคณะ (2012a) วิเคราะห์สารพฤกษเคมีในสารสกัดจากลำต้นมะแขว่น โดยใช้ dichloromethane เป็นตัวทำละลาย ด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, chromatography และ melting points พบสาร limonellone, (-)-asarinin, dihydroalatomide, (-)-tembamide, dictamnine และ N-nornitidine ส่วนสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากเปลือกลำต้นที่ใช้ ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR พบสาร lupeol, xanthoxyletin, osthol, scopoletin และ rutaecapine (Somanabandhu และคณะ, 1992)

ผลมะแขว่นมีกลิ่นหอมคล้ายพืชตระกูลส้ม โดยสารระเหยที่พบส่วนมากอยู่ในกลุ่ม monoterpene ซึ่งสารเหล่านี้บรรจุอยู่ที่เนื้อเยื่อพืช (pericarp) และน้ำมันหอมระเหยในเมล็ด Itthipanichpong และคณะ (2002) สกัดน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบสารประกอบทั้งสิ้น 33 ชนิด โดยสารประกอบหลักที่พบคือ limonene (1), terpinen-4-ol (2) และ sabinene (3) โดยมีปริมาณ 31.1, 13.9 และ 9.1% ตามลำดับ (รูปที่ 2.3)

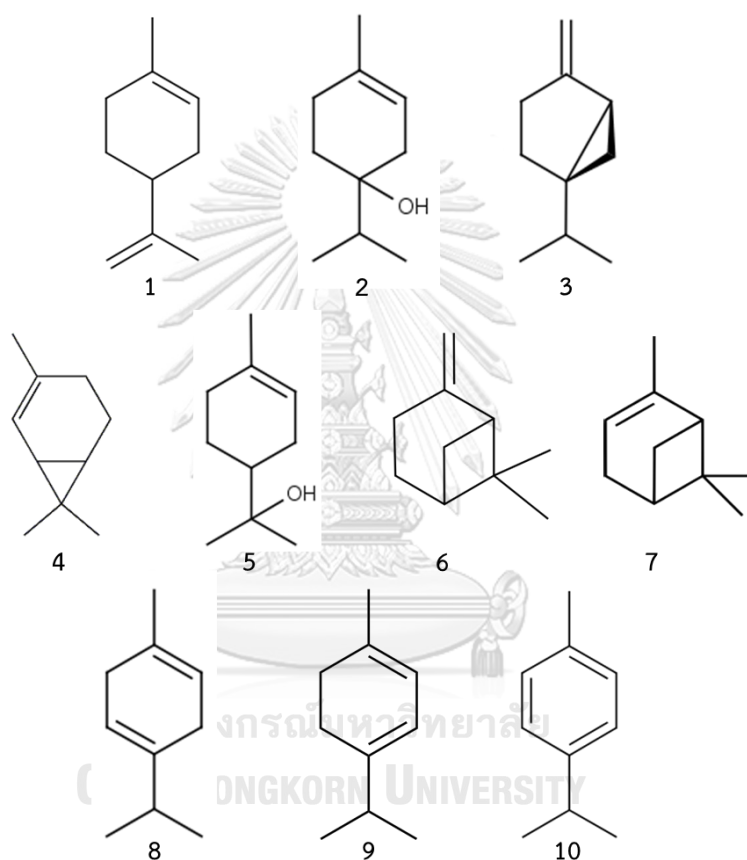
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในมะแขว่น

Plant part	Compound	Chemical category	Reference
ลำต้น	limonellone	quinolone alkaloid	(Tangitjaroenkun และคณะ, 2012a)
(Stem)	(-)-asarinin	lignan	(Tangitjaroenkun และคณะ, 2012a)
	dihydroalatomide	aromatic amide	(Tangitjaroenkun และคณะ, 2012a)
	(-)-tembamide	aromatic amide	(Tangitjaroenkun และคณะ, 2012a)
	dictamnine	furoquinoline alkaloid	(Tangitjaroenkun และคณะ, 2012a)
	n-nornitidine	benzophenanthridine alkaloid	(Tangitjaroenkun และคณะ, 2012a)
	เปลือก	lupeol	triterpene
ลำต้น	xanthoxyletin	pyronocoumarin	(Somanabandhu และคณะ, 1992)
(Stem bark)	osthol	o-methylated coumarin	(Somanabandhu และคณะ, 1992)
	scopoletin	hydroxycoumarin	(Somanabandhu และคณะ, 1992)
	rutaecapine	quinazolinocarboline alkaloid	(Somanabandhu และคณะ, 1992)
ผล (Fruits)	xanthoxyline	phenolic compound	(Charoenying และคณะ, 2010)
	limonene	monoterpene	(Itthipanichpong และคณะ, 2002)
	terpinen-4-ol	monoterpene	(Itthipanichpong และคณะ, 2002)
	sabinene	monoterpene	(Itthipanichpong และคณะ, 2002)
	3-carene	monoterpene	(Tangitjaroenkun และคณะ, 2012b)
	$\alpha$ -terpineol	monoterpene alcohol	(Jirovetz และคณะ, 1998)
	$\beta$ -pinene	monoterpene	(Jirovetz และคณะ, 1998)
	$\alpha$ -pinene	monoterpene	(Jirovetz และคณะ, 1998)
	$\gamma$ -terpinene	monoterpene	(Jirovetz และคณะ, 1998)
	$\alpha$ -terpinene	monoterpene	(Jirovetz และคณะ, 1998)
<i>p</i> -cymene	alkylbenzene	(Jirovetz และคณะ, 1998)	

ที่มา: ดัดแปลงจาก Supabphol และ Tangitjaroenkun (2014)

Tangitjaroenkun และคณะ (2012b) ศึกษาสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น พบว่า ส่วนใหญ่คือ monoterpene hydrocarbons (88.34%) รองลงมาคือ oxygenated monoterpene (8.26%) และ sesquiterpenoids (1.4%) ซึ่งสารประกอบหลักที่พบคือ sabinene (42.73%), limonene (39.05%), terpinen-4-ol (5.40%) และ 3-carene (**4**) (2.70%) (รูปที่ 2.3) นอกจากนี้ Jirovetz และคณะ (1998) ยังได้ศึกษาสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจาก

มะแขว่นทางตอนใต้ของประเทศอินเดียพบสารประกอบอื่น ๆ เพิ่มเติม ได้แก่ sabinene (47.12%), alpha-terpineol (**5**) (7.73%), terpinen-4-ol (6.61%), beta-pinene (**6**) (5.99%), limonene (4.06%), alpha-pinene (**7**) (3.87%), gamma-terpinene (**8**) (3.64%), alpha-terpinene (**9**) (3.45%) และ para-cymene (**10**) (3.08%) (รูปที่ 2.3) จากความแตกต่างของปริมาณสารประกอบที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าแหล่งที่ปลูก สภาพแวดล้อม สภาพภูมิประเทศส่งผลต่อความหลากหลายของสารประกอบที่พบภายในมะแขว่นอีกด้วย



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารระเหย 10 ชนิดที่พบในมะแขว่น

ที่มา: Supabphol และ Tangjitjaroenkun (2014)

### 2.1.3 สมบัติการต้านออกซิเดชันของมะแขว่น

อนุมูลอิสระ (free radicals) หรือ สารออกซิแดนท์ (oxidants) ที่เกี่ยวข้องกับร่างกายมนุษย์ ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ไวต่อปฏิกิริยากับออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) และไนโตรเจน (reactive nitrogen species, RNS) เช่น superoxide anion, hydroxyl radical และ hydrogen peroxide ซึ่งว่องไวต่อการทำปฏิกิริยามากเนื่องจากมี unpaired electrons บนโมเลกุล สามารถไป

ทำลายเซลล์ในร่างกาย DNA รวมทั้งเข้าทำปฏิกิริยากับสารสำคัญในร่างกายได้ จึงเป็นต้นเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ และมะเร็ง เป็นต้น (Ali และคณะ, 2008) รวมทั้งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดเสื่อมเสียของอาหาร (oxidative deterioration) จากการเกิดออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัวทำให้เกิดสี และกลิ่นรสไม่พึงประสงค์ (off-flavor) ที่ทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับ

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) คือสารที่สามารถชะลอหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อะตอมของไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer, HAT) หรือให้อิเล็กตรอน (single electron transfer, SET) เพื่อเพิ่มเสถียรภาพให้กับอนุมูลอิสระ ลดความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ (Gordon, 2001) สารต้านออกซิเดชันสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ในร่างกาย หรือได้รับจากอาหารโดยเฉพาะ ผัก ผลไม้ สมุนไพร และถั่ว ซึ่งพืชสามารถผลิตสารต้านออกซิเดชันได้อย่างหลากหลาย

วิธีวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันที่นิยมใช้ ได้แก่ วิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging และวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ซึ่งวิธีแรกเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว โดยใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นสารที่สามารถรับอิเล็กตรอนหรืออะตอมของไฮโดรเจนได้ โดย DPPH• เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายที่ได้มีสีม่วงเข้ม ทั้งนี้ DPPH• จะเกิดปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชัน (AH) ดังนี้



เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชัน สีของสารละลายสีม่วงจะจางลง ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงจะลดลงมาก ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ก็จะลดลงมากเช่นกัน วิธีวิเคราะห์นี้ถูกรายงานครั้งแรกโดย Brand-Williams และคณะ (1995) โดยวัดปริมาณ DPPH ที่ลดลง ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันที่ใช้เป็นมาตรฐานคือ butylated hydroxytoluene (BHT) การแสดงผลนิยมรายงานเป็นค่า 50% inhibitory concentration of DPPH radical (IC<sub>50</sub>) ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH• ลดลงไป 50% โดยค่า IC<sub>50</sub> ต้องมีค่าต่ำกว่า 100 mg/mL จึงจะถือว่ามียุทธภัณฑ์ต้านออกซิเดชัน

ส่วนวิธี FRAP เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Benzie และ Strain (1996) เป็นวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็วและง่าย โดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method โดยที่ ferric tripyridyltriazine (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) complex จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านออกซิเดชัน ทำให้

ได้  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ complex ซึ่งมีสีน้ำเงิน สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร แล้วเทียบกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐานคือ  $\text{FeSO}_4$  หรือ Trolox แสดงฤทธิ์การต้านออกซิเดชันเป็นค่า FRAP value ( $\text{Fe(II)/g}$ ) หรือ mg Trolox/g

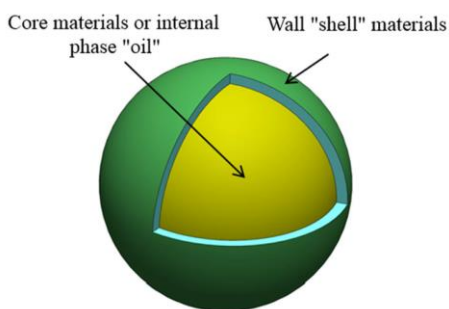
Tangjitjaroenkun และคณะ (2012c) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น (EO) และสารสกัดจากลำต้นโดยใช้ dichloromethane (SD) และ methanol (SM) เป็นตัวทำละลาย ด้วยวิธี DPPH radical scavenging และวิธี trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) เมื่อพิจารณาจากวิธี DPPH ได้ค่า  $\text{IC}_{50}$  ของตัวอย่าง EO, SD และ SM ประมาณ 5.76, 0.12 และ 0.05 mg/mL ตามลำดับ ส่วน TEAC ของตัวอย่างทั้งสามมีค่า 7.05, 14.34 และ 15.47  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ ดังนั้นประสิทธิภาพของการต้านออกซิเดชันเรียงลำดับได้ดังนี้  $\text{SM} > \text{SD} > \text{EO}$  นอกจากนี้ Nanasombat และ Wimuttigosol (2011) วิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น ทั้งสิ้น 4 วิธี ได้ค่าดังนี้  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 5.66 mg/mL (วิธี DPPH radical scavenging), 66.16% (วิธี  $\beta$ -carotene bleaching test), 0.26 mM/mg (วิธี FRAP) และ 79.07% (วิธี superoxide anion scavenging activity)

อย่างไรก็ตาม D-limonene และสารออกฤทธิ์สำคัญอื่น ๆ ซึ่งมีสมบัติการต้านออกซิเดชันของไขมัน ที่พบในน้ำมันหอมระเหย ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน ความชื้น แสง และออกซิเจน หากไม่ได้รับการปกป้องจากสิ่งแวดล้อมภายนอก จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่าวิธีเอ็นแคปซูลชันสามารถเพิ่มเสถียรภาพ และป้องกันน้ำมันหอมระเหยจากการถูกทำลายโดยปัจจัยภายนอกต่าง ๆ ได้ (Asbahani และคณะ, 2015)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 2.2 เอ็นแคปซูลชัน (encapsulation)

เอ็นแคปซูลชัน หรือไมโครเอ็นแคปซูลชัน เป็นกระบวนการกักเก็บที่สารสำคัญถูกเคลือบหรือห่อหุ้มด้วยสารชนิดอื่น (รูปที่ 2.4) โดยสารที่ถูกเคลือบ (coated) หรือ ถูกยัดจับไว้ (entrapped) ส่วนใหญ่จะเป็น ของเหลว แต่บางครั้งอาจเป็นอนุภาคของแข็ง หรือแก๊ส เรียกชื่อว่า core material หรือ internal phase ส่วนสารที่นำมาเคลือบ หรือใช้ห่อหุ้มจะเรียกว่า wall material, carrier, membrane, shell หรือ coating (Madene และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.4 องค์ประกอบของไมโครแคปซูล

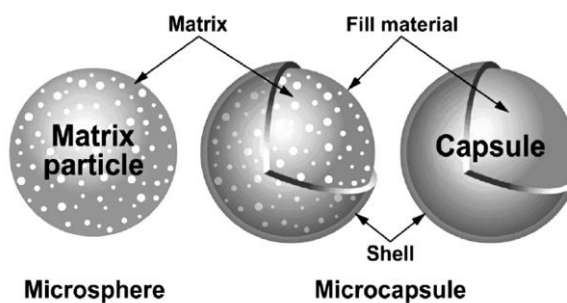
ที่มา: Bakry และคณะ (2016)

มีการประยุกต์ใช้เทคนิคเอ็นแคปซูลชันในหลากหลายอุตสาหกรรม เช่น อาหาร การเกษตร เกษษกรรม และเคมี เหตุผลหลักที่เลือกใช้เทคนิคนี้คือการปกป้องสารสำคัญไม่ให้ถูกทำลายโดยภาวะแวดล้อม เช่น ความร้อน ความชื้น แสง และออกซิเจน ทำให้ช่วยยืดอายุการเก็บรักษา ในบางครั้งเทคนิคนี้ยังช่วยกลบกลิ่น รส และสีที่ไม่ต้องการ และยังสามารถลดอันตรกิริยาที่อาจเกิดขึ้นระหว่างสารสำคัญด้วยกันเอง หรือสารสำคัญกับองค์ประกอบในอาหารได้อีกด้วย เหตุผลสุดท้ายคือการช่วยควบคุมการปลดปล่อยสารภายใต้ภาวะที่ต้องการ (การละลาย อุณหภูมิ และ pH) (Sobel และคณะ, 2014)

ไมโครแคปซูลแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ microcapsule และ microsphere หรือ multinuclear (รูปที่ 2.5) ตามความแตกต่างของรูปร่าง และโครงสร้าง ซึ่งขึ้นอยู่กับเทคนิคที่ใช้เตรียม microcapsule ซึ่งมีโครงสร้างของ shell ที่ห่อหุ้ม core ได้ชัดเจนและสมบูรณ์ มักเกิดขึ้นโดยใช้เทคนิคทางเคมี เช่น coacervation, liposomes และ inclusion ส่วน microsphere นั้น core จะกระจายตัวไปใน shell matrix ซึ่งเกิดขึ้นโดยใช้เทคนิคทางกล เช่น spray drying, spray cooling/chilling, spinning disk, extrusion และ fluidized bed (Oxley, 2014) ทั้งนี้เทคนิคที่ต่างกันยังส่งผลให้ขนาดของไมโครแคปซูล และปริมาณการกักเก็บสารสำคัญ (payload) แตกต่างกันอีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.2

วิธีเอ็นแคปซูลชันที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ วิธีทางกลด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย เนื่องจากราคาถูก ได้ผลผลิตมาก ประยุกต์ใช้ได้ง่ายในอุตสาหกรรม แต่เก็บรักษาสารสำคัญได้ไม่ดี และไม่เหมาะสมกับสารที่สูญเสียได้ง่ายด้วยความร้อน จึงมีการประยุกต์ใช้วิธีทางเคมีเพิ่มมากขึ้น ซึ่งวิธีที่นิยมคือ คอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน (complex coacervation) (Madene และคณะ, 2006)





รูปที่ 2.5 รูปร่างของไมโครแคปซูล

ที่มา: Oxley (2014)

ตารางที่ 2.2 ลักษณะไมโครแคปซูลที่เตรียมโดยเทคนิคเอ็นแคปซูลชันแบบต่าง ๆ

Encapsulation method	Particle size ( $\mu\text{m}$ )	Payload (%)	Surface oil	Bioavailability
Simple coacervation	20–200	<60	Lower	High
Complex coacervation	5–200	70–90	Lowest	High
Spray drying	1–50	<40	High	Medium
Freeze drying	1–100	<40	High	Medium
Liposome	0.1–1	Low	NA	High
Spray chilling	20–200	10–20	NA	NA
Extrusion	200–2000	6–20	Low	NA
Fluidised bed	>100	60–90	NA	High

NA คือ not available

ที่มา: ดัดแปลงจาก Barrow และคณะ (2013)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 2.3 คอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน (complex coacervation)

คำว่า “coacervation” หมายถึงการแบ่งแยกของเหลวในระบบคอลลอยด์ออกเป็น 2 เฟส (IUPAC, 1997) เทคนิคนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ simple และ complex coacervation ขึ้นอยู่กับจำนวนพอลิเมอร์ที่เกี่ยวข้อง

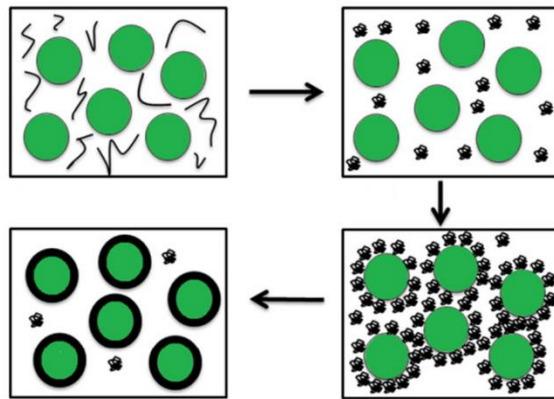
simple coacervation จะใช้พอลิเมอร์เพียงชนิดเดียวเป็นสารเคลือบ ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลประกอบด้วย ค่า pH ค่าความแรงไอออน (ionic strength) อุณหภูมิ และโครงสร้างของพอลิเมอร์ เช่นการใช้เจลาตินเป็นสารเคลือบ จะต้องปรับ pH ให้ใกล้เคียงกับค่า isoelectric point ของเจลาติน ทำให้ประจุบนโมเลกุลสมดุล และตกตะกอนได้เป็นไมโครแคปซูล (Schmitt และ Turgeon, 2011)

complex coacervation จะใช้พอลิเมอร์มากกว่าหนึ่งชนิด เพื่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่าง ประจุที่แตกต่างกันของสารละลายพอลิเมอร์ ส่งผลให้เกิดชั้นที่แยกออกจากกัน 2 ชั้น ได้แก่ ชั้น polymer-poor continuous phase และชั้น polymer-rich dense phase (coacervate phase) ซึ่งเป็นชั้นของสารเคลือบ ทั้งนี้นิยมใช้โปรตีนเป็นสารให้ประจุบวก (polycation) และพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นสารให้ประจุลบ (polyanion) เนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักในอาหาร ช่วยให้โครงสร้าง เนื้อสัมผัส และเสถียรภาพกับอาหาร จึงเอื้อต่อการนำไมโครแคปซูลไปประยุกต์ใช้ด้วยกัน (Souza และ คณะ, 2013)

ข้อดีของวิธีคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชันในการปกป้องสารสำคัญคือ โดยทั่วไปภาวะในการเตรียมไม่รุนแรง ระดับการบรรจุสารสำคัญ (core loading level) อาจสูงถึงร้อยละ 99 มีชั้นห่อหุ้มที่สมบูรณ์ ประสิทธิภาพการกักเก็บสูง ป้องกันการถูกทำลายด้วยออกซิเจนได้ดี และสามารถควบคุม การปลดปล่อยสารสำคัญได้ดีมาก อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ค่อนข้างซับซ้อน ใช้เวลานาน และมีต้นทุนการผลิตสูง (Gouin, 2004; Barrow และคณะ, 2013; Yan และ Zhang, 2014)

### 2.3.1 กลไกการเกิดคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน

กลไกการเกิดคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชันมีทั้งสิ้น 3 ขั้นตอนหลัก ดังรูปที่ 2.6 คือ การสร้างอิมัลชัน การเกิดโคแอเซอร์เวชัน และการสร้างชั้นห่อหุ้ม โดยการอธิบายกลไกนี้จะใช้ตัวอย่างของ โปรตีนเจลาตินผสมกับกัมอะราบิกเป็นสารห่อหุ้มหรือสารเคลือบ ขั้นตอนแรก คือการสร้างอิมัลชัน โดยเติมสารสำคัญที่ต้องการกักเก็บลงในสารละลายเจลาติน กวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 45-50 °C โปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ เนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่ให้คุณสมบัติ amphoteric จะเคลื่อนที่มาล้อมรอบสารสำคัญเพื่อสร้างเสถียรภาพให้ระบบอิมัลชัน ขั้นตอนต่อมา เติมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ จากนั้นปรับ pH เพื่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุของสารประกอบทั้งสองชนิดแล้วเกิดปรากฏการณ์คอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชันขึ้น และขั้นตอนสุดท้าย คือการสร้างชั้นห่อหุ้ม (outer-shell) โดยการลดอุณหภูมิของสารละลายให้ต่ำกว่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิด เจลของเจลาติน และนำไปทำแห้งจะได้ไมโครแคปซูลที่ต้องการ (Thies, 2007) ดังนั้นกลไกสำคัญที่จะทำให้เกิดการสร้างชั้นห่อหุ้ม ก็คืออันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์ (protein-polysaccharide interaction)

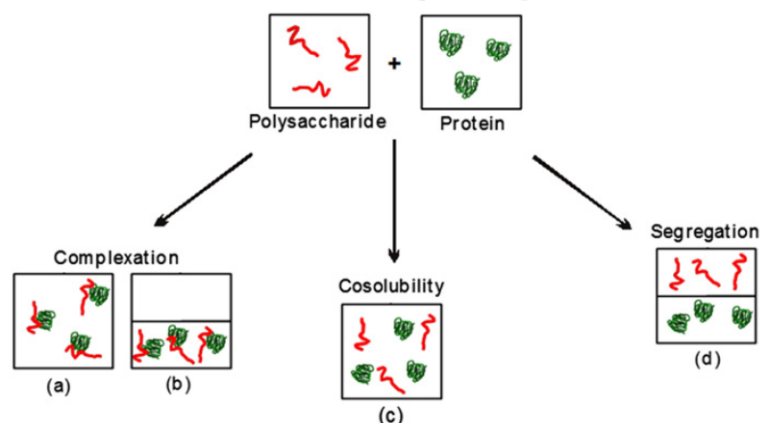


รูปที่ 2.6 กลไกการเกิด complex coacervation

ที่มา: Bakry และคณะ (2016)

### 2.3.2 อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์

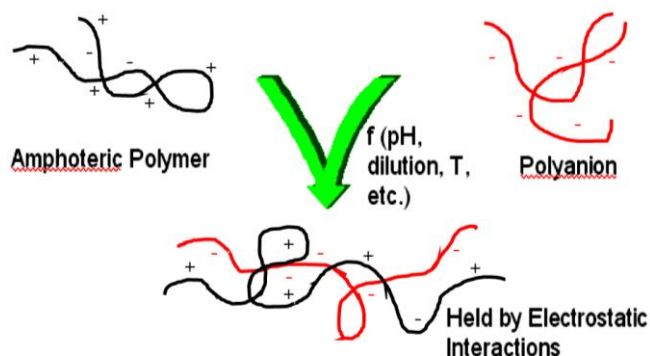
Rodríguez Patino และ Pilosof (2011) อธิบายพฤติกรรมของสารละลายผสมของโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์ไว้ดังรูปที่ 2.7 ในสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ พอลิเมอร์ทั้งสองจะละลาย และมีเสถียรภาพ เรียกว่ามี co-solubility (รูปที่ 2.7c) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ อาจทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์แล้วรวมตัวกันเป็น soluble หรือ insoluble complex (รูปที่ 2.7a และ b) หรือเกิดการแยกตัวกัน (รูปที่ 2.7d) โดย insoluble complex จะก่อให้เกิดการแยกของระบบคอลลอยด์ออกเป็น 2 เฟส ซึ่งเป็นปรากฏการณ์โคเอเซอร์เวชัน (Schmitt และคณะ, 1998)



รูปที่ 2.7 พฤติกรรมของสารละลายผสม โปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์

ที่มา: Rodríguez Patino และ Pilosof (2011)





รูปที่ 2.9 electrostatic interaction ระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ghosh และ Bandyopadhyay (2012)

#### 2.4 สารเคลือบที่ใช้ในวิธีคอมเพล็กซ์โคแอสอร์เวชัน

Madene และคณะ (2006) และ Vasisht (2014) ระบุสมบัติของสารเคลือบที่จะนำมาใช้ในกระบวนการไว้ดังนี้

- จัดอยู่ในกลุ่ม generally recognized as safe (GRAS) หรือเป็นวัตถุเจือปนอาหารที่ผ่านการรับรองจาก US Food and Drug Administration (FDA)
- ป้องกันการซึมผ่านได้ดี
- มีสมบัติการเกิดฟิล์มที่ดี
- ไม่ทำปฏิกิริยากับสารสำคัญ
- ควบคุมการปลดปล่อยสารในภาวะที่ต้องการได้ดี

สารเคลือบส่งผลต่อเสถียรภาพของไมโครแคปซูล ประสิทธิภาพการกักเก็บ และการปกป้องสารสำคัญ รวมทั้งการควบคุมการปลดปล่อยสาร (Nesterenko และคณะ, 2013) ดังนั้นการเลือกสารเคลือบที่เหมาะสมจึงมีบทบาทสำคัญต่อเทคนิคคอมเพล็กซ์โคแอสอร์เวชัน โดยโปรตีน และพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นกลุ่มของสารเคลือบที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ราคาถูก และได้รับการรับรองเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (Souza และคณะ, 2013)

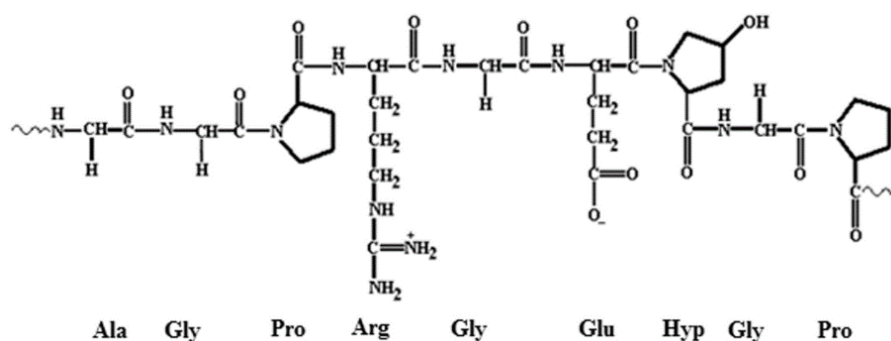
โปรตีนเป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ แบ่งตามลักษณะโครงสร้างออกได้เป็น 2 ประเภทคือ โปรตีนเส้นใย (fibrous protein) และโปรตีนก้อน (globular protein) ขึ้นอยู่กับการเรียงตัวของกรดอะมิโน และภาวะของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความดัน ตัวทำละลาย และค่า pH เป็นต้น (Matalanis และคณะ, 2011) จากที่กล่าวข้างต้น โปรตีนทุกตัวมีคุณสมบัติ amphoteric ซึ่งค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) เปลี่ยนแปลงไปตามค่า pH โดยจะเป็น

กลางที่จุด  $pI$  และมีค่าประจุเป็นบวกและลบที่จุดต่ำกว่าและสูงกว่าค่า  $pI$  ตามลำดับ (Devi และคณะ, 2017) จึงเป็นผลดีต่อการเกิด electrostatic interaction ในระหว่างกระบวนการ โพรตีนที่นิยมใช้ได้แก่ เจลาติน โพรตีนถั่วเหลือง เคซีน เวย์โปรตีน และแอลบูมิน (Yan และ Zhang, 2014)

พอลิแซ็กคาไรด์มักแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ homo-polysaccharides และ heteropolysaccharides (Matalanis และคณะ, 2011) พอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติทางประจุคล้ายกับโปรตีน โดยประจุจะขึ้นกับ ionic groups ที่มี บางตัวให้ประจุลบ (anionic) เช่น กัมอะราบิก แอลจินต และ แชนแทนกัม เนื่องจากหมู่  $COOH$  ( $pK_a \approx 3.5$ ) เปลี่ยนเป็น  $COO^-$  ส่วนคาราจีแนนมีหมู่ซัลเฟต ซึ่ง  $SO_3H$  ( $pK_a \approx 2$ ) เปลี่ยนเป็น  $SO_3^-$  ที่  $pH$  สูงกว่าค่า  $pK_a$  ส่วนบางตัวให้ประจุบวก (cationic) เช่น ไคโตซาน ซึ่งมีหมู่เอมีโน  $NH_2$  ที่สามารถเปลี่ยนเป็น  $NH_3^+$  ได้ที่  $pH$  ต่ำกว่าค่า  $pK_a$  (ประมาณ 6.5) (Kizilay และคณะ, 2011; Yan และ Zhang, 2014)

#### 2.4.1 เจลาติน (gelatin)

เจลาติน (รูปที่ 2.10) เป็นโปรตีนที่นิยมใช้มากที่สุดสำหรับการทำคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน เนื่องจากมีคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ การเกิดเจล และมีการเชื่อมข้ามที่ตีมาก (Thies, 2007) โดยผลิตจากกระบวนการไฮโดรไลซิสของคอลลาเจนที่ได้จากหนัง เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หรือกระดูกของสัตว์ (Haug และ Draget, 2011) เจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ ชนิด A และ B ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิต โดยเจลาตินชนิด A ผลิตด้วยกระบวนการที่ใช้กรด เพื่อไฮโดรไลซ์คอลลาเจนที่มีการเชื่อมข้ามไม่มาก เช่น หนังหมู และหนังปลา ส่วนเจลาตินชนิด B ผลิตจากคอลลาเจนที่มีการเชื่อมข้ามสูง เช่น คอลลาเจนจากกระดูกวัว โดยใช้ด่าง ค่า  $pI$  ของ เจลาตินชนิด A และ B มีค่าเท่ากับ 6.0-9.0 และ 4.8-5.2 ตามลำดับ (Haug และ Draget, 2011; Meng และ Cloutier, 2014)



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของเจลาติน

ที่มา: Devi และคณะ (2017)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาตินจากหนังหมู

Amino acid	% mole
Aspartic acid	4.6
Hydroxyproline	9.1
Threonine	1.8
Serine	3.5
Glutamic acid	7.2
Proline	13.2
Glycine	33
Alanine	11.2
Valine	2.6
Cystine	0
Methionine	0.4
Isoleucine	1.0
Leucine	2.4
Tyrosine	0.3
Phenylalanine	1.4
Hydroxylysine	0.6
Lysine	2.7
Histidine	0.4
Arginine	4.9
Tryptophan	0

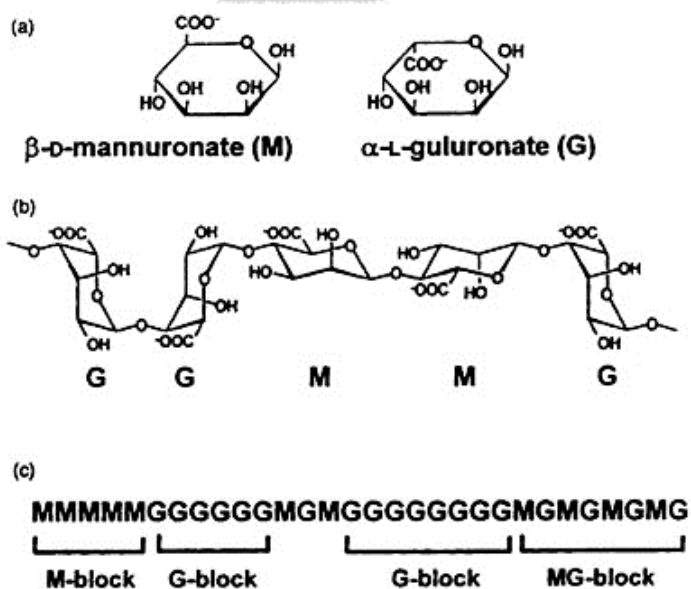
ที่มา: Zhou และคณะ (2006)

กรดอะมิโนส่วนใหญ่ที่พบในเจลาตินจากหนังหมู (ตารางที่ 2.3) คือ glycine (33%), proline (13.2%), alanine (11.2%) และ hydroxyproline (9.1%) รวมทั้งกรดอะมิโนที่แสดงประจุลบ คือ glutamic acid (7.2%), aspartic acid (4.6%) และกรดอะมิโนที่แสดงประจุบวกได้แก่ arginine (4.9%), lysine (2.7%), histidine (0.4%) และกรดอะมิโนอื่น ๆ (Zhou และคณะ, 2006)

## 2.4.2 แอลจีเนต (alginate)

แอลจีเนตเป็นสารที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล สายพันธุ์ที่นิยมใช้ได้แก่ *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* และ *Laminaria digitata* ปริมาณสารที่พบจะขึ้นกับฤดูกาล และแหล่งที่สาหร่ายเจริญเติบโต (Draget และคณะ, 2006; Brownlee และคณะ, 2009) โครงสร้างของแอลจีเนตเป็นพอลิเมอร์ไร้กิ่งก้าน (unbranched binary copolymer) ของ alginic acid ( $\alpha$ -L-guluronic acid; G และ 1,4- $\beta$ -D-manuronic acid; M) โมเลกุลประกอบด้วยบริเวณ homopolymeric ของ M และ G ที่เรียกว่า M- และ G-blocks ตามลำดับ และบางส่วนของโมเลกุลเป็น MG-blocks โดยมีปริมาณของ M และ G เรียงสลับเท่า ๆ กัน ดังรูปที่ 2.11 ค่า pKa ของหมู่คาร์บอกซิลของ G และ M ประมาณ 3.13 และ 3.21 ตามลำดับ (Wang และคณะ, 1991)

ขั้นตอนการผลิตแอลจีเนต เริ่มจากการแลกเปลี่ยนไอออนในน้ำทะเลที่ติดมากับสาหร่ายด้วยโปรตอน เพื่อให้ได้ alginic acid ที่บริสุทธิ์ จากนั้นทำให้เป็นกลางด้วยการแทนที่อะตอมของไฮโดรเจนด้วยโซเดียม เพื่อให้ได้แอลจีเนตที่สามารถละลายน้ำได้ (water-soluble sodium alginate salt) (Draget, 2009) เป็นที่รู้จักกันดีว่าแอลจีเนตมีคุณสมบัติการเกิดเจล ผ่านการเชื่อมของหมู่คาร์บอกซิลกับประจุบวก และสามารถเซตตัวเป็นเจลได้โดยไม่ต้องใช้ความร้อน จึงเหมาะต่อการนำมาใช้เป็นสารเคลือบสำหรับห่อหุ้มสารที่ละลายตัวได้ง่ายด้วยความร้อน (Burnside, 2014)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของแอลจีเนตแบบต่าง ๆ

Haworth conformation (a), chair conformation (b) และ symbolic representation (c)

ที่มา: Draget (2009)



Devi และคณะ (2012) ศึกษาการใช้สารเคลือบเจลาตินชนิด A ร่วมกับแอลจินेट เพื่อกักเก็บน้ำมันมะกอกด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชันพบว่าอัตราส่วนของเจลาตินต่อแอลจินेट และค่า pH ที่เหมาะสมคือ 3.5:1 และ 3.5-3.8 ตามลำดับ ไมโครแคปซูลที่ได้มีรูปทรงกลม ขนาดไม่สม่ำเสมอ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของพอลิเมอร์ และจากการวิเคราะห์ด้วย Fourier transform infrared spectroscopy ยืนยันว่ากระบวนการนี้ไม่พบการเกิดอันตรกิริยาระหว่างน้ำมันมะกอกกับสารเคลือบทั้งสองชนิด

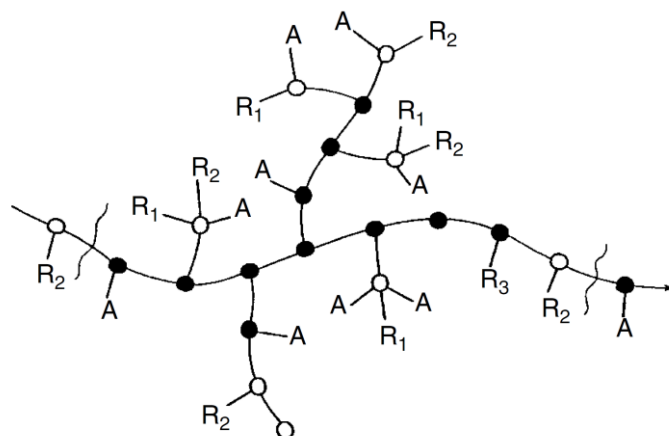
### 2.4.3 กัมอะราบิก (gum arabic)

กัมอะราบิกหรือกัมอะคาเซีย (gum acacia) เป็นยาง (exudate) ของพืชในวงศ์ Acacia โดยเฉพาะ *Acacia senegal* และ *Acacia seyal* เกิดขึ้นโดยการตัด หรือฉีกบางส่วนของเปลือก ลำต้นอย่างระมัดระวัง พืชจะผลิตน้ำยางออกมาจากปฏิกิริยาตอบสนองตามธรรมชาติเมื่อเนื้อเยื่อถูกทำลาย หรือเกิดความเครียดจากสิ่งแวดล้อม น้ำยางจะไหลเกาะกันเป็นก้อนอยู่ตามกิ่งก้านและลำต้นของพืช เมื่อกระทบกับความร้อนจากแสงแดด จะแข็งตัว และมีลักษณะใสคล้ายแก้ว จากนั้นเก็บก้อนยางที่ได้ คัดเกรด แล้วนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปอื่น ๆ เช่น บดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ หรือละลายแล้วทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นทำให้เป็นผงโดยการทำ spray หรือ roller drying (Williams และ Phillips, 2009)

โครงสร้างพื้นฐานของกัมอะราบิกประกอบด้วยน้ำตาล (galactose, arabinose และ rhamnose) glucuronic acid และกรดอะมิโน (hydroxyproline, serine, aspartic acid, leucine และ glycine) ดังรูปที่ 2.12 (Williams และ Phillips, 2009) พอลิเมอร์แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนคาร์โบไฮเดรต (arabinogalactan, 88%) ส่วนที่มีโปรตีนต่ำ (arabinogalactan-protein complex, 10%) และส่วนที่มีโปรตีนสูง (glycoprotein, 1%) (Nussinovitch, 2003)

โมเลกุลของ arabinogalactan ช่วยให้กัมอะราบิกมีคุณสมบัติการเกิดฟิล์ม ในขณะที่ส่วนโปรตีนโดยเฉพาะ glycoprotein ช่วยสร้างเสถียรภาพให้ระบบอิมัลชัน เนื่องจากกรดอะมิโนมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จึงสามารถฝังตัวในหยดน้ำมันแล้วหันส่วนที่มีประจุลบ จากการแตกตัวของ glucuronic acid ออกด้านนอก ทำให้เกิดแรงผลักระหว่างหยดน้ำมัน จึงป้องกันการเกิด coalescence ของหยดน้ำมันได้ นอกจากนี้กัมอะราบิกยังมีความสามารถในการละลายน้ำสูง มีความหนืดต่ำที่ความเข้มข้นประมาณ 25% และยังสามารถแสดงประจุลบที่ pH สูงกว่า 2.2 ได้ ดังนั้น

กัมอะราบิกจึงเป็นที่นิยมสำหรับนำมาใช้เป็นสารเคลือบ (Al-Assaf และ Phillips, 2009; Burnside, 2014)



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของกัมอะราบิก

(A คือ arabinosyl, ● คือ (1→3) galactopyranose, ○ คือ (1→6) galactopyranose หรือ glucopyranosyluronic acid, R<sub>1</sub> คือ rhamnose-1,4-glucose, R<sub>2</sub> คือ galactose-1,3-arabinose และ R<sub>3</sub> คือ arabinose-1,3-arabinose-1,3-arabinose)

ที่มา: Williams และ Phillips (2009)

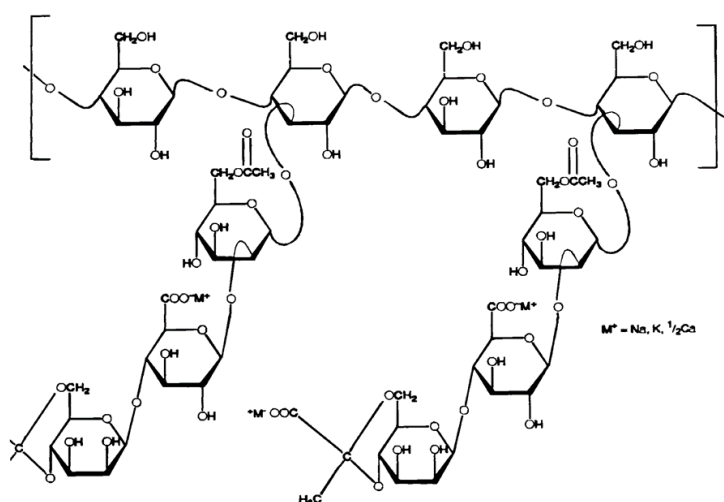
Junyaprasert และคณะ (2001) ศึกษาการกักเก็บ vitamin A palmitate ในน้ำมันข้าวโพด ด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน โดยใช้เจลาตินร่วมกับกัมอะราบิกเป็นสารเคลือบ พบว่าปริมาณการกักเก็บ vitamin A palmitate มากที่สุดที่อัตราส่วนเจลาตินต่อกัมอะราบิก และอัตราส่วนสารสำคัญต่อสารเคลือบเท่ากับ 1:1 และ 1:2 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการทำแห้งแบบ freeze drying ให้ลักษณะของไมโครแคปซูล และปริมาณการกักเก็บสารสูงกว่าแบบ air-drying และ hot air drying กระบวนการดังกล่าวนี้ช่วยเปลี่ยนวิตามินเอในรูปแบบน้ำมันให้กลายเป็นรูปแบบผงช่วยให้การเตรียม การขนส่ง และการกักเก็บง่ายขึ้น และยังช่วยเพิ่มเสถียรภาพ ปกป้องวิตามินเอจากการทำลายของสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

#### 2.4.4 แซนแทนกัม (xanthan gum)

แซนแทนกัม เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภท anionic สร้างขึ้นจากการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Xanthomonas campestris* แบบใช้อากาศ โครงสร้างหลักคือ  $\beta$ -(1,4)-D-glucose (Kennedy และคณะ, 2015) มี pentasaccharide units เป็นหน่วยย่อยซ้ำ ๆ ซึ่ง

ประกอบด้วย glucose 2 หน่วย mannose 2 หน่วย และ glucuronic acid 1 หน่วย มีอัตราส่วนโดยโมล ดังนี้ 2.8:2.0:2.0 ดังรูปที่ 2.13 (García-Ochoa และคณะ, 2000) นิยมใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัว และสารเพิ่มความหนืดในอุตสาหกรรมอาหาร pKa ของ glucuronic acid มีค่าประมาณ 2.8 (Ye, 2008)

Souza และคณะ (2013) ศึกษาการเกิดคอมเพล็กซ์ระหว่าง egg yolk lipoprotein กับ แชนแทนกัม พบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 4.0 ให้สารละลายที่มีความขุ่นต่ำที่สุด แสดงว่าเกิดคอมเพล็กซ์ที่ไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนลงมามากที่สุด เมื่อ pH เพิ่มขึ้น ค่าความขุ่นกลับเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดการผลักรันระหว่างประจุของพอลิเมอร์ ทำให้ได้คอมเพล็กซ์ที่ละลายน้ำมากขึ้น รูปร่างของไมโครแคปซูลที่ได้ แตกต่างจากโครงสร้างของวัตถุดิบตั้งต้นอย่างสิ้นเชิง ทำให้มั่นใจได้ว่าเกิดอันตรกิริยาระหว่าง egg yolk lipoprotein กับ แชนแทนกัมขึ้นอย่างแน่นอน



รูปที่ 2.13 โครงสร้างของแชนแทนกัม

ที่มา: García-Ochoa และคณะ (2000)

## 2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อวิธีคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน

เนื่องจากคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชันระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์ เกิดขึ้นได้จาก electrostatic interaction ดังนั้นปัจจัยที่จะมีผลต่ออันตรกิริยานี้อย่างมากคือ pH ความแรงไอออน อัตราส่วนของโปรตีนต่อพอลิแซ็กคาไรด์ อัตราส่วนระหว่างสารสำคัญต่อสารเคลือบ ที่จะส่งผลต่อการเกิดคอมเพล็กซ์ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายนอก หรือปัจจัยทางกลที่เกี่ยวข้อง และมีความสำคัญ เช่น วิธีการทำแห้ง เป็นต้น (Lv และคณะ, 2013)

### 2.5.1 pH

pH เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดต่อเทคนิคคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน โดยส่งผลต่อการแตกตัวของหมู่ฟังก์ชันบนพอลิเมอร์ (หมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิล) ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์ควรมีค่าอยู่ระหว่าง pKa ของพอลิแซ็กคาไรด์ กับ pI ของโปรตีน หรือเรียกค่านี้ว่า electrical equivalence pH (EEP) ซึ่งจะทำให้เกิดสมดุลระหว่างประจุที่ตรงกันข้าม และเกิดคอมเพล็กซ์ขึ้น (Schmitt และ Turgeon, 2011)

Calderón-Oliver และคณะ (2017) ศึกษาการรักษาเสถียรภาพของ nisin ผสมกับสารสกัดจาก avocado (สารต้านออกซิเดชัน) โดยใช้เทคนิคคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน ซึ่งมีคอลลาเจน และ เพกทิน เป็นสารเคลือบในอัตราส่วน 4:1 ตามลำดับ ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ pH และวิธีการทำแห้ง (spray drying และ freeze drying, ซึ่งจะนำไปอธิบายในข้อที่ 2.5.5) การเลือก pH ที่เหมาะสมของผู้วิจัย ใช้วิธีการวัดค่าศักย์ซีต้าของสารเคลือบ โดยใช้เครื่อง zetasizer ปรับ pH ในช่วง 2.5-8.0 คอลลาเจนมีค่าศักย์ซีต้าเป็นบวก ที่ช่วง pH 2.5-5.5 แสดงว่าที่ค่า pH ในช่วงนี้ คอลลาเจนสามารถเกิดอันตรกิริยากับประจุลบของเพกทินได้ ระยะเวลาแตกต่างของค่าศักย์ซีต้าที่ประมาณเท่ากันระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์ มีค่าอยู่ที่ pH 3.0 แสดงว่าที่ pH นี้จะสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์ได้อย่างสมบูรณ์ และเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทดลอง

นอกจากนี้ ยังอาจศึกษาอิทธิพลของ pH ได้หลายรูปแบบ Jun-xia และคณะ (2011) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการห่อหุ้มน้ำมันส้มเกลี้ยง (sweet orange oil) ซึ่งเหมาะสำหรับการใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสด้วยโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (soy protein isolate) กับกัมอะราบิก และทำแห้งด้วย spray dryer ปัจจัยที่ใช้ศึกษาคือ pH ความแรงไอออน และอัตราส่วนของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดต่อกัมอะราบิก ซึ่งในรายงานส่วนนี้จะอธิบายอิทธิพลของ pH ที่อยู่ในช่วง 2.5-4.5 และเลือกจุดที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากค่า coacervation yield และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายส่วนใสด้านบน (supernatant) ซึ่งจะบ่งบอกถึงปริมาณโปรตีนที่ไม่เข้าร่วมในการเกิดอันตรกิริยากับพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าที่ pH 4.0 ให้ระดับการเกิดโคแอเซอร์เวชันสูงที่สุด แต่ที่ pH 2.5 ให้ระดับการเกิดโคแอเซอร์เวชันต่ำที่สุด ความหนาแน่นของประจุบนพอลิเมอร์ทั้งสองมีค่าสมดุลกันที่ pH 4.0 ดังนั้นที่ pH ค่านี้เป็นจุด EEP ของคอมเพล็กซ์ระหว่างโปรตีนถั่วเหลืองสกัดกับกัมอะราบิก ซึ่งผลที่ได้จากทั้ง coacervation yield กับค่าการดูดกลืนแสงมีความสอดคล้องกัน ที่ pH ต่ำกว่า 3.5 พบว่า coacervation yield มีค่าลดลงเรื่อย ๆ เนื่องจากเกิด protonation ของหมู่

คาร์บอกซิลบนกัมอะราบิก และเมื่อ pH สูงถึง 4.5 ก็มี coacervation yield ลดลงอีกเนื่องจากมีค่าเข้าใกล้ pI ของ โปรตีนถั่วเหลืองสกัด

### 2.5.2 ความแรงไอออน (ionic strength)

จำนวนของ micro-ions ที่มีในสารละลายส่งผลต่อการเกิดคอมเพล็กซ์โคแอสเซอเรชัน เพราะว่าการเกิดอันตรกิริยาของโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์นั้น เกิดผ่าน electrostatic attraction เป็นหลัก ดังนั้นการมี micro-ions ดังเช่นที่ได้จากการแตกตัวของเกลือ จะไปรบกวนสมดุลของประจุบนพอลิเมอร์ ที่ค่าความแรงไอออนต่ำ ๆ จะมีผลรบกวนน้อย เนื่องจากประจุบนพอลิเมอร์ยังมีเพียงพอต่อการเกิด electrostatic attraction แต่ที่ความเข้มข้นเกลือสูงขึ้น ประจุบน พอลิเมอร์จะถูกรบกวนด้วยประจุบน micro-ions มากขึ้น (Schmitt และคณะ, 1998)

จากงานวิจัยของ Jun-xia และคณะ (2011) ที่ศึกษาผลของค่าความแรงไอออนต่อการสร้างแคปซูลน้ำมันส้มเกลี้ยงที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกัมอะราบิก โดยแปรความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ที่ 0-2 โมลต่อลิตร พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ จะทำให้ coacervation yield ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนใน supernatant ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากไอออนของเกลือจะไปบดบังประจุบนพอลิเมอร์ และเมื่อความเข้มข้นของเกลือมากกว่า 1 โมลต่อลิตร จะยับยั้งการเกิดอันตรกิริยาได้จนเกือบหมด

### 2.5.3 อัตราส่วนของโปรตีนต่อพอลิแซ็กคาไรด์

อัตราส่วนของโปรตีนต่อพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นปัจจัยที่ควบคุมสมดุลระหว่างประจุ ระดับการเกิด electrostatic attraction และอัตราการรวมตัวกันเอง (self-aggregation) ของพอลิเมอร์ (Yan และ Zhang, 2014) หากพอลิเมอร์ตัวใดมีปริมาณมากเกินไปจะทำให้ coacervation yield ลดลง เนื่องจากเกิดความไม่สมดุลของประจุ

งานวิจัยของ Jun-xia และคณะ (2011) ยังได้ศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดต่อกัมอะราบิก ที่ 2:5-9:5 พบว่าที่อัตราส่วน 4:5 และ 1:1 ให้ coacervation yield สูงที่สุด การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของอัตราส่วนนี้จะทำให้ได้ coacervation yield ที่ลดลง ที่อัตราส่วน 1:1 ให้ค่าการดูดกลืนแสงน้อยที่สุด ส่วนที่อัตราส่วนมากกว่านี้จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น แต่น้อยกว่าที่อัตราส่วน 2:5 เนื่องจากที่ความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดมาก จะมีอัตราการรวมตัว

กันเองมากด้วย จึงขัดขวาง หรือบดบังการเกิดคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน ก่อนที่จะสร้างเป็นผนังไว้ห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ (น้ำมันส้มเกลี้ยงในที่นี้)

#### 2.5.4 อัตราส่วนระหว่างสารสำคัญต่อสารเคลือบ

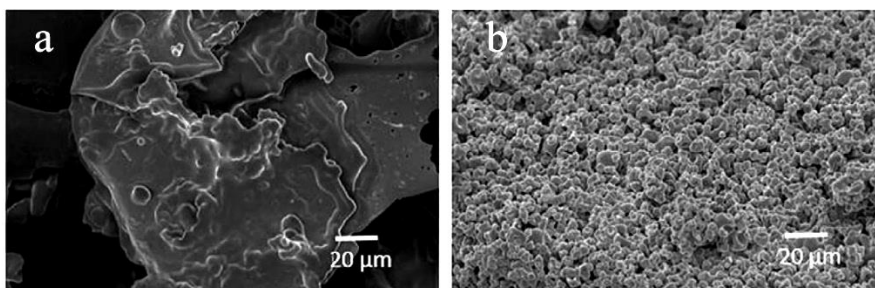
Aziz และคณะ (2014) ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสร้างไมโครแคปซูลน้ำมัน krill (อุดมไปด้วย n-3-polyunsaturated fatty acid) โดยใช้เจลาติน และกัมอะราบิกเป็นสารเคลือบ (pH ในการสร้าง coacervates คือ 4.0) อัตราส่วนระหว่างน้ำมัน krill ต่อสารเคลือบที่ใช้ศึกษาคือ 1:1-3:1 โดยอัตราส่วนระหว่างสารสำคัญต่อสารเคลือบนี้จะส่งผลต่อโครงสร้างภายในของไมโครแคปซูล ที่อัตราส่วนต่ำกว่า 2:1 แคปซูลจะมีโครงสร้าง multi-nuclear ที่มีหยดน้ำมันเล็ก ๆ อยู่ภายในแล้วห่อหุ้มด้วยสารที่ใช้ และมีลักษณะทรงกลม ส่วนที่อัตราส่วนมากกว่า 2:1 โครงสร้างจะเป็น mono-nuclear ประกอบด้วยหยดไขมันเพียงหยดเดียวภายในสารเคลือบ มีรูปทรงกลม แต่ที่อัตราส่วน 3:1 มีรูปร่าง ไม่ปกติ เนื่องจากเมื่อมีปริมาณน้ำมันมากเกินไปทำให้ระบบอิมัลชันเกิดได้ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้การห่อหุ้มสารสำคัญเกิดได้ไม่ดี โครงสร้าง multi-nuclear มีเสถียรภาพที่ดีกว่า และสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารได้ดีกว่า mono-nuclear โดยการปลดปล่อยสารเป็นไปอย่างช้า ๆ จนกว่าสารเคลือบทั้งหมดจะถูกทำลาย แต่โครงสร้างแบบ mono-nuclear จะเกิดการปลดปล่อยสารอย่างรวดเร็วเพียงแค่ว่าสารเคลือบถูกทำลายไปบางส่วน ดังนั้นในงานวิจัยนี้อัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 1.5:1

#### 2.5.5 วิธีการทำแห้ง

การทำแห้งจะเป็นขั้นตอนสุดท้ายหลังจากคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน เพื่อให้ไมโครแคปซูลที่ได้เสถียร ยืดอายุการเก็บรักษา และนำไปใช้งานได้ง่าย แต่การทำแห้งมักส่งผลต่อการทำลายชั้นห่อหุ้มของไมโครแคปซูล ซึ่งจะส่งผลต่อขนาด และการควบคุมการปลดปล่อยสาร (Thies, 2007) วิธีการทำแห้งที่นิยมใช้ได้แก่ การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying)

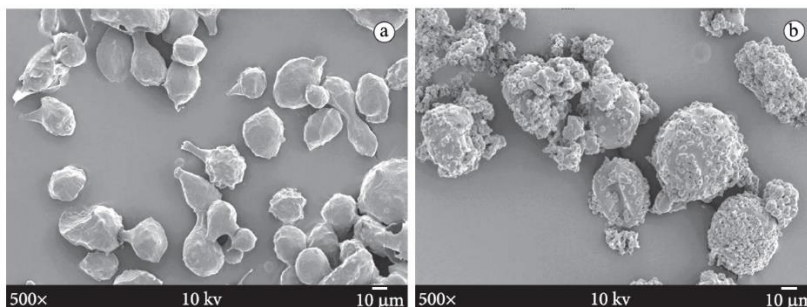
จากงานวิจัยของ Calderón-Oliver และคณะ (2017) ซึ่งศึกษาการทำแห้งไมโครแคปซูลโดย spray drying (อุณหภูมิลมร้อนเข้าที่ 140 °C และลมร้อนออกที่ 70 °C) เปรียบเทียบกับ freeze drying (ความดัน 5 มิลลิเมตรปรอท อุณหภูมิ -50 °C) แสดงโครงสร้างไมโครแคปซูลที่ได้จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) ดังรูปที่

2.14 พบว่าไมโครแคปซูลที่ทำแห้งด้วย freeze drying มีโครงสร้างคล้ายฟองน้ำ เป็นร่างแห มีรูพรุน ส่วนการทำแห้งด้วย spray drying ให้ไมโครแคปซูลที่มีผิวที่เรียบกว่า และมีลักษณะเป็นทรงกลม



รูปที่ 2.14 โครงสร้างของไมโครแคปซูล nisin ผสมกับสารสกัดจาก avocado ที่ได้จากการทำแห้งโดยใช้ freeze drying (a) และ spray drying (b)  
ที่มา: Calderón-Oliver และคณะ (2017)

ในทางตรงกันข้าม งานวิจัยของ Alvim และ Grosso (2010) ซึ่งสร้างไมโครแคปซูลของ paprika oleoresin (เป็นสีธรรมชาติซึ่งสกัดมาจากพริกชี้ฟ้าแดง เหมาะกับหลายอุตสาหกรรมที่ต้องการใช้สีแดงจากธรรมชาติ อุตสาหกรรมที่นิยมใช้กันมากคือ ปลากระป๋อง ซอส ชูริมิ ไส้กรอก) ด้วยเจลาตินกับกัมอะราบิก และเปรียบเทียบการทำแห้งแบบ freeze drying (ความดัน 0.1 มิลลิเมตรปรอท และอุณหภูมิ  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) กับ spray drying (อุณหภูมิลมร้อนเข้าที่  $225\text{ }^{\circ}\text{C}$  และลมร้อนออกที่  $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) พิจารณาโครงสร้าง และการปลดปล่อยสาร โดยโครงสร้างของไมโครแคปซูลแสดงในรูปที่ 2.15 พบว่าไมโครแคปซูลจาก freeze drying สามารถรักษาความแข็งแรงของผนังห่อหุ้มไว้ได้ มีรูปทรงกลม ผนังมีรอยแตรเล็กน้อยแต่ไม่มีรอยฉีกขาด ส่วนการทำแห้งด้วย spray drying ได้ไมโครแคปซูลรูปทรงกลมที่มีผิวขรุขระ และการทำแห้งด้วยวิธีแรกให้ค่าผลผลิต (yield) ที่สูงกว่า เนื่องจากการทำแห้งด้วยวิธีหลังมีโอกาสที่ไมโครแคปซูลจะติดอยู่ตามท่อภายในเครื่อง spray dryer มากกว่า



รูปที่ 2.15 โครงสร้างของไมโครแคปซูล paprika oleoresin ที่ได้จากการทำแห้งโดยใช้ freeze drying (a) และ spray drying (b)  
ที่มา: Alvim และ Grosso (2010)

## 2.6 การหาภาวะที่เหมาะสม

คอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชันระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยมากมายดังกล่าวข้างต้น จึงจำเป็นต้องออกแบบการทดลองให้เหมาะสม ทั้งนี้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) เป็นวิธีการที่รวบรวมเทคนิคทั้งด้านคณิตศาสตร์ และสถิติมาใช้สร้างแบบจำลอง และวิเคราะห์ปัญหาในกรณีที่ผลตอบสนองมีความสัมพันธ์กับปัจจัยหรือตัวแปรอิสระหลายตัว เพื่อหาระดับของปัจจัยที่ทำให้ผลตอบสนองมีค่าที่ดีที่สุด แผนการทดลองที่เหมาะสมจะต้องมีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 2 ตัวแปร (เชิงปริมาณ) และตัวแปรตามอย่างน้อย 1 ตัวแปร (เชิงปริมาณ) แผนการทดลองที่สามารถสร้างพื้นผิวตอบสนองได้ เช่น Box-Behnken design (BBD), central composite design (CCD) และ mixture design เป็นต้น พื้นผิวแบบสามมิติจะวาดจากสมการที่ได้จากผลการทดลอง โดยมีลักษณะเป็นสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (สมการที่ 2.1) หรือสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง (สมการที่ 2.2) (Myers และคณะ, 2009)

Sánchez และคณะ (2016) พบว่าแผนการทดลอง Box-Behnken design เหมาะสมต่อการหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไมโครแคปซูลของสารสกัดจากบรอกโคลี โดยมีตัวแปรต้นคือ pH อัตราส่วนสารสกัดต่อปริมาณของแข็งทั้งหมด และปริมาณสารเคลือบ (เจลาตินกับกัมอะราบิก) และตัวแปรตามคือร้อยละของผลผลิต (% yield) ไมโครแคปซูลที่ได้ช่วยเพิ่มเสถียรภาพของสารสำคัญซึ่งก็คือ คลอโรฟิลล์ รักษาสมบัติการต้านออกซิเดชัน และช่วยบดบังกลิ่นเหม็นของบรอกโคลี ซึ่งน่าจะทำให้การยอมรับของผู้บริโภคดีขึ้น



$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i \chi_i + \varepsilon \quad (2.1)$$

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} \chi_i \chi_j + \varepsilon \quad (2.2)$$

เมื่อ	$\hat{y}$	คือ ตัวแปรตาม
	$\chi_i, \chi_j$	คือ ตัวแปรต้น
	$\beta_0$	คือ จุดตัดหรือค่าคงที่
	$\beta_i$	คือ สัมประสิทธิ์ของสมการเชิงเส้น
	$\beta_{ii}$	คือ สัมประสิทธิ์ของสมการกำลังสอง
	$\beta_{ij}$	คือ สัมประสิทธิ์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระทั้งสอง
	$\varepsilon$	คือ ความคลาดเคลื่อนสุ่ม

Justi และคณะ (2018) ศึกษาการกักเก็บน้ำมัน Pequi pulp oil ซึ่งอุดมไปด้วยแคโรทีนอยด์ โดยใช้สารเคลือบเป็นเจลาตินกับกัมอะราบิก ด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน วางแผนการทดลองแบบ central composite design ที่มีตัวแปรต้นคือ อุณหภูมิ ความเร็วของโฮโมจีไนเซอร์ และปริมาณน้ำมันที่ใส่ วิเคราะห์ค่าร้อยละการผลิต ประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมัน และปริมาณแคโรทีนอยด์ เป็นตัวแปรตาม พบว่า ตัวแปรต้นทั้งสามมีอิทธิพลต่อการเกิดคอมเพล็กซ์ ( $p \leq 0.05$ ) และมีค่า coefficient of determination ( $R^2$ ) ของแบบจำลองสูงถึง 0.98 แสดงว่าการวางแผนแบบ CCD เหมาะต่อการหาภาวะที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้ โดยที่ภาวะเหมาะสม (อุณหภูมิ=50 °C, ความเร็วของโฮโมจีไนเซอร์=15,000 rpm และปริมาณน้ำมันที่ใส่=7.5 กรัม) มีค่าร้อยละการผลิต ประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมัน และปริมาณแคโรทีนอยด์ สูงที่สุดซึ่งเท่ากับ 96.91%, 96.86% และ 192.65  $\mu\text{g/g}$ , db ตามลำดับ

## บทที่ 3

### อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์

##### 3.1.1 วัตถุดิบ

ผลมะแขว่นแห้ง จากอำเภอนาหมื่น จังหวัดน่าน ได้รับความอนุเคราะห์ในการจัดซื้อจาก ผศ. ดร. ปิยะนุช รสเครือ (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดน่าน) ขนส่งมายังภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำมาคัดแยกผลออกจากก้าน บรรจุสุญญากาศ (-1 bar) ในถุง PVDC coated nylon และเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-18 °C) จนกว่าจะใช้งาน

เจลาตินชนิด A (gelatin type A, food grade) ซึ่งผลิตจากหนังหมู 100% โซเดียมแอลจีเนต (sodium alginate, food grade) กัมอะราบิก (gum arabic, food grade) และแซนแทนกัม (xanthan gum, food grade) ซื้อจากบริษัท ซีที เคมีคอล เทรดดิ้ง (ประเทศไทย) จำกัด (CT Chemical Trading, Thailand)

##### 3.1.2 สารเคมี

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	(A.R.)
2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine	(A.R.)
2,6-di-tert-butyl-4-methyl-phenol	(G.C.)
anhydrous sodium sulphate	(A.R.)
boric acid	(A.R.)
C7-C30 saturated alkanes standard	(G.C.)
ethanol 95%	(A.R.)
ethanol 99.9%	(A.R.)
ferric chloride	(A.R.)
ferrous sulfate heptahydrate	(A.R.)
glacial acetic acid	(A.R.)
glutaraldehyde (25% aqueous solution, Loba Chemie, India)	(A.R.)

hexane	(H.P.L.C.)
hydrochloric acid	(A.R.)
methanol	(H.P.L.C.)
methanol 99.9%	(A.R.)
methyl red	(A.R.)
methylene blue	(A.R.)
petroleum ether	(A.R.)
potassium bromide	(I.R.)
selenium mixture	(A.R.)
sodium acetate trihydrate	(A.R.)
sodium hydroxide	(A.R.)
sulfuric acid 98%	(A.R.)

### 3.1.3 วัสดุ และอุปกรณ์

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS1602S/01, Switzerland)

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)

ถุง PVDC coated nylon ขนาด 22 x 30 เซนติเมตร ความหนา 59.5 ไมโครเมตร โดยมี oxygen transmission rate (OTR) = 6.852 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>·day และ water vapor transmission rate (WVTR) = 3.879 g/m<sup>2</sup>·day (Janjaras Chem Supply, Thailand)

ถุง AL/PE (aluminum foil laminated polyethylene; PET12/AL7/LLDPE80) ขนาด 6 x 9 นิ้ว ความหนา 100 ไมโครเมตร (TK foil, Thailand)

10 µL syringe (SGE Analytical Science, Australia)

100 µL syringe (SGE Analytical Science, Australia)

2 mL amber vials (National Scientific, USA)

20 mL vials/Teflon-lined caps (National Scientific, USA)

3 mL disposable syringe (Nipro, Thailand)

biomedical freezer (-18 °C) (Sanyo รุ่น MDF-U537D, Japan)

biomedical freezer (-35 °C) (Sanyo รุ่น MDF-136, Japan)

Fourier transform infrared spectrometer (Perkin elmer รุ่น Spectrum one, Waltham, Massachusetts, USA)

freeze dryer (Labconco รุ่น FREEZONE6, Kansas City, Missouri, USA)

heating mantle (Mtops รุ่น MS-E104, South Korea)

homogenizer (Ystral รุ่น X10, Germany)

hot air oven (Gen Lab รุ่น PRIME, UK)

impulse sealer (Glory-Pack รุ่น PHS 450-10D, South Korea)

laboratory blender (Waring Commercial รุ่น 8010BU, USA)

magnetic stirrer with heating plate (IKA รุ่น C-MAG HS7, Germany)

muffle furnace (Carbolite gero รุ่น CWF1200, UK)

pH meter (Mettler Toledo รุ่น Seven compact, Switzerland)

polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane (Thermo Fisher scientific, USA)

protein digester (BÜCHI รุ่น K-424, Switzerland)

protein distillation unit (BÜCHI รุ่น B-324, Switzerland)

refrigerator (Sanyo รุ่น SF-C95, Japan)

rotary vacuum evaporator (BÜCHI รุ่น Rotavapor R-114, Switzerland)

scanning electron microscope (JEOL รุ่น JSM-IT300, Japan)

scrubber (BÜCHI รุ่น B-414, Switzerland)

shaking incubator (n-Biotek รุ่น NB-205, South Korea)

shaking water bath (Julabo รุ่น SW23, Germany)

sonicator (Elma รุ่น Elmasonic E70H, Germany)

Soxhlet extractor (Gerhardt รุ่น HC61, Germany)

spectrophotometer (Thermo Fisher scientific รุ่น GENESYS 20, USA)

sputter coater (Balzers รุ่น SCD040, Germany)

test sieve 10 mesh (Proeti, ETI-A0136, Spain)

test sieve 50 mesh (Retsch, ASTM802015, Germany)

thermometer (Ebro รุ่น TFX410, Germany)

triple quadrupole gas chromatography mass spectrometer (GC-MS)

- GC model (Agilent Technologies รุ่น 7890B GC system, USA)
- MSD model (Agilent Technologies รุ่น 7000C GC/MS Triple Quad, USA)
- GC column (HP-5ms Ultra Inert, J&W, Agilent Technologies, USA; 30 m x 250  $\mu\text{m}$  i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness)
- autosampler (Agilent Technologies รุ่น 7633 ALS, USA)

vacuum packing machine (Multivac รุ่น AG 500, Germany)

vacuum pump (Gast รุ่น DOA-P504-BN, USA)

Whatman No.4 filter paper (Whatman, Maidstone, UK)

zetasizer nano (Malvern Instruments รุ่น ZS90, UK)

### 3.2 ขั้นตอน และวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผลมะแขว่น

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยการทำให้ proximate analysis ดังนี้

ปริมาณความชื้น	โดยวิธีของ AOAC (2005) 32.1.02 (ภาคผนวก ก.1)
ปริมาณโปรตีน	โดยวิธีของ AOAC (2005) 32.1.22 (ภาคผนวก ก.2)
ปริมาณไขมัน	โดยวิธีของ AOAC (2005) 32.1.25 (ภาคผนวก ก.3)
ปริมาณเส้นใยอาหาร	โดยวิธีของ AOAC (2005) 32.1.16 (ภาคผนวก ก.4)
ปริมาณเถ้า	โดยวิธีของ AOAC (2005) 32.1.05 (ภาคผนวก ก.5)
ปริมาณคาร์โบไฮเดรต	คำนวณเป็นค่าผลต่างจาก 100% (ภาคผนวก ก.6)

#### 3.2.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น

บดผลมะแขว่น 100 กรัม ให้ละเอียดด้วย laboratory blender ที่ความเร็ว 15,600 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงขนาด 10 mesh ซึ่งตัวอย่างมะแขว่นที่ได้ 50 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปประกอบกับชุดสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยไอน้ำ ให้ความร้อนน้ำโดยมีอุณหภูมิประมาณ 100 °C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง น้ำมันหอมระเหยที่ได้จะผสมกับไอน้ำที่กลั่นตัวลงในหลอดแยก ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นสมบูรณ์แล้วแยกน้ำมันออกมา ดึงน้ำออกจากน้ำมันหอมระเหยอีกครั้งโดยการเติม anhydrous sodium sulphate (ผ่านการอบที่

อุณหภูมิ 90 °C นาน 3 ชั่วโมง) จากนั้นเก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -18 °C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

คำนวณปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ โดยคิดเป็นร้อยละของผลผลิต ดังสมการที่ 3.1

$$\text{ร้อยละของผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักของน้ำมันหอมระเหยที่ได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักของมะแขว่นตั้งต้น (กรัม)}} \times 100 \quad (3.1)$$

วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นดังนี้

- วิเคราะห์สารระเหยในน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) โดยดัดแปลงวิธีของ Jun-xia และคณะ (2011) (ภาคผนวก ก.7) ดำเนินการวิเคราะห์ที่ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Scientific and Technological Research Equipment Centre; STREC, Chulalongkorn University)
- วิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ตามวิธีของ Nanasombat และ Wimmittigol (2011) (ภาคผนวก ก.8)
- วิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) ตามวิธีของ Nanasombat และ Wimmittigol (2011) (ภาคผนวก ก.9)

### 3.2.3 การศึกษาชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น

#### 3.2.3.1 การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของสารเคลือบ

วิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้าของสารละลายแอลจินต (ALG) กัมอะราบิก (GAB) แซนแทนกัม (XTG) และเจลาติน (GEL) เข้มข้น 0.8% (w/v) ด้วยเครื่อง zetasizer nano ที่สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Metallurgy and Materials Science Research Institute; MMRI, Chulalongkorn University) ตามวิธีของ Calderón-Oliver และคณะ (2017) (ภาคผนวก ก.10) สร้างกราฟของค่าศักย์ซีต้า (mV) ที่ pH ต่าง ๆ ของสารเคลือบแต่ละชนิด โดยอัตราส่วนของค่าศักย์ซีต้าระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละตัว สามารถใช้กำหนดอัตราส่วนของปริมาณโปรตีนต่อพอลิแซ็กคาไรด์ได้

### 3.2.3.2 การเตรียมไมโครแคปซูล

วิธีการเตรียมดัดแปลงจาก Saravanan และ Rao (2010) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เติมน้ำมันหอมระเหย ลงในสารละลาย GEL ปั่นด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จากนั้นเติมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ (ALG, GAB หรือ XTG) เข้มข้น 0.8% (w/v) ลงในอิมัลชัน ควบคุมอุณหภูมิระหว่างผลิตที่ 45 °C แล้วปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยจากการค้นคว้าข้อมูล และการทดลองเบื้องต้น (preliminary experiment) ได้ค่า pH อัตราส่วนของโปรตีนต่อพอลิแซ็กคาไรด์ และอัตราส่วนระหว่างสารเคลือบต่อน้ำมันหอมระเหย แสดงดังตารางที่ 3.1 จากนั้นลดอุณหภูมิลงจนถึง 10 °C ด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติมสารช่วยการเชื่อมข้าม (crosslinking agent) คือ glutaraldehyde ปริมาณ 0.05 mmol/g protein แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดความคงตัวของไมโครแคปซูลอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรอง Whatman no. 4 แล้วนำไมโครแคปซูลมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -35 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) ปรับความดันที่ 0.05 mbar อุณหภูมิ -45 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำผงไมโครแคปซูลมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 mesh แล้วบรรจุลงถุง AL/PE เก็บที่อุณหภูมิ -18 °C

วิเคราะห์สมบัติทางเคมี กายภาพ และประสิทธิภาพการกักเก็บดังนี้

- ร้อยละการผลิตไมโครแคปซูล (encapsulation yield, EY)

โดยคำนวณค่าร้อยละการผลิตไมโครแคปซูล (EY) ตามสมการที่ 3.2

$$EY (\%) = \frac{\text{น้ำหนักไมโครแคปซูลหลังทำแห้ง}}{\text{น้ำหนักของพอลิเมอร์รวมกับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้}} \times 100 \quad (3.2)$$

- ประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยของไมโครแคปซูล (encapsulation efficiency, EE) ดัดแปลงวิธีจาก Aziz และคณะ (2014) (ภาคผนวก ก.11)

- วิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยสกัดน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดจากไมโครแคปซูล เช่นเดียวกับการหาค่า EE (ภาคผนวก ก.11) นำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มาวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ FRAP ตามวิธีของ Nanasombat และ Wimuttigol (2011) (ภาคผนวก ก.8 และ ก.9)

- วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไมโครแคปซูล ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) (ภาคผนวก ก.12) ดำเนินการวิเคราะห์ที่ STREC จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- วิเคราะห์โครงสร้างของไมโครแคปซูล ด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM) (ภาคผนวก ก.13) ดำเนินการวิเคราะห์ที่ STREC จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 3.1** ภาวะที่ใช้เตรียมไมโครแคปซูล

run	wall system	pH	ratio of protein to polysaccharide	proportion of wall:core
1	GEL-ALG	3.50	4.00	2.50
2	GEL-GAB	4.00	1.50	2.50
3	GEL-XTG	4.00	4.00	2.50

GEL คือ gelatin, ALG คือ alginate, GAB คือ gum Arabic และ XTG คือ xanthan gum

วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 (IBM Corp., NY, USA) เปรียบเทียบและพิจารณาผลการทดลองที่ได้ เพื่อกำหนดชนิดของสารเคลือบที่เหมาะสม สำหรับศึกษาภาวะที่เหมาะสมในขั้นถัดไป

#### 3.2.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะเขว่น

เลือกพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 3.2.3 มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะเขว่น โดยศึกษาผลของ pH (3.20-4.20) อัตราส่วนของโปรตีนต่อพอลิแซ็กคาไรด์ (GEL:GAB; 1.00-2.00) และอัตราส่วนระหว่างสารเคลือบต่อน้ำมันหอมระเหย (wall:core; 1.00-5.00) ที่มีความเหมาะสมในการเตรียมไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหย วางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ response surface methodology (RSM) ใช้การสุ่มตัวอย่างแบบ central composite design (CCD) ดังแสดงในตารางที่ 3.2 เตรียมไมโครแคปซูลเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.3.2 ตัวแปรตาม (dependent variables) ที่วิเคราะห์คือ encapsulation yield และ encapsulation efficiency ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Aziz และคณะ (2014) (ภาคผนวก ก.11)



ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น

Design point	Independent variables					
	Code			Actual value		
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	pH	GEL:GAB	wall:core
1	-1	-1	-1	3.40	1.20	1.80
2	1	-1	-1	4.00	1.20	1.80
3	-1	1	-1	3.40	1.80	1.80
4	1	1	-1	4.00	1.80	1.80
5	-1	-1	1	3.40	1.20	4.20
6	1	-1	1	4.00	1.20	4.20
7	-1	1	1	3.40	1.80	4.20
8	1	1	1	4.00	1.80	4.20
9	-1.68	0	0	3.20	1.50	3.00
10	1.68	0	0	4.20	1.50	3.00
11	0	-1.68	0	3.70	1.00	3.00
12	0	1.68	0	3.70	2.00	3.00
13	0	0	-1.68	3.70	1.50	1.00
14	0	0	1.68	3.70	1.50	5.00
15	0	0	0	3.70	1.50	3.00
16	0	0	0	3.70	1.50	3.00
17	0	0	0	3.70	1.50	3.00

นำผลการทดลองมาสร้างเป็นสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง (สมการที่ 3.3) โดยมีตัวแปรต้นคือ pH อัตราส่วนของโปรตีนต่อพอลิแซ็กคาไรด์ และอัตราส่วนระหว่างสารเคลือบต่อน้ำมันหอมระเหย และตัวแปรตามคือ ค่า EY และ EE ดังนี้

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} \chi_i \chi_j + \varepsilon \quad (3.3)$$

เมื่อ	$\hat{y}$	คือ ตัวแปรตาม
	$\chi_i, \chi_j$	คือ ตัวแปรต้น
	$\beta_0$	คือ จุดตัดหรือค่าคงที่
	$\beta_i$	คือ สัมประสิทธิ์ของสมการเชิงเส้น
	$\beta_{ii}$	คือ สัมประสิทธิ์ของสมการกำลังสอง
	$\beta_{ij}$	คือ สัมประสิทธิ์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระทั้งสอง
	$\varepsilon$	คือ ความคลาดเคลื่อนสุ่ม

ทำนายสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง ด้วยโปรแกรม Minitab Statistical Software version 17 (Minitab Inc., State College, PA, USA) และนำสมการที่ได้มาสร้าง surface และ contour plot โดยใช้โปรแกรม Design Expert version 11.0 (Stat Ease, Minneapolis, MN, USA) คัดเลือกภาวะที่ให้ค่า EY และ EE สูง เป็นภาวะที่เหมาะสม

ตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (validation) ด้วยการเตรียมไมโครแคปซูลที่ภาวะเหมาะสม แล้ววิเคราะห์ค่า EY และ EE ของตัวอย่าง ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้คำนวณเปรียบเทียบกับค่าที่ทำนายจากสมการ ดังสมการที่ 3.4 (Sánchez และคณะ, 2016)

$$\text{ร้อยละความแตกต่าง} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยที่วิเคราะห์ได้จริง} - \text{ค่าเฉลี่ยจากการทำนาย}}{\text{ค่าเฉลี่ยจากการทำนาย}} \times 100 \quad (3.4)$$

วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของไมโครแคปซูลที่ภาวะเหมาะสมดังนี้

- วิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยสกัดน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดจากไมโครแคปซูล (ภาคผนวก ก.11) นำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มาวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ FRAP ตามวิธีของ Nanasombat และ Wimuttigosol (2011) (ภาคผนวก ก.8 และ ก.9)
- วิเคราะห์โครงสร้างจุลภาคของไมโครแคปซูล ด้วยเทคนิค SEM (ภาคผนวก ก.13)

ดำเนินการวิเคราะห์ที่ STREC จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- วิเคราะห์สารระเหยของน้ำมันหอมระเหยที่กักเก็บในไมโครแคปซูล (encapsulated oil) ด้วยเทคนิค GC-MS โดยดัดแปลงวิธีของ Jun-xia และคณะ (2011) (ภาคผนวก ก.7) ดำเนินการวิเคราะห์ที่ STREC จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 4

### ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 องค์ประกอบโดยประมาณของผลมะแขว่นแห้ง

นำผลมะแขว่นแห้งมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ ได้ผลดังตารางที่ 4.1 พบว่า มีปริมาณความชื้น 10.50 ปริมาณโปรตีน 6.34 ปริมาณไขมัน 6.70 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต 31.26 ปริมาณเส้นใยอาหาร 42.41 และปริมาณเถ้า 2.79 g/100 g, wb และเมื่อนำผลมะแขว่นแห้งมาสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่ามีค่าร้อยละผลผลิต เท่ากับ  $7.76 \pm 0.89$

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบโดยประมาณของผลมะแขว่นแห้ง

ปริมาณ (g/100 g, wb)	มะแขว่น
ความชื้น	10.50 $\pm$ 0.18
โปรตีน	6.34 $\pm$ 0.02
ไขมัน	6.70 $\pm$ 0.31
คาร์โบไฮเดรต	31.26 $\pm$ 0.85
เส้นใยอาหาร	42.41 $\pm$ 3.56
เถ้า	2.79 $\pm$ 0.17

ค่าในตารางแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

#### 4.2 สารระเหย และสมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น

ผลการวิเคราะห์สารระเหย หรือองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น ด้วยเทคนิค GC-MS แสดงดังตารางที่ 4.2 จากการเปรียบเทียบผลของ mass spectrum และค่า retention index (RI) กับแหล่งข้อมูลอ้างอิง พบว่าสารระเหยมีทั้งสิ้น 20 ชนิด ดังนี้ D-limonene (52.44%) , alpha-phellandrene (20.47%), alpha-pinene (7.36%), cis-beta-ocimene (5.51%), beta-myrcene (5.05%), trans-beta-ocimene (2.29%), beta-cymene (1.18%), gamma-murolene (0.75%), octyl ester (0.74%), decanal (0.69%), beta-elemene (0.63%), linalool (0.61%), 3-carene (0.43%), sabinene (0.42%), beta-caryophyllene

ตารางที่ 4.2 สารระเหยที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น

RT (min)	Compound	RI exp. <sup>a</sup>	RI ref. <sup>b</sup>	%Relative area
4.74	alpha-thujene	925	924 <sup>c</sup>	0.19
4.91	alpha-pinene	932	932 <sup>c</sup>	7.36
5.87	sabinene	972	973 <sup>d</sup>	0.42
6.31	beta-myrcene	990	991 <sup>d</sup>	5.05
6.71	alpha-phellandrene	1005	1005 <sup>e</sup>	20.47
6.88	3-carene	1010	1009 <sup>f</sup>	0.43
7.32	beta-cymene	1023	1023 <sup>g</sup>	1.18
7.49	D-limonene	1029	1031 <sup>h</sup>	52.44
7.72	<i>trans</i> -beta-ocimene	1036	1040 <sup>i</sup>	2.29
8.06	<i>cis</i> -beta-ocimene	1046	1050 <sup>i</sup>	5.51
9.45	alpha-terpinolene	1088	1088 <sup>e</sup>	0.17
9.85	linalool	1100	1101 <sup>c</sup>	0.61
13.34	alpha-terpineol	1189	1191 <sup>i</sup>	0.31
13.99	decanal	1205	1204 <sup>e</sup>	0.69
14.27	octyl ester	1212	1212 <sup>j</sup>	0.74
21.39	beta-elemene	1384	1389 <sup>c</sup>	0.63
22.37	dodecanal	1408	1407 <sup>d</sup>	0.22
22.70	beta-caryophyllene	1416	1417 <sup>c</sup>	0.35
25.18	gamma-muurokene	1478	1477 <sup>c</sup>	0.75
25.79	valencene	1494	1491 <sup>e</sup>	0.19

<sup>a</sup> ค่า RI จากการคำนวณกับสารละลายมาตรฐาน n-alkanes, <sup>b</sup> ค่า RI สำหรับเปรียบเทียบจาก Reference,

<sup>c</sup> Pereira และคณะ (2018), <sup>d</sup> Choi (2003), <sup>e</sup> Adams (2007), <sup>f</sup> Adams และ Nguyen (2005), <sup>g</sup> Le Quere และ Latrasse (1990), <sup>h</sup> Jordan และคณะ (2002), <sup>i</sup> Smeriglio และคณะ (2018) และ <sup>j</sup> Mijin และ Antonović (2006)

(0.35%), alpha-terpineol (0.31%), dodecanal (0.22%), valencene (0.19%), alpha-thujene (0.19%) และ alpha-terpinolene (0.17%) แสดงให้เห็นว่า D-limonene เป็นองค์ประกอบที่พบมากในพืชตระกูลส้ม (citrus) ซึ่งมะแขว่นก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้เช่นกัน ดังนั้นมะแขว่นจึงมีลักษณะกลิ่นคล้ายส้ม (citrus-like odor) (Pereira และคณะ, 2018) หากแบ่งสารระเหยที่พบตามลักษณะโครงสร้างของสารจะแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท ได้แก่ ก) monoterpene (D-limonene, alpha-phellandrene, alpha-pinene, *cis*-beta-ocimene, beta-myrcene, *trans*-

beta-ocimene, beta-cymene, linalool, 3-carene, sabinene, alpha-terpineol, alpha-thujene และ alpha-terpinolene), ข) sesquiterpene (gamma-muurolene, beta-elemene, beta-caryophyllene และ valencene) และ ค) ester (octyl ester) และ ง) aldehyde (decanal และ dodecanal)

Charoensup และคณะ (2016) ศึกษาสารระเหยในมะแขว่นที่มาจากพื้นที่ตอนเหนือของประเทศไทย ประกอบไปด้วยจังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย ตาก ลำปาง อุตรดิตถ์ น่าน แพร่ ลำพูน และพะเยา โดยนำมาผสมรวมกันแล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้ HP-5 เป็นคอลัมน์ พบว่าสารระเหยมีดังนี้ limonene (43.63%), (+)-sabinene (16.72%), terpinen-4-ol (10.95%), gamma-terpinene (5.20%) และ alpha-phellandrene (3.66%)

สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging และ FRAP แสดงดังตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระลงได้ 50% ( $IC_{50}$ ) เท่ากับ 8.23 mg/mL และค่า FRAP value เท่ากับ 752.57  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$  เนื่องจากองค์ประกอบหลักที่สำคัญในน้ำมันหอมระเหยคือสารประกอบกลุ่ม monoterpene พวก D-limonene, alpha-phellandrene และ alpha-pinene ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน Yang และคณะ (2017) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารมาตรฐานดังนี้ linalool, 3-carene, alpha-terpineol, decanal, citral, D-limonene และ alpha-pinene พบว่า alpha-pinene และ D-limonene มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุดโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 22.01 และ 22.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ตามลำดับ นอกจากนี้ Torres-Martínez และคณะ (2017) ยังได้ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันทั้งหมด (total antioxidant capacity, TAC) ด้วยวิธี phosphomolybdenum method พบว่าค่า %TAC ของ D-limonene (98.74%) สูงกว่า ascorbic acid (62.43%) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 4.3 สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น

	$IC_{50}$ of DPPH radicals (mg/mL)	FRAP value ( $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ )
Essential oil	8.23 $\pm$ 0.50	752.57 $\pm$ 11.20
BHT	0.08 $\pm$ 0.00	-

ค่าในตารางแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

Tangjitjaroenkun และคณะ (2012c) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นจากจังหวัดแพร่ ที่สกัดด้วยไอน้ำซึ่งมีค่าร้อยละการผลิตน้ำมันเท่ากับ 11.63 พบว่าค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 5.76 mg/mL ส่วน Nanasombat และ Wimuttigosol (2011) พบว่าค่า  $IC_{50}$  ของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นที่ซื้อจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร เท่ากับ 5.66 mg/mL ค่าเหล่านี้มีความแตกต่างกับค่าที่วิเคราะห์ได้ในงานวิจัยนี้ เนื่องจากความหลากหลายของภาวะแวดล้อม ระบบนิเวศวิทยา สภาพทางภูมิศาสตร์ รวมทั้งภาวะที่ใช้ในการปลูก ส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์น้ำมันหอมระเหยของพืช ทำให้องค์ประกอบทางเคมี และสมบัติการต้านออกซิเดชันมีความแตกต่างกัน (Supabphol และ Tangjitjaroenkun, 2014)

#### 4.3 การศึกษาชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น

งานวิจัยในส่วนนี้ ศึกษาชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสม และเป็นการเปลี่ยนน้ำมันมะแขว่นให้อยู่ในรูปแบบผง หรือไมโครแคปซูล (microcapsule) ขั้นตอนแรก วิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้าของสารเคลือบที่นำมาศึกษา โดยสารเคลือบประเภทโปรตีนจะเลือกใช้เจลาติน (GEL) และสารเคลือบประเภทพอลิแซ็กคาไรด์เลือกใช้แอลจินेट (ALG) กัมอะราบิก (GAB) และแซนแทนกัม (XTG) เพื่อนำผลที่ได้มากำหนดค่าอัตราส่วนของโปรตีนต่อพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดในการเตรียมไมโครแคปซูล จากนั้นวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของไมโครแคปซูล ดังนี้ encapsulation yield (EY), encapsulation efficiency (EE), สมบัติการต้านออกซิเดชัน (ด้วยวิธี DPPH และ FRAP), หมู่ฟังก์ชัน (ด้วยเทคนิค FTIR) และโครงสร้างของไมโครแคปซูล (ด้วยเทคนิค SEM)

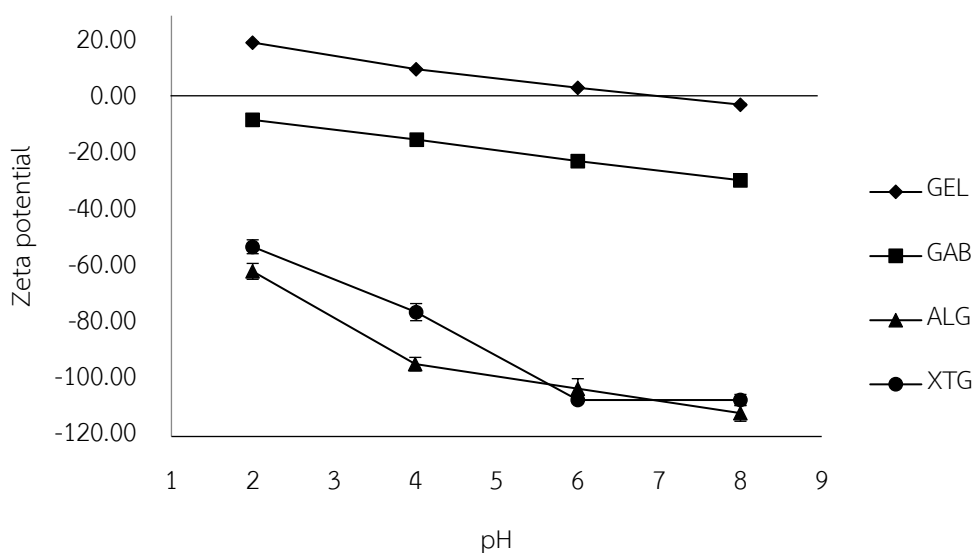
##### 4.3.1 ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของสารเคลือบ

คอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชันเกิดขึ้นผ่านอันตรกิริยาระหว่างประจุที่ตรงกันข้าม ดังนั้นจึงวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า (ประจุบริเวณรอยต่อระหว่างพื้นผิวอนุภาคของสารเคลือบกับสารละลาย) ของสารเคลือบแต่ละชนิด เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่จะทำให้ผลรวมของประจุเกิดความสมดุล (Ghosh และ Bandyopadhyay, 2012)

จากรูปที่ 4.1 พบว่าในช่วง pH 2.00-8.00 ค่าศักย์ซีต้าของ GEL, ALG, GAB และ XTG มีค่าเท่ากับ -1.70 ถึง +20.43, -111.67 ถึง -61.13, -28.67 ถึง -7.14 และ -107.00 ถึง -52.37 mV ตามลำดับ GEL มีคุณสมบัติ amphoteric ซึ่งค่าศักย์ซีต้าจะเปลี่ยนแปลงไปตามค่า pH และจะเป็นกลางที่จุด pi (pH ประมาณ 7.00) และมีค่าศักย์ซีต้าเป็นบวกจากการรับโปรตอนของหมู่อะมิโน

(NH<sub>2</sub>) และลบจากการแตกตัวของหมู่ COOH ที่จุดต่ำกว่าและสูงกว่าค่า pI ตามลำดับ ที่ pH ช่วง 2.00-7.00 ค่าศักย์ซีต้าของ GEL เป็นบวก แสดงว่าในช่วงนี้ GEL สามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุกับ ALG, GAB และ XTG ซึ่งมีค่าศักย์ซีต้าเป็นลบได้ (Devi และคณะ, 2017) จากการแตกตัวของหมู่ COOH ของกรด guluronic และ mannuronic ใน ALG, กรด glucuronic ใน GAB และ XTG ทำให้มีค่าศักย์ซีต้าเป็นลบตลอดช่วง pH 2.00-8.00 อย่างไรก็ตามค่าศักย์ซีต้าของ GAB เป็นลบน้อยกว่า ALG และ XTG เนื่องจากมีหมู่อะมิโนใน arabinogalactan-protein และ glycoprotein ซึ่งแสดงศักย์ซีต้าบวกเป็นองค์ประกอบ (Nussinovitch, 2003)

นอกจากนี้ อัตราส่วนระหว่างค่าศักย์ซีต้าของโปรตีน (ประจุบวก) กับพอลิแซ็กคาไรด์ (ประจุลบ) สามารถใช้เป็นตัวกำหนดอัตราส่วนของปริมาณโปรตีนต่อพอลิแซ็กคาไรด์ได้ จากการค้นคว้าข้อมูล และการทดลองเบื้องต้น พบว่า ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเตรียมไมโครแคปซูลชนิด GEL-ALG, GEL-GAB และ GEL-XTG เท่ากับ 3.50, 4.00 และ 4.00 ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากรูปที่ 4.1 ที่ pH 3.50 อัตราส่วนระหว่างค่าศักย์ซีต้าของ GEL ต่อ ALG มีค่าประมาณ 4.00 และที่ pH 4.00 อัตราส่วนระหว่างค่าศักย์ซีต้าของ GEL ต่อ GAB และ GEL ต่อ XTG มีค่าประมาณ 1.50 และ 4.00 ตามลำดับ จึงสามารถกำหนดอัตราส่วนของปริมาณเจลาตินต่อพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดังนี้ GEL:ALG เท่ากับ 4.00, GEL:GAB เท่ากับ 1.50 และ GEL:XTG เท่ากับ 4.00



รูปที่ 4.1 ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของสารเคลือบ

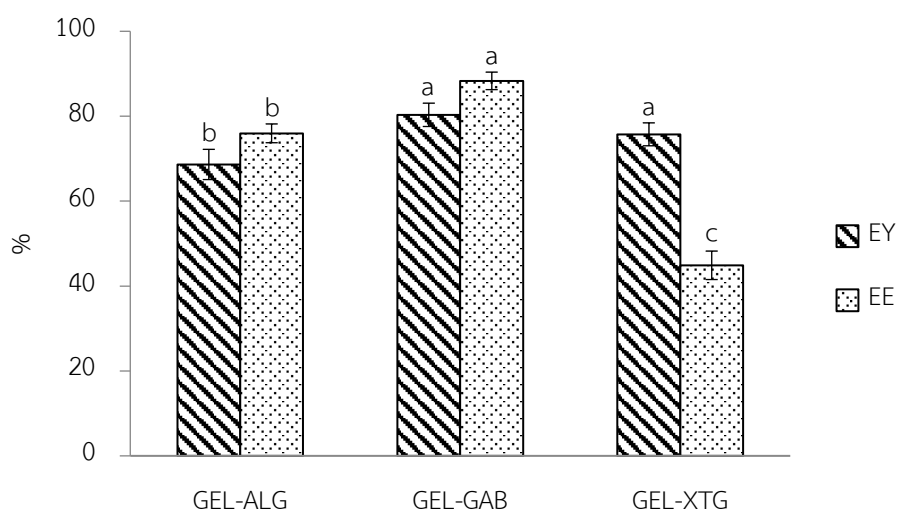


#### 4.3.2 ผลของชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อร้อยละการผลิต และประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยของไมโครแคปซูล

ผลของพอลิแซ็กคาไรด์ 3 ชนิด (ALG, GAB และ XTG) ต่อร้อยละการผลิตและประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยของไมโครแคปซูล แสดงในรูปที่ 4.2

ชนิดของสารเคลือบมีอิทธิพลต่อค่า EY และ EE โดยค่า EY ของไมโครแคปซูล GEL-GAB (80.33%) และ GEL-XTG (75.73%) สูงกว่า GEL-ALG (68.64%) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) อีกทั้งตัวอย่าง GEL-GAB ให้ค่า EE มากที่สุดซึ่งเท่ากับ 88.33% รองลงมาคือ GEL-ALG (75.97%) และ GEL-XTG (44.89%) ตามลำดับ ความแตกต่างที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นผลมาจากโครงสร้าง และธรรมชาติของสารเคลือบแต่ละชนิด (García-Saldaña และคณะ, 2016) และเนื่องจากยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาผลของชนิดของสารเคลือบต่อการเกิดคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชันมากนัก จึงต้องการการศึกษาวิเคราะห์อื่น ๆ เพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

Maji และ Hussain (2009) ศึกษาการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นของประเทศอินเดียที่สกัดด้วยไอน้ำ โดยใช้ GEL กับ chitosan เป็นสารเคลือบที่อัตราส่วน 1:1 และใช้เจนิพิน (genipin) เป็นสารช่วยการเชื่อมข้ามในปริมาณ 0.5 mmol/g polymer พบว่ามีค่า EE เท่ากับ 60.05% นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคลือบ GEL กับ ALG ด้วยเทคนิคอิมัลชันแบบ water in oil in water (w/o/w) โดยมี Tween 80 เป็นอิมัลซิไฟเออร์ พบว่ามีค่า EY และ EE เท่ากับ 87.97% และ 83.90% ตามลำดับ (Banerjee และคณะ, 2013)

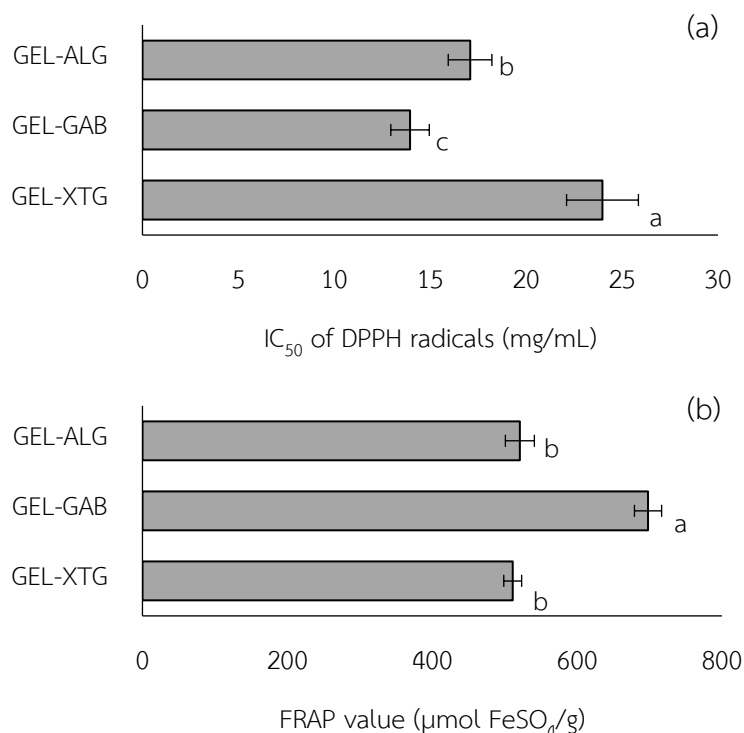


รูปที่ 4.2 ค่า encapsulation yield (EY) และ encapsulation efficiency (EE) ของไมโครแคปซูล

#### 4.3.3 ผลของชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยในไมโครแคปซูล

เพื่อที่จะวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่าง ๆ จะต้องสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไมโครแคปซูลชนิด GEL-ALG, GEL-GAB และ GEL-XTG ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity และวิธี FRAP ซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.3 หลักการของการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP แตกต่างกัน คือ วิธีแรกจะวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันที่มีสมบัติเป็น hydrogen atom transfer (HAT) เพียงอย่างเดียวแต่วิธีหลังจะวิเคราะห์ตามหลักการทั้ง HAT และ single electron transfer (SET) โดยจะเป็นการตรวจวัดความสามารถในการเป็น reducing agent (Huang และคณะ, 2005) จึงนิยมใช้ทั้งสองวิธีนี้ร่วมกันในการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน (Deepa และคณะ, 2006)

น้ำมันหอมระเหยใน GEL-GAB มีสมบัติการต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยมีค่า  $IC_{50}$  ต่ำที่สุดเท่ากับ 13.95 mg/mL รองลงมาคือ GEL-ALG (17.08 mg/mL) และ GEL-XTG (23.98 mg/mL) ตามลำดับ และค่า FRAP ของ GEL-GAB สูงที่สุดเท่ากับ 698.06  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$  ส่วน GEL-ALG และ GEL-XTG มีค่า FRAP ไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ )



รูปที่ 4.3 สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นในไมโครแคปซูล โดยวิธี DPPH radical scavenging activity (a) และ วิธี FRAP (b)

#### 4.3.4 ผลของชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อหมู่ฟังก์ชันของไมโครแคปซูล

ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารเคลือบแต่ละชนิด (GEL, ALG, GAB และ XTG) ไมโครแคปซูล (GEL-ALG, GEL-GAB และ GEL-XTG) น้ำมันหอมระเหยตั้งต้น และน้ำมันหอมระเหยในไมโครแคปซูลทั้ง 3 ชนิด แสดงในรูปที่ 4.4-4.6 ตามลำดับ เจลาตินแสดงประจุบวกที่ pH ต่ำกว่าค่า pI เนื่องจากมีหมู่อะมิโน ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระซึ่งสามารถแสดงประจุลบได้ ในระหว่างกระบวนการคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน หมู่คาร์บอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์จะเกิดอันตรกิริยากับหมู่อะมิโนของเจลาติน เกิดเป็นหมู่เอไมด์ (amide) ขึ้น (Saravanan และ Rao, 2010) ซึ่งการเกิดขึ้นของหมู่เอไมด์นี้สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค FTIR

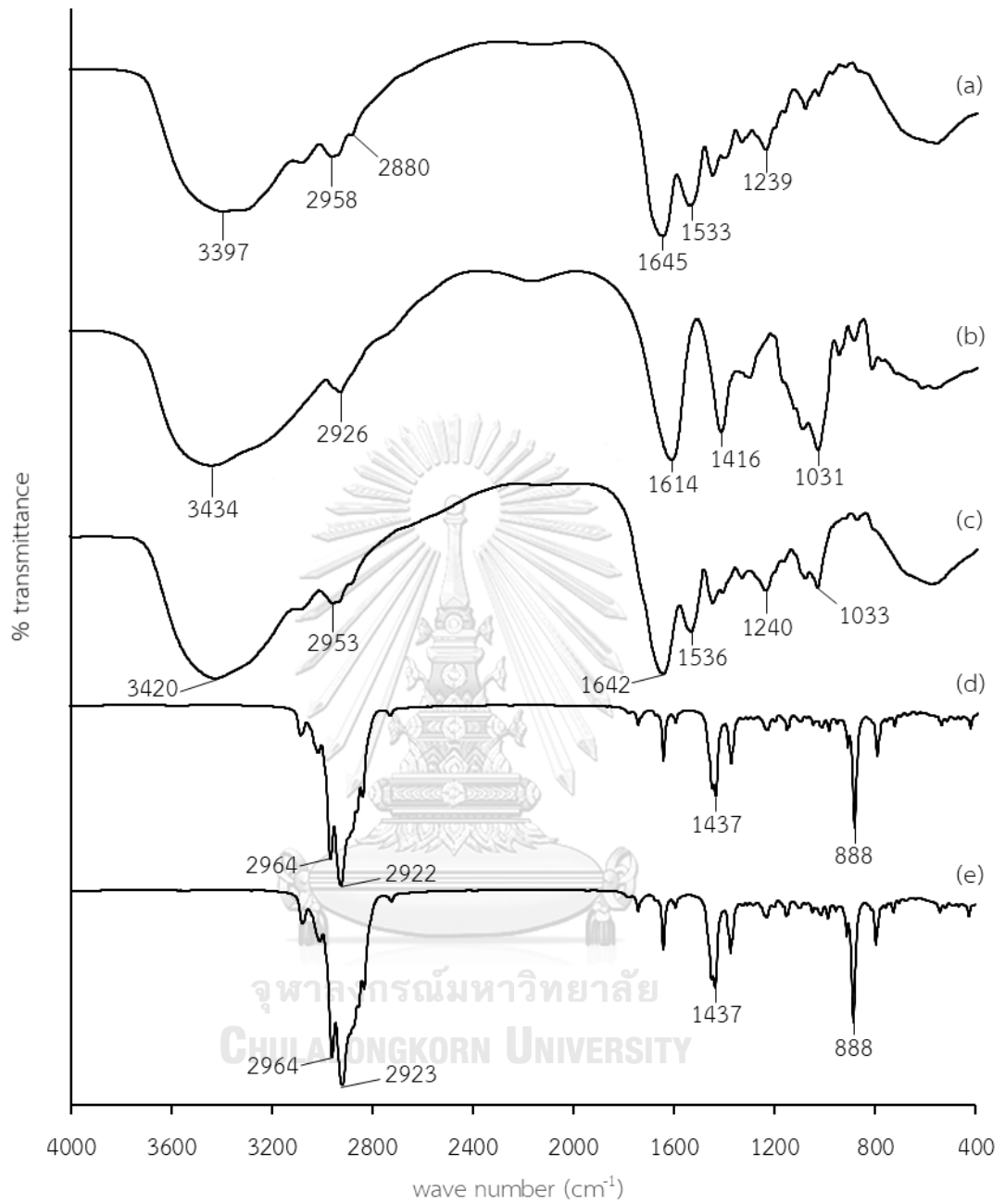
อินฟราเรดสเปกตรัมของ GEL (รูปที่ 4.4a, 4.5a และ 4.6a) แสดงหมู่อะมิโน (N-H stretching of amino group) ที่เลขคลื่น  $3397\text{ cm}^{-1}$  และพบหมู่อัลคีน (C-H stretching of alkene) ที่  $2958\text{ cm}^{-1}$  และหมู่อัลเคน (C-H stretching of alkane) ที่  $2880\text{ cm}^{-1}$  และที่เลขคลื่น  $1645\text{ cm}^{-1}$  และ  $1533\text{ cm}^{-1}$  พบหมู่เอไมด์ปฐมภูมิ และทุติยภูมิ (amide-I and -II, C=O and N-H stretching) ตามลำดับ ส่วนพีคอื่น ๆ ที่พบได้แก่ พันธะ C-N stretching ที่  $1333\text{ cm}^{-1}$ , หมู่ amide-III ที่ช่วง  $1085\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$  และพบ C-O stretching ของหมู่คาร์บอกซิลที่  $1165\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้ใกล้เคียงกับการทดลองของ Devi และคณะ (2012) และ Souza และ Garcia-Rojas (2017)

สำหรับสเปกตรัมของ ALG (รูปที่ 4.4b) พบพีคดังนี้  $3434\text{ cm}^{-1}$ ,  $2926\text{ cm}^{-1}$ ,  $1614\text{ cm}^{-1}$ ,  $1416\text{ cm}^{-1}$  และ  $1031\text{ cm}^{-1}$  ส่วนสเปกตรัมของ GAB (รูปที่ 4.5b) พบพีค  $3433\text{ cm}^{-1}$ ,  $2922\text{ cm}^{-1}$ ,  $1611\text{ cm}^{-1}$ ,  $1425\text{ cm}^{-1}$  และ  $1029\text{ cm}^{-1}$  ส่วน XTG (รูปที่ 4.6b) พบพีค  $3434\text{ cm}^{-1}$ ,  $2921\text{ cm}^{-1}$ ,  $1619\text{ cm}^{-1}$ ,  $1408\text{ cm}^{-1}$  และ  $1052\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงถึง O-H stretching ของแอลกอฮอล์, O-H stretching ของหมู่คาร์บอกซิล, carboxylate anion asymmetric, symmetric stretching และ C-O stretching ของหมู่อีเทอร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ XTG ยังพบพีคของ carboxylic acid ที่  $1730\text{ cm}^{-1}$  พีค C-H stretching ที่  $1252\text{ cm}^{-1}$  (Lii และคณะ, 2002)

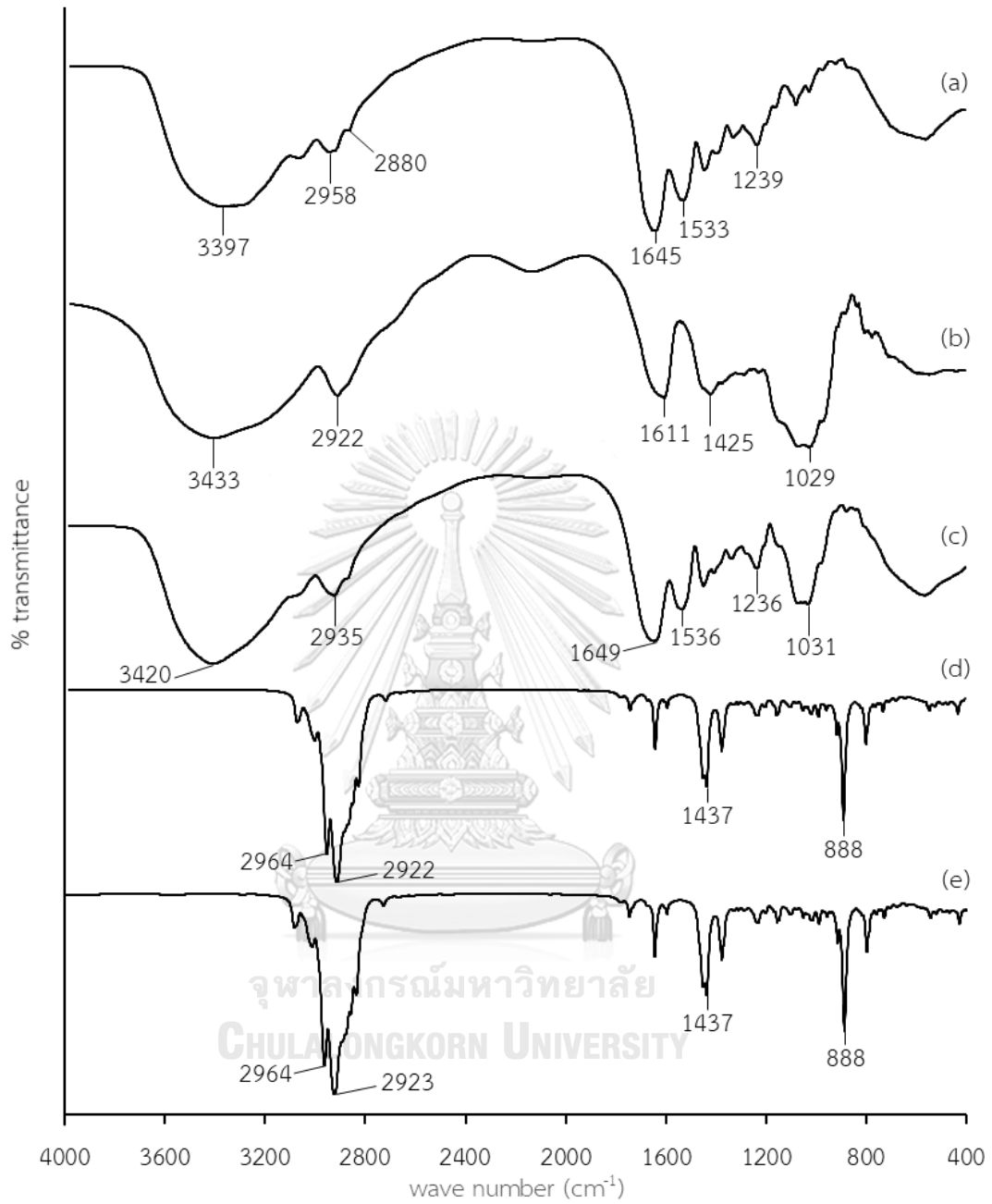
ส่วนไมโครแคปซูล GEL-ALG, GEL-GAB และ GEL-XTG (รูปที่ 4.4c, 4.5c และ 4.6c) ไม่พบพีคของหมู่อะมิโนอิสระ แต่พบพีคของหมู่เอไมด์ปฐมภูมิ และทุติยภูมิที่  $1642\text{-}1649\text{ cm}^{-1}$  และ  $1534\text{-}1536\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเกิดจากการสันของ C=O ในพันธะเปปไทด์ แสดงให้เห็นชัดเจนว่าเกิดคอมเพล็กซ์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 3 ตัวอย่าง กับหมู่อะมิโนของ GEL (Devi และคณะ,

2012; García-Saldaña และคณะ, 2016; Ibekwe และคณะ, 2017; Souza และ Garcia-Rojas, 2017)

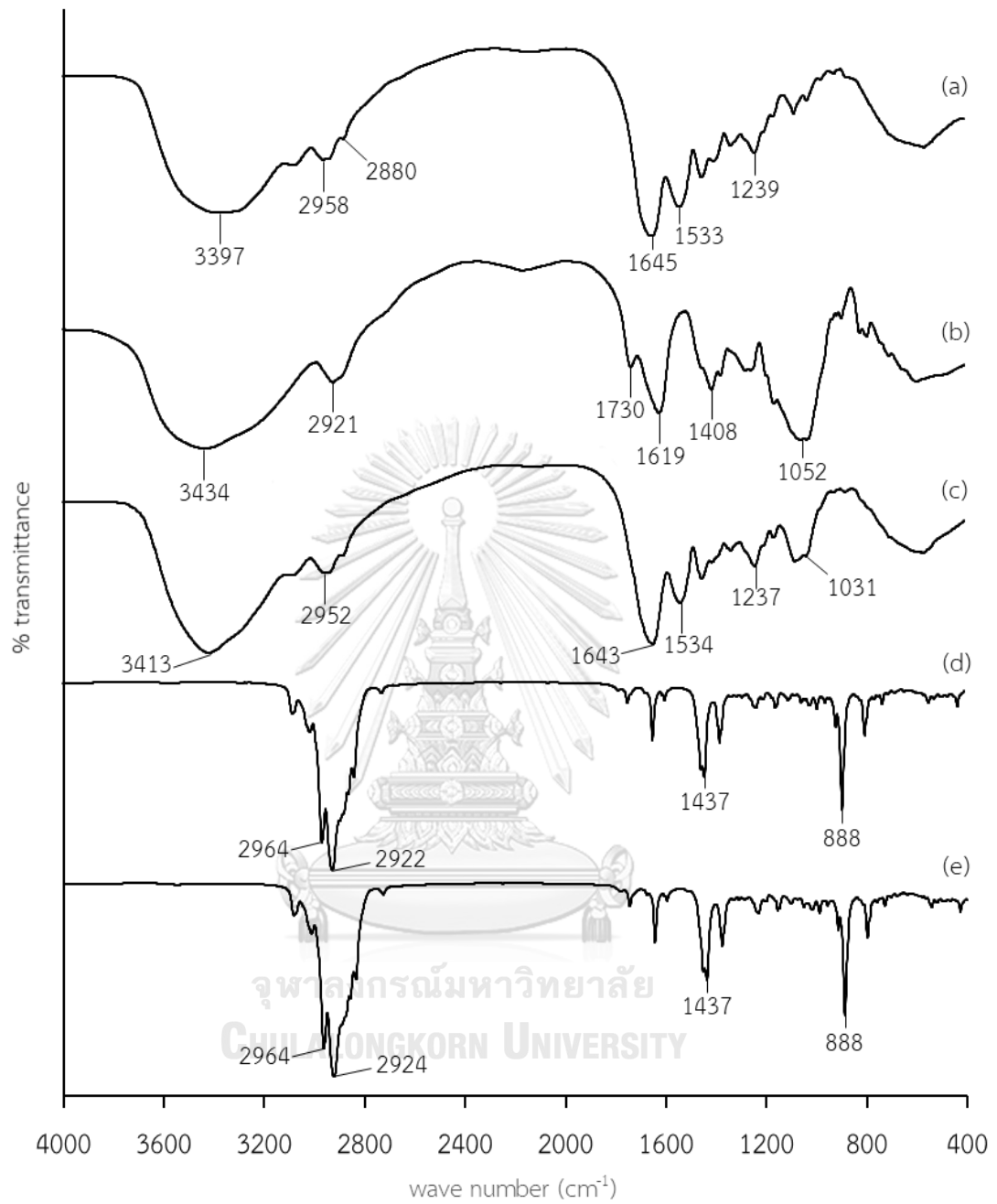
น้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น (รูปที่ 4.4d, 4.5d และ 4.6d) ประกอบด้วยหมู่ C-H stretching ของ aromatic ring ที่ช่วง  $3000-3100\text{ cm}^{-1}$  และหมู่ C-H stretching ของ alkane ที่ช่วง  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  หมู่ C=C ของ alkene ที่  $1645\text{ cm}^{-1}$  และพีคอื่น ๆ ที่พบได้แก่  $1437\text{ cm}^{-1}$ ,  $1377\text{ cm}^{-1}$  และ  $1156\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงหมู่  $-\text{CH}_2$  asymmetric alkane,  $-\text{CH}_2$  symmetric alkane, C-O stretching ของแอลกอฮอล์ หรือฟีนอล ตามลำดับ และพบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของสารระเหย (กลุ่ม terpene) ซึ่งอยู่ที่  $888\text{ cm}^{-1}$  และ  $797\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึง C-H (out-of-plane, oop bending) ของวงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ 2 หมู่แบบพารา และเมตา ตามลำดับ (Banerjee และคณะ, 2013; Fabie-Agapin และคณะ, 2017) และเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของน้ำมันหอมระเหยตั้งต้น กับน้ำมันหอมระเหยในไมโครแคปซูล GEL-ALG (รูปที่ 4.4e), GEL-GAB (รูปที่ 4.5e) และ GEL-XTG (รูปที่ 4.6e) พบว่ามีลักษณะพีคเหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าสารเคลือบที่เลือกใช้ทั้ง 3 ชนิดไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำมันหอมระเหยที่กักเก็บ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญข้อหนึ่งของการเลือกสารเคลือบ (Vasisht, 2014) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Devi และคณะ (2012) ที่พบว่าสเปกตรัมของน้ำมันมะกอกก่อนและหลังการเกิดคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชันของ GEL กับ ALG ไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ Banerjee และคณะ (2013) วิเคราะห์เปรียบเทียบน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นของอินเดียก่อนกับหลังการกักเก็บด้วย GEL-ALG ก็ได้ผลการทดลองเช่นเดียวกันคือไม่มีความแตกต่างกันของสเปกตรัม



รูปที่ 4.4 อินฟราเรดสเปกตรัมของ GEL (a), ALG (b), GEL-ALG (c), น้ำมันหอมระเหยตั้งต้น (d) และ น้ำมันหอมระเหยในไมโครแคปซูล (e)



รูปที่ 4.5 อินฟราเรดสเปกตรัมของ GEL (a), GAB (b), GEL-GAB (c), น้ำมันหอมระเหยตั้งต้น (d) และ น้ำมันหอมระเหยในไมโครแคปซูล (e)

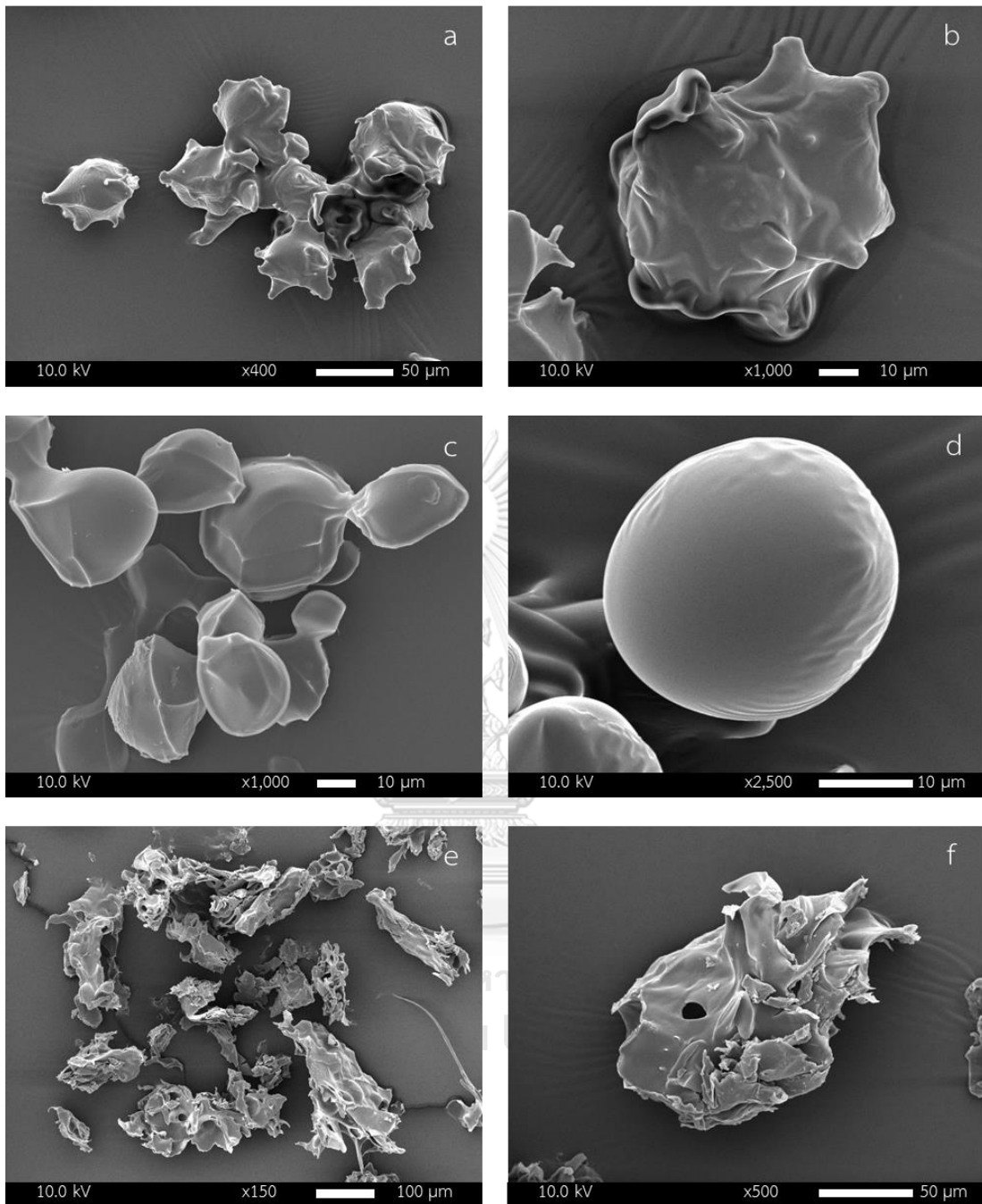


รูปที่ 4.6 อินฟราเรดสเปกตรัมของ GEL (a), XTG (b), GEL-XTG (c), น้ำมันหอมระเหยตั้งต้น (d) และ น้ำมันหอมระเหยในไมโครแคปซูล (e)

#### 4.3.5 ผลของชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อโครงสร้างของไมโครแคปซูล

การเกิดคอมเพล็กซ์ระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์ได้รับการยืนยันอีกครั้งโดยผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM ดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าไมโครแคปซูล GEL-GAB (รูปที่ 4.7c และ d) มีลักษณะทรงกลม ขนาดอนุภาค (particle size) ประมาณ 30-40 ไมโครเมตร อย่างไรก็ตามความหลากหลายของขนาดนั้นค่อนข้างสูง เนื่องจากการควบคุมขนาดของหยดน้ำมันนั้นเป็นไปได้ยาก ทั้งนี้สารเคลือบสามารถห่อหุ้มน้ำมันได้สมบูรณ์ และไม่พบรูพรุนบนผิวของไมโครแคปซูล แสดงถึงประสิทธิภาพในการกักเก็บของ GEL-GAB และส่งผลให้ค่า EE และสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงตามไปด้วย ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่ GAB มีองค์ประกอบของ arabinogalactan-protein และ glycoprotein ที่ให้คุณสมบัติรักษาเสถียรภาพของอิมัลชัน จึงป้องกันการรวมตัวกันของหยดไขมันได้ (Padala และคณะ, 2009) ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Junyaprasert และคณะ (2001) ที่วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของไมโครแคปซูล GEL-GAB ที่กักเก็บน้ำมันข้าวโพดที่ผสมวิตามินเอ ด้วยเทคนิค SEM พบว่าไมโครแคปซูลมีขนาดอนุภาคในช่วง 20-30 ไมโครเมตร มีลักษณะเป็นทรงกลมไม่เกาะกลุ่มกันเป็นก้อน ในขณะที่ไมโครแคปซูล GEL-ALG และ GEL-XTG สูญเสียรูปร่างทรงกลม เนื่องจากสารละลายคอลลอยด์ของทั้ง ALG และ XTG มีความหนืดและความสามารถในการกักเก็บน้ำสูงกว่า GAB (Burnside, 2014) ทำให้เกิดการเสียรูปร่างเนื่องจากการระเหยของน้ำมากกว่าในระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Eratte และคณะ, 2015) โดยไมโครแคปซูล GEL-ALG (รูปที่ 4.7a และ b) มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน (irregular shape) ลักษณะผิวขรุขระ ไม่สม่ำเสมอ ขนาดอนุภาคประมาณ 50-60 ไมโครเมตร ใหญ่กว่าไมโครแคปซูล GEL-GAB เนื่องจากใช้อัตราส่วนของพอลิเมอร์สูงกว่า ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Calderón-Oliver และคณะ (2017) ที่พบว่าไมโครแคปซูล collagen-ALG มีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวขรุขระ และสูญเสียรูปร่างเนื่องจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ส่วนไมโครแคปซูล GEL-XTG (รูปที่ 4.7e และ f) มีลักษณะเป็นแผ่น คล้ายฟองน้ำ ผิวขรุขระ มีรูพรุนเล็กน้อย ทำให้ค่า EE และสมบัติการต้านออกซิเดชันต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น ๆ ขนาดอนุภาคประมาณ 100-150 ไมโครเมตร ทั้งนี้ Souza และคณะ (2013) ได้รายงานโครงสร้างของ egg yolk lipoprotein-XTG ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับผลของงานวิจัยนี้





รูปที่ 4.7 โครงสร้างของไมโครแคปซูล GEL-ALG ( $\times 400$ ; a และ  $\times 1,000$ ; b), GEL-GAB ( $\times 1,000$ ; c และ  $\times 2,500$ ; d) และ GEL-XTG ( $\times 150$ ; e และ  $\times 500$ ; f)

จากผลการวิเคราะห์ทั้งทางเคมีและกายภาพ เพื่อศึกษาชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น พบว่าไมโครแคปซูล GEL-GAB เหมาะต่อการใช้เป็นสารเคลือบเพื่อปกป้องน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นมากที่สุด ซึ่งสารประกอบที่เป็นโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสองนี้ทำให้ได้ร้อยละการผลิต ประสิทธิภาพในการกักเก็บ และสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด รวมทั้งผลการทดลองที่ได้จาก FTIR ยืนยันว่าพอลิเมอร์ทั้งสองเกิดอันตรกิริยาระหว่างกัน และสามารถห่อหุ้มน้ำมันได้อย่างสมบูรณ์ ผิวของไมโครแคปซูลไม่มีรูพรุน

อย่างไรก็ตาม คอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชันระหว่างโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยที่หลากหลาย แต่ในขั้นตอนนี้สามารถสรุปได้เพียงปัจจัยเดียวคือ ชนิดของสารเคลือบที่เหมาะสม จึงจำเป็นต้องนำ ไมโครแคปซูล GEL-GAB มาศึกษาปัจจัยที่สำคัญอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการสร้างไมโครแคปซูลเพื่อกักเก็บน้ำมันหอมระเหย โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธี response surface methodology (RSM) ซึ่งใช้เทคนิคทั้งด้านคณิตศาสตร์ และสถิติมาสร้างตัวแบบ และสามารถวิเคราะห์ปัญหาในกรณีที่ผลตอบสนองมีความสัมพันธ์กับปัจจัยหรือตัวแปรอิสระหลายตัว เพื่อหาระดับของปัจจัยที่ทำให้ผลตอบสนองมีค่าดีที่สุด

#### 4.4 ภาวะที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น

ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นด้วยสารเคลือบ GEL-GAB โดยใช้แผนการทดลอง RSM แบบ central composite design (CCD) ศึกษาตัวแปรต้น ดังนี้ pH (3.20-4.20), อัตราส่วน GEL:GAB (1.00-2.00) และอัตราส่วน wall:core (1.00-5.00) และศึกษาตัวแปรตาม ได้แก่ ค่า EY และ EE ของไมโครแคปซูลที่เตรียมจากภาวะต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

จากข้อมูลในตารางที่ 4.4 พบว่า EY มีค่าอยู่ในช่วง 56.67-82.45% และ EE มีค่าอยู่ในช่วง 60.11-88.17% เมื่อนำข้อมูลมาสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นโค้งโดยใช้ค่าจริง (actual value) ได้สมการทำนายค่า EY และ EE ดังแสดงในสมการที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

$$\begin{aligned} EY (\%) = & - 88 + 103.0x_1 - 83.8x_2 + 10.7x_3 - 19.6x_1^2 - 19.4x_2^2 - 3.515x_3^2 \\ & + 36.2x_1x_2 + 1.31x_1x_3 + 1.64x_2x_3 \end{aligned} \quad (4.1)$$

$$\begin{aligned} EE (\%) = & - 333 + 221x_1 - 26.8x_2 + 9.1x_3 - 32.9x_1^2 - 29.0x_2^2 - 4.209x_3^2 \\ & + 23.8x_1x_2 - 0.13x_1x_3 + 8.03x_2x_3 \end{aligned} \quad (4.2)$$

เมื่อ  $x_1$  คือ pH

$x_2$  คือ อัตราส่วนของ GEL ต่อ GAB

$x_3$  คือ อัตราส่วนระหว่างสารเคลือบต่อน้ำมันหอมระเหย

ตารางที่ 4.4 ค่า encapsulation yield (EY) และ encapsulation efficiency (EE) ของไมโครแคปซูล ที่เตรียมจากภาวะต่างกัน

Design point	Independent variables						Dependent variables	
	Code			Actual value			%EY	%EE
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	pH	GEL:GAB	wall:core		
1	-1	-1	-1	3.40	1.20	1.80	75.17	81.69
2	1	-1	-1	4.00	1.20	1.80	80.14	85.69
3	-1	1	-1	3.40	1.80	1.80	65.64	67.66
4	1	1	-1	4.00	1.80	1.80	82.45	85.03
5	-1	-1	1	3.40	1.20	4.20	65.60	60.11
6	1	-1	1	4.00	1.20	4.20	71.47	68.89
7	-1	1	1	3.40	1.80	4.20	57.43	62.39
8	1	1	1	4.00	1.80	4.20	77.06	74.62
9	-1.68	0	0	3.20	1.50	3.00	65.70	73.11
10	1.68	0	0	4.20	1.50	3.00	77.10	78.34
11	0	-1.68	0	3.70	1.00	3.00	72.37	76.69
12	0	1.68	0	3.70	2.00	3.00	70.50	76.69
13	0	0	-1.68	3.70	1.50	1.00	67.80	73.11
14	0	0	1.68	3.70	1.50	5.00	56.67	61.10
15	0	0	0	3.70	1.50	3.00	78.30	83.53
16	0	0	0	3.70	1.50	3.00	78.00	81.57
17	0	0	0	3.70	1.50	3.00	80.40	88.17

สมการที่ 4.1 มีค่า coefficient of determination ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.915 ส่วนสมการที่ 4.2 มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.903 ซึ่งหมายความว่าสมการทั้งสองสามารถทำนายค่า EY และ EE ได้ 91.5% และ 90.3% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม มีความจำเป็นต้องพิจารณาความเหมาะสมของสมการจากค่า lack of fit ควบคู่ไปด้วย ทั้งนี้ค่าที่เหมาะสมจะต้องมีค่ามากกว่า 0.05 จากตารางที่ 4.5 พบว่าสมการ EY มีค่า lack of fit = 0.100 และสมการ EE มีค่า lack of fit = 0.414 อีกทั้งค่า p-value ของ model

ทั้งสองมีค่าต่ำกว่า 0.05 แสดงว่าสมการทั้งสองมีความเหมาะสมในการอธิบายภาวะที่เหมาะสมของการเกิดคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน (Sánchez และคณะ, 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยทั้งสามปัจจัยที่นำมาศึกษาไม่ได้มีอิทธิพลต่อค่า EY และ EE ครบทั้งหมดทุกปัจจัย เนื่องจากมีบางปัจจัยที่มีค่า p-value มากกว่า 0.05 จึงต้องพิจารณาปัจจัยหลักแต่ละชนิดที่มีอิทธิพลต่อค่า EY และ EE ร่วมด้วย พบว่า pH ( $x_1$ ) และอัตราส่วนระหว่างสารเคลือบต่อน้ำมันหอมระเหย ( $x_3$ ) เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ในขณะที่อัตราส่วนของ GEL ต่อ GAB ( $x_2$ ) ถือเป็นปัจจัยที่ไม่ส่งผลต่อค่า EY และ EE มากที่สุด จึงกำหนดให้เป็นค่าคงที่ที่ 1.55 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ทำให้ค่า EY และ EE สูงที่สุด

**ตารางที่ 4.5** p-value ของปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อ encapsulation yield (EY) และ encapsulation efficiency (EE)

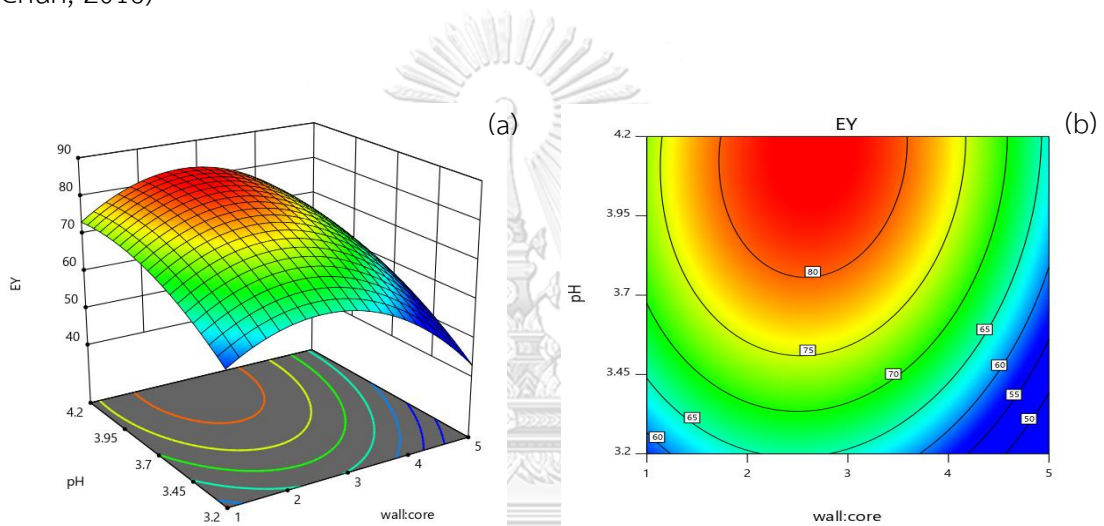
p-value	EY	EE
Model	0.005	0.008
$x_1$ -pH	0.001	0.012
$x_2$ -GEL:GAB	0.342	0.675
$x_3$ -wall:core	0.005	0.002
$x_1^2$	0.135	0.050
$x_2^2$	0.138	0.076
$x_3^2$	0.002	0.002
$x_1x_2$	0.034	0.194
$x_1x_3$	0.715	0.976
$x_2x_3$	0.648	0.093
Lack of fit	0.100	0.414

การแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวโดยมี GEL:GAB เป็นค่าคงที่ที่ 1.55 ของสมการการทำนาย EY และ EE นำเสนอในรูปแบบ surface และ contour plot ดังแสดงในรูปที่ 4.8 และ 4.9

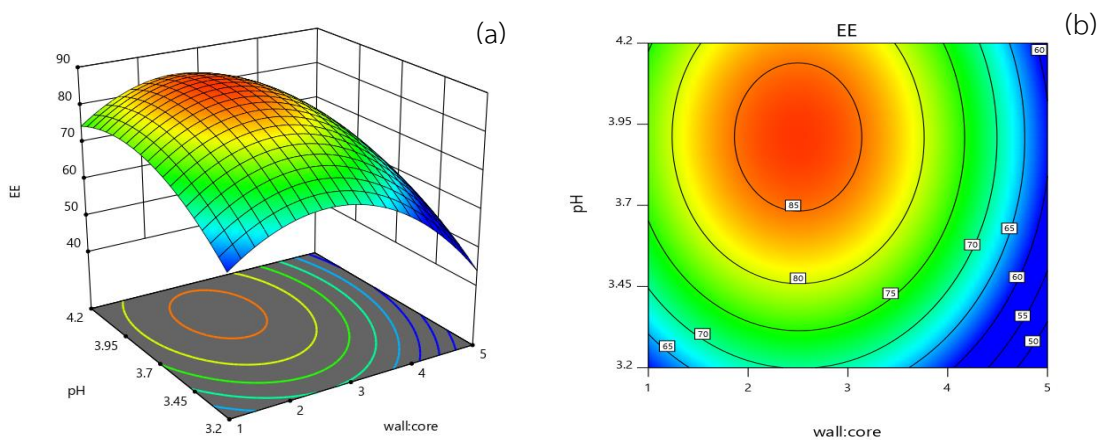
ค่า pH ส่งผลต่อการแตกตัวของหมู่ฟังก์ชันบนพอลิเมอร์ (หมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิล) ควบคุมสมดุลระหว่างประจุที่ตรงกันข้าม และความหนาแน่นของประจุ (Wang และคณะ, 2015) จากรูปที่ 4.8 และ 4.9 เมื่อ pH ลดลง พบว่าค่า EY และ EE เพิ่มขึ้น จนถึง pH ประมาณ 3.50

จากนั้นค่า EY และ EE ลดลงเรื่อย ๆ เพราะการลดลงของค่า pH ที่เกินจุดที่เหมาะสม ทำให้ GEL มีประจุบวกเพิ่มขึ้น ส่วน GAB แสดงประจุลบน้อยลงเนื่องจากเกิดการ protonation ที่หมู่คาร์บอกซิล ทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุลดลง (Dong และคณะ, 2007)

อัตราส่วนระหว่างสารเคลือบต่อน้ำมันหอมระเหยส่งผลต่อเสถียรภาพของอิมัลชัน เมื่ออัตราส่วนมากหรือน้อยเกินไปจะให้ค่า EY และ EE ต่ำ โดยอัตราส่วนที่ต่ำทำให้อิมัลชันที่เกิดขึ้นไม่เสถียร จึงมีน้ำมันบริเวณผิวของไมโครแคปซูลเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า EY และ EE ลดลง ในขณะที่เมื่ออัตราส่วนเพิ่มขึ้น จะลดปริมาณน้ำมันที่สามารถห่อหุ้มได้ลง ค่าทั้งสองจึงลดลง (Getachew และ Chun, 2016)



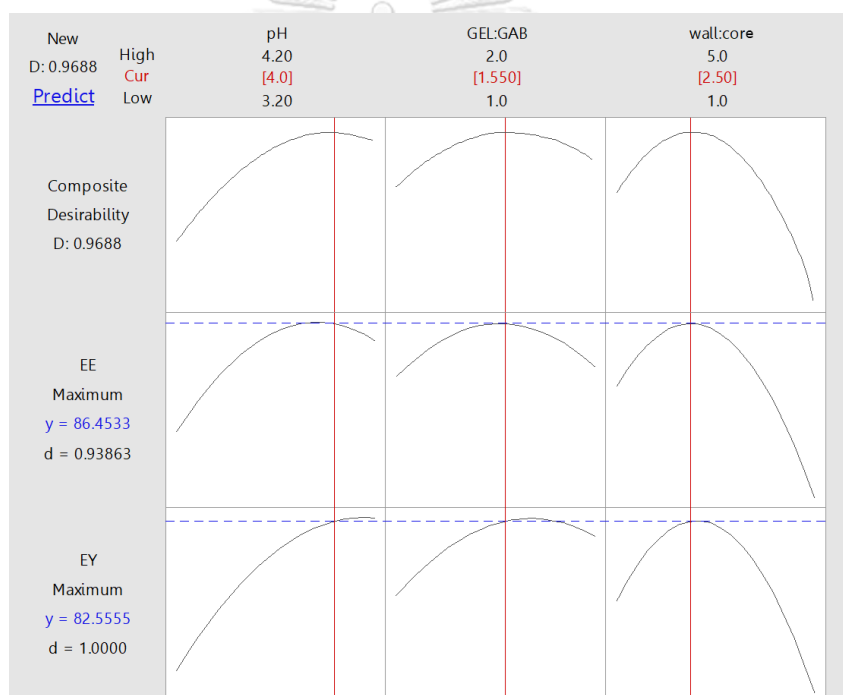
รูปที่ 4.8 surface (a) และ contour plot (b) จากสมการ encapsulation yield (GEL:GAB = 1.55)



รูปที่ 4.9 surface (a) และ contour plot (b) จากสมการ encapsulation efficiency (GEL:GAB = 1.55)

จากรูปที่ 4.8 และ 4.9 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไมโครแคปซูลมีดังนี้ pH เท่ากับ 4.00 ซึ่งอยู่ในช่วง pKa ของ GAB (2.20) และ pi ของ GEL (7.00) อัตราส่วนของ GEL ต่อ GAB ที่ 1.55 และอัตราส่วนระหว่างสารเคลือบต่อน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 2.50 ซึ่งภาวะเหล่านี้ทำให้ EY และ EE มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 82.56% และ 86.45% ตามลำดับ (รูปที่ 4.10)

การตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (validation) ด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ EE และ EY ที่ได้จากการทดลองที่ภาวะที่เหมาะสมและจากการทำนายด้วยสมการที่ 4.1 และ 4.2 แสดงผลในรูปแบบของร้อยละความแตกต่างพบว่า สมการทำนายค่า EY และ EE มีร้อยละความแตกต่างเท่ากับ 1.83 และ 4.18 ตามลำดับ ซึ่งได้ค่าน้อยมาก แสดงว่าสมการมีความถูกต้องเหมาะสม และสามารถอธิบายพฤติกรรมของตัวแปรต้นได้ดีมาก



รูปที่ 4.10 จุดที่เหมาะสมของระดับปัจจัยต่อ encapsulation yield และ efficiency

หมายเหตุ: D และ d คือ optimality, current variable (Cur) คือ ภาวะที่เหมาะสม

และ y คือ ค่า EY หรือ EE ที่ภาวะเหมาะสม

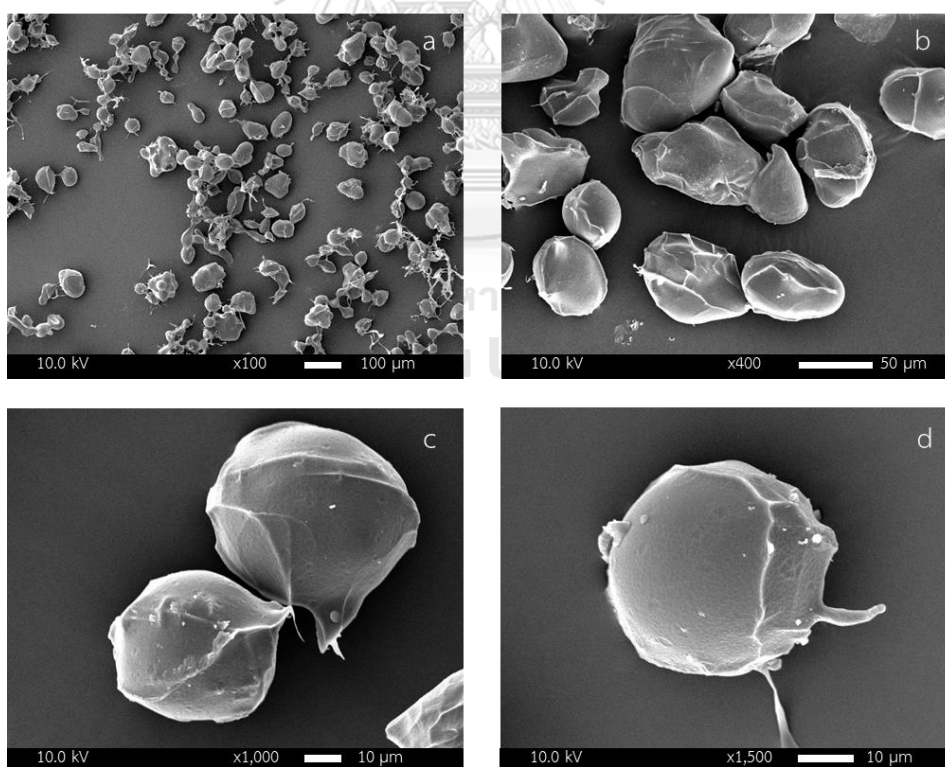
#### 4.5 สมบัติทางเคมี และกายภาพของไมโครแคปซูลที่เตรียมจากภาวะที่เหมาะสม

เตรียมไมโครแคปซูล GEL-GAB ที่ภาวะที่เหมาะสมดังนี้ pH เท่ากับ 4.00 GEL:GAB ที่ 1.55 และ wall:core เท่ากับ 2.50 แล้วนำมาวิเคราะห์ EY, EE และสมบัติการต้านออกซิเดชัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.6

จากตารางที่ 4.6 พบว่าค่า EY, EE, IC<sub>50</sub> และ FRAP value เท่ากับ 81.04%, 90.06%, 13.15 mg/mL และ 705.50  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$  ตามลำดับ ซึ่งร้อยละการผลิต ประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย และสมบัติการต้านออกซิเดชันของไมโครแคปซูล GEL-GAB ที่เตรียมจากภาวะที่เหมาะสมข้างต้นดีกว่าผลการทดลองที่ได้อธิบายไว้แล้วในหัวข้อที่ 4.3 รวมทั้งลักษณะโครงสร้างของไมโครแคปซูลที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM (รูปที่ 4.11) พบว่ามีลักษณะคล้ายทรงกลม ขนาดอนุภาคประมาณ 30-50 ไมโครเมตร การห่อหุ้มสมบูรณ์ และไม่พบรูพรุนบนผิวของไมโครแคปซูล

ตารางที่ 4.6 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของไมโครแคปซูล GEL-GAB ที่ภาวะที่เหมาะสม

คุณสมบัติ	GEL-GAB
EY (%)	81.04 $\pm$ 1.55
EE (%)	90.06 $\pm$ 2.02
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	13.15 $\pm$ 0.98
FRAP value ( $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ )	705.50 $\pm$ 13.41



รูปที่ 4.11 โครงสร้างของไมโครแคปซูล GEL-GAB ที่ภาวะที่เหมาะสม (pH=4.00, GEL:GAB=1.55 และ wall:core=2.50) ที่กำลังขยายของ SEM เท่ากับ  $\times 100$  (a),  $\times 400$  (b),  $\times 1,000$  (c) และ  $\times 1,500$  (d)

การสูญเสีย และการเปลี่ยนแปลงของสารระเหยในน้ำมันหอมระเหยเป็นข้อจำกัด หรือปัญหาที่สำคัญภายหลังกระบวนการกักเก็บด้วยวิธีเอ็นแคปซูลชัน (Jun-xia และคณะ, 2011) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยทั้งก่อน และหลังกระบวนการคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน โดยใช้เทคนิค GC-MS จากตารางที่ 4.7 พบว่าไมโครแคปซูล GEL-GAB มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาสารระเหยดีมาก เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้กระบวนการคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชันร่วมกับการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งซึ่งไม่ได้ใช้อุณหภูมิสูงในกระบวนการ จึงทำให้สัดส่วนขององค์ประกอบของสารระเหยเปลี่ยนแปลงน้อยมาก โดยสารระเหยเช่น D-limonene ในน้ำมันหอมระเหยก่อน และหลังกระบวนการมีสัดส่วนใกล้เคียงกันมาก แต่สารบางตัวมีสัดส่วนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เช่น beta-myrcene, 3-carene, beta-cymene และ *trans*-beta-ocimene เป็นต้น เนื่องจากมีสารบางตัวลดลง หรือสลายไป เมื่อกำหนดค่า %relative area จึงทำให้สารบางตัวเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (Jun-xia และคณะ, 2011; Getachew และ Chun, 2016)

Jun-xia และคณะ (2011) วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของน้ำมันส้มเกลี้ยงทั้งก่อนและหลังกระบวนการคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน ซึ่งใช้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดกับกัมอะราบิกเป็นสารเคลือบ และใช้การทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าไมโครแคปซูลที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพสูงในการกักเก็บสารระเหยในน้ำมันส้มเกลี้ยง โดยสัดส่วนของ D-limonene เพิ่มขึ้นจาก 89.65% เป็น 90.97% ส่วนงานวิจัยของ Yeo และคณะ (2005) พบว่าคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชันของ bake flavor oil ที่ใช้สารเคลือบ GEL-GAB และนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารแช่เยือกแข็ง สามารถควบคุมการปลดปล่อยของกลิ่น และช่วยปรับปรุงลักษณะทางประสาทสัมผัสของอาหารแช่เยือกแข็งได้

เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองทั้งหมดแล้ว สามารถสรุปได้ว่าการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นในไมโครแคปซูลด้วยวิธีเอ็นแคปซูลชัน แบบคอมเพล็กซ์โคแอเซอร์เวชัน โดยใช้สารเคลือบชนิด GEL-GAB มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารเคลือบชนิด GEL-ALG และ GEL-XTG และทำให้น้ำมันหอมระเหยเปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบผง หรือไมโครแคปซูลจึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และความสะดวกในการนำไปประยุกต์ใช้ การขนส่ง และการเก็บรักษา พร้อมทั้งยังช่วยปกป้อง และรักษาสมบัติเชิงหน้าที่ และเสถียรภาพของสารระเหยในน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น อีกทั้งยังช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทยได้ ในปัจจุบันผู้บริโภคต้องการความสะดวก รวดเร็ว และต้องการอาหารที่ดีต่อสุขภาพ และเป็นที่พึงพอใจ ดังนั้นสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้จากผล การศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้ โดยนำไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหยไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ เช่น การนำไปผสมเป็นเครื่องปรุงรสสำเร็จรูปชนิดผง เช่น ลาบ ยำ และแกงต่าง ๆ นำไปผสมกับผลิตภัณฑ์



เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ หรือเนื้อสัตว์แปรรูปเพื่อเพิ่มกลิ่นรส ลดการเกิดออกซิเดชันของไขมัน และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ได้

**ตารางที่ 4.7** สารระเหยที่พบในน้ำมันหอมระเหยตั้งต้น (essential oil) และน้ำมันหอมระเหยที่กักเก็บในไมโครแคปซูล (encapsulated oil)

No.	Compound	% Relative area	
		Essential oil	Encapsulated oil
1	alpha-thujene	0.19	0.18
2	alpha-pinene	7.36	7.07
3	sabinene	0.42	0.42
4	beta-myrcene	5.05	5.06
5	alpha-phellandrene	20.47	20.18
6	3-carene	0.43	0.44
7	beta-cymene	1.18	1.30
8	D-limonene	52.44	52.39
9	<i>trans</i> -beta-ocimene	2.29	2.34
10	<i>cis</i> -beta-ocimene	5.51	5.62
11	alpha-terpinolene	0.17	0.18
12	linalool	0.61	0.66
13	alpha-terpineol	0.31	0.33
14	decanal	0.69	0.72
15	octyl ester	0.74	0.77
16	beta-elemene	0.63	0.68
17	dodecanal	0.22	0.23
18	beta-caryophyllene	0.35	0.38
19	gamma-muurolene	0.75	0.83
20	valencene	0.19	0.22

หมายเหตุ: การวิเคราะห์ และการระบุชนิดของสารระเหย เหมือนกับในตารางที่ 4.2

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

สารระเหยในน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นมีดังนี้ monoterpene (D-limonene, alpha-phellandrene, alpha-pinene, *cis*-beta-ocimene, beta-myrcene, *trans*-beta-ocimene, beta-cymene, linalool, 3-carene, sabinene, alpha-terpineol, alpha-thujene และ alpha-terpinolene), sesquiterpene (gamma-muurolene, beta-elemene, beta-caryophyllene และ valencene), ester (octyl ester) และ aldehyde (decanal และ dodecanal) และมีสมบัติการต้านออกซิเดชันดังนี้ ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 8.23 mg/mL (ด้วยวิธี DPPH radical scavenging) และค่า FRAP value เท่ากับ 752.57  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$

การศึกษาชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นพบว่า ค่า pH ที่มีโอกาสเกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุของ GEL กับพอลิแซ็กคาไรด์ (ALG, GAB และ XTG) อยู่ในช่วง 2.00-7.00 ไมโครแคปซูลที่เตรียมจาก GEL-GAB มีร้อยละในการผลิต และประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย รวมทั้งสมบัติการต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุด และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR พบว่าไมโครแคปซูล GEL-ALG, GEL-GAB และ GEL-XTG มีการเกิดคอมเพล็กซ์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 3 ตัวอย่าง กับหมู่อะมิโนของ GEL อีกทั้งสารเคลือบที่เลือกใช้ทั้งหมด ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำมันหอมระเหยที่กักเก็บภายใน

ภาวะที่เหมาะสมในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น จากแผนการทดลอง RSM แบบ CCD มีดังนี้ pH เท่ากับ 4.00 อัตราส่วนของ GEL ต่อ GAB เท่ากับ 1.55 และอัตราส่วนระหว่างสารเคลือบต่อน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 2.50 นอกจากนี้ไมโครแคปซูล GEL-GAB ที่เตรียมได้จากค่าตัวแปรที่เหมาะสมทั้งสามนี้ มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาสารระเหยดีมาจากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

- ควรศึกษาปัจจัยอื่น ๆ เพิ่มเติมที่ส่งผลต่อกระบวนการคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน เช่น ความแรงของอ็อน, อัตราเร็วของโฮโมจิไนเซชัน และวิธีการทำแห้ง เป็นต้น
- ในปัจจุบันมีผู้บริโภคที่เลือกรับประทานอาหารมังสวิรัต หรืออาหารเจเพิ่มขึ้น จึงควรศึกษาสารเคลือบชนิดโปรตีนที่ทำจากพืช เช่น โปรตีนจากถั่ว เป็นต้น
- ควรศึกษาเสถียรภาพของไมโครแคปซูล และพฤติกรรมการปลดปล่อยของสารระเหยออกจากไมโครแคปซูล
- ควรศึกษาการนำไมโครแคปซูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างอาหาร



## บรรณานุกรม

- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (R. P. Adams Ed. 4<sup>th</sup> ed.). Carol Stream, IL, USA: Allured Publishing Corporation.
- Adams, R. P. and Nguyen, S. (2005). Infra-specific variation in *Juniperus deppeana* and *J. sperryi* in the Davis mountains of Texas: Variation in leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Phytologia*, 87(2), 97-109.
- Al-Assaf, S. and Phillips, G. O. (2009). Hydrocolloids: Structure-function relationships. *Food Science and Technology*, 23(3), 17-20.
- Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., and Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41(1), 1-15.
- Alvim, I. D. and Grosso, C. R. F. (2010). Microparticles obtained by complex coacervation: Influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 1069-1076.
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (18<sup>th</sup> ed.). Gaithersberg, MD, USA: AOAC International.
- Arun, K. V. and Paridhavi, M. (2011). Evaluation of physicochemical parameters on the fruit of *Zanthoxylum limonella* Alston (Family-Rutaceae). *International Journal of Comprehensive Pharmacy*, 2(11), 1-3.
- Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., and Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1), 220-243.
- Aziz, S., Gill, J., Dutilleul, P., Neufeld, R., and Kermasha, S. (2014). Microencapsulation of krill oil using complex coacervation. *Journal of Microencapsulation* 31(8), 774-784.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., and Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits,

- techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143-182.
- Banerjee, S., Chattopadhyay, P., Ghosh, A., Goyary, D., Karmakar, S., and Veer, V. (2013). Influence of process variables on essential oil microcapsule properties by carbohydrate polymer–protein blends. *Carbohydrate Polymers*, 93(2), 691-697.
- Barrow, C. J., Wang, B., Adhikari, B., and Liu, H. (2013). Spray drying and encapsulation of omega-3 oils. In C. Jacobsen, N. S. Nielsen, A. F. Horn, and A.-D. M. Sørensen (Eds.), *Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids* (pp. 194-225). Cambridge, England: Woodhead Publishing.
- Benzie, I. F. and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brownlee, I. A., Seal, C. J., Wilcox, M., Dettmar, P. W., and Pearson, J. P. (2009). Applications of alginates in food. In B. Rehm (Ed.), *Alginates: Biology and Applications* (pp. 211-228). Berlin, Heidelberg, Germany: Springer.
- Burnside, E. (2014). Hydrocolloids and gums as encapsulating agents. In A. G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare, and R. Sobel (Eds.), *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 241-252). San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Buttara, M., Intarapichet, K.-O., and Cadwallader, K. R. (2014). Characterization of potent odorants in Thai chempedak fruit (*Artocarpus integer* Merr.), an exotic fruit of Southeast Asia. *Food Research International*, 66, 388-395.
- Calderón-Oliver, M., Pedroza-Islas, R., Escalona-Buendía, H. B., Pedraza-Chaverri, J., and Ponce-Alquicira, E. (2017). Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract. *Food Hydrocolloids*, 62, 49-57.
- Charoensup, R., Duangyod, T., Phuneerub, P., and Singharachai, C. (2016). Pharmacognostic specification of *Zanthoxylum limonella* (Dennst.) Alston: Fruits

- and seeds in Thailand. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 7(4), 134-138.
- Charoenying, P., Teerarak, M., and Laosinwattana, C. (2010). An allelopathic substance isolated from *Zanthoxylum limonella* Alston fruit. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 411-416.
- Choi, H.-S. (2003). Character impact odorants of *Citrus* Hallabong [(*C. unshiu* Marcov × *C. sinensis* Osbeck) × *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2687-2692.
- Deepa, N., Kaur, C., Singh, B., and Kapoor, H. C. (2006). Antioxidant activity in some red sweet pepper cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 572-578.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., and Martino, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71(1), 126-134.
- Devi, N., Hazarika, D., Deka, C., and Kakati, D. K. (2012). Study of complex coacervation of gelatin A and sodium alginate for microencapsulation of olive oil. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 49(11), 936-945.
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., and Maji, T. K. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 136-145.
- Dong, Z. J., Toure, A., Jia, C. S., Zhang, X. M., and Xu, S. Y. (2007). Effect of processing parameters on the formation of spherical multinuclear microcapsules encapsulating peppermint oil by coacervation. *Journal of Microencapsulation*, 24(7), 634-646.
- Draget, K. I. (2009). Alginates. In G. O. Phillips and P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids* (2<sup>nd</sup> ed., pp. 807-828). Cambridge, England: Woodhead Publishing.
- Draget, K. I., Moe, S. T., Skjak-Bræk, G., and Smidsrød, O. (2006). Alginates. In A. M. Stephen, G. O. Phillips, and P. O. Williams (Eds.), *Food Polysaccharides and Their Applications* (2<sup>nd</sup> ed., pp. 289-334). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Edris, A. and Bergnstahl, B. (2001). Encapsulation of orange oil in a spray dried double emulsion. *Nahrung*, 45(2), 133-137.

- Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T. R., Dowling, K., Barrow, C. J., and Adhikari, B. P. (2015). Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, 19, 882-892.
- Fabie-Agapin, J. S., Janagap, S., Martizano, J., Ortillo, D., and Azucena-Topor, V. (2017). Physico-chemical characterization of essential oil from the peel and leaf of dalanghita (*Citrus nobilis*). *International Journal of Novel Research in Physics Chemistry and Mathematics*, 4(2), 1-13.
- García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., and Gómez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18(7), 549-579.
- García-Saldaña, J. S., Campas-Baypoli, O. N., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D. I., Cantú-Soto, E. U., and Rodríguez-Ramírez, R. (2016). Microencapsulation of sulforaphane from broccoli seed extracts by gelatin/gum arabic and gelatin/pectin complexes. *Food Chemistry*, 201, 94-100.
- Getachew, A. T. and Chun, B.-S. (2016). Optimization of coffee oil flavor encapsulation using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 126-134.
- Ghosh, A. K. and Bandyopadhyay, P. (2012). Polysaccharide-protein interactions and their relevance in food colloids. In D. N. Karunaratne (Ed.), *The Complex World of Polysaccharides* (pp. 395-408). Bangalore, India: Intech.
- Gordon, M. H. (2001). The development of oxidative rancidity in foods. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, and M. H. Gordon (Eds.), *Antioxidants in Food: Practical Applications* (pp. 7-21). Cambridge, England: Woodhead Publishing.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15(7), 330-347.
- Haug, I. J. and Draget, K. I. (2011). Gelatin. In G. O. Phillips and P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Food Proteins* (pp. 92-115). Cambridge, England: Woodhead Publishing.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.

- Ibekwe, C. A., Oyatogun, G. M., Esan, T. A., and Oluwasegun, K. M. (2017). Synthesis and characterization of chitosan/gum arabic nanoparticles for bone regeneration. *American Journal of Materials Science and Engineering*, 5(1), 28-36.
- Itthipanichpong, C., Ruangrunsi, N., and Pattanaautsahakit, C. (2002). Chemical compositions and pharmacological effects of essential oil from the fruit of *Zanthoxylum limonella*. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 85 Suppl 1, S344-354.
- IUPAC. (1997). *IUPAC Compendium of Chemical Technology*. Durham, North Carolina, USA.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Shafi, M. P., and Saidutty, A. (1998). Analysis of the aroma compounds of the essential oil of seeds of the spice plant *Zanthoxylum rhetsa* from southern India. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 206(3), 228-229.
- Jordan, M. J., Margaria, C. A., Shaw, P. E., and Goodner, K. L. (2002). Aroma active components in aqueous kiwi fruit essence and kiwi fruit puree by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5386-5390.
- Jun-xia, X., Hai-yang, Y., and Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125(4), 1267-1272.
- Junyaprasert, V. B., Mitrevej, A., Sinchaipanid, N., Boonme, P., and Wurster, D. E. (2001). Effect of process variables on the microencapsulation of vitamin A palmitate by gelatin-acacia coacervation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(6), 561-566.
- Justi, P. N., Sanjinez-Argandoña, E. J., and Macedo, M. L. R. (2018). Microencapsulation of Pequi pulp oil by complex coacervation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40, 1-11.
- Kennedy, J. R. M., Kent, K. E., and Brown, J. R. (2015). Rheology of dispersions of xanthan gum, locust bean gum and mixed biopolymer gel with silicon dioxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 48, 347-353.



- Kizilay, E., Kayitmazer, A. B., and Dubin, P. L. (2011). Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1), 24-37.
- Le Quere, J. L. and Latrasse, A. (1990). Composition of the essential oils of black currant buds (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(1), 3-10.
- Lii, C. y., Liaw, S. C., Lai, V. M. F., and Tomasik, P. (2002). Xanthan gum–gelatin complexes. *European Polymer Journal*, 38(7), 1377-1381.
- Lv, Y., Zhang, X., Zhang, H., Abbas, S., and Karangwa, E. (2013). The study of pH-dependent complexation between gelatin and gum arabic by morphology evolution and conformational transition. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 323-332.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., and Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 1-21.
- Maji, T. K. and Hussain, M. R. (2009). Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in genipin crosslinked chitosan–gelatin complex for mosquito repellent application. *Journal of Applied Polymer Science*, 111(2), 779-785.
- Matalanis, A., Jones, O. G., and McClements, D. J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1865-1880.
- McClements, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24(6), 621-625.
- Meng, Y. and Cloutier, S. (2014). Gelatin and other proteins for microencapsulation. In A. G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare, and R. Sobel (Eds.), *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 227-239). San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Mijin, D. Z. and Antonović, D. G. (2006). The temperature dependence of the retention index for *n*-alkyl esters of acetic, propionic, cyclohexanecarboxylic, benzoic and phenylacetic acid on DB-1 and DB-5 capillary columns. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 71, 629-637.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., and Anderson-Cook, C. M. (2009). The analysis of second-order response surfaces. In R. H. Myers, D. C. Montgomery, and C. M. Anderson-Cook (Eds.), *Response Surface Methodology: Process and Product*

- Optimization Using Designed Experiments* (pp. 219–265). Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons.
- Nanasombat, S. and Wimuttigosol, P. (2011). Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 45-53.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., and Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469-479.
- Nussinovitch, A. (2003). Hydrocolloids in flavor encapsulation. In A. Nussinovitch (Ed.), *Water-Soluble Polymer Applications in Foods* (pp. 93-113). Oxford, England: Blackwell Science.
- Oxley, J. (2014). Overview of microencapsulation process technologies. In A. G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare, and R. Sobel (Eds.), *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 35-46). San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Padala, S. R., Williams, P. A., and Phillips, G. O. (2009). Adsorption of gum Arabic, egg white protein, and their mixtures at the oil-water interface in limonene oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4964-4973.
- Pereira, K. C., Quintela, E. D., da Silva, D. J., do Nascimento, V. A., da Rocha, D. V. M., Silva, J., Forim, M. R., Silva, F. G., and Casal, C. M. (2018). Characterization of nanospheres containing *Zanthoxylum riedelianum* fruit essential oil and their insecticidal and deterrent activities against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Molecules*, 23(8), 2052-2070.
- Rodríguez Patino, J. M. and Pilosof, A. M. R. (2011). Protein–polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1925-1937.
- Sánchez, F. M., García, F., Calvo, P., Bernalte, M. J., and González-Gómez, D. (2016). Optimization of broccoli microencapsulation process by complex coacervation using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34, 243-249.
- Saravanan, M. and Rao, K. P. (2010). Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 808-816.

- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., and Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 689-753.
- Schmitt, C. and Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1), 63-70.
- Smeriglio, A., Alloisio, S., Raimondo, F. M., Denaro, M., Xiao, J., Cornara, L., and Trombetta, D. (2018). Essential oil of *Citrus lumia* Risso: Phytochemical profile, antioxidant properties and activity on the central nervous system. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 407-416.
- Sobel, R., Versic, R., and Gaonkar, A. G. (2014). Introduction to microencapsulation and controlled delivery in foods. In A. G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare, and R. Sobel (Eds.), *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 3-12). San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Somanabandhu, A. O., Ruangrunsi, N., Lange, G. L., and Organ, M. G. (1992). Constituents of the stem bark of *Zanthoxylum limonella*. *Journal of The Science Society of Thailand*, 18, 181-185.
- Souza, C. J. F. and Garcia-Rojas, E. E. (2017). Interpolymeric complexing between egg white proteins and xanthan gum: Effect of salt and protein/polysaccharide ratio. *Food Hydrocolloids*, 66, 268-275.
- Souza, C. J. F., Garcia-Rojas, E. E., Melo, N. R., Gaspar, A., and Lins, J. F. C. (2013). Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 375-381.
- Supabphol, R. and Tangjitjaroenkun, J. (2014). Chemical constituents and biological activities of *Zanthoxylum limonella* (Rutaceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(12), 2119-2130.
- Tangjitjaroenkun, J., Chantarasriwong, O., and Chavasiri, W. (2012a). Chemical constituents of the stems of *Zanthoxylum limonella* Alston. *Phytochemistry Letters*, 5(3), 443-445.
- Tangjitjaroenkun, J., Chavasiri, W., Thunyaharn, S., and Yompakdee, C. (2012b). Bactericidal effects and time-kill studies of the essential oil from the fruits of

- Zanthoxylum limonella* on multi-drug resistant bacteria. *Journal of Essential Oil Research*, 24(4), 363-370.
- Tangjitjaroenkun, J., Supabphol, R., and Chavasiri, W. (2012c). Antioxidant effect of *Zanthoxylum limonella* Alston. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(8), 1407-1414.
- Thies, C. (2007). Microencapsulation of flavors by complex coacervation. In J. M. Lakkis (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (pp. 149-169). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Torres-Martínez, R., García-Rodríguez, Y. M., Ríos-Chávez, P., Saavedra-Molina, A., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., and Garciglia, R. S. (2017). Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacognosy Magazine*, 13(Suppl 4), S875-S880.
- Vasisht, N. (2014). Selection of materials for microencapsulation. In A. G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare, and R. Sobel (Eds.), *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 173-180). San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Wang, H. M., Loganathan, D., and Linhardt, R. J. (1991). Determination of the pKa of glucuronic acid and the carboxy groups of heparin by <sup>13</sup>C-nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. *Biochemical Journal*, 278(Pt 3), 689-695.
- Wang, L., Cao, Y., Zhang, K., Fang, Y., Nishinari, K., and Phillips, G. O. (2015). Hydrogen bonding enhances the electrostatic complex coacervation between K-carrageenan and gelatin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 482, 604-610.
- Williams, P. A. and Phillips, G. O. (2009). Gum arabic. In G. O. Phillips and P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids* (2<sup>nd</sup> ed., pp. 252-273). Cambridge, England: Woodhead Publishing.
- Wongsrisom, N., Jinata, J., Manosan, B., Kuntakhoo, J., Wankuan, S., and Sriyam, S. (2014). Anti-bacterial activities of essential oils from mah-khwuaen (*Zanthoxylum limonella* Alston). *KMUTT Research and Development Journal*, 37(1), 3-15.

- Yan, C. and Zhang, W. (2014). Coacervation processes. In A. G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare, and R. Sobel (Eds.), *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 125-137). San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Yang, C., Chen, H., Chen, H., Zhong, B., Luo, X., and Chun, J. (2017). Antioxidant and anticancer activities of essential oil from Gannan navel orange peel. *Molecules*, 22, 1391-1400.
- Ye, A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: Principles and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(3), 406-415.
- Yeo, Y., Bellas, E., Firestone, W., Langer, R., and Kohane, D. S. (2005). Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7518-7525.
- Zhou, P., Mulvaney, S. J., and Regenstein, J. M. (2006). Properties of Alaska pollock skin gelatin: A comparison with tilapia and pork skin gelatins. *Journal of Food Science*, 71(6), C313-C321.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ภาคผนวก ก

### วิธีวิเคราะห์

#### ภาคผนวก ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC (2005)

##### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. ถ้วยอะลูมิเนียม
3. เดสิคเคเตอร์ (desiccator)
4. hot air oven (Gen Lab รุ่น PRIME, UK)

##### วิธีวิเคราะห์

1. อบถ้วยอะลูมิเนียมในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ  $100 \pm 5$  °C นาน 1 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบแล้วทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ จากนั้นจึงชั่งน้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมเปล่าที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างผลมะแขว่นบดที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 10 mesh ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียม
3. อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ  $100 \pm 5$  °C จนตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่ (ได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 0.005 กรัม)
4. นำตัวอย่างออกจากตู้อบลมร้อน ทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์
5. ชั่งน้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมที่มีตัวอย่างแห้ง และคำนวณหาปริมาณความชื้นตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ moisture (wet basis)} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

$$\% \text{ moisture (dry basis)} = \frac{M_1 - M_2}{M_2} \times 100$$

เมื่อ  $M_1$  คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

$M_2$  คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

ภาคผนวก ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (crude protein) ตามวิธีของ AOAC (2005)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. เครื่องย่อยโปรตีน (digester, BÜCHI รุ่น K-424, Switzerland)
3. เครื่องดักจับไอกรด (scrubber, BÜCHI รุ่น B-414, Switzerland)
4. เครื่องกลั่นไนโตรเจน (distillation unit, BÜCHI รุ่น B-324, Switzerland)

สารเคมี

1. 98% sulfuric acid (A.R. grade, QRëC, New Zealand)
2. 0.1 M hydrochloric acid (A.R. grade, QRëC, New Zealand)
3. 50% (w/v) sodium hydroxide (A.R. grade, Loba Chemie, India)
4. 4% (w/v) boric acid (A.R. grade, Merck, Germany)
5. selenium mixture (A.R. grade, Merck, Germany)
6. อินดิเคเตอร์ (เตรียมโดยละลาย methyl red 0.125 g และ methylene blue 0.0825 g ใน 90% (v/v) ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

วิธีวิเคราะห์

ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งน้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในหลอดย่อย
2. เติม selenium mixture 0.5 กรัม และ sulfuric acid 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อย
3. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง
4. ต่อหลอดย่อยเข้ากับเครื่องย่อยโปรตีน แล้วย่อยจนตัวอย่างมีสีน้ำตาลเข้ม (ใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที)
5. ปิดเตา และยกออกจากเครื่องย่อย ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง



### ขั้นตอนการกลั่นและไตเตรต

1. กลั่นตัวอย่างที่ผ่านการย่อย โดยเติม 50% (w/v) NaOH ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อยโปรตีน เวลาในการกลั่นเท่ากับ 5 นาที เพื่อให้ทำปฏิกิริยาเกินพอ ซึ่งสังเกตได้จากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีคล้ำ นำขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 4% (w/v) boric acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ปลายของอุปกรณ์ควบแน่นแช่ในสารละลาย

2. กลั่นให้ได้ของเหลวอยู่ในระดับ 200 มิลลิลิตร

3. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ในขวดรูปชมพู่ด้วย 0.1 M HCl ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจนถึงจุดยุติ (สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน) บันทึกปริมาตร HCl ที่ใช้ และคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนดังสมการ

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(V_s - V_b) \times N \times 14 \times 100}{\text{g sample} \times 1000}$$

เมื่อ  $V_s$  คือ ปริมาตรของ HCl ที่ไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

$V_b$  คือ ปริมาตรของ HCl ที่ไตเตรต blank (มิลลิลิตร)

$N$  คือ ความเข้มข้น HCl (M)

4. คำนวณปริมาณโปรตีน ดังสมการ

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = \% \text{ Nitrogen} \times 6.25$$

CHULALONGKORN UNIVERSITY

### ภาคผนวก ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมด (crude fat) ตามวิธีของ AOAC (2005)

#### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. เครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet extractor, Gerhardt รุ่น HC61, Germany)
3. rotary vacuum evaporator (BÜCHI รุ่น Rotavapor R-114, Switzerland)
4. thimble
5. hot air oven (Gen Lab รุ่น PRIME, UK)
6. เดซิเคเตอร์ (desiccator)

### สารเคมี

1. petroleum ether (A.R. grade, J.T. Baker Neutrasorb, USA)

### วิธีวิเคราะห์

1. อบขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ  $100 \pm 5$  °C จนแห้งสนิท และทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักขวดเปล่าที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างที่อบแห้งแล้วให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
3. ใส่ตัวอย่างลงใน thimble แล้วปิดด้วยสำลี ประกอบเข้ากับชุดสกัดไขมัน โดยใช้ตัวทำละลาย petroleum ether ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 2 ชั่วโมง
4. ระเหย petroleum ether ในขวดก้นกลม ด้วยเครื่องระเหยจนหมด
5. อบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ  $100 \pm 5$  °C จนแห้งสนิท แล้วทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์
6. ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมที่อบแล้ว (มีไขมัน) เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณไขมันทั้งหมด ตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณไขมันทั้งหมด (\%)} = \frac{W_0}{W} \times 100$$

เมื่อ  $W_0$  คือ น้ำหนักน้ำมันที่สกัดได้ (กรัม)

$W$  คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก.4 การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยอาหาร (crude fiber) ตามวิธีของ AOAC (2005)

### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. แท่งแก้วปลายยาง
3. ผ้าขาวบาง
4. กระดาษลิตมัส
5. กรวยบุชเนอร์
6. ครูซิเบิล

7. vacuum pump (Gast รุ่น DOA-P504-BN, USA)
8. hot air oven (Gen Lab รุ่น PRIME, UK)
9. magnetic stirrer with heating plate (IKA รุ่น C-MAG HS7, Germany)
10. เตาเผา (muffle furnace, Carbolite gero รุ่น CWF 1200, UK)
11. เดสิคเคเตอร์ (desiccator)
12. ถ้วยอะลูมิเนียม

### สารเคมี

1. 1.25% (w/w) sulfuric acid (A.R. grade, QRëC, New Zealand)
2. 5% (w/w) sodium hydroxide (A.R. grade, Loba Chemie, India)
3. 1% (w/w) hydrochloric acid (A.R. grade, QRëC, New Zealand)
4. 95% ethanol (A.R. grade, QRëC, New Zealand)

### วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างแห้งที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว ประมาณ 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
2. เติม 1.25% (w/w)  $H_2SO_4$  จนถึงขีดบอกปริมาตร 200 มิลลิลิตร
3. ให้ความร้อนจนเดือด แล้วต้มด้วยไฟอ่อน 20 นาที ในระหว่างการต้ม หากปริมาตรลดต่ำกว่าขีด 200 มิลลิลิตร ให้เติมน้ำกลั่นต้มเดือดให้ถึงขีด ระหว่างต้ม ให้คนด้วยแท่งแก้วที่มีปลายยาวเป็นระยะ ๆ
4. กรองส่วนผสมผ่านผ้าขาวบางหลาย ๆ ชั้น บนกรวยบุชเนอร์ ซึ่งวางบนขวดรูปชมพู่ ที่ต่อกับปั๊มสุญญากาศ
5. ล้างกากของตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นต้มเดือดหลาย ๆ ครั้ง จนน้ำที่ผ่านออกมาไม่เป็นกรดอีก (ทดสอบความเป็นกรดของน้ำที่ผ่านออกมาด้วยกระดาษลิตมัส)
6. นำกากใส่กลับลงในบีกเกอร์ใบเดิม หากมีกากติดอยู่ที่ผ้าขาวบาง ให้ชะออกด้วยน้ำกลั่น ปริมาณน้อยที่สุด
7. เติม 5% (w/w) NaOH ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
8. เติมน้ำกลั่นต้มเดือดจนถึงขีดบอกปริมาตร 200 มิลลิลิตร

9. ให้ความร้อนจนเดือด แล้วต้มด้วยไฟอ่อน 20 นาที ในระหว่างการต้ม หากปริมาตรลดลงต่ำกว่าขีด 200 มิลลิลิตร ให้เติมน้ำกลั่นต้มเดือดจนถึงขีด ระหว่างต้ม คนด้วยแท่งแก้วที่มีปลายยาวเป็นระยะ ๆ

10. กรองส่วนผสมผ่านผ้าขาวบางหลาย ๆ ชั้น บนกรวยบุชเนอร์ ซึ่งวางบนขวดรูปชมพู่ ที่ต่อกับปัมสุญญากาศ

11. ล้างกากด้วยน้ำกลั่นต้มเดือดหลาย ๆ ครั้ง แล้วชะด้วย 1% (w/w) HCl 1 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นต้มเดือดจนน้ำล้างที่ผ่านออกมาไม่เป็นกรดอีก (ทดสอบความเป็นกรดของน้ำล้างที่ผ่านออกมาด้วยกระดาษลิตมัส)

12. ชะกากด้วย 95% ethanol จากนั้นนำกากใส่ลงในถ้วยอะลูมิเนียม อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ  $100 \pm 5$  °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่

13. นำถ้วยอะลูมิเนียมออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก (หักลบน้ำหนักของภาชนะ กำหนดให้น้ำหนักตัวอย่างนี้เป็น  $W_1$ )

14. ชั่งครูชีเบลพร้อมฝาที่เผาและทิ้งให้เย็น (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน)

15. ใส่กากในครูชีเบล นำไปเผาบน hot plate จนได้เถ้าสีดำและหมดควัน

16. เผาตัวอย่างจากข้อ 15 ในเตาเผา (muffle furnace) ที่ 550 °C จนได้เถ้าสีขาว

17. นำครูชีเบลออกมาจากเตาเผา ทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก (หักลบน้ำหนักของภาชนะ กำหนดให้น้ำหนักตัวอย่างนี้เป็น  $W_2$ ) คำนวณ % crude fiber ตามสมการ

$$\% \text{ crude fiber} = \frac{W_1 - W_2}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)}} \times 100$$

เมื่อ  $W_1$  คือ น้ำหนัก crude fiber + น้ำหนักเถ้า

$W_2$  คือ น้ำหนักเถ้า

## ภาคผนวก ก.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้าตามวิธีของ AOAC (2005)

### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. ครูชีเบล
3. muffle furnace (Carbolite gero รุ่น CWF 1200, UK)
4. magnetic stirrer with heating plate (IKA รุ่น C-MAG HS7, Germany)
5. เดสิคเคเตอร์ (desiccator)

### วิธีวิเคราะห์

1. เผาครูชีเบลพร้อมฝาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 °C นาน 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผา แล้วทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก
2. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ (ต่างกันไม่เกิน 0.005 กรัม) แล้วบันทึกผล ( $W_1$ )
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 3 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ลงในครูชีเบล บันทึกผล (S)
4. เผาตัวอย่างจากข้อ 3 บน hot plate จนได้เถ้าสีดำและหมดควัน
5. เผาตัวอย่างจากข้อ 4 ในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 °C จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว (อย่างต่ำ 3 ชั่วโมง) นำออกจากเตาเผา เก็บในเดสิคเคเตอร์ ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก
6. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 5 จนกว่าน้ำหนักจะคงที่ (ต่างกันไม่เกิน 0.005 กรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล ( $W_2$ )
7. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสมการ

$$\% \text{ ash} = \frac{W_2 - W_1}{S} \times 100$$

เมื่อ	$W_1$	คือ น้ำหนักครูชีเบล
	$W_2$	คือ น้ำหนักครูชีเบล + น้ำหนักเถ้า
	S	คือ น้ำหนักตัวอย่าง

### ภาคผนวก ก.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

คำนวณโดยวิเคราะห์องค์ประกอบอื่น ๆ ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยอาหาร และเถ้า รวมกันในหน่วยร้อยละ แล้วหักออกจาก 100 จะได้ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{คาร์โบไฮเดรต (wb)} = 100 - (\% \text{ความชื้น} - \% \text{โปรตีน} - \% \text{ไขมัน} - \% \text{เส้นใยอาหาร} - \% \text{เถ้า})$$

$$\% \text{คาร์โบไฮเดรต (db)} = 100 - (\% \text{โปรตีน} - \% \text{ไขมัน} - \% \text{เส้นใยอาหาร} - \% \text{เถ้า})$$

### ภาคผนวก ก.7 การวิเคราะห์สารระเหยในน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ตัดแปลงวิธีจาก Jun-xia และคณะ (2011)

#### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. 10  $\mu\text{L}$  syringe (SGE Analytical Science, Australia)
3. 100  $\mu\text{L}$  syringe (SGE Analytical Science, Australia)
4. 20 mL vials/Teflon-lined caps (National Scientific, USA)
5. 2 mL amber vials (National Scientific, USA)
6. 3 mL disposable syringe (Nipro, Thailand)
7. sonicator (Elma รุ่น Elmasonic E70H, Germany)
8. polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane 0.22  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher scientific, USA)
9. triple quadrupole gas chromatography mass spectrometer (GC-MS)
  - GC model: Agilent Technologies รุ่น 7890B GC system, USA
  - MSD model: Agilent Technologies รุ่น 7000C GC/MS Triple Quad, USA
  - GC column: HP-5ms Ultra Inert, J&W, Agilent Technologies, USA (30 m x 250  $\mu\text{m}$  i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness)
  - autosampler: Agilent Technologies รุ่น 7633 ALS, USA

### สารเคมี

1. hexane (H.P.L.C. grade, Fischer Scientific, UK)
2. methanol (H.P.L.C. grade, Fischer Scientific, UK)
3. anhydrous sodium sulphate (A.R. grade, Loba Chemie, India)
4. C7-C30 saturated alkanes standard (G.C. grade, Supelco, USA)

### วิธีเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย หรือไมโครแคปซูล GEL-GAB 1 กรัม ลงในขวด 20 mL vials/Teflon-lined caps
2. เติมหักละลายผสมระหว่าง hexane กับน้ำ ในอัตราส่วน 1:2 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร
3. sonicate ตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ เก็บชั้นของสารละลาย hexane (ชั้นบน)
5. เติมหัก anhydrous sodium sulphate (ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 90 °C นาน 3 ชั่วโมง) ประมาณ 5 กรัม เพื่อดูดซับน้ำที่อาจติดมาด้วย
6. ดูดสารละลายที่ได้ด้วย 3 mL disposable syringe
7. ต่อ PTFE membrane เข้ากับปลาย syringe แล้วฉีดสารละลายลงสู่ 2 mL amber vials เพื่อกรองตัวอย่างก่อนวิเคราะห์

### วิธีวิเคราะห์

1. ฉีดตัวอย่างที่สกัดได้ หรือ สารละลายมาตรฐาน n-alkanes เข้มข้น 100 ppm (ใน hexane) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ลงในเครื่อง GC-MS ด้วย auto sampler โดยมีการตั้งค่า injection ดังนี้

- inlet mode: split mode; split ratio = 50:1
- inlet temperature: 230 °C

2. ตั้งค่าคอลัมน์ชนิด HP-5ms โดยใช้แก๊ส helium เป็นตัวพา ดังนี้
  - He carrier flow rate: 1.0 mL/min
  - average velocity: 36.623 cm/sec
  - constant flow: 1.0 mL/min

3. ตั้งค่าโปรแกรมของ oven ให้เพิ่มอุณหภูมิจาก 60 °C ไป 250 °C ที่อัตรา 3 °C ต่อนาที เป็นเวลาทั้งสิ้น 60 นาที จากนั้นทำ post run ที่อุณหภูมิ 280 °C โดยใช้ He flow rate ที่ 2.0 mL/min

4. ภาวะของ mass selective detector (MSD) เป็นดังนี้

- solvent delay: 1.6 min
- m/z scan range: 33-400 amu
- transfer line temperature (Aux heater): 280 °C
- ionization source temperature: 230 °C
- ionization voltage: 70 eV

5. หาชนิดของสารโดยเทียบข้อมูลจาก mass selective detector กับข้อมูลจาก library ของ National Institute of Standards and Technology (NIST2011, USA) และเทียบค่า retention index (RI) ที่คำนวณได้กับค่า RI จากเอกสารอ้างอิง โดยค่า RI สามารถคำนวณได้จากสมการ Kovats RI (Buttara และคณะ, 2014) ดังนี้

$$RI = 100N + 100n \frac{t_{R_a} - t_{R_N}}{t_{R_{(N+n)}} - t_{R_N}}$$

เมื่อ RI คือ retention index หรือ เวลาสัมพัทธ์ของสารที่แยกออกมา (ไม่มีหน่วย)

N คือ จำนวนคาร์บอนของสารมาตรฐาน n-alkanes ที่แยกออกมาก่อนสารที่สนใจ

n คือ จำนวนคาร์บอนที่แตกต่างกันของสารมาตรฐาน n-alkanes ที่ล้อมระหว่างสารที่สนใจ

$t_{R_a}$ ,  $t_{R_N}$  และ  $t_{R_{(N+n)}}$  คือ retention time ของสารที่สนใจ สารมาตรฐาน n-alkanes ที่แยกออกมาก่อน และหลังสารที่สนใจ ตามลำดับ



ภาคผนวก ก.8 การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ตามวิธีของ Nanasombat และ Wimuttigosol (2011)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. spectrophotometer (Thermo Fisher scientific รุ่น GENESYS 20, USA)

สารเคมี

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (A.R. grade, Sigma-Aldrich, Germany)
2. 99.9% methanol (A.R. grade, Fisher Scientific, UK)
3. 2,6-di-tert-butyl-4-methyl-phenol (butylated hydroxytoluene, BHT) (G.C. grade, Sigma-Aldrich, Germany)

วิธีเตรียมสารละลาย DPPH

1. เตรียม stock solution โดยนำ DPPH 20 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ประมาณ 50 มิลลิลิตร เทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จะได้สารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02% (w/v) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ได้ไม่เกิน 5 วัน
2. เตรียม daily working solution โดยเปิดสารละลาย DPPH (stock solution) 20 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จะได้สารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.004% (w/v)

วิธีเตรียมตัวอย่าง

1. เตรียมตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นในช่วง 0-100 mg/mL ใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย
2. เตรียม positive control (BHT) ที่ความเข้มข้นในช่วง 0-1 mg/mL ใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย

### วิธีวิเคราะห์

1. บีบตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยหรือ BHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลาย DPPH 4 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที สารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเข้ม เป็นสีม่วงอ่อน หรือสีเหลือง (หากมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูง)

2. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ methanol ในการปรับค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0 (set blank)

3. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณ % inhibition ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

เมื่อ  $A_{\text{control}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม (ไม่มีน้ำมันหอมระเหย หรือ BHT)

$A_{\text{sample}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันหอมระเหย หรือ BHT

4. สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย หรือ BHT กับค่า % inhibition แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระลงได้ 50% ( $IC_{50}$ )

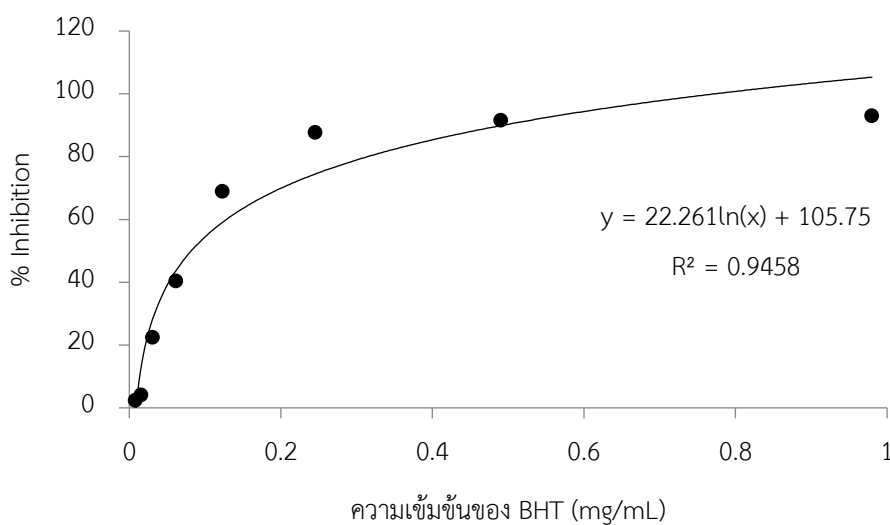
### ตัวอย่างวิธีการคำนวณค่า $IC_{50}$

1. หาค่า %inhibition ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ ก.1

ตารางที่ ก.1 ค่า %inhibition ของ BHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น BHT (mg/mL)	$A_{\text{sample}}$	$A_{\text{control}}$	% Inhibition
0.9800	0.076	0.909	91.64
0.4900	0.092	0.909	89.88
0.2450	0.101	0.909	88.89
0.1225	0.301	0.909	66.89
0.0613	0.556	0.909	38.83
0.0306	0.731	0.909	19.58
0.0153	0.816	0.909	10.23
0.0077	0.852	0.909	6.27

2. สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ BHT กับค่า % inhibition ดังรูปที่ ก.1



รูปที่ ก.1 กราฟ %inhibition ของสารละลาย BHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3. คำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระลงได้ 50% ( $IC_{50}$ ) จากสมการที่ได้จากกราฟดังนี้

$$y = 22.261\ln(x) + 105.75; \text{ แทนค่า } y (\% \text{inhibition}) = 50$$

$$50 = 22.261\ln(x) + 105.75$$

$$x = 0.082 \text{ mg/mL}$$

4. จากผลการคำนวณ ค่า  $IC_{50}$  ของ BHT เท่ากับ 0.082 mg/mL

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก.9 การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) ตามวิธีของ Nanasombat และ Wimuttigol (2011)

#### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. spectrophotometer (Thermo Fisher scientific รุ่น GENESYS 20, USA)
3. shaking water bath (Julabo รุ่น SW23, Germany)

### สารเคมี

1. sodium acetate trihydrate (A.R. grade, QRëC, New Zealand)
2. 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (A.R. grade, Sigma-Aldrich, Germany)
3. ferric chloride (A.R. grade, QRëC, New Zealand)
4. glacial acetic acid (A.R. grade, QRëC, New Zealand)
5. 0.1 M hydrochloric acid (A.R. grade, QRëC, New Zealand)
6. 99.9% methanol (A.R. grade, Fisher Scientific, UK)
7. ferrous sulfate heptahydrate (A.R. grade, Loba Chemie, India)

### วิธีเตรียมสารละลาย FRAP

1. เตรียมสารละลาย acetate buffer โดยผสม sodium acetate trihydrate 0.3 กรัม และ glacial acetic acid 1.6 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย deionized water
2. เตรียมสารละลาย ferric chloride โดยละลาย ferric chloride 270 มิลลิกรัม ใน deionized water แล้วปรับเป็นปริมาตร 50 มิลลิลิตร
3. เตรียมสารละลาย TPTZ โดยชั่งน้ำหนัก 31.2 มิลลิกรัม ละลายใน HCl เข้มข้น 0.04 M เกล่งในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และเติม HCl จนถึงขีดบอกปริมาตร
4. เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสม acetate buffer 25 มิลลิลิตร, ferric chloride 2.5 มิลลิลิตร และ TPTZ 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ

### วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4$ )

1. ชั่ง  $\text{FeSO}_4$  69.5 มิลลิกรัม ละลายใน deionized water ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลาย  $\text{FeSO}_4$  ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5,000  $\mu\text{M}$
2. เจือจางสารละลาย  $\text{FeSO}_4$  จากข้อ 1 ด้วย deionized water จนได้ความเข้มข้นในช่วง 50-800  $\mu\text{M}$

### วิธีวิเคราะห์

1. ให้ความร้อนสารละลาย FRAP ที่อุณหภูมิ 37 °C ใน water bath จะได้สารละลายสีน้ำตาลอมส้ม

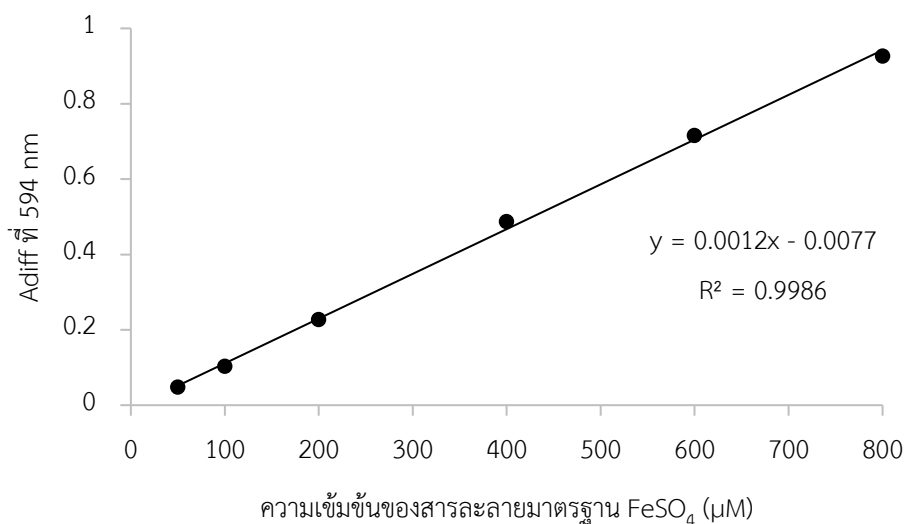
2. ปิเปตตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย 50 ไมโครลิตร (ในการสร้างกราฟมาตรฐานจะใช้สารละลายของ FeSO<sub>4</sub> แทนตัวอย่าง) ผสมกับสารละลาย FRAP 1.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร โดยใช้ deionized water ในการปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0 (set blank) ซึ่งสีของตัวอย่างจะเปลี่ยนสีจากเดิมไปเป็นสีน้ำเงิน

4. หาผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{diff}$ ) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากตัวอย่าง ( $A_{final}$ ) มาหักลบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย FRAP ( $A_{initial}$ )

$$A_{diff} = A_{final} - A_{initial}$$

5. คำนวณหาสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยเทียบกับ  $A_{diff}$  ของกราฟมาตรฐานของ FeSO<sub>4</sub> (รูปที่ ก.2) รายงานค่าเป็น FRAP value ( $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ )



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP

ภาคผนวก ก.10 การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของสารเคลือบ ตามวิธีของ Calderón-Oliver และคณะ (2017)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS1602S/01, Switzerland)
2. pH meter (Mettler Toledo รุ่น Sevencompact, Switzerland)
3. shaking water bath (Julabo รุ่น SW23, Germany)
4. zetasizer nano (Malvern Instruments รุ่น ZS90, UK)

สารเคมี

1. 0.1 M hydrochloric acid (A.R. grade, QR&C, New Zealand)
2. 0.1 M sodium hydroxide (A.R. grade, Loba Chemie, India)

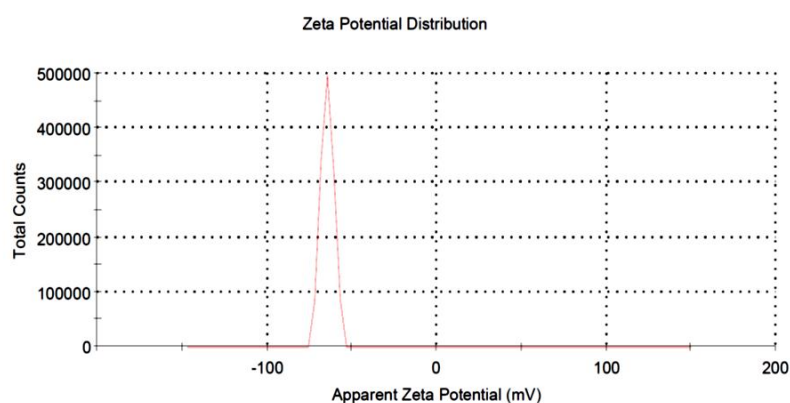
วิธีวิเคราะห์

1. ชั่ง แอลจีเนต (ALG) กัมอะราบิก (GAB) แชนแทนกัม (XTG) หรือเจลาติน (GEL) 0.8 กรัม ละลายใน deionized water ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 °C
2. ปรับ pH ของสารละลายในข้อ 1 ด้วย HCl หรือ NaOH เข้มข้น 0.1 M ให้ค่า pH อยู่ในช่วงประมาณ 2.00-8.00
3. ฉีดสารละลาย ALG, GAB, XTG หรือ GEL ที่ pH ต่าง ๆ เข้า capillary cell ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เพราะฟองที่เกิดขึ้นจะขัดขวางการเคลื่อนที่ของอนุภาค
4. ใส่ capillary cell เข้าเครื่อง zetasizer nano ตั้งค่าดังนี้  
measurement position: 2.00 mm  
cell description: Clear disposable zeta cell
5. วัดค่าศักย์ซีต้า (zeta potential, mV) โดยตัวอย่างผลการทดลองที่ได้มีลักษณะดังรูปที่ ก.3 ซึ่งเป็นตัวอย่างสารละลาย ALG ที่ pH 2.00

**Results**

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV): -64.4</b>	<b>Peak 1: -64.4</b>	100.0	3.79
<b>Zeta Deviation (mV): 3.79</b>	<b>Peak 2: 0.00</b>	0.0	0.00
<b>Conductivity (mS/cm): 5.11</b>	<b>Peak 3: 0.00</b>	0.0	0.00

**Result quality Good**



รูปที่ ก.3 ตัวอย่างผลการทดลองที่ได้จากเครื่อง zetasizer

ภาคผนวก ก.11 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น  
(Encapsulation efficiency, EE) ตัดแปลงวิธีจาก Aziz และคณะ (2014)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS1602S/01, Switzerland)
2. shaking water bath (Julabo รุ่น SW23, Germany)
3. shaking incubator (n-Biotek รุ่น NB-205, South Korea)
4. rotary vacuum evaporator (BÜCHI รุ่น Rotavapor R-114, Switzerland)
5. กระดาษกรอง Whatman No.4 (Whatman, Maidstone, UK)

สารเคมี

1. 1 M sodium hydroxide (A.R. grade, Loba Chemie, India)
2. petroleum ether (A.R. grade, J.T. Baker Neutrasorb, USA)
3. 99.9% ethanol (A.R. grade, Fisher Scientific, UK)

### วิธีวิเคราะห์

#### *ปริมาณน้ำมันทั้งหมด (total oil content)*

1. ชั่งไมโครแคปซูล 1 กรัม ผสมกับ ethanol 2 มิลลิลิตร และ 1 M sodium hydroxide ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วที่มีฝาปิด
2. แช่ใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 45 °C นาน 15 นาที เพื่อให้ไมโครแคปซูลแตกออกจนหมด
3. ทิ้งไว้ให้เย็น โดยแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง
4. เติงลงในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร สกัดน้ำมันทั้งหมดด้วย petroleum ether ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับ ethanol 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 5 นาที
5. ทิ้งไว้จนแยกชั้น แล้วนำสารละลายส่วนบนไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง rotary vacuum evaporator
6. ชั่งน้ำหนัก เพื่อหาปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่สกัดได้

#### *ปริมาณน้ำมันที่ผิวไมโครแคปซูล (surface oil)*

1. ชั่งไมโครแคปซูล 1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
2. เติม petroleum ether ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 90 รอบต่อนาที นาน 15 นาที
3. กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman no. 4
4. สกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง
5. ระเหยสารละลายที่ได้จากการสกัดเพื่อเอา petroleum ether ออกโดยใช้เครื่อง rotary vacuum evaporator
6. ชั่งน้ำหนัก เพื่อหาปริมาณน้ำมันที่ผิวไมโครแคปซูล
7. คำนวณ encapsulation efficiency ดังสมการ

$$EE (\%) = \frac{\text{ปริมาณน้ำมันทั้งหมด} - \text{ปริมาณน้ำมันที่ผิวไมโครแคปซูล}}{\text{ปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่เติมลงไป}} \times 100$$



## ภาคผนวก ก.12 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไมโครแคปซูลด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. โกร่งบดยา
3. Fourier transform infrared spectrometer (Perkin elmer รุ่น Spectrum one, Waltham, Massachusetts, USA)

### สารเคมี

1. potassium bromide (I.R. grade, Merck, Germany)

### วิธีวิเคราะห์

ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยใช้วิธี *liquid cell technique*

1. ควบน้ำมันหอมระเหย หรือน้ำมันหอมระเหยที่กักเก็บในไมโครแคปซูล GEL-ALG, GEL-GAB และ GEL-XTG ประมาณ 1 หยด
2. ป้ายลงบนแผ่นผลึก KBr window cell แล้วยึดเข้ากับตัวยึด
3. วิเคราะห์หา % transmittance โดยนำเข้าเครื่อง FTIR แล้วตั้งค่าดังนี้
  - wave number range:  $4,000-400\text{ cm}^{-1}$
  - resolution:  $4.0\text{ cm}^{-1}$

ตัวอย่างผงใช้วิธี *KBr pellet technique*

1. ชั่งผงวัตถุดิบ GEL, ALG, GAB และ XTG และตัวอย่างผงไมโครแคปซูล GEL-ALG, GEL-GAB และ GEL-XTG ประมาณ 2 มิลลิกรัม
2. บดรวมกับผง KBr ประมาณ 100 มิลลิกรัม (KBr ผ่านการอบเพื่อไม่ให้มีน้ำ ที่จะดูดกลืนรังสี infrared และรบกวนการทดลองได้)
3. อัดผงที่ได้จากข้อ 2 ด้วยเครื่องอัด minipress จะได้ KBr disc ที่มีลักษณะเป็นแผ่นกลมใสออกมา
4. ใส่ตัวยึดแผ่น KBr disc แล้วนำเข้าเครื่อง FTIR โดยตั้งค่าเหมือนตัวอย่างข้างบน

## ภาคผนวก ก.13 การวิเคราะห์โครงสร้างของไมโครแคปซูล ด้วยเทคนิค scanning electron microscopy (SEM)

### อุปกรณ์

1. sputter coater (Balzers รุ่น SCD040, Germany)
2. scanning electron microscope (JEOL รุ่น JSM-IT300, Japan)

### วิธีวิเคราะห์

1. แปะกาบสองหน้าลงบนแท่งอะลูมิเนียมทรงกระบอกขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง  $\times$  สูง เท่ากับ 1 $\times$ 1 ตารางเซนติเมตร
2. โรยผงไมโครแคปซูล GEL-ALG, GEL-GAB หรือ GEL-XTG ลงบนแผ่นกาบที่ติดบนแท่งอะลูมิเนียม
3. ฉาบผิวตัวอย่างให้เป็นฟิล์มบางด้วยทองคำหนาประมาณ 15 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง sputter coater โดยใช้แผ่นทองเป็นเป้าโลหะติดไว้ที่ขั้วแคโทด ส่วนตัวอย่างที่จะฉาบ วางไว้ที่ขั้วแอโนด
4. วางตัวอย่างที่ผ่านการเคลือบทองแล้วบนฐานของเครื่อง SEM โดยตั้งค่า accelerated voltage ที่ 10.0 กิโลโวลต์ ปรับกำลังขยายตามต้องการ แล้วส่องกราด และบันทึกภาพที่ได้

**ภาคผนวก ข**  
**ข้อมูลการทดลองเพิ่มเติม**

**ตารางที่ ข.1** ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของสารเคลือบ

pH	GEL	ALG	GAB	XTG
2.00	20.43 ± 0.29	-61.13 ± 2.83	-7.14 ± 0.17	-52.37 ± 2.47
4.00	10.90 ± 0.10	-94.20 ± 2.41	-14.17 ± 0.12	-75.67 ± 3.06
6.00	4.34 ± 0.18	-103.00 ± 3.61	-21.87 ± 1.47	-107.00 ± 1.00
8.00	-1.70 ± 0.41	-111.67 ± 2.89	-28.67 ± 0.64	-107.00 ± 2.00

ค่าในตารางแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย ± SD จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

**ตารางที่ ข.2** ค่า encapsulation yield (EY) และ encapsulation efficiency (EE) ของไมโครแคปซูล

Sample	EY (%)	EE (%)
GEL-ALG	68.64 ± 3.56 <sup>b</sup>	75.97 ± 2.21 <sup>b</sup>
GEL-GAB	80.33 ± 2.75 <sup>a</sup>	88.33 ± 2.06 <sup>a</sup>
GEL-XTG	75.73 ± 2.70 <sup>a</sup>	44.89 ± 3.36 <sup>c</sup>

ค่าในตารางแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย ± SD จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

a,b... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันกำกับไว้ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

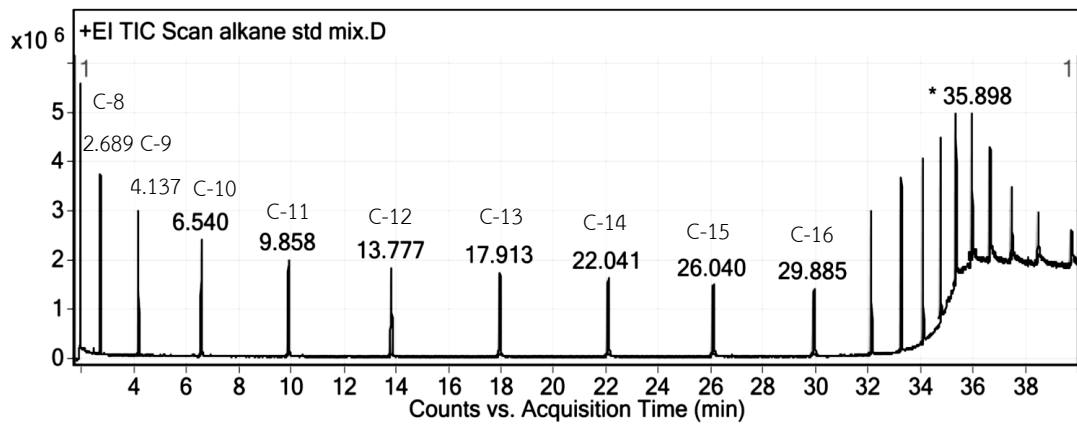
CHULALONGKORN UNIVERSITY

**ตารางที่ ข.3** สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยในไมโครแคปซูลชนิดต่าง ๆ

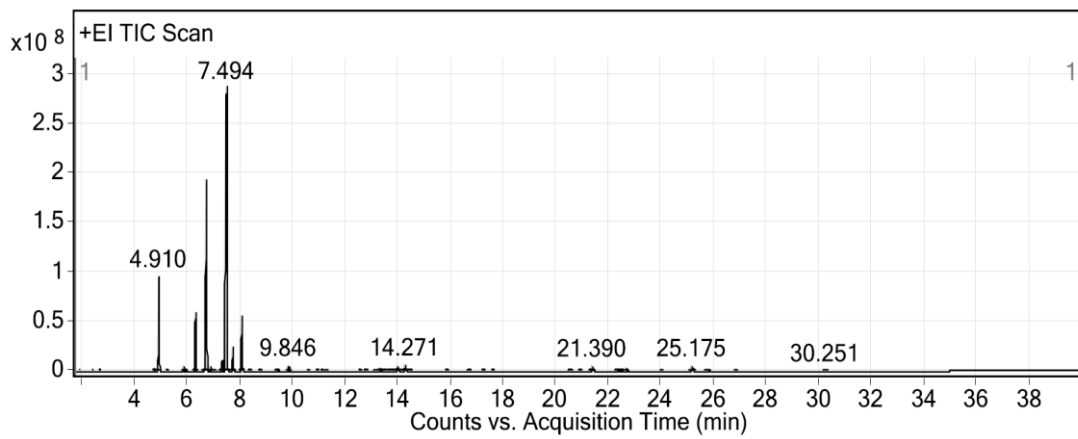
Sample	IC <sub>50</sub> of DPPH radicals (mg/mL)	FRAP value (μmol FeSO <sub>4</sub> /g)
GEL-ALG	17.08 ± 1.14 <sup>b</sup>	521.08 ± 20.02 <sup>b</sup>
GEL-GAB	13.95 ± 1.00 <sup>c</sup>	698.06 ± 18.76 <sup>a</sup>
GEL-XTG	23.98 ± 1.87 <sup>a</sup>	511.22 ± 12.31 <sup>b</sup>

ค่าในตารางแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย ± SD จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

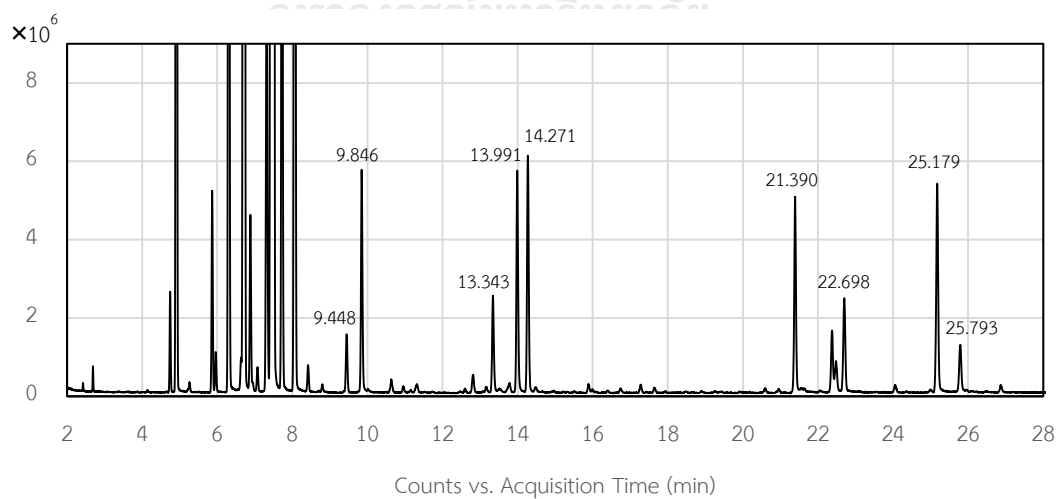
a,b... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันกำกับไว้ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )



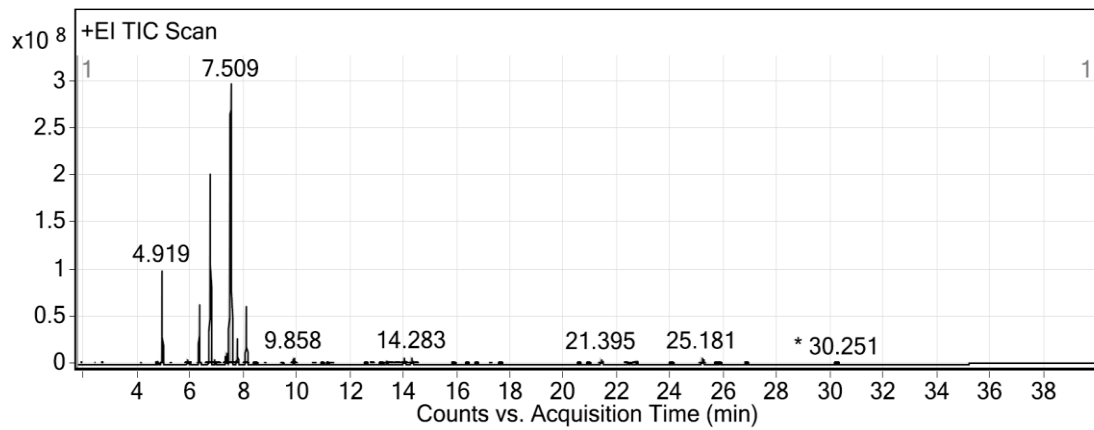
รูปที่ ข.1 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน n-alkanes



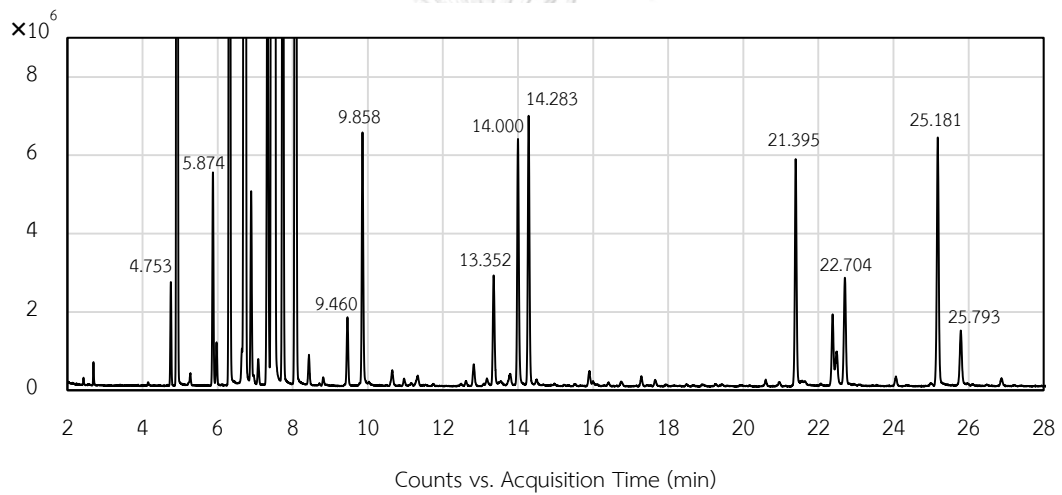
รูปที่ ข.2 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นดั้งต้น



รูปที่ ข.3 ภาพขยายของโครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นดั้งต้น



รูปที่ ข.4 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นในไมโครแคปซูล GEL-GAB



รูปที่ ข.5 ภาพขยายของโครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นในไมโครแคปซูล GEL-GAB

**ภาคผนวก ค**  
**การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

**ตารางที่ ค.1** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับค่า EY

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	208.335 <sup>a</sup>	2	104.167	11.362	.009
Intercept	50491.588	1	50491.588	5507.372	4.029E-10
Factor	208.335	2	104.167	11.362	.009
Error	55.008	6	9.168		
Total	50754.931	9			
Corrected Total	263.343	8			

a. R Squared = .791 (Adjusted R Squared = .721)

**ตารางที่ ค.2** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับค่า EE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3005.645 <sup>a</sup>	2	1502.822	221.210	2.000E-6
Intercept	43754.878	1	43754.878	6440.571	2.520E-10
Factor	3005.645	2	1502.822	221.210	2.000E-6
Error	40.762	6	6.794		
Total	46801.285	9			
Corrected Total	3046.407	8			

a. R Squared = .987 (Adjusted R Squared = .982)

**ตารางที่ ค.3** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับค่า DPPH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	158.090 <sup>a</sup>	2	79.045	40.804	0.000321
Intercept	3026.332	1	3026.332	1562.251	1.7526E-8
Factor	158.090	2	79.045	40.804	0.000321
Error	11.623	6	1.937		
Total	3196.044	9			
Corrected Total	169.713	8			

a. R Squared = .932 (Adjusted R Squared = .909)

**ตารางที่ ค.4** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับค่า FRAP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	66323.099 <sup>a</sup>	2	33161.550	110.045	0.000019
Intercept	2994149.613	1	2994149.613	9935.982	6.8704E-11
Factor	66323.099	2	33161.550	110.045	0.000019
Error	1808.065	6	301.344		
Total	3062280.777	9			
Corrected Total	68131.164	8			

a. R Squared = .973 (Adjusted R Squared = .965)

**ตารางที่ ค.5** ผลการวิเคราะห์ response surface regression ของค่า EY

Analysis of variance					
Source	Df	Adj ss	Adj ms	F-value	P-value
Model	9	888.923	98.769	8.35	0.005
Linear	3	522.710	174.237	14.73	0.002
pH	1	323.279	323.279	27.33	0.001
GEL:GAB	1	12.292	12.292	1.04	0.342
wall:core	1	187.140	187.140	15.82	0.005
Square	3	279.891	93.297	7.89	0.012
pH*pH	1	33.746	33.746	2.85	0.135
GEL:GAB*GEL:GAB	1	33.231	33.231	2.81	0.138

wall:core*wall:core	1	278.582	278.582	23.55	0.002
2-way interaction	3	86.322	28.774	2.43	0.150
pH*GEL:GAB	1	81.924	81.924	6.93	0.034
pH*wall:core	1	1.715	1.715	0.15	0.715
GEL:GAB*wall:core	1	2.682	2.682	0.23	0.648
Error	7	82.801	11.829		
Lack-of-fit	5	79.381	15.876	9.28	0.100
Pure error	2	3.420	1.710		
Total	16	971.724			

### Model summary

S	R-sq	R-sq (adj)	R-sq (pred)
3.43929	91.48%	80.52%	37.36%

### Coded coefficients

Term	Effect	Coef	Se coef	T-value	P-value	Vif
Constant		78.63	1.98	39.68	0.000	
pH	9.731	4.865	0.931	5.23	0.001	1.00
GEL:GAB	-1.897	-0.949	0.931	-1.02	0.342	1.00
wall:core	-7.404	-3.702	0.931	-3.98	0.005	1.00
pH*pH	-3.46	-1.73	1.02	-1.69	0.135	1.16
GEL:GAB*GEL:GAB	-3.43	-1.72	1.02	-1.68	0.138	1.16
wall:core*wall:core	-9.94	-4.97	1.02	-4.85	0.002	1.16
pH*GEL:GAB	6.40	3.20	1.22	2.63	0.034	1.00
pH*wall:core	0.93	0.46	1.22	0.38	0.715	1.00
GEL:GAB*wall:core	1.16	0.58	1.22	0.48	0.648	1.00

### Regression equation in uncoded units

$$\begin{aligned}
 EY = & - 88 + 103.0 \text{ pH} - 83.8 \text{ GEL:GAB} + 10.7 \text{ wall:core} - 19.6 \text{ pH*pH} \\
 & - 19.4 \text{ GEL:GAB*GEL:GAB} - 3.515 \text{ wall:core*wall:core} + 36.2 \text{ pH*GEL:GAB} \\
 & + 1.31 \text{ pH*wall:core} + 1.64 \text{ GEL:GAB*wall:core}
 \end{aligned}$$



ตารางที่ ค.6 ผลการวิเคราะห์ response surface regression ของค่า EE

Analysis of variance					
Source	Df	Adj ss	Adj ms	F-value	P-value
Model	9	1118.27	124.252	7.27	0.008
Linear	3	598.89	199.631	11.68	0.004
pH	1	191.69	191.693	11.22	0.012
GEL:GAB	1	3.28	3.278	0.19	0.675
wall:core	1	403.92	403.922	23.64	0.002
Square	3	419.56	139.855	8.19	0.011
pH*pH	1	95.18	95.181	5.57	0.050
GEL:GAB*GEL:GAB	1	74.00	73.997	4.33	0.076
wall:core*wall:core	1	399.48	399.485	23.38	0.002
2-way interaction	3	99.81	33.272	1.95	0.211
pH*GEL:GAB	1	35.34	35.342	2.07	0.194
pH*wall:core	1	0.02	0.016	0.00	0.976
GEL:GAB*wall:core	1	64.46	64.457	3.77	0.093
Error	7	119.60	17.085		
Lack-of-fit	5	96.59	19.319	1.68	0.414
Pure error	2	23.01	11.503		
Total	16	1237.87			

#### Model summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
4.13345	90.34%	77.92%	34.96%

#### Coded coefficients

Term	Effect	Coef	Se coef	T-value	P-value	Vif
Constant		84.38	2.38	35.43	0.000	
pH	7.49	3.75	1.12	3.35	0.012	1.00
GEL:GAB	-0.98	-0.49	1.12	-0.44	0.675	1.00
wall:core	-10.88	-5.44	1.12	-4.86	0.002	1.00

pH*pH	-5.81	-2.91	1.23	-2.36	0.050	1.16
GEL:GAB*GEL:GAB	-5.12	-2.56	1.23	-2.08	0.076	1.16
wall:core*wall:core	-11.91	-5.95	1.23	-4.84	0.002	1.16
pH*GEL:GAB	4.20	2.10	1.46	1.44	0.194	1.00
pH*wall:core	-0.09	-0.04	1.46	-0.03	0.976	1.00
GEL:GAB*wall:core	5.68	2.84	1.46	1.94	0.093	1.00

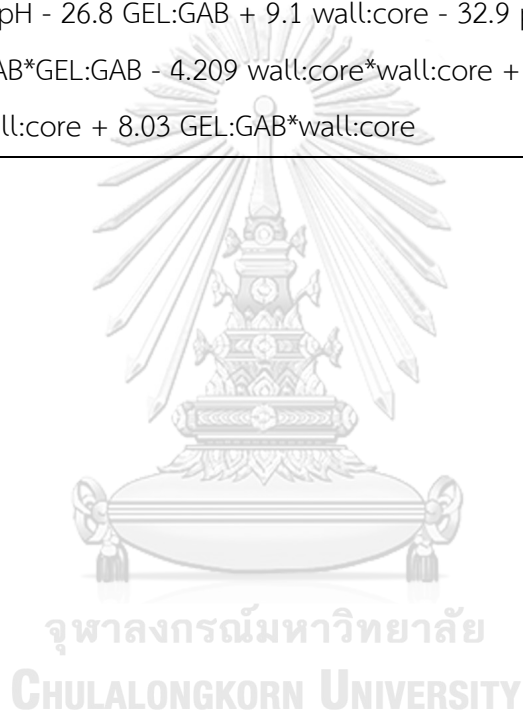
---

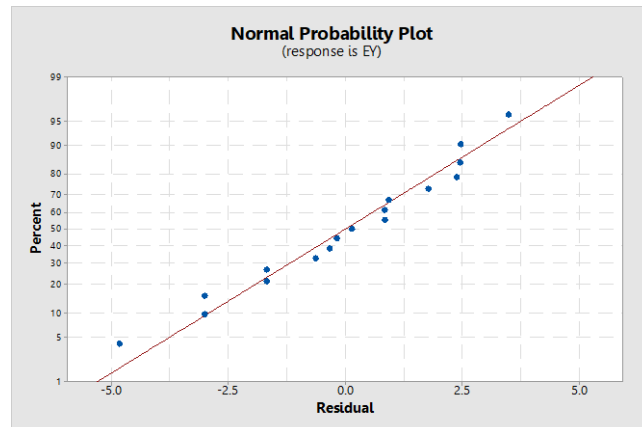
#### Regression equation in uncoded units

---

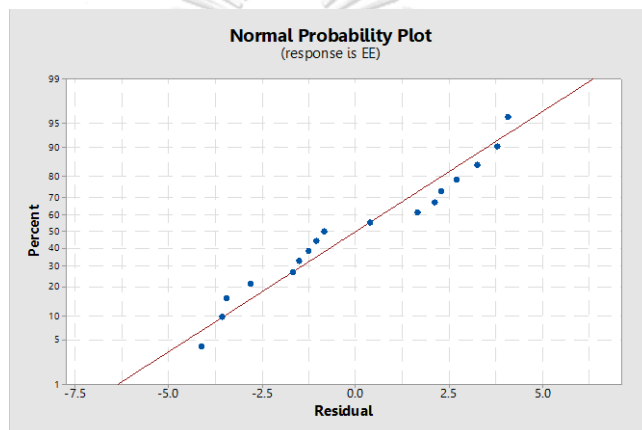
$$\begin{aligned}
 EE = & - 333 + 221 \text{ pH} - 26.8 \text{ GEL:GAB} + 9.1 \text{ wall:core} - 32.9 \text{ pH*pH} \\
 & - 29.0 \text{ GEL:GAB*GEL:GAB} - 4.209 \text{ wall:core*wall:core} + 23.8 \text{ pH*GEL:GAB} \\
 & - 0.13 \text{ pH*wall:core} + 8.03 \text{ GEL:GAB*wall:core}
 \end{aligned}$$


---





รูปที่ ค.1 กราฟการแจกแจงความน่าจะเป็นแบบปกติของค่า EY



รูปที่ ค.2 กราฟการแจกแจงความน่าจะเป็นแบบปกติของค่า EE

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นาย จิระภัทร บุญยิ่ง
วัน เดือน ปี เกิด	24 มกราคม 2536
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) จากภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2558
ที่อยู่ปัจจุบัน	40/655 ซ.นวมินทร์ 111 แยก 1 ถ.นวมินทร์ แขวงนวมินทร์ เขตบึงกุ่ม กทม. 10230
ผลงานตีพิมพ์	นำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ในหัวข้อ Microencapsulation of ma-kwaen ( <i>Zanthoxylum limonella</i> Alston.) essential oil by complex coacervation with gelatin-alginate ในงานประชุมวิชาการ International Conference of Agriculture and Natural Resources (ANRES 2018) ณ โรงแรมวินด์เซอร์ สวีท แอนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 26-28 เมษายน พ.ศ. 2561 จัดขึ้นโดย สถาบันวิจัย และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์