Published Online: 2 JUL 2026

ผลของระยะเวลาการหมักก่อนสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกทับทิมพันธุ์ตูนิเซียนซอฟต์ซีดที่ปลูกในประเทศจีน ซึ่งสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ

Effect of Pre-Maceration Time on Total Phenolic Content, Total Hydrolyzable Tannin Content, and Antioxidant Activity of Microwave-Assisted Extracts from the Peel of China-Grown Tunisian Soft Seed Pomegranate (*Punica granatum* L.)

อธิชา ประเสริฐสินเจริญ
อีเมล: 6752003283@lamduan.mfu.ac.th
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ คันชิง
อีเมล: sumate.kun@mfu.ac.th
สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการหมักก่อนสกัดที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0, 15, 45 และ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และค่าการตอบสนองของเครื่องมือของสารประกอบฟีนอลิกเป้าหมายในสารสกัดจากเปลือกทับทิมพันธุ์ตูนิเซียนซอฟต์ซีด (Tunisian Soft Seed; TSS) (*Punica granatum* L.) ที่ปลูกในประเทศจีน โดยใช้ผงเปลือกทับทิม 4.00 กรัม และน้ำกลั่น 40.0 มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 นาที การทดลองใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ PM0, PM15, PM45 และ PM90 โดยดำเนินการทดลองซ้ำอย่างอิสระกลุ่มละ 3 ครั้ง รวมสารสกัดทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ประสิทธิภาพการสกัดประเมินจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content; TPC) ปริมาณแทนนินที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้รวม (Total Hydrolyzable Tannin; THT) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ประเมินด้วยวิธี DPPH และ ABTS นอกจากนี้ ยังศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดทั้ง 4 รายการ และวิเคราะห์โปรไฟล์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS ในโหมดไอออนไนเซชันแบบอิเล็กโทรสเปรย์เชิงลบ

ผลการวิจัยพบว่า ภายใต้สภาวะการทดลองนี้ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของตัวชี้วัดทั้ง 4 รายการระหว่างกลุ่มที่มีระยะเวลาการหมักก่อนสกัดแตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยค่า TPC อยู่ในช่วง 5.79–5.85 mg GAE/mL ค่า THT อยู่ในช่วง 11.90–12.13 mg GE/mL ค่า DPPH อยู่ในช่วง 25.15–25.46 mg TEAC/mL และค่า ABTS อยู่ในช่วง 33.59–34.54 mg TEAC/mL การวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่า DPPH มีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับสูงกับ ABTS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.795$, $p = 0.002$) ขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดคู่อื่นไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายหลังการคัดกรองข้อมูล LC-QTOF/MS ตามเกณฑ์ที่กำหนด พบรายการที่มีคุณลักษณะสอดคล้องกับสารประกอบฟีนอลิกจำนวน 108 รายการ และคัดเลือกสารประกอบฟีนอลิกเป้าหมาย 5 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก คอริลาจิน พูนิคาลิน พูนิคาลาจินไอโซเมอร์แอลฟาและบีตา และกรดเอลลาจิก โดยเป็นการระบุชนิดเบื้องต้นในระดับ MSI Level 2 ผลการเปรียบเทียบค่าพื้นที่ใต้พีคพบว่า พูนิคาลาจิน พูนิคาลิน และคอริลาจินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ($p = 0.776$, 0.911 และ 0.514 ตามลำดับ) ส่วนกรดแกลลิกตรวจพบในระดับต่ำและไม่สม่ำเสมอ จึงรายงานผลในเชิงพรรณนา ขณะที่กรดเอลลาจิกมีค่าการตอบสนองของเครื่องมือต่ำเกินกว่าจะนำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มได้อย่างน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ ยังตรวจพบสารประกอบที่มีสูตรโมเลกุล $C_{13}H_8O_7$ ในทุกตัวอย่าง และรายงานเป็นสารประกอบที่คาดว่าอยู่ในกลุ่มยูโรลิธินในระดับ MSI Level 3 โดยสรุป ภายใต้สภาวะที่ศึกษา การหมักก่อนสกัดเป็นเวลา 0–90 นาทีไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อผลการวิเคราะห์ที่ศึกษา และการหมักก่อนสกัดเป็นเวลานานอาจไม่จำเป็นภายใต้สภาวะดังกล่าว ผลการศึกษาสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการพัฒนากระบวนการสกัดที่ลดขั้นตอนและระยะเวลาดำเนินงาน ตลอดจนส่งเสริมการเพิ่มมูลค่าเปลือกทับทิมตามหลักการสกัดสีเขียวและเศรษฐกิจหมุนเวียน

คำสำคัญ: เปลือกทับทิมพันธุ์ตูนิเซียนซอฟต์ซีด, การหมักก่อนสกัด, การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ, ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม, ปริมาณแทนนินที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้รวม, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, LC-QTOF/MS

Abstract

This study investigated the effects of different pre-maceration times of 0, 15, 45, and 90 min at 25 ± 2 °C on total phenolic content, total hydrolyzable tannin content, antioxidant activity, and the instrumental responses of target phenolic compounds in extracts from the peel of Tunisian Soft Seed (TSS) pomegranate (*Punica granatum* L.) grown in China. Pomegranate peel powder (4.00 g) was mixed

with 40.0 mL of distilled water at a solid-to-liquid ratio of 1:10 (w/v), followed by microwave-assisted extraction at 50 °C for 13 min. A completely randomized design was employed, consisting of four experimental groups: PM0, PM15, PM45, and PM90. Three independent replicates were performed for each group, resulting in a total of 12 extracts. Extraction performance was evaluated based on total phenolic content (TPC), total hydrolyzable tannin content (THT), and antioxidant activity measured using the DPPH and ABTS assays. Correlations among these four parameters were also examined, and phenolic profiles were analyzed using liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF/MS) in negative electrospray ionization mode. Pre-maceration time did not significantly affect any of the four parameters among the experimental groups ($p > 0.05$). TPC values ranged from 5.79 to 5.85 mg GAE/mL, THT values from 11.90 to 12.13 mg GE/mL, DPPH values from 25.15 to 25.46 mg TEAC/mL, and ABTS values from 33.59 to 34.54 mg TEAC/mL. A strong and statistically significant positive correlation was observed between DPPH and ABTS ($r = 0.795$, $p = 0.002$), whereas the other parameter pairs were not significantly correlated. Following screening according to the predefined criteria, 108 features with characteristics consistent with phenolic compounds were retained. Five target phenolic compounds—gallic acid, corilagin, punicalin, the α- and β-isomers of punicalagin, and ellagic acid—were putatively identified at MSI Level 2. The peak areas of punicalagin, punicalin, and corilagin did not differ significantly among the experimental groups ($p = 0.776$, 0.911, and 0.514, respectively). Gallic acid was detected at low and inconsistent levels and was therefore reported descriptively, while the instrumental response of ellagic acid was too low for reliable comparison among groups. A compound with the molecular formula $C_{13}H_8O_7$ was also detected in all samples and reported as a putative urolithin-like compound at MSI Level 3. In conclusion, under the defined experimental conditions, pre-maceration for 0–90 min did not significantly affect the measured outcomes. Prolonged pre-maceration may therefore be unnecessary under these conditions, and the findings may support the development of a simplified extraction process with fewer processing steps and a

shorter operating time, while promoting the valorization of pomegranate peel in accordance with green extraction and circular economy principles.

Keywords: Tunisian Soft Seed Pomegranate Peel, Pre-maceration, Microwave-assisted Extraction, Total Phenolic Content, Total Hydrolyzable Tannin Content, Antioxidant Activity, LC-QTOF/MS

บทนำ/หลักการและเหตุผล (Introduction)

ทับทิม (*Punica granatum* L.) เป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง อย่างไรก็ตาม กระบวนการบริโภคและแปรรูปทับทิมก่อให้เกิดเปลือกทับทิมในปริมาณมาก ซึ่งมักถูกจัดเป็นของเสียอินทรีย์ ทั้งที่เปลือกทับทิมเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบฟีนอลิกและเอลลาจิแทนนินหลายชนิด เช่น punicalagin, punicalin, ellagic acid, corilagin และ gallic acid สารเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้าน จึงสะท้อนให้เห็นว่าเปลือกทับทิมเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีศักยภาพในการนำกลับมาใช้ประโยชน์เพื่อพัฒนาเป็นสารสกัดจากธรรมชาติหรือส่วนประกอบเชิงหน้าที่ในผลิตภัณฑ์อาหารและสุขภาพ (Mo et al., 2022; Singh et al., 2023)

วิธีการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชแบบดั้งเดิม เช่น การแช่สกัด การให้ความร้อนแบบทั่วไป หรือการสกัดด้วยเครื่องซอกห์เลต มักใช้เวลานาน ใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก และอาจทำให้สารออกฤทธิ์ที่ไวต่อความร้อนเกิดการเสื่อมสภาพได้ ข้อจำกัดดังกล่าวทำให้เทคโนโลยีการสกัดสมัยใหม่ได้รับความสนใจมากขึ้น โดยเฉพาะเทคนิคไมโครเวฟช่วยสกัด (Microwave-Assisted Extraction; MAE) ซึ่งใช้พลังงานไมโครเวฟทำให้เกิดความร้อนแบบไดอิเล็กทริกและส่งเสริมการแตกของผนังเซลล์พืช จึงช่วยเพิ่มการถ่ายเทมวลและลดระยะเวลาการสกัด (Kaderides et al., 2019; Zhang et al., 2020)

แม้ MAE จะเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง แต่การเตรียมวัตถุดิบก่อนเข้าสู่กระบวนการสกัดยังอาจมีผลต่อการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ การหมักก่อนสกัด (pre-maceration) หมายถึง การนำวัตถุดิบพืชสัมผัสกับตัวทำละลายที่อุณหภูมิที่กำหนดก่อนเริ่มกระบวนการสกัดหลัก เพื่อให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าสู่เมทริกซ์ของพืช ทำให้เนื้อเยื่อดูดซึมน้ำและเกิดการบวม ตลอดจนเริ่มต้นการละลายและการแพร่ของสารออกฤทธิ์ออกจากเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ร่วมกับ MAE ซึ่งให้พลังงานและความร้อนภายในระบบอย่างรวดเร็ว ยังมีข้อมูลจำกัดว่าการเพิ่มระยะเวลาการหมักก่อนสกัดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกทับทิมได้หรือไม่

งานวิจัยเกี่ยวกับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกทับทิมส่วนใหญ่มุ่งศึกษาปัจจัยของกระบวนการสกัด เช่น ชนิดของตัวทำละลาย อุณหภูมิ ระยะเวลาในการสกัด กำลังไมโครเวฟ และอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว ขณะที่ข้อมูลเกี่ยวกับผลของระยะเวลาการหมักก่อนสกัดก่อนเข้าสู่ระบบ MAE ยังมีจำกัด โดยเฉพาะการประเมินร่วมกันระหว่างตัวชี้วัดเชิงปริมาณ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และโปรไฟล์สารประกอบฟีนอลิกในระดับสารประกอบรายชนิด ช่องว่างดังกล่าวจึงเป็นเหตุผลสำคัญของการศึกษานี้

ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการหมักก่อนสกัดที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0, 15, 45 และ 90 นาที ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกทับทิมพันธุ์ตูนิเซียนซอฟต์ซีดที่สกัดด้วยเทคนิคไมโครเวฟช่วยสกัด นอกจากนี้ ยังมุ่งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดดังกล่าว และวิเคราะห์โปรไฟล์สารประกอบฟีนอลิกเป้าหมายด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS เพื่อประเมินว่าการเพิ่มระยะเวลาการหมักก่อนสกัดมีความจำเป็นต่อประสิทธิภาพการสกัดภายใต้สภาวะการทดลองนี้หรือไม่

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการหมักก่อนสกัด 4 ระดับ ได้แก่ 0, 15, 45 และ 90 นาที ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ประเมินด้วยวิธี DPPH และ ABTS และค่าการตอบสนองของเครื่องมือของสารประกอบฟีนอลิกเป้าหมายที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS

วัตถุดิบที่ใช้ คือ ผลทับทิมสดพันธุ์ตูนิเซียนซอฟต์ซีด (Tunisian Soft Seed; TSS) (*Punica granatum* L.) ที่ปลูกในประเทศจีนและจัดจำหน่ายในตลาดประเทศไทย คัดเลือกผลที่สมบูรณ์และไม่มีร่องรอยการเสื่อมสภาพ จากนั้นแยกเปลือก อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน บด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 mesh เพื่อให้ได้ผงเปลือกทับทิมที่มีขนาดอนุภาคใกล้เคียงกัน

การหมักก่อนสกัดดำเนินการโดยชั่งผงเปลือกทับทิม 4.00 กรัม เติมน้ำกลั่น 40.0 มิลลิลิตร เพื่อให้อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวเท่ากับ 1:10 (w/v) และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียสตามระยะเวลาที่กำหนด โดยกำหนดเวลาเริ่มต้นของแต่ละกลุ่มให้แตกต่างกัน (staggered start) เพื่อให้ทุกกลุ่มสิ้นสุดระยะเวลาการหมักก่อนสกัดพร้อมกันและเข้าสู่กระบวนการ MAE ในรอบเดียวกัน

การสกัดด้วย MAE ดำเนินการด้วยเครื่อง Milestone ETHOS UP ในโหมดควบคุมอุณหภูมิ โดยกำหนดกำลังไมโครเวฟสูงสุดที่ตั้งไว้เท่ากับ 800 วัตต์ ใช้เวลาเพิ่มอุณหภูมิประมาณ 10 นาทีจนถึง 50 องศาเซลเซียส จากนั้นรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 นาที โดยเครื่องปรับการ

จ่ายกำลังไมโครเวฟโดยอัตโนมัติตามอุณหภูมิของตัวอย่าง หลังการสกัด ปล่อยให้สารสกัดเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นแยกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยง กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 และแผ่นกรองเมมเบรน PES ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) ดำเนินการด้วยวิธี Folin–Ciocalteu และรายงานผลเป็น mg GAE/mL (Singleton & Rossi, 1965; Singleton et al., 1999) ปริมาณแทนนินที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้รวม (THT) วิเคราะห์โดยอาศัยการไฮโดรไลซิสด้วยกรดร่วมกับวิธี Folin–Ciocalteu และรายงานผลเป็น mg GE/mL ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประเมินด้วยวิธี DPPH และ ABTS และรายงานผลเป็น mg TEAC/mL (Brand-Williams et al., 1995; Re et al., 1999) การวิเคราะห์โปรไฟล์สารประกอบฟีนอลิกดำเนินการด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS ในโหมดไอออนไนเซชันแบบอิเล็กโทรสเปรย์เชิงลบ โดยพิจารณาค่ามวลแม่นยำ สูตรโมเลกุล รูปแบบไอโซโทป เวลาการคงอยู่ และผลการจับคู่กับฐานข้อมูล การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มใช้ค่าพื้นที่ใต้พีคเป็นค่าการตอบสนองของเครื่องมือ และไม่ตีความเป็นความเข้มข้นสัมบูรณ์

ข้อมูลรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากตัวอย่างทดลองอิสระกลุ่มละ 3 ซ้ำ (n = 3) โดยผลการวิเคราะห์ซ้ำทางเทคนิค 3 ครั้งของแต่ละตัวอย่างถูกเฉลี่ยก่อนนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มใช้ one-way ANOVA ร่วมกับ Tukey HSD, Welch ANOVA ร่วมกับ Games–Howell หรือ Kruskal–Wallis test ตามคุณลักษณะของข้อมูล โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$ ข้อมูลค่าพื้นที่ใต้พีคของสารประกอบเป้าหมายถูกแปลงด้วย $\log_{10}$ ก่อนการวิเคราะห์ทางสถิติ ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง TPC, THT, DPPH และ ABTS ใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สันจากตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่าง

ผลการวิจัย (Results)

ผลการวิเคราะห์ตัวชี้วัดเชิงปริมาณของสารสกัดเปลือกทับทิมจากกลุ่ม PM0, PM15, PM45 และ PM90 แสดงในตารางที่ 1 โดยตัวชี้วัดทั้ง 4 รายการ ได้แก่ TPC, THT, DPPH และ ABTS มีค่าอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองในทุกพารามิเตอร์ ($p > 0.05$) ภายใต้เงื่อนไขการทดลองนี้

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกทับทิมที่ผ่านการหมักก่อนสกัดในระยะเวลาต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

กลุ่มทดลอง	TPC (mg GAE/mL)	THT (mg GE/mL)	DPPH (mg TEAC/mL)	ABTS (mg TEAC/mL)
PM0	5.79 ± 0.02	11.90 ± 0.19	25.32 ± 0.77	34.19 ± 0.09

ตารางที่ 1 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง	TPC (mg GAE/mL)	THT (mg GE/mL)	DPPH (mg TEAC/mL)	ABTS (mg TEAC/mL)
PM15	5.81 ± 0.02	11.90 ± 0.17	25.15 ± 0.80	33.59 ± 1.33
PM45	5.85 ± 0.04	11.93 ± 0.18	25.46 ± 1.01	34.16 ± 1.17
PM90	5.83 ± 0.02	12.13 ± 0.20	25.43 ± 0.27	34.54 ± 0.27
p-value	0.135 ns	0.468 ns	0.956 ns	0.398 ns

หมายเหตุ ns หมายถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$); GAE = Gallic Acid Equivalent; GE = Gallotannin Equivalent; TEAC = Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; สถิติที่ใช้ ได้แก่ TPC และ DPPH วิเคราะห์ด้วย one-way ANOVA + Tukey HSD, THT วิเคราะห์ด้วย Kruskal-Wallis test และ ABTS วิเคราะห์ด้วย Welch ANOVA + Games–Howell

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) อยู่ในช่วง 5.79–5.85 mg GAE/mL โดยกลุ่ม PM45 มีค่าเฉลี่ยสูงสุด ผลการวิเคราะห์ one-way ANOVA + Tukey HSD ให้ค่า $p = 0.135$ จึงไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ TPC ระหว่างกลุ่มทดลอง

ปริมาณแทนนินที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้รวม (THT) อยู่ในช่วง 11.90–12.13 mg GE/mL โดยกลุ่ม PM90 มีค่าเฉลี่ยสูงสุด ผลการวิเคราะห์ด้วย Kruskal–Wallis test ให้ค่า $p = 0.468$ จึงไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH อยู่ในช่วง 25.15–25.46 mg TEAC/mL โดยกลุ่ม PM45 มีค่าเฉลี่ยสูงสุด ผลการวิเคราะห์ one-way ANOVA + Tukey HSD ให้ค่า $p = 0.956$ ส่วน ABTS อยู่ในช่วง 33.59–34.54 mg TEAC/mL โดยกลุ่ม PM90 มีค่าเฉลี่ยสูงสุด และผล Welch ANOVA + Games–Howell ให้ค่า $p = 0.398$ ภายใต้เงื่อนไขการทดลองนี้ ทั้ง DPPH และ ABTS ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดทั้ง 4 รายการพบว่า คู่ความสัมพันธ์ระหว่าง DPPH กับ ABTS มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $r = 0.795$ และ $p = 0.002$ แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 ส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง TPC หรือ THT กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่พบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สันระหว่าง TPC, THT, DPPH และ ABTS (n = 12)

ตัวแปร	TPC	THT	DPPH	ABTS
TPC	1	0.194 (0.545)	0.229 (0.474)	0.295 (0.352)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวแปร	TPC	THT	DPPH	ABTS
THT	0.194 (0.545)	1	−0.001 (0.997)	0.417 (0.177)
DPPH	0.229 (0.474)	−0.001 (0.997)	1	0.795** (0.002)
ABTS	0.295 (0.352)	0.417 (0.177)	0.795** (0.002)	1

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือค่า p; ** มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

ผลการวิเคราะห์โปรไฟล์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS ในโหมดไอออนไนเซชันแบบอิเล็กโทรสเปรย์เชิงลบ ภายหลังการคัดกรองด้วยเกณฑ์ 5 ข้อ พบรายการที่มีคุณลักษณะสอดคล้องกับสารประกอบฟีนอลิกจำนวน 108 รายการ จากนั้นคัดเลือกสารประกอบฟีนอลิกเป้าหมาย 5 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก คอริลาจิน พูนิคาลิน พูนิคาลาจินในรูปไอโซเมอร์แอลฟาและบีตา และกรดเอลลาจิก โดยข้อมูลมวลแม่นยำ สูตรโมเลกุล รูปแบบไอโซโทป เวลาการคงอยู่ และผลการจับคู่กับฐานข้อมูลสนับสนุนการระบุชนิดเบื้องต้นในระดับ MSI Level 2

ตารางที่ 3 สารประกอบฟีนอลิกเป้าหมายที่ระบุเบื้องต้นจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS

No.	Tentative Identification	Molecular Formula	[M−H]− (m/z)	Neutral Mass (Da)	Mass Error (ppm)	RT (min)
1	Gallic acid	$C_7H_6O_5$	169.014	170.022	−1.09	3.949
2	Corilagin	$C_{27}H_{22}O_{18}$	633.073	634.081	1.42	3.801
3	Punicalin	$C_{34}H_{22}O_{22}$	781.052	782.060	1.77	4.666
4	Punicalagin α/β	$C_{48}H_{28}O_{30}$	541.027 [M−2H]²−	1084.067	2.66	5.426 / 8.032
5	Ellagic acid	$C_{14}H_6O_8$	300.999	302.006	2.19	7.475

หมายเหตุ m/z = mass-to-charge ratio; Da = dalton; ppm = parts per million; RT = retention time; $[M-H]^-$ หมายถึงไอออนโมเลกุลที่สูญเสียโปรตอนหนึ่งตัว และ $[M-2H]^{2-}$ หมายถึงไอออนโมเลกุลที่สูญเสียโปรตอนสองตัวและมีประจุลบสองประจุ การระบุสารเป็นการระบุชนิดเบื้องต้นในระดับ MSI Level 2 (putative identification) โดยยังไม่ได้ยืนยันด้วยสารมาตรฐานอ้างอิง

เมื่อพิจารณาค่าพื้นที่ใต้พีคซึ่งใช้เป็นค่าการตอบสนองของเครื่องมือ พบว่า พูนิคาลาจินมีค่าพื้นที่ใต้พีคสูงที่สุดในทุกกลุ่มทดลอง รองลงมาคือพูนิคาลินและคอริลาจิน ผลการเปรียบเทียบพบว่าพูนิคาลาจิน พูนิคาลิน และคอริลาจินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ($p = 0.776$, 0.911 และ 0.514 ตามลำดับ) ส่วนกรดแกลลิกตรวจพบในระดับต่ำและไม่สม่ำเสมอจึงรายงานผลในเชิงพรรณนา ขณะที่กรดเอลลาจิกมีค่าการตอบสนองของเครื่องมือต่ำเกินกว่าจะนำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มได้อย่างน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ ยังตรวจพบสารประกอบที่มีสูตรโมเลกุล $C_{13}H_8O_7$ ในทุกตัวอย่าง ซึ่งรายงานเป็นสารประกอบที่คาดว่าอยู่ในกลุ่มยูโรลิธิน (putative urolithin-like compound) ในระดับ MSI Level 3 เนื่องจากยังไม่ได้ยืนยันด้วยสารมาตรฐานอ้างอิงหรือหลักฐานเชิงโครงสร้างเพิ่มเติม

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ (Discussion and Recommendations)

ผลการศึกษาภายใต้สภาวะการสกัดด้วยเทคนิค MAE ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 นาที และใช้อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1:10 (w/v) พบว่า ระยะเวลาการหมักก่อนสกัดในช่วง 0–90 นาที ไม่ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) ปริมาณแทนนินที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้รวม (THT) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ประเมินด้วยวิธี DPPH และ ABTS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ภายใต้สภาวะของการศึกษานี้ การเพิ่มระยะเวลาการหมักก่อนสกัดไม่ใช่ปัจจัยที่กำหนดประสิทธิภาพการสกัดอย่างชัดเจน

ประเด็นแรก เป็นไปได้ว่า MAE ให้พลังงานในระดับที่เพียงพอจนลดความแตกต่างที่เกิดจากกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนสกัด เนื่องจากคลื่นไมโครเวฟทำให้เกิดความร้อนภายในเมทริกซ์พืชอย่างรวดเร็ว เอื้อต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเซลล์และการถ่ายเทมวลของสารออกฤทธิ์ เมื่อพลังงานจาก MAE มีบทบาทเด่น จึงอาจทำให้บทบาทของการหมักก่อนสกัดที่อุณหภูมิห้องไม่เด่นชัดภายใต้ช่วงเวลาที่ศึกษา

ประเด็นที่สอง ระบบการสกัดอาจเข้าสู่ภาวะใกล้สมดุลภายใต้สภาวะ MAE ที่กำหนดไว้ โดยค่า TPC และ THT ที่อยู่ในช่วงแคบ ร่วมกับผลการวิเคราะห์ LC-QTOF/MS ที่พบว่า punicalagin, punicalin และ corilagin มีแนวโน้มไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลอง สะท้อนว่า ปริมาณสารที่สกัดได้อาจถูกกำหนดโดยสมดุลของระบบการสกัดมากกว่าระยะเวลาการหมักก่อนสกัดเพียงอย่างเดียว

ประเด็นที่สาม ขนาดอนุภาคของผงเปลือกทับทิมที่ผ่านตะแกรง 50 mesh ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสและลดระยะทางการแพร่ของตัวทำละลายเข้าสู่เมทริกซ์พืช จึงอาจทำให้ข้อจำกัดด้านการแพร่ลดลงตั้งแต่ก่อนเข้าสู่กระบวนการ MAE ส่งผลให้การเพิ่มระยะเวลาการหมักก่อนสกัดไม่ได้เพิ่มค่าตัวชี้วัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ประเด็นที่สี่ ในเชิงกระบวนการและการต่อยอดสู่ระดับอุตสาหกรรม ผลการศึกษานี้สะท้อนว่า ภายใต้เงื่อนไข MAE ที่กำหนด การลดหรือไม่เพิ่มระยะเวลาการหมักก่อนสกัดอาจช่วยลดเวลารวมของกระบวนการ ลดความซับซ้อนในการปฏิบัติงาน และลดการใช้ทรัพยากรที่เกี่ยวข้อง โดยยังคงให้ผลลัพธ์ของตัวชี้วัดหลัก ได้แก่ TPC, THT, DPPH และ ABTS อยู่ในระดับใกล้เคียงกันระหว่างกลุ่มทดลอง

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาควรตีความภายใต้ข้อจำกัดของงานวิจัย ได้แก่ การใช้เปลือกทับทิมพันธุ์ตูนิเซียนซอฟต์ซีดที่ปลูกในประเทศจีนจากแหล่งจำหน่ายเพียงแหล่งเดียว การกำหนดอุณหภูมิการหมักก่อนสกัดไว้ที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ระยะเวลาสูงสุด 90 นาที และจำนวนซ้ำกลุ่มละ 3 ครั้ง องค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกยังอาจแตกต่างตามแหล่งภูมิศาสตร์ที่ปลูก สภาพแวดล้อม และการจัดการวัตถุดิบ ดังนั้น การเปรียบเทียบค่าที่ได้กับงานวิจัยจากแหล่งปลูกอื่นควรดำเนินการด้วยความระมัดระวัง นอกจากนี้ การวิเคราะห์ LC-QTOF/MS ในการศึกษานี้เป็นการระบุชนิดเบื้องต้นและการเปรียบเทียบค่าการตอบสนองของเครื่องมือ มิใช่การวิเคราะห์ความเข้มข้นสัมบูรณ์ และสารประกอบที่คาดว่าอยู่ในกลุ่มยูโรลิธินยังต้องได้รับการยืนยันด้วยข้อมูลการแตกตัวของไอออนและสารมาตรฐานอ้างอิง

ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป ได้แก่ การศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิของการหมักก่อนสกัดที่หลากหลายขึ้น การเพิ่มจำนวนซ้ำ การเปรียบเทียบสภาวะ MAE หลายระดับ และการใช้สารมาตรฐานอ้างอิงเพื่อยืนยันชนิดและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเป้าหมายแบบสัมบูรณ์ รวมถึงควรศึกษาวัตถุดิบจากหลายแหล่งปลูกและหลายรุ่นการผลิต เพื่อประเมินผลของแหล่งภูมิศาสตร์และความแปรปรวนของวัตถุดิบ ตลอดจนดำเนินการศึกษาในระดับขยายขนาดก่อนนำผลไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่า ภายใต้สภาวะการทดลองที่กำหนด ระยะเวลาการหมักก่อนสกัดในช่วง 0–90 นาที ไม่ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และค่าการตอบสนองของเครื่องมือของสารประกอบฟีนอลิกหลักในสารสกัดเปลือกทับทิมที่ได้จากเทคนิค MAE แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการวิเคราะห์ LC-QTOF/MS สนับสนุนความคงที่ของพูนิคาลาจิน พูนิคาลิน และคอริลาจินระหว่างกลุ่มทดลอง ขณะที่กรดแกลลิกและกรดเอลลาจิกไม่เหมาะสำหรับการเปรียบเทียบเชิงอนุมานภายใต้ข้อมูลที่ได้ และพบสารประกอบที่คาดว่าอยู่ในกลุ่มยูโรลิธินในระดับ MSI Level 3 ผลการวิจัยจึงชี้ว่า การหมักก่อนสกัดเป็นเวลานานอาจไม่จำเป็นภายใต้สภาวะ MAE ที่ศึกษา และสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการพัฒนา

กระบวนการสกัดที่ลดขั้นตอนและระยะเวลาดำเนินงาน อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้ควรจำกัดอยู่ภายใต้สภาวะและวัตถุดิบที่ใกล้เคียงกับการศึกษานี้

รายการอ้างอิง

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology, 28*(1), 25–30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Chernushevich, I. V., Loboda, A. V., & Thomson, B. A. (2001). An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry, 36*(8), 849–865. https://doi.org/10.1002/jms.207

Kaderides, K., Papaoikonomou, L., Serafim, M., & Goula, A. M. (2019). Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 137*, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.01.006

Mo, Y., Ma, J., Gao, W., Zhang, L., Li, J., Li, J., & Zhang, J. (2022). Pomegranate peel as a source of bioactive compounds: A mini review on their physiological functions. *Frontiers in Nutrition, 9*, Article 887113. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.887113

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine, 26*(9–10), 1231–1237. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Singh, J., Kaur, H. P., Verma, A., Chahal, A. S., Jajoria, K., Rasane, P., . . . Durul, M. S. (2023). Pomegranate peel phytochemistry, pharmacological properties, methods of extraction, and its application: A comprehensive review. *ACS Omega, 8*(39), 35452–35469. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c02586

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture, 16*(3), 144–158. https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology, 299*, 152–178. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Zhang, Y., Wang, D., Lee, R. P., Henning, S. M., & Heber, D. (2020). Microwave assisted aqueous extraction of phenolic compounds from pomegranate and banana peels: Process modelling and optimization. *Food Chemistry, 328*, Article 127112. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127112