

การพัฒนาวิธีการสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดง: การผสมผสานระหว่างการสกัดด้วยอัลตราซาวนด์ และไม่เซลล์ไลเซชันโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง

Development of Extraction Method of Quercetin from Shallot: A Combination of Ultrasound-Assisted Extraction and Micellization using Response Surface Methodology

สุรวิทย์ ดวงจิตต์^{1*} วรินทร์ พันธมาศ² พรพิชชา เคนมาตร์² ไพจิตร ศรีธรรมาพัฒน์³ วรนนท์ รังสิมาวงศ์¹

ทิภาดา สามสีทอง⁴ กุสุมา จิตแสง¹ และ สุรวิทย์ บำรุงไทย³

Sureewan Duangjit^{1*}, Warinthon Pantamas², Ponpicha Kenmat², Phaijit Sriananuwat³, Worranan Rangsimawong¹,

Tipada Samseethong⁴, Kusuma Jitsaeng¹ and Sureewan Bamrungthai²

¹กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

²นักศึกษาคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

³กลุ่มวิชาชีวเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

⁴กลุ่มวิชาเภสัชกรรมคลินิก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

¹Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University,

² Faculty of Pharmaceutical Sciences Student, Ubon Ratchathani University,

³Division of Biopharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University,

⁴Division of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University

*E-mail: sureewan.d@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

หัวหอมแดง (Shallot หรือ Red onion) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Allium ascalonicum* L. เป็นพืชสมุนไพรที่คนไทยรู้จักและคุ้นเคยมานาน ในงานวิจัยนี้เลือกใช้หัวหอมแดงศรีสะเกษซึ่งเป็นแหล่งเพาะปลูกหัวหอมแดงทางภูมิศาสตร์ที่ได้รับการรับรองให้เป็นพืชสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ที่สำคัญ (Geographical Indication; GI) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดงด้วยวิธีผสมผสานระหว่างการสกัดด้วยอัลตราซาวนด์และไม่เซลล์ไลเซชันโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ ตัวแปรต้น (Causal factors; X_n) ที่ต้องการศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (Temperature; X_1) ระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (Heating time; X_2) ตัวแปรตอบสนอง (Response variables; Y_n) ได้แก่ ขนาดอนุภาค (Y_1) การกระจายขนาด (Y_2) ประจุ (Y_3) ความเป็นกรดต่าง (Y_4) ปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ (Y_5) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Y_6) วิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดด้วยโปรแกรม Design Expert® และทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และน่าเชื่อถือได้ (Reliability) ของสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่สุดด้วยการทดลองจริง ผลการทดลองพบว่า ชนิด ความเข้มข้นของพอลิซอร์เบต และวิธีการสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดเคอร์ซีติน เมื่อพิจารณาปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้พบว่าพอลิซอร์เบต 80 ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก สามารถสกัดเคอร์ซีตินได้ปริมาณสูงสุดคือ 597.10 ± 2.65 ไมโครกรัมต่อกรัมของผงหอมแดง สภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทำนายคือ $X_1 = 40$ องศาเซลเซียส และ $X_2 = 180$ นาที ค่าจริงของปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้เท่ากับ 1425.73 ± 6.62 ไมโครกรัมต่อกรัมของผงหอมแดง อาจสรุปได้ว่าค่าจริงที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Design Expert® สามารถนำสารสกัดเคอร์ซีตินในพอลิซอร์เบต 80 ไปใช้เป็นสารสำคัญในเภสัชภัณฑ์ได้หลากหลายชนิด

คำสำคัญ: พอลิซอร์เบต หัวหอมแดง เคอร์ซีติน การสกัดด้วยอัลตราซาวนด์ พื้นผิวตอบสนอง

Abstract

Shallot or red onion, a scientific name *Allium ascalonicum* L., is a medicinal plant that Thai people have known well and have been familiar with for a long period. In this research, Sisaket shallots were selected as the geographic growing area for the shallot, which is certified as a major geographical indication (GI) product. The purpose of this research was to develop an extraction method of quercetin from shallot by the combination of ultrasound-assisted extraction and micellization using response surface methodology. The extraction temperature (X_1) and heating time (X_2) were chosen as causal factors. The response variables (Y_n) were vesicle size (Y_1), size distribution (Y_2), zeta potential (Y_3), pH (Y_4), the quercetin content in extract (Y_5), and the antioxidant activity (Y_6). The appropriate conditions were optimized by Design Expert[®]. The accuracy and reliability were confirmed by the experiments. The results suggest that the types, concentrations of polysorbate, and method of extraction affect the extraction efficiency of quercetin. Considering the quercetin content in the extract, the concentration of 1% polysorbate 80 was highest at 597.10 ± 2.65 $\mu\text{g/g}$ of shallot-dried powder. The optimal extraction conditions obtained by optimization were $X_1 = 40$ °C and $X_2 = 180$ min. The actual value of the quercetin content in the extract was 1425.73 ± 6.62 $\mu\text{g/g}$ of shallot-dried powder. It can be concluded that the actual value coincided well with the value predicted by Design Expert[®]. Quercetin in polysorbate 80 can be used as an active pharmaceutical ingredient in various pharmaceuticals.

Keywords: Polysorbate, Allium Ascalonicum, Quercetin, Ultrasound-Assisted Extraction, Response Surface Methodology

บทนำ

หัวหอมแดง มีชื่อเรียกภาษาอังกฤษคือ shallot มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Allium ascalonicum* L. เป็นพืชสมุนไพรที่คนไทยรู้จักและคุ้นเคยมานาน มีการเพาะปลูกไว้บริโภคภายในครัวเรือนและเพื่อจำหน่ายสร้างรายได้ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้หัวหอมแดงศรีสะเกษ ซึ่งเป็นแหล่งเพาะปลูกหัวหอมแดงทางภูมิศาสตร์ที่ได้รับการรับรองให้เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของท้องถิ่น (Office of Agricultural Economics, 2016) เนื่องจากสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศของจังหวัดศรีสะเกษเหมาะสมแก่การเพาะปลูกหัวหอมแดง รวมถึงภูมิปัญญาในการเพาะปลูกของคนในท้องถิ่นทำให้ได้ผลผลิตหัวหอมแดงที่มีคุณภาพและมีปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณสูงกว่าพื้นที่อื่น ลักษณะหัวหอมแดงที่นำมาใช้ในการศึกษานี้มีลักษณะเปลือกแห้งมัน สีแดงเข้มปนม่วง หัวมีลักษณะกลม มีกลิ่นฉุน เคอร์ซีติน (Quercetin) เป็นสารสำคัญที่พบมาในหัวหอมแดง มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Anti-oxidant) ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) ต้านเชื้อจุลชีพ (Anti-microbial) ต้านการแพร่กระจาย (Anti-proliferative) และกระตุ้นการสร้างใหม่ (Regenerative activities) มีรายงานว่าเคอร์ซีตินช่วยป้องกันและลดรอยแผลเป็นได้ (Chanprapaph et al., 2012; Prager and Gauglitz, 2018)

มีการพัฒนาวิธีสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมหลายงานวิจัยด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น วิธีการหมัก (Maceration) (Vieira et al., 2017) วิธีการหมักแบบต่อเนื่อง (Percolation) (Moldovan et al., 2022) การสกัดด้วยอัลตราซาวนด์

(Ultrasonic-Assisted Extraction; UAE) (González-de-Peredo et al., 2021) การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave-Assisted Extraction; MAE) (González-de-Peredo et al., 2022) ตัวทำละลายเป็นอีกปัจจัยที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เช่น พอลิเอทิลีนไกลคอล 407 (Fraile et al., 2014) พอลิซอร์เบต (Vigneshwari and Dash, 2023) เอทานอล (Nguyen et al., 2019) อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของปัจจัยทั้งวิธีการสกัด (Extraction process) และตัวทำละลาย (Solvent used) พร้อมกันยังมีข้อมูลไม่มากนัก เพื่อให้การสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดงเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาปัจจัยวิธีการสกัดและตัวทำละลายพร้อมกันในการศึกษานี้ โดยใช้วิธีพินผิวตอบสนองและการออกแบบการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดงด้วยวิธีผสมผสานระหว่างการสกัดด้วยอัลตราซาวนด์และไมเซลล์ไลเซนชันโดยใช้วิธีพินผิวตอบสนอง โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ ตัวแปรต้น (Causal factors; X_n) ที่ต้องการศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (temperature; X_1) ระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (Heating time; X_2) ตัวแปรตอบสนอง (Response variables; Y_n) ได้แก่ ขนาดอนุภาค (Y_1) การกระจายขนาด (Y_2) ประจุ (Y_3) ความเป็นกรดต่าง (Y_4) ปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ (Y_5) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Y_6) สภาวะที่เหมาะสมที่สุดกำหนดตัวแปรตอบสนอง คือ สภาวะที่สามารถสกัดปริมาณเคอร์ซีตินได้สูงที่สุด (Maximum) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (Maximum) และทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่สุดด้วยการทดลองจริง

วิธีการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างหัวหอมแดง เตรียมหัวหอมแดง 2 กิโลกรัม (ใช้ตลอดการวิจัยนี้) ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า ตัดส่วนรากและโคนใบทิ้ง ลอกเปลือกออก แช่น้ำเปล่า 2 ชั่วโมง หั่นเป็นชิ้นเล็กขนาดสม่ำเสมอ พึ่งลมให้แห้ง 2 ชั่วโมง อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง Hot air oven (Binder model ED 23, Germany) นาน 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด บรรจุในซองซิปปิดสนิท และเก็บในโถแก้วดูความชื้น (Dessicator)

การสกัดสารสำคัญจากหัวหอมแดงด้วยเทคนิคไมเซลล์ ชั่งผงหัวหอมแดง 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของระบบไมเซลล์ร้อยละ 1-5 โดยน้ำหนัก เติมตัวทำละลายไมเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ได้แก่ พอลิซอร์เบต 20 (polysorbate 20 หรือ Tween® 20; T20) พอลิซอร์เบต 60 (polysorbate 60 หรือ Tween® 60; T60) และ พอลิซอร์เบต 80 (polysorbate 80 หรือ Tween® 80; T80) และตัวทำละลายมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษานี้คือ น้ำ (Deionized water; DI water) (ตัวควบคุม) แบ่งตัวอย่างเป็น 2 กลุ่มคือ ใช้ความร้อน (95 ± 2 องศาเซลเซียส) และไม่ใช้ความร้อน (30 ± 2 องศาเซลเซียส) สกัดสารสำคัญจากหัวหอมแดงด้วยเครื่องอัลตราซาวนด์ความถี่ 80 เฮิร์ตซ์ (Branson CPX5800H-E, Branson Ultrasonics Co.Ltd, CT, USA) นาน 180 นาที (แบบต่อเนื่อง) แยกสารสกัดที่ได้ และผงหัวหอมแดงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendorf Centrifuge 5425 R, Thailand) ที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเคอร์ซีตินในการสกัดด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารสกัดหัวหอมแดงกักเก็บในไมเซลล์ ศึกษาลักษณะภายนอก ความนำไฟฟ้า กลิ่น ด้วยตาเปล่า ศึกษาขนาด การกระจายขนาด และประจุ ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ศึกษาความเป็นกรดต่างด้วยเครื่อง pH meter (HORIBA รุ่น pH-33, HORIBA Advanced Techno, Co., Ltd., Japan)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเคอร์ซีติน เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีตินความเข้มข้นตั้งต้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 10-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สภาวะที่ใช้วิเคราะห์สารเคอร์ซีตินคือ คอลัมน์ C18 (VetiSep™, GES C18 HPLC Column, Vertrical®, Thailand) คุณสมบัติคอลัมน์

ขนาดอนุภาคภายใน 5 มิลลิเมตร ความกว้าง 4.6 มิลลิเมตร ความยาว 250 มิลลิเมตร เครื่อง HPLC ที่ใช้ คือ รุ่น UltiMate 3000 UHPLC System (Thermo Scientific™, MA USA) ตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย acetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร และ acetonitrile ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ปริมาณที่ฉีด 20 ไมโครลิตร ความยาวคลื่นที่ใช้ 370 นาโนเมตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH assay) เตรียมสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) สารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน วิตามินอี (Trolox®) และวิตามินซี (Ascorbic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.004, 0.01, 0.01 และ 0.01 ตามลำดับ โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย สร้างกราฟมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH และตัวอย่างสารสกัดจากหัวหอมแดง ในถาดหลุม 96 ช่อง (96-well plate) ปริมาตร 180 และ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ เขย่า 1 นาที และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร หลีกเลียงแสงสว่างตลอดการทดสอบ คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน ($\mu\text{g QE/g}$) วิตามินอี ($\mu\text{g TE/g}$) และวิตามินซี ($\mu\text{g AE/g}$) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยคำนวณจากสมการที่ 1

$$\% \text{inhibition} = [(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100 \quad \text{สมการที่ 1}$$

โดย $\text{Abs}_{\text{control}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม และ $\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ

การออกแบบสภาวะสำหรับสกัดสารสำคัญจากหอมแดงบดละเอียดด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ตัวแปรต้น (Causal factors; X_n) ที่ต้องการศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (Temperature; X_1) ระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (Heating time; X_2) ดังแสดงในตารางที่ 3 อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ($X_1 = 40, 60, 80$ องศาเซลเซียส) และระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน ($X_2 = 60, 120, 180$ นาที) ระบบไมเซลล์ที่ใช้คือพอลิซอร์เบต 80 ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก และระยะเวลาในการสกัดด้วยอัลตราซาวนด์ (Sonication time) 180 นาทีแบบต่อเนื่อง ตัวแปรตอบสนอง (Response variables; Y_n) ได้แก่ ขนาดอนุภาค การกระจายขนาด ประจุ ความเป็นกรดต่าง ปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ให้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดกำหนดตัวแปรตอบสนอง คือ สภาวะที่สามารถสกัดปริมาณเคอร์ซีตินได้สูงที่สุด (Maximum) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (Maximum)

การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่สุด ชั่งผงหัวหอมแดง 0.2 กรัม เติมตัวทำละลายพอลิซอร์เบต 80 ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สกัดสารสำคัญจากหัวหอมแดงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน 180 นาที ตามลำดับ จากนั้นเปรียบเทียบผลได้สารเคอร์ซีตินที่สกัดได้ของค่าที่ได้จากการทำนาย (Predicted value) และค่าจริงที่ได้จากการทดลอง (Actual value)

สถิติในการวิจัย ข้อมูลรายงานค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($N = 3$) การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way Analysis Of Variance (ANOVA) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ LSD ค่านัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 ($P \text{ Value} < 0.05$)

ผลการวิจัย

การสกัดสารสำคัญจากหอมแดงด้วยเทคนิคไมเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกระบบตัวทำละลายไมเซลล์ที่เหมาะสมที่สามารถสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดงให้ได้ในปริมาณสูง โดยเปรียบเทียบ (1) ชนิดสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ได้แก่ พอลิซอร์เบต 20 พอลิซอร์เบต 60 และพอลิซอร์เบต 80 และ (2) วิธีการสกัดด้วยความร้อนและไม่ใช้

ความร้อน ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ของสารสกัดหัวหอมในตัวทำละลายไมเซลล์ แสดงในตารางที่ 1 พบว่าการสกัดเคอร์ซีดินจากหัวหอมแดงด้วยพอลิซอร์เบต 80 โดยใช้ความร้อนสามารถสกัดเคอร์ซีดินได้ปริมาณสูงที่สุดคือ 1689.70 ± 3.87 ไมโครกรัมต่อกรัมของผงหอมแดง โดยผู้วิจัยได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของพอลิซอร์เบต 80 ในช่วงร้อยละ 1 ถึง 5 พบว่าสารละลายไมเซลล์ของพอลิซอร์เบต 80 ความเข้มข้นร้อยละ 1 สามารถสกัดเคอร์ซีดินได้ปริมาณสูงที่สุดคือ 597.10 ± 2.65 ไมโครกรัมต่อกรัมของผงหอมแดง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ของสารสกัดหัวหอมในตัวทำละลายไมเซลล์

ตัวทำละลาย	ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ (ไมโครกรัมต่อกรัมของผงหอมแดง)	
	ไม่ใช้ความร้อน (30 ± 2 องศาเซลเซียส)	ใช้ความร้อน (95 ± 2 องศาเซลเซียส)
น้ำปราศจากไอออน	17.75 ± 0.15	4.75 ± 0.07
พอลิซอร์เบต 20	770.60 ± 10.75	$1,530.70 \pm 3.27$
พอลิซอร์เบต 60	789.90 ± 5.75	$1,620.45 \pm 16.85$
พอลิซอร์เบต 80	619.55 ± 12.37	$1,689.70 \pm 3.87$

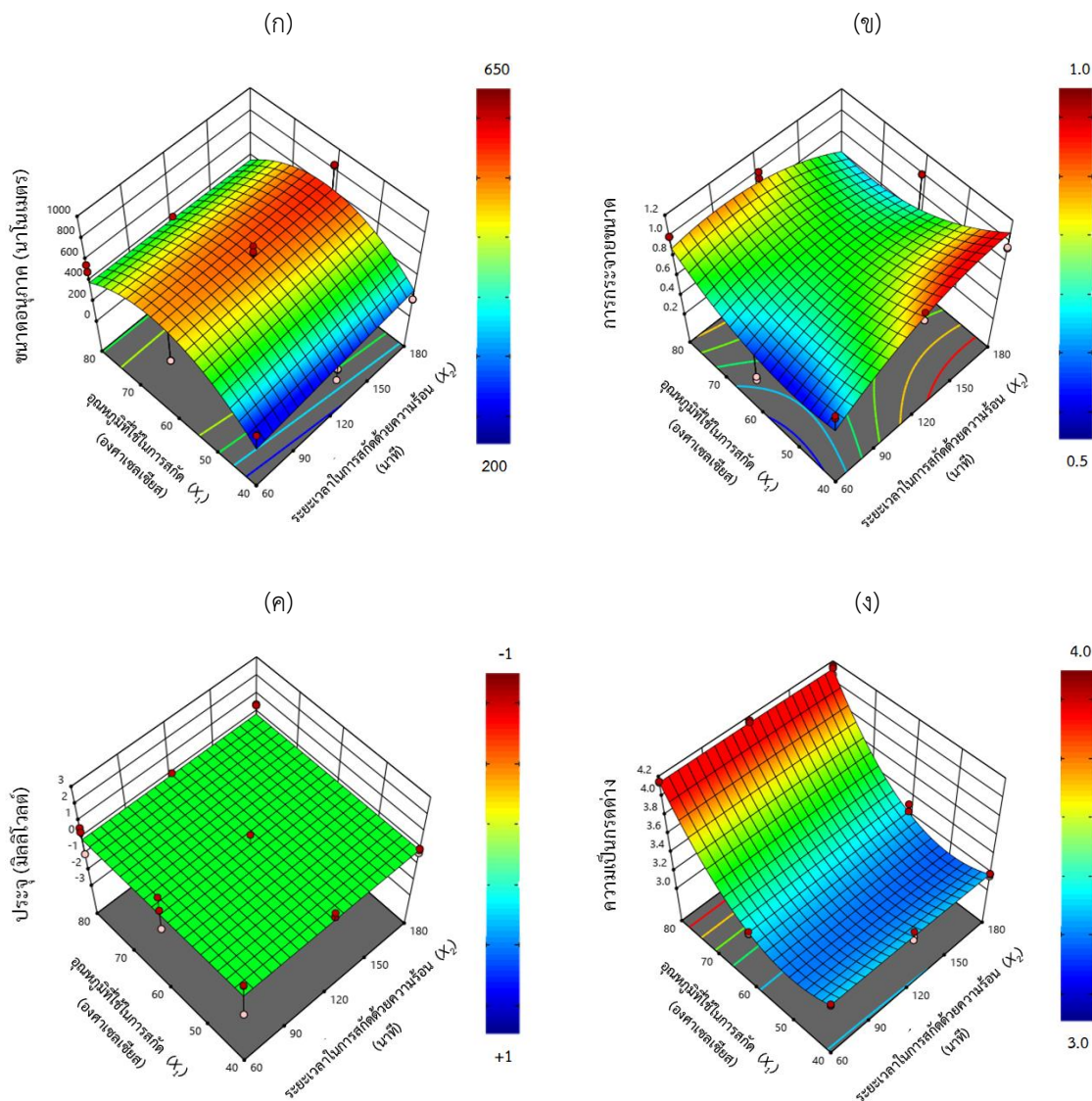
ตารางที่ 2 ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้และความเป็นกรดต่างของสารสกัดหัวหอมในตัวทำละลายไมเซลล์พอลิซอร์เบต 80 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีไม่ใช้ความร้อน

ร้อยละความเข้มข้น (โดยน้ำหนัก)	ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ (ไมโครกรัมต่อกรัมของผงหอมแดง)	ความเป็นกรดต่าง
1	597.10 ± 2.65	4.14 ± 0.02
2	431.15 ± 4.25	4.08 ± 0.04
3	426.25 ± 1.90	4.01 ± 0.02
4	550.05 ± 2.35	3.82 ± 0.01
5	569.80 ± 1.95	3.81 ± 0.01

การออกแบบสภาวะสำหรับสกัดสารสำคัญจากหอมแดงบดละเอียดด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง รหัสตัวแปร (Code) ตัวแปรต้นในการสกัดและตัวแปรตอบสนองแสดงในตารางที่ 3 กำหนดให้ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (Temperature; X_1) ระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (Heating time; X_2) เป็นตัวแปรต้นที่ต้องการศึกษา และตัวแปรตอบสนอง ได้แก่ ขนาดอนุภาค การกระจายขนาด ประจุ ความเป็นกรดต่าง ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อรวบรวมข้อมูล (Data set) ครบถ้วน ผู้วิจัยวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดด้วยโปรแกรม Design Expert® ข้อกำหนดของแบบจำลองนัยสำคัญ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย และการวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรตอบสนอง แสดงในตารางที่ 4 พบว่าโมเดล (Model) ตัวแปรตอบสนองของขนาดอนุภาค การกระจายขนาด ความเป็นกรดต่าง ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ตัวแปรตอบสนองของความเป็นกรดต่าง ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) อยู่ในช่วง 0.8 ถึง 0.9 ซึ่งบ่งชี้ว่า ตัวแปรต้นระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (X_1) และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (X_2) มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อตัวแปรตอบสนองของความเป็นกรดต่าง ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัยที่ศึกษาวิธีการสกัดเคอร์ซีดินจากผงใบมะขาม

จากภาพที่ 1 พื้นผิวตอบสนองของตัวแปรตอบสนองขนาดอนุภาค การกระจายขนาด ประจุ และความเป็นกรดต่างของไมเซลล์พอลิซอร์เบต 80 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะในการสกัดและขนาดอนุภาค (ภาพที่ 1ก) สภาวะในการสกัดและการกระจายขนาด (ภาพที่ 1ข) สภาวะในการสกัดและประจุ (ภาพที่ 1ค) สภาวะในการสกัดและ ความเป็นกรดต่าง

(ภาพที่ 1) แถบสีน้ำเงินและแดงใช้แทนค่าของจำนวนตัวเลขที่สัมพันธ์กับตัวแปรตอบสนองนั้น ๆ แถบสีน้ำเงินแสดงถึงค่าน้อยและแถบสีแดงแสดงค่ามาก พื้นผิวตอบสนองของตัวแปรตอบสนองแต่ละตัวแปรแสดงถึงคุณลักษณะของสารสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดงด้วยระบบไมเซลล์พอลิซอร์เบต 80 ว่ามีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 200 ถึง 650 นาโนเมตร การกระจายขนาดอยู่ในช่วง 0.5 ถึง 1.0 มีประจุอยู่ในช่วง ± 1 มิลลิโวลต์ และมีความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 3 ถึง 4 ประโยชน์ที่ได้รับจากพื้นผิวตอบสนองนี้ช่วยอธิบายความเข้าใจเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (X_1) และระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (X_2) ส่งผลต่อคุณสมบัติของไมเซลล์พอลิซอร์เบต 80 และคุณลักษณะของไมเซลล์ ได้แก่ ขนาด การกระจายขนาด ประจุ ความเป็นกรดต่าง เป็นข้อมูลของระบบตัวพา (Carrier) ไมเซลล์ในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์สำหรับลดรอยแผลเป็นผิวหนัง เพื่อให้สามารถดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังได้ดีเนื่องจากไมเซลล์มีอนุภาคขนาดเล็ก



ภาพที่ 1 พื้นผิวตอบสนองของตัวแปรตอบสนองการสกัดด้วยพอลิซอร์เบต 80 (ก) ขนาดอนุภาคไมเซลล์ (ข) การกระจายขนาด (ค) ประจุ และ (ง) ความเป็นกรดต่าง

ตารางที่ 3 ตัวแปรต้นและตัวแปรตอบสนองในการสกัดเคอร์จินจากหัวหอมแดงด้วยไมเซลล์ฟอสฟอริเบต 80

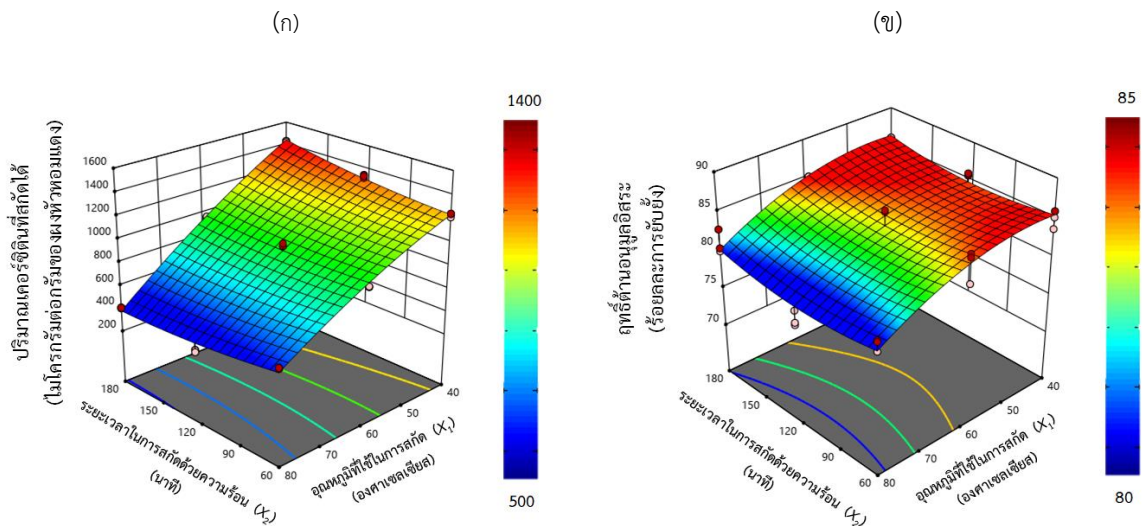
สภา	รหัส (code)	ตัวแปรต้นในการสกัด (causal factors)			ตัวแปรตอบสนอง (response variable)				ฤทธิ์ด้านอนุเอลิตระ (ร้อยละขั้วขั้ว)	
		X ₁	X ₂	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (นาที)	ขนาดอนุภาค (นาโนเมตร)	การกระจายขนาด	ประจุ (มิลลิโวลต์)		ความเป็นกรด
1	-1	-1	40	60	264.77±3.78	0.68±0.02	-0.02±1.18	3.22±0.01	1232.52±16.53	84.90±1.14
2	-1	0	40	120	165.05±6.01	0.95±0.05	+0.25±0.15	3.21±0.05	1327.43±14.24	85.68±0.15
3	-1	+1	40	180	175.73±2.29	0.94±0.01	-0.10±0.13	3.18±0.02	1425.73±6.63	85.88±0.23
4	0	-1	60	60	287.40±1.97	0.25±0.02	+0.09±1.03	3.23±0.02	900.98±3.23	84.22±2.02
5	0	0	60	120	656.70±7.50	0.68±0.02	+0.02±0.48	3.22±0.01	966.98±13.69	84.38±1.98
6	0	+1	60	180	846.07±3.76	1.00±0.00	-0.55±0.16	3.23±0.07	955.25±8.16	84.70±0.57
7	+1	-1	80	60	496.80±1.41	1.00±0.00	+0.02±0.86	4.14±0.01	551.95±6.53	80.20±0.74
8	+1	0	80	120	392.00±15.56	0.98±0.03	-0.35±0.58	4.14±0.02	353.93±11.24	76.94±1.00
9	+1	+1	80	180	251.03±1.07	0.45±0.02	+0.12±0.59	4.12±0.04	407.37±4.14	81.02±1.54

ตารางที่ 4 ข้อกำหนดของแบบจำลองปัจจัยสำคัญ คำสัมประสิทธิ์การถดถอย และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (p value) ของตัวแปรตอบสนอง

Polynomial term	ขนาดอนุภาค		การกระจายขนาด		ประจุ		ความเป็นกรด		ปริมาณเคอร์จินที่สกัดได้		ฤทธิ์ด้านอนุเอลิตระ	
	Coefficient	p values	Coefficient	p values	Coefficient	p values	Coefficient	p values	Coefficient	p values	Coefficient	p values
Model	-	0.0018*	-	0.0046*	-	< 0.0001*	-	< 0.0001*	-	< 0.0001*	-	<
Intercept	605.2090	-	0.74444	-	-0.0569	-	3.23111	-	921.3940	-	83.6630	0.0001*
X ₁ : temperature	33.6389	0.4082	0.0767	0.1210	-	-	-0.0128	0.1040	17.1500	0.0774	0.3806	0.2904
X ₂ : heating time	96.8406	0.0242*	-0.0239	0.6198	-	-	0.4667	< 0.0001	-445.4060	< 0.0001*	-3.0506	< 0.0001
X ₁ X ₂	-44.6917	0.3703	-0.2042	0.0021*	-	-	0.0042	0.6556	-84.4500	< 0.0001*	-0.0408	0.9252
X ₁ ²	-2.9800	0.9660	-0.1500	0.0821	-	-	-0.0050	0.7049	29.5167	0.0792	1.1539	0.0714
X ₂ ²	-317.3850	0.0002*	0.1883	0.0323*	-	-	0.4400	< 0.0001	-57.9167	0.0016	-1.9961	0.0035
R ²	0.5765	-	0.5313	-	0.0000	-	0.9958	-	0.9913	-	0.8128	-
Adjusted R ²	0.4757	-	0.4197	-	0.0000	-	0.9948	-	0.9893	-	0.7682	-
Predicted R ²	0.3135	-	0.2389	-	-0.0784	-	0.9934	-	0.9862	-	0.6972	-
Adequate precision	6.6006	-	6.0054	-	NA	-	63.7658	-	57.363	-	10.9383	-
Lack of fit	-	< 0.0001*	-	< 0.0001*	-	0.9058	-	0.7767	-	< 0.0001*	-	0.0197*

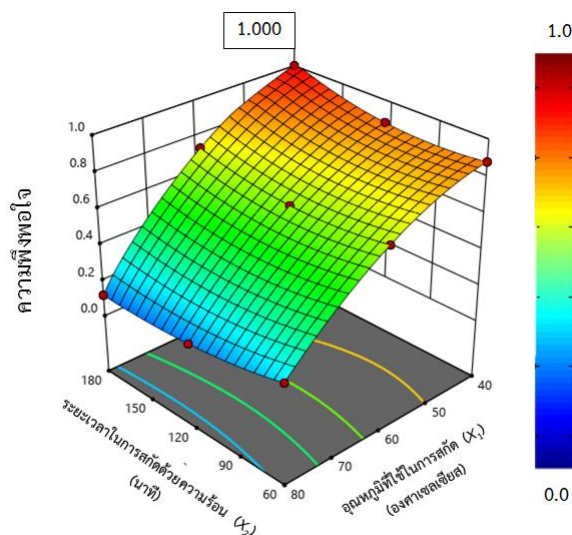
* นัยสำคัญทางสถิติ

จากภาพที่ 2 พื้นผิวตอบสนองของตัวแปรตอบสนองปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมเซลล์พอลิซอร์เบต 80 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะในการสกัดและปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ (ภาพที่ 2ก) สภาวะในการสกัดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ภาพที่ 2ข) พบว่า พื้นผิวตอบสนองของทั้งปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีรูปแบบ (Pattern) ที่สอดคล้องกันเนื่องจากต้านอนุมูลอิสระเป็นผลมาจากปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ และพบว่า ปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นผลตอบสนองแบบโดยตรงจากตัวแปรต้นคือ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (X_1) และระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน ภาพที่ 3 แสดงพื้นผิวตอบสนองของความพึงพอใจที่กำหนดให้สภาวะที่สามารถสกัดปริมาณเคอร์ซีตินได้สูงที่สุด (Maximum) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (Maximum) คือสภาวะที่เหมาะสมที่สุด



ภาพที่ 2 พื้นผิวตอบสนองของตัวแปรตอบสนองการสกัดด้วยพอลิซอร์เบต 80

(ก) ปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ (ข) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 3 พื้นผิวตอบสนองของความพึงพอใจ

การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่สุด จากการทดลองสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดงด้วยไมเซลล์พอลิซอร์เบต 80 ภายใต้สภาวะที่ได้จากการทำนายที่เหมาะสมที่สุด 2 สภาวะ คือ สภาวะที่ 1 คือ $X_1 = 40$ องศาเซลเซียส และ $X_2 = 60$ นาที และสภาวะที่ 2 คือ สภาวะที่ 1 คือ $X_1 = 40$ องศาเซลเซียส และ $X_2 = 180$ นาที ด้วยการทดลองจริง (Experimental condition) ทั้งสองสภาวะที่มีค่าความพึงพอใจที่ 0.815 และ 1.000 ตามลำดับ พบว่าค่าจริง (Actual value) ร้อยละอคติ (% bias) และช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงในตารางที่ 5 พบว่า ค่าจริงของปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ ที่ได้จากการทดลองของสภาวะที่ 1 และ 2 มีค่าเท่ากับ 1232.52 ± 16.52 และ 1425.73 ± 6.62 ไมโครกรัมต่อกรัมของผงหอมแดง ตามลำดับ ทั้งสองสภาวะมีค่าอคติที่มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 10 และอยู่ในช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงให้เห็นว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Design Expert[®] มีความแม่นยำ (Accuracy) และน่าเชื่อถือได้ (Reliability)

ตารางที่ 5 ค่าทำนาย ค่าจริง ร้อยละอคติ และช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ร้อยละ ของสภาวะการสกัดสารเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดง ด้วยพอลิซอร์เบต 80 ที่เวลา 60 และ 180 นาที

สภาวะในการสกัด	ค่าทำนาย	ค่าจริง**	ร้อยละอคติ*	ช่วงเชื่อมั่นค่าล่าง	ช่วงเชื่อมั่นค่าบน	ความพึงพอใจ
$X_1 = 40$ องศาเซลเซียส $X_2 = 60$ นาที	1,236.80	$1,232.52 \pm 16.52$	-0.35	1,195	1,279	0.815
$X_1 = 40$ องศาเซลเซียส $X_2 = 180$ นาที	1,440.00	$1,425.73 \pm 6.62$	-1.00	1,398	1,482	1.000

*ร้อยละอคติ = [(ค่าจริง - ค่าทำนาย)/ค่าจริง] x 100 ** หน่วยคือไมโครกรัมต่อกรัมของผงหอมแดง

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การสกัดสารสำคัญจากหอมแดงด้วยเทคนิคไมเซลล์ ในการศึกษาเปรียบเทียบชนิด ความเข้มข้น และวิธีการสกัดพบว่า ระบบไมเซลล์พอลิซอร์เบต 80 ความเข้มข้นร้อยละ 1 สกัดด้วยวิธีใช้ความร้อนสามารถสกัดเคอร์ซีตินได้ปริมาณสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าพอลิซอร์เบต 80 ช่วยเพิ่มค่าการละลายของเคอร์ซีตินได้มากที่สุด ไมเซลล์พอลิซอร์เบต 80 > พอลิซอร์เบต 20 > พอลิซอร์เบต 40 (Vigneshwari and Dash, 2023) โดยในการศึกษานี้พบว่าการสกัดด้วยความร้อนไมเซลล์พอลิซอร์เบต 80 > พอลิซอร์เบต 60 > พอลิซอร์เบต 20 ส่วนการสกัดโดยไม่ใช้ความร้อนพบว่าไมเซลล์พอลิซอร์เบต 60 > พอลิซอร์เบต 20 > พอลิซอร์เบต 80 เมื่อพิจารณาคุณสมบัติเฉพาะตัวของพอลิซอร์เบตชนิดต่าง ๆ พบว่าค่าจุดวิกฤตการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration) ของพอลิซอร์เบต 20, 60 และ 80 มีค่าเท่ากับ 0.049, 0.017 และ 0.015 มิลลิโมล ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก) พอลิซอร์เบต 80 ที่มีค่าจุดวิกฤตการเกิดไมเซลล์ต่ำที่สุด แสดงถึงการเกิดไมเซลล์มีความต้องการความเข้มข้นของพอลิซอร์เบต 80 น้อยกว่าพอลิซอร์เบต 60 และ 20 ตามลำดับ จึงคาดว่า จะเกิดไมเซลล์ได้และมีจำนวนอนุภาคไมเซลล์เกิดขึ้นมากกว่าพอลิซอร์เบตชนิดอื่น จึงอาจส่งผลให้พอลิซอร์เบต 80 มีประสิทธิภาพในการสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดงได้ปริมาณสูงที่สุด

การออกแบบสภาวะสำหรับสกัดสารสำคัญจากหอมแดงบดละเอียดด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง เป็นอีกครั้งที่ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีสกัดสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดงด้วยวิธีผสมผสานระหว่างการสกัดด้วยอัลตราซาวนด์และไมเซลล์ไลเซนซันโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง และให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีการประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวนด์ (González-de-Peredo et al., 2021) หรือคลื่นไมโครเวฟ (González-de-Peredo et al., 2022) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอม ช่วยลดระยะเวลาในการทำงาน รวมถึงลดการใช้พลังงานความร้อนในกระบวนการสกัด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบมาตรฐาน เช่น วิธีการหมัก พบว่าการใช้เทคโนโลยีสีเขียว (Green

technology) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารสำคัญได้ (Vieira et al., 2017) และช่วยลดปัญหาสุขภาพ และมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้ตัวทำละลายชนิดสารลดแรงตึงผิวที่มีความปลอดภัยมากกว่าตัวทำละลายอินทรีย์

การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่สุด ในการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และน่าเชื่อถือได้ (Reliability) ของสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่สุด เป็นอีกครั้งที่ค่าจริงที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Design Expert® อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ความสามารถในการสกัดซ้ำ (Reproducibility) ให้ผลการทดลองแม่นยำ สภาวะในการสกัดอื่น ๆ จำเป็นต้องได้รับการควบคุมเป็นอย่างดี ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการสกัดยังขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น แหล่งวัตถุดิบ ส่วนของพืชที่นำมาสกัดสารสำคัญ กระบวนการเตรียมตัวอย่าง สภาวะแวดล้อมในการสกัด เป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงเช่นกัน

ผู้วิจัยและคณะประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีการสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดงด้วยวิธีผสมผสานระหว่างการสกัดด้วยอัลตราซาวนด์และไมเซลล์ไลเซนชันโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง จากการศึกษาพบว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ได้แก่ พอลิซอร์เบต 80 สามารถเป็นตัวทำละลายในการสกัดสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดงได้ สภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด 40 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน 180 นาที ร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราซาวนด์ 180 นาที จากการศึกษาสามารถพัฒนาและเพิ่มโอกาสของสารสกัดเคอร์ซีตินจากหัวหอมแดงซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้สามารถใช้เป็นสารสำคัญในเภสัชภัณฑ์และเครื่องสำอางได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษาวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สป.อว.) ผ่านทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ปีงบประมาณ 2564 รหัสโครงการ RGNS 64-237 โปรแกรมสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรม เครือข่าย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (ITAP UBU) และบริษัท เดอะ เน็กซ์ แชนเตอร์ จำกัด ที่สนับสนุนทุนวิจัย ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุทยานวิทยาศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่อำนวยความสะดวกด้านสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Chanprapaph, K., Tanrattanakorn, S., Wattanakrai, P., Wongkitisophon, P. and Vachiramon, V. (2012). Effectiveness of onion extract gel on surgical scars in asians. *Dermatology Research and Practice*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/212945>.
- Fraille, M., Buratto, R., Gómez, B., Martín, Á. and Cocero, M. J. (2014). Enhanced delivery of quercetin by encapsulation in poloxamers by supercritical antisolvent process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(11), 4318-4327. <https://doi.org/10.1021/ie5001136>.
- González-de-Peredo, A. V., Vázquez-Espinosa, M., Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Barbero, G. F. and Palma, M. (2021). Development of optimized ultrasound-assisted extraction methods for the recovery of total phenolic compounds and anthocyanins from onion bulbs. *Antioxidants (Basel)*, 10(11), 1755.
- Moldovan, C., Frumuzachi, O., Babotă, M., Barros, L., Mocan, A., Carradori, S. and Crișan, G. (2022). Therapeutic uses and pharmacological properties of shallot (*Allium ascalonicum*): a systematic review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 903686.

- Nguyen, T., Nguyen, M. T., Nguyen, P. C. and Ngo, T. (2019). Identification and extraction method of quercetin from flesh and skin of shallot (*Allium ascalonicum*) cultivated in Soc Trang province, Vietnam. *Food Research*, 4(2), 358-365. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(2\).306](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(2).306).
- Office of Agricultural Economics. (2016). *Agricultural statistics of Thailand 2015*. Bangkok: National Office of Buddhism Press.
- Prager, W. and Gauglitz, G. G. (2018). Effectiveness and Safety of an Overnight Patch Containing *Allium cepa* Extract and Allantoin for Post-Dermatologic Surgery Scars. *Aesthetic Plastic Surgery*, 42(4), 1144-1150.
- González-de-Peredo, A. V., Vázquez-Espinosa, M., Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Barbero, G. F., Palma, M. and Carrera, C. (2022). Optimization of a microwave assisted extraction method for maximum flavonols and antioxidant activity of onion extracts. *Antioxidants*, 11(12), 2393. DOI: 10.3390/antiox11122393.
- Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A. P., Ferreira, O. and Ferreira, I. C. F. R. (2017). Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from *Juglans regia* L. for the valorization of walnut leaves. *Industrial Crops and Products*, 107, 341-352. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.012>.
- Vigneshwari, R. and Dash, S. (2023). Comparative Interaction of Flavonoid Quercetin with Different Tween Surfactants. *ACS Food Science & Technology*, 3(5), 969-980.