

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสกัดสารแอนทราควิโนนส์จากรากยอดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต

โดย นางสาว อาทิวรรณ ไชติพิฤกษ์ และคณะ

มิถุนายน 2549

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสกัดสารแอนทราควิโนนส์จากรากขอดีด้วยน้ำกึ่งวิกฤต

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. นางสาวอาทิวรรณ โชติพิทักษ์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. นายประเสริฐ ภาวสันต์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. Prof. Motonobu Goto Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Kumamoto University

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG4780096
ชื่อโครงการ การสกัดสารแอนทราควิโนนส์จากรากยอดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต
ชื่อนักวิจัย นางสาวอาทิวรรณ โชติพิฤกษ์
อีเมล artiwan.sh@chula.ac.th
ระยะเวลาโครงการ 1 กรกฎาคม 2547-30 มิถุนายน

ต้นยอ (*Morinda citrifolia*) เป็นพืชพื้นบ้านที่ปัจจุบันได้รับความสนใจศึกษาค้นคว้า และพบว่าในรากของต้นยอมีสารต่างๆ ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อโรคหลายชนิดๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และยังมีฤทธิ์ต่อต้านโรคมะเร็งและสามารถบรรเทาอาการเจ็บปวดอีกด้วย แต่เดิมการสกัดสารแอนทราควิโนนส์จะทำได้โดยการสกัดด้วยเอทานอล จากนั้นทำการระเหยเอาตัวทำละลายเอทานอลออก แต่วิธีนี้อาจมีสารละลายอินทรีย์ตกค้างอยู่ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการใช้ น้ำกึ่งวิกฤตในการสกัดสารแอนทราควิโนนส์จากรากแห้งของต้นยอ โดยศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ (110°C , 170°C และ 220°C) ความดัน และอัตราการไหลของน้ำ พบว่าแม้การนำในภาวะอุณหภูมิและความดันบรรยากาศนั้นไม่สามารถสกัดสารแอนทราควิโนนส์ออกมาได้ ทั้งนี้เนื่องจากค่าคงที่ ไดอิเล็กตริก (dielectric constant) ของน้ำที่สภาวะปกติมีค่าสูงมาก (ประมาณ 80 ที่ 25 องศาเซลเซียส) ซึ่งทำให้น้ำมีความเป็นขั้วสูงมาก แต่เมื่อน้ำมีอุณหภูมิสูงขึ้นถึงประมาณ 205 องศาเซลเซียส ค่าคงที่ dielectric จะลดลงอยู่ที่ประมาณ 33 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าคงที่ไดอิเล็กตริกของเมทานอล ทำให้น้ำที่สภาวะนี้สามารถสกัดสารแอนทราควิโนนส์ได้ดี ที่อุณหภูมิในการสกัดเท่ากับ 220°C จะได้สารสกัดปริมาณมากที่สุด คือประมาณ 43.6 มิลลิกรัมต่อกรัมของรากยอด และในการสกัดด้วยอัตราการไหลของน้ำสูงกว่า 4 มิลลิลิตรต่อนาทีขึ้นไป จะสามารถสกัดสารแอนทราควิโนนส์ที่มีอยู่ในรากออกมาได้หมดภายในเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาค้นคว้าผลของค่าความดัน พบว่าความดันไม่มีผลต่อปริมาณสารแอนทราควิโนนส์ที่ได้การสกัดสารในช่วงอุณหภูมิที่ทำการศึกษา อัตราการสกัดมีค่าสูงที่สุดเมื่ออัตราการไหลของน้ำเท่ากับ 6 มิลลิลิตรต่อนาที แต่ประสิทธิภาพในการสกัด ซึ่งวัดจากปริมาณสารแอนทราควิโนนส์ที่สกัดได้เทียบกับปริมาตรของน้ำจะมีค่าน้อยกว่าการสกัดด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 4 มิลลิลิตรต่อนาที นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้โดยการใช้ น้ำกึ่งวิกฤต และพบว่ามีความสัมพันธ์ดีกว่าการใช้อัลตราซาวด์ โดยมีคุณสมบัติดีในระดับเดียวกันกับการสกัดจากวิธีไมโครเวฟ และ Soxhlet ผู้วิจัยยังได้ศึกษาถึงความสามารถในการทำลายของสารแอนทราควิโนนส์ในน้ำที่ภาวะอุณหภูมิต่างๆ และเสนอแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการละลายของสารแอนทราควิโนนส์ในน้ำกึ่งวิกฤต ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญต่อการออกแบบระบบสกัด

คำหลัก ต้นยอ การสกัด น้ำกึ่งวิกฤต แอนทราควิโนนส์ ความสามารถในการละลาย

Abstract

Project code: MRG4780096
Project title: Subcritical Water Extraction of Anthraquinones from Roots of *Morinda citrifolia*
Investigator: Miss Artiwan Shotipruk
E-mail address: artiwana.sh@chula.ac.th
Project Period: July 1, 2003-June 30, 2005

Morinda citrifolia is a plant used in folk remedies that has recently gained increased interest from scientific professionals. The roots of the plants contain anthraquinones, which show several therapeutic effects. These include anti-bacterial, anti-viral, and anti-cancer activities as well as analgesic effects. Conventionally, the compound is extracted with ethanol, followed by evaporation. This could leave residual solvents in the product. This study examines pressurized hot water extraction of anthraquinones from dried roots of *Morinda citrifolia* (Noni). The effects of temperature (110 °C, 170 °C and 220 °C), pressure, and water flow rate (2, 4, and 6 ml min⁻¹) on extraction yield and extraction rate were determined. Although water at ambient condition could not extract anthraquinones due to high polarity the water ($\epsilon=80$ at 25 °C), subcritical water has lower dielectric constant ($\epsilon =33$, at 205 °C), thus water could effectively extract the compound at this condition. Based on our experiment, at 220 °C, the extraction yield was the highest and was approximately 43.6 mg g⁻¹. Subcritical water extraction at 4 ml min⁻¹ or higher was found to be able to recover all the anthraquinones present in the roots within three hours of extraction even at 170 °C. Pressure had no significant effect on the results for the range of temperatures studied. The flow rate of 6 ml min⁻¹ resulted in the highest extraction rate, but the extraction efficiency was lower than that of 4 ml min⁻¹. Anthraquinones solubility in pressurized hot water was determined. Moreover, the antioxidant activity of the subcritical water extract was investigated and was found to be higher than that of the extracts obtained with ultrasound assisted extraction. The activity was comparable to the extracts obtained with microwave and soxhlet solvent extraction. In addition to this, we also determined the solubility of anthraquinones at various subcritical water conditions and proposed a mathematical model that describes the solubility.

Key words: *Morinda citrifolia*, extraction, subcritical water, anthraquinones, solubility

Executive Summary

นับจากอดีตจนถึงปัจจุบัน มนุษย์ได้รู้จักการนำเอาส่วนต่างๆของพืชมาใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆหลายชนิด และถึงแม้ว่าในปัจจุบันเทคโนโลยีจะก้าวหน้าไปมากและส่งผลให้มนุษย์สามารถสังเคราะห์ตัวยารักษาโรคต่างๆโดยวิธีทางเคมีได้แล้วก็ตาม ผู้บริโภคจำนวนมากก็ยังให้ความสนใจกับการใช้ยารักษาโรคที่ได้จากพืชสมุนไพรอยู่ ทั้งนี้เนื่องจากผู้บริโภคมีความคำนึงถึงความปลอดภัยของสุขภาพและผลข้างเคียงที่อาจจะได้รับการบริโภคยาสังเคราะห์ ดังนั้นผลิตภัณฑ์จำพวกยาที่ได้มาจากธรรมชาติจึงเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย โดยทั่วไปแล้ว การสกัดองค์ประกอบทางยาที่สำคัญจากพืชสมุนไพร ทำได้โดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล แอลกอฮอล์ จากนั้นทำการกลั่นเอาตัวทำละลายอินทรีย์ออก การสกัดด้วยวิธีนี้ นอกจากจะใช้เวลานานและต้องผ่านขั้นตอนหลายขั้นตอนแล้ว อาจมีสารละลายอินทรีย์หลงเหลืออยู่ในสารสกัด ซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีการพัฒนาทางเลือกใหม่ในการสกัดให้มีประสิทธิภาพและปลอดภัยมากขึ้น และทางเลือกหนึ่งก็คือการเลือกใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นแทนการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และตัวทำละลายที่ปลอดภัยและได้รับความสนใจมากชนิดหนึ่งก็คือ น้ำ แต่จะเห็นว่ น้ำในสภาวะปกติ คือที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศนั้น ไม่สามารถละลายสารอินทรีย์สำคัญหลายชนิดได้ หรืออาจจะละลายได้ไม่ดีเท่าที่ควร ทั้งนี้เนื่องมาจากค่าคงที่ dielectric ของน้ำที่สภาวะปกติมีค่าสูงมาก (ประมาณ 80 ที่ 25 องศาเซลเซียส) ซึ่งทำให้น้ำมีความมีขั้วสูงมาก และไม่สามารถละลายสารอินทรีย์ได้ แต่เมื่อน้ำมีอุณหภูมิสูงขึ้นถึงประมาณ 205 องศาเซลเซียสหรืออยู่ในสภาวะที่เรียกว่าสภาวะกึ่งวิกฤต ค่าคงที่ dielectric จะลดลงอยู่ที่ประมาณ 33 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าคงที่ dielectric ของเมทานอล ทำให้น้ำที่สภาวะนี้สามารถละลายสารอินทรีย์ได้ ผู้เสนอขอรับทุนเห็นว่าเนื่องจากการที่สารแอนทราควิโนนส์ที่ผลิตและสะสมอยู่ในรากของต้นยอเป็นสารอินทรีย์ที่มีขั้วเล็กน้อยและโมเลกุลมีขนาดเล็กมาก จึงน่าจะมีความสามารถในการละลายในน้ำที่สภาวะกึ่งวิกฤตนี้ได้ดี และเนื่องจากยังไม่มีผู้ศึกษาการสกัดรากยอ ด้วยน้ำที่สภาวะกึ่งวิกฤตนี้ ผู้เสนอขอรับทุนจึงเสนอที่จะศึกษาการสกัดสารจำพวกแอนทราควิโนนส์นี้จากรากยอ โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดเช่น อุณหภูมิและอัตราการไหลของน้ำที่ทำให้สกัดสารได้มากที่สุด และนอกจากปริมาณสารสกัดแล้ว ผู้เสนอขอรับทุนจะศึกษาอิทธิพลของสภาวะที่ใช้ในการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ต่อประสิทธิภาพการต่อต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้อีกด้วย โดยจะเทียบกับการสกัดด้วยวิธีดั้งเดิมที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย นอกจากนี้ โครงการวิจัยนี้ยังเสนอที่จะหาข้อมูลพื้นฐาน เช่นความสามารถในการละลายของสารแอนทราควิโนนส์ในน้ำกึ่งวิกฤตที่สภาวะต่างๆ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการออกแบบการสกัดต่อไป

เนื้อหางานวิจัย

1. บทนำ

1.1 ความเป็นมาของปัญหา

สารจำพวกแอนทราควิโนนส์เป็นสารสีเหลืองที่พบมากในลำต้นและรากของต้นยอ สารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญหลายประการ เช่น เป็นสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส พบว่าสารในกลุ่มนี้ สามารถนำไปใช้เป็นยารักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย เช่น ไข้หวัด และใช้รักษาอาการติดเชื้อที่ผิวหนัง¹ ในส่วนของฤทธิ์ต่อต้านเชื้อไวรัส พบว่ามีสารประกอบชนิดหนึ่งในกลุ่มนี้ที่สามารถระงับเชื้อไวรัสโรคเอดส์ (เอช ไอ วี) ได้² นอกจากนี้ สารจำพวกแอนทราควิโนนส์ยังมีฤทธิ์แก้ปวดและกล้ามเนื้อเกร็ง สามารถใช้เป็นยาแก้ปวดได้อีกด้วย³ และยังมีผู้พบอีกว่า สารในกลุ่มแอนทราควิโนนส์อีกชนิดหนึ่งในรากของต้นยอเรียกว่า Damnacanthol มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งในอวัยวะต่างๆ เช่น มะเร็งในปอด ลำไส้ ตับอ่อน และเม็ดเลือดขาว⁴

วิธีการสกัดสารจำพวกแอนทราควิโนนส์ในอดีต ทำได้โดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล แอลกอฮอล์ โดยการนำรากมาแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง จากนั้นแยกส่วนของรากออกและนำสารละลายอินทรีย์ที่มีสารแอนทราควิโนนส์ละลายอยู่ไประเหยเพื่อแยกเอาสารละลายอินทรีย์ออก การแยกนี้มักจะทำโดยการกลั่น การสกัดด้วยวิธีดั้งเดิมนี้นอกจากจะใช้เวลานานและต้องผ่านขั้นตอนหลายขั้นตอนแล้ว อาจมีสารละลายอินทรีย์ตกค้างอยู่ในสารสกัด ซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยมากขึ้น การหาตัวทำละลายใหม่เพื่อใช้ทดแทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้แต่เดิมเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ตัวทำละลายใหม่ที่ได้รับความสนใจเป็นพิเศษในช่วงเวลาประมาณสิบปีที่ผ่านมาคือ คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะวิกฤตยิ่งยวด เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะนี้มีคุณสมบัติพิเศษ เช่น สามารถแพร่เข้าสู่ภายในของส่วนของพืชสมุนไพรได้ดี ทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพมากขึ้นกว่าการใช้ตัวทำละลายแบบดั้งเดิม และการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะวิกฤตยิ่งยวดนี้ ยังสามารถทำได้ที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส) ไม่ทำให้สารสกัดที่มีความไวต่ออุณหภูมิสูงสลายตัวแต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์เป็นโมเลกุลไม่มีขั้ว ฉะนั้นจึงใช้ได้ดีกับสารที่ไม่มีขั้ว จำพวกน้ำมันจากเมล็ดพืชซึ่งมีความสามารถในการละลายสูงในคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด⁵ ในกรณีของสารที่มีขั้ว จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายร่วมเช่น เอทานอล เพื่อช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของสารมีขั้วในคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด ซึ่งการนำเอาสารละลายอินทรีย์เข้า

มาใช้ จะต้องแยกออกในภายหลังและอาจมีปัญหาสารอินทรีย์ตกค้างขึ้นมาอีก เนื่องจากปัญหาดังกล่าวนี้ จึงได้เกิดความจำเป็นในการหาตัวทำละลายตัวใหม่ขึ้นมาใช้แทน และตัวทำละลายที่มีศักยภาพในการสกัดสารอินทรีย์ที่มีขั้วคือน้ำที่สภาวะต่ำกว่าสภาวะวิกฤต หรือน้ำร้อนในสภาวะที่ความดันสูง จะเห็นว่าการนำในสภาวะปกติ คือที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศนั้นนั้นไม่สามารถละลายสารอินทรีย์สำคัญหลายชนิดได้ หรือละลายได้ไม่ดีเท่าที่ควร ทั้งนี้เนื่องมาจากค่าคงที่ dielectric ของน้ำที่สภาวะปกติมีค่าสูงมาก (ประมาณ 80 ที่ 25 องศาเซลเซียส) ซึ่งทำให้น้ำมีความมีขั้วสูงมาก และไม่สามารถละลายสารอินทรีย์ได้ แต่เมื่อน้ำมีอุณหภูมิสูงขึ้นถึงประมาณ 205 องศาเซลเซียส ค่าคงที่ dielectric จะลดลงอยู่ที่ประมาณ 33 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าคงที่ dielectric ของเมทานอล ทำให้น้ำที่สภาวะนี้สามารถละลายสารอินทรีย์ได้

ในส่วนของโครงการนี้ ได้ศึกษาเฉพาะสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในรากของต้นยอเท่านั้น โดยในรากของต้นยอจะประกอบไปด้วยสารอินทรีย์หลายชนิด ซึ่งในโครงการนี้ ได้ศึกษาถึงสารกลุ่ม Anthraquinones เนื่องจากสารกลุ่ม Anthraquinones มีคุณสมบัติที่สำคัญในการยับยั้งมะเร็งต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย³ และเชื้อไวรัสโรคเอดส์ (HIV)⁴ ได้ โดยการจะศึกษาสารอินทรีย์ทุกตัวที่อยู่ในกลุ่ม Anthraquinones ทำได้ยากและไม่สะดวก ดังนั้นเพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์จึงเลือก 1,2-Dihydroxyanthraquinones (Alizarin) เป็นตัวแทนของสารกลุ่มนี้

จุดมุ่งหมายของโครงการนี้ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารกลุ่ม Anthraquinones ออกจากรากของต้นยอ ด้วยวิธีน้ำกึ่งวิกฤต ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด (อัตราการสกัดสาร Anthraquinones ออกจากรากของต้นยอสูงสุด และได้ปริมาณสาร Anthraquinones มากที่สุด) โดยพิจารณาจากปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความดัน และอัตราการไหล เป็นต้น ซึ่งจะนำไปใช้ในการพัฒนาทางเลือกใหม่ในการสกัดสาร Anthraquinones จากรากของต้นยอ ที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

1.2 การสำรวจการวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

น้ำในกึ่งวิกฤตได้ถูกนำมาใช้ในการสกัดสารอินทรีย์จาก organic waste และได้ผลเป็นที่น่าพอใจ สำหรับการสกัดสารจากพืชสมุนไพรด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าสภาวะวิกฤตนี้ นับว่ายังเป็นเรื่องใหม่ งานวิจัยที่ผ่านมาโดยมาก ได้นำน้ำที่สภาวะนี้มาทดลองสกัดสารจำพวกน้ำมันหอมระเหยจาก majoram⁶ savory และ peppermint⁷ และ oregano⁸ โดยผู้ศึกษาพบว่าการสกัดด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีสกัดแบบดั้งเดิม (เช่น แอลกอฮอล์) อันได้แก่การสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ดั้งเดิม หรือการสกัดด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ และนอกจากสารประเภทน้ำมันหอมระเหยแล้ว มีผู้ทดลองใช้น้ำที่สภาวะนี้สกัดสารประกอบสำคัญอื่นๆจากพืชได้สำเร็จ เช่น สาร hypericin และ

pseudohypericin จาก St. John's wort⁹ สาร iridoid glycosides จาก Veronica lonifolia¹⁰ และ สาร kava lactones จากรากของ kava¹¹ และถึงแม้ว่าการสกัดวิธีนี้จะทำให้คุณหมึกค่อนข้างสูง แต่ก็ยังมีผู้พบที่สามารถใช้สกัดสารจำพวก antioxidant เช่นสาร berberine จาก coptidis rhizoma สาร glycyrrhizin จาก radix glycyrrhizae/licuorice และสาร baicalein จาก scutellariae radix ได้อย่างมีประสิทธิภาพ¹² และยังพบอีกว่าสารสกัดจาก Salvia officinalis L ที่สกัดด้วยวิธีนี้ มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ได้ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากวิธีดั้งเดิม¹³

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของโครงการนี้คือ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดสารกลุ่มแอนทราควิโนนส์ จากรากของต้นยอด้วยวิธีน้ำกึ่งวิกฤต เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด สำหรับขอบเขตของงานวิจัย เป็นดังต่อไปนี้

1. พัฒนาระบบการและขั้นตอนการวัดความเข้มข้นของสารมาตรฐานและสารตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วย น้ำกึ่งวิกฤต โดยใช้เครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ที่เหมาะสม
2. ศึกษาผลของคุณหมึก ความดัน และอัตราการไหลของน้ำ ที่มีผลต่อการสกัดสารกลุ่มแอนทราควิโนนส์ ด้วยน้ำกึ่งวิกฤต เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารกลุ่มแอนทราควิโนนส์ จากรากของต้นยอ
3. ทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดสารกลุ่มแอนทราควิโนนส์ ด้วยวิธีดั้งเดิมซึ่งใช้เอทานอลในการสกัด กับ วิธีสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต
4. ทดลองหาค่าความสามารถในการละลายของสารอาลิซารินในน้ำกึ่งวิกฤต

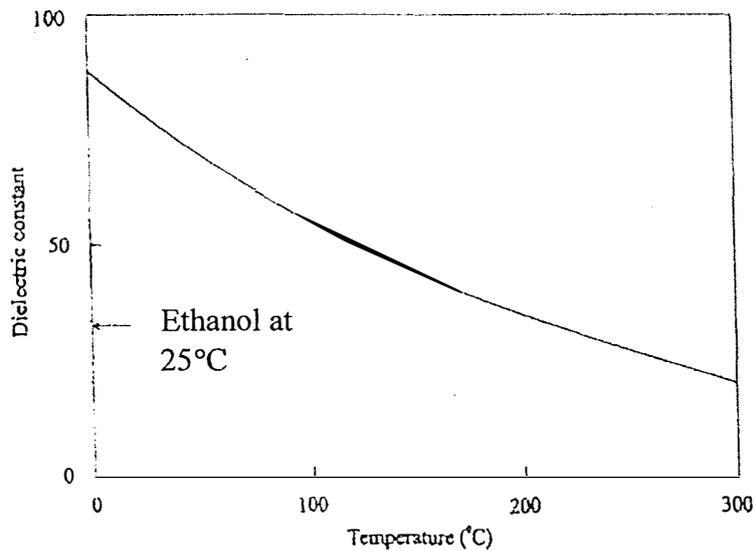
1.4 ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัยนี้

1. ได้ทางเลือกใหม่สำหรับการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ
2. ทราบข้อมูลพื้นฐาน เช่น ความสามารถในการละลายของสารกลุ่มแอนทราควิโนนส์ในน้ำกึ่งวิกฤต และอัตราการสกัดสารแอนทราควิโนนส์ด้วยวิธีนี้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการออกแบบการสกัดต่อไป

2. ข้อมูลพื้นฐานและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำกึ่งวิกฤต (Subcritical Water)

น้ำกึ่งวิกฤต คือ น้ำที่มีอุณหภูมิมากกว่าจุดเดือดแต่น้อยกว่าอุณหภูมิวิกฤต (Critical Temperature) ซึ่งในที่นี้จะหมายถึงน้ำภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง ($100^{\circ}\text{C} - 374^{\circ}\text{C}$) และความดันสูงพอเพื่อควบคุมให้น้ำยังคงเป็นของเหลว (Liquid Phase) โดยที่สภาวะอุณหภูมิสูงนี้ โมเลกุลพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond) ของน้ำจะเกิดการแตกตัว ทำให้น้ำมีสภาพขั้วลดลง ซึ่งสภาพความเป็นขั้วของตัวทำละลายนั้นกำหนดโดยค่า Dielectric Constant ซึ่งจะแปรผกผันกับอุณหภูมิของตัวทำละลาย นั่นคือ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ค่า Dielectric Constant มีค่าลดลง ซึ่งส่งผลให้สารมีสภาพขั้วลดลง ในทางกลับกัน ถ้าอุณหภูมิของสารลดลง มีผลทำให้ค่า Dielectric Constant มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้สารมีสภาพขั้วที่เพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นน้ำที่สภาวะนี้ จะมีสภาพขั้วใกล้เคียงกับสารละลายอินทรีย์อื่นๆ ซึ่งทำให้สามารถสกัดสารกลุ่ม Anthraquinones ได้ดีมากกว่าน้ำที่สภาวะปกติ



รูปที่ 1 Dielectric Constant ของน้ำกลั่นที่อุณหภูมิต่างๆ

จากรูปที่ 1 จะพบว่าเมื่อน้ำกลั่นมีอุณหภูมิสูงขึ้น ค่า Dielectric Constant จะลดลง ซึ่งเมื่ออุณหภูมิสูงมากพอ คือ ประมาณ 205°C ค่า Dielectric Constant ของน้ำกลั่น ณ สภาวะนั้น จะมีค่าใกล้เคียงกับค่า Dielectric Constant ของเอทานอลที่อุณหภูมิห้อง

2.2 ต้นยอ (Morinda Citrifolia)

ต้นยอเป็นพืชยืนต้นที่อยู่ในวงศ์ Rubiaceae ที่พบมากในเขตร้อนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เมื่อเติบโตเต็มที่ คืออายุประมาณ 3 ปี (รูปที่ 2ก) สามารถให้ผลได้ตลอดปี ส่วนประกอบต่างๆ ของต้นยอสามารถนำมาใช้ในทางการแพทย์ ตารางที่ 1 แสดงสารอินทรีย์ที่พบในส่วนประกอบต่างๆ ของต้นยอ โดยในโครงการนี้จะศึกษาการสกัดสาร Anthraquinones จากส่วนรากของต้นยอ (รูปที่ 2 ข) เนื่องจากที่ส่วนนี้มีปริมาณสาร Anthraquinones อยู่เป็นปริมาณมาก

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบต่างๆ ของต้นยอและสารอินทรีย์ที่พบ ¹⁴

ส่วนของต้นยอ	สารอินทรีย์ที่พบ
ใบ	Anthraquinones , Ursolic Acid
ราก	Alizarin, Molindone, Lucidin, Anthraquinones
ลำต้น	Alizarin, Molindone
ผล	Asperuloside, Caprylic Acid



ก)

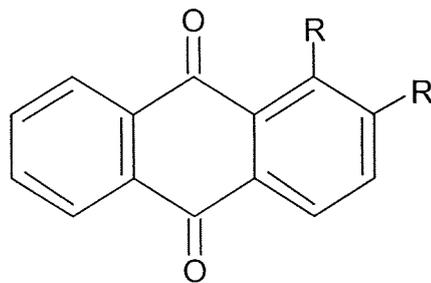


ข)

รูปที่ 2 ก) ต้นยอ ข) รากของต้นยอแห้ง

2.3 สารกลุ่ม Anthraquinones

สูตรโครงสร้าง



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม Anthraquinones

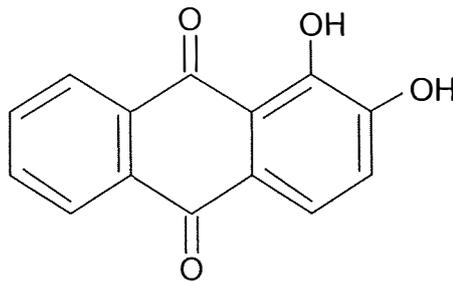
สารกลุ่ม Anthraquinones จะมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 3 โดย R ทั้งสองตำแหน่งในรูปจะแทนหมู่ฟังก์ชันชนิดต่างๆ ที่มาเกาะกับวงแหวนอะโรแมติก ตัวอย่างเช่น ถ้าไม่มี R ทั้งสองตำแหน่งจะมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า 9,10-Anthracenedione ถ้าไม่มี R ทั้งสองตำแหน่งแล้วมี Na^+ มาเกาะที่ตำแหน่ง O ทั้งสองตำแหน่งจะมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Disodium 1,4-dihydroanthrahydroquinone ถ้ามีหมู่เมทิล (CH_3 -) มาเกาะที่ตำแหน่ง R ตำแหน่งแรก จะมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า 2-Methyl-9,10-anthraquinone ส่วนถ้ามีหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) มาเกาะที่ตำแหน่ง R ทั้งสองตำแหน่ง จะมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Alizarin ซึ่งเป็นตัวแทนของสารกลุ่ม Anthraquinones ในโครงงานนี้ และจะอธิบายรายละเอียดอีกครั้งในส่วนถัดไป

คุณสมบัติต่างๆ

สารกลุ่ม Anthraquinones จะมีสีเหลือง พบมากในส่วนของลำต้นและรากของต้นยอ สารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติทางการแพทย์ที่สำคัญ คือ เป็นสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส จึงสามารถนำไปใช้เป็นยารักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย เช่น ไข้หวัด อากาศติดเชื้อที่ผิวหนัง และสารประกอบชนิดหนึ่งในกลุ่ม Anthraquinone นี้สามารถระงับเชื้อไวรัสโรคเอดส์(HIV) ได้ นอกจากนี้สารกลุ่ม Anthraquinones ยังมีฤทธิ์แก้ปวดและกล่อมประสาท จึงสามารถใช้เป็นยาแก้ปวดได้อีกด้วย และได้มีผู้ศึกษาพบว่า สารในสารกลุ่ม Anthraquinones ชนิดหนึ่งในรากของต้นยอ ซึ่งมีชื่อเรียกว่า Damnacanthal มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งในอวัยวะต่างๆ เช่น มะเร็งในปอด ลำไส้ ตับอ่อน และเม็ดเลือดขาว

2.4 สาร Alizarin (1,2-Dihydroxyanthraquinones)

สูตรโครงสร้าง



รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของสาร Alizarin

สารที่เข้าแทนสารกลุ่ม Anthraquinones ในโครงการนี้ ก็คือ สาร Alizarin ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 4 โดยหมู่ฟังก์ชันที่มาเกาะกับวงแหวนอะโรแมติกจะเป็น หมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) ทั้งสองตำแหน่ง

คุณสมบัติต่างๆ ¹⁵

ชื่ออื่นๆ : 1,2-Dihydroxy-9,10-anthraquinone
1,2-Dihydroxyanthraquinone

สูตรอย่างง่าย : $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_4$

มวลโมเลกุล : 240.20 ประกอบด้วย : C=70.00% H=3.36% O=26.64% (โดยมวล)

พืชที่สามารถพบ : Madder Plant = Rubia Tiinctorum L., Rubiaceae;
Krappwurzel

จุดระเหิด : 100°C ที่ 2 mmHg

จุดหลอมเหลว : 290°C

จุดเดือด : 430°C

ความสามารถในการละลาย

- น้ำ $2.1 \times 10^{-6}\text{ M}$ ที่ 18°C

$2.5 \times 10^{-6}\text{ M}$ ที่ 25°C

ละลายได้ 300 ส่วนในน้ำร้อน

- สารอื่นๆ ความสามารถที่จะละลายได้ดี : Methanol, Ether ที่ 25°C

ความสามารถที่จะละลายได้ : Benzene, Toluene, Xylene, Pyridine,

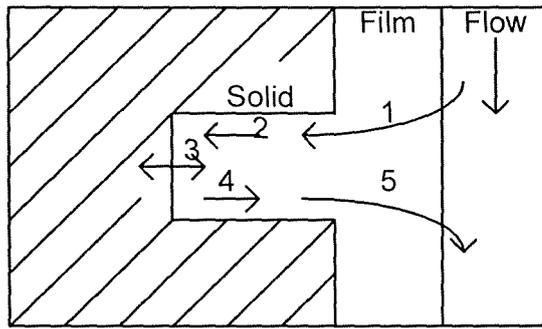
Carbondisulfide , Glacial Acetic Acid

2.5 ทฤษฎีการถ่ายเทมวลสาร (Mass Transfer) ในการสกัด

ในการสกัดสารแบบใช้ตัวทำละลายอินทรีย์จากส่วนของพืช โดยทั่วไปจะมีขั้นตอนกลไกในการสกัดที่เกี่ยวข้องมากมายหลายขั้นตอน ซึ่งอาจแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดสารอินทรีย์ที่ต้องการจะสกัดและชนิดของสารชีวภาพ ที่มีสารนั้นอยู่ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 5 ขั้นตอนดังนี้

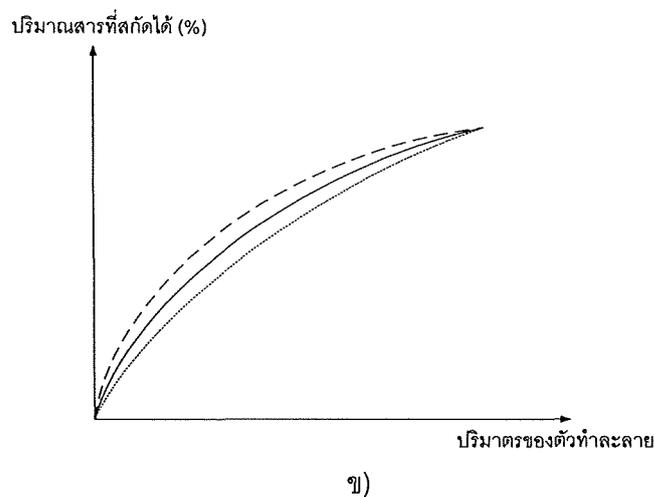
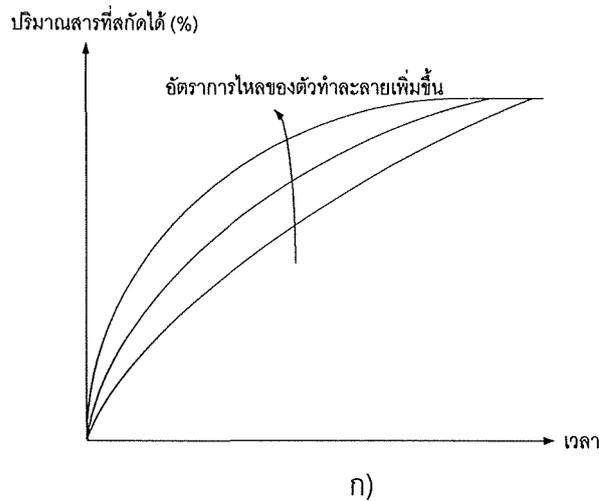
1. การแพร่ของตัวทำละลายจากชั้นของของไหลผ่านชั้นฟิล์มเข้าสู่ผิวหน้าของสารชีวภาพ
2. การที่ตัวทำละลายแพร่เข้าไปในรูพรุนของมวลชีวภาพซึ่งมีสารที่ต้องการสกัดอยู่ภายใน
3. สารที่ต้องการสกัดมีการกระจายตัวเข้าสู่ตัวทำละลายอินทรีย์ (Distribution) ซึ่งอาจเกิดได้เป็น 2 กรณี คือ
4. ตัวทำละลายที่มีสารที่ต้องการสกัดละลายอยู่แพร่ออกจากรูพรุนของสารชีวภาพ
5. การแพร่ของตัวทำละลายที่มีสารที่ต้องการสกัดละลายอยู่จากผิวหน้าของสารชีวภาพ ผ่านชั้น ฟิล์มเข้าชั้นของของไหล

โดยสามารถอธิบายเป็นแผนภาพได้ดังนี้



รูปที่ 5 กลไกการถ่ายเทมวลของสารที่เกิดขึ้นในการสกัด

ซึ่งในขั้นตอนที่กล่าวมาแล้วทั้ง 5 ขั้นตอนนี้ แต่ละขั้นตอนจะมีความต้านทานการเคลื่อนที่ของสารต่างกัน โดยที่ความต้านทานการเคลื่อนที่รวมของทั้งระบบ จะมีค่าเท่ากับค่าผลรวมความต้านทานการเคลื่อนที่ ของขั้นตอนย่อยทั้ง 5 ขั้นตอน ซึ่งการหาค่าความต้านทานของแต่ละขั้นตอนเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก ดังนั้นเพื่อการศึกษาได้ง่ายขึ้น จึงอาจเป็นไปได้ที่จะทำการพิจารณาเฉพาะบางขั้นตอนที่มีค่าความต้านทานสูงเท่านั้น ในสภาวะที่ไม่มีกรไหลของตัวทำละลายผ่านมวลชีวภาพหรือสภาวะที่มีการไหลผ่านอย่างช้าๆ จะทำให้ชั้นฟิล์มบริเวณผิวของมวลชีวภาพมีความหนามาก ซึ่งจะทำให้ค่าความต้านทานการแพร่ผ่านชั้นฟิล์มมีค่าสูง ทำให้ขั้นตอนการแพร่ของตัวทำละลายผ่านชั้นฟิล์มนี้ (ขั้นตอนที่ 1 และ 5) เป็นขั้นตอนที่กำหนดความสามารถในการสกัดสาร แต่หากเปลี่ยนสภาวะในการสกัดสารโดยให้ตัวทำละลายมีการไหลผ่านมวลชีวภาพอย่างรวดเร็ว จะทำให้ชั้นฟิล์มมีความหนาน้อยลง ค่าความต้านทานการแพร่ผ่านชั้นฟิล์มจะมีค่าต่ำลง จึงทำให้ขั้นตอนนี้ไม่ใช่ขั้นตอนที่กำหนดความสามารถในการสกัดสาร ดังนั้นเมื่อพิจารณาการสกัดสารที่ตัวทำละลายไหลผ่านชั้นฟิล์มอย่างรวดเร็ว จะเหลือขั้นตอนที่กำหนดความสามารถในการสกัดสารเพียง 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งถ้าการสกัดสารถูกจำกัดด้วยค่าความสามารถในการกระจายตัวของสารที่ต้องการสกัดลงในตัวทำละลาย (Solute-Solvent Partition Limited) ขั้นตอนที่กำหนดความสามารถในการสกัดสาร จะเป็นขั้นตอนที่ 3 แต่ถ้าการสกัดสารถูกจำกัดด้วยความสามารถการแพร่ของตัวทำละลายผ่านรูพรุนของสารชีวภาพ (Diffusion Limited) ขั้นตอนที่กำหนดความสามารถในการสกัดสาร จะเป็นขั้นตอนที่ 2 และ 4 การพิจารณาว่าขั้นตอนการกระจายตัวของสารที่ต้องการสกัดลงในตัวทำละลายหรือขั้นตอนการแพร่ของตัวทำละลายผ่านรูพรุนของสารชีวภาพเป็นขั้นตอนที่กำหนดความสามารถในการสกัดสารสามารถพิจารณาได้จากกราฟของเปอร์เซ็นต์ของสารที่สกัดได้เทียบกับเวลา และเปอร์เซ็นต์ของสารที่สกัดได้เทียบกับปริมาตร เทียบกับเวลาดังต่อไปนี้

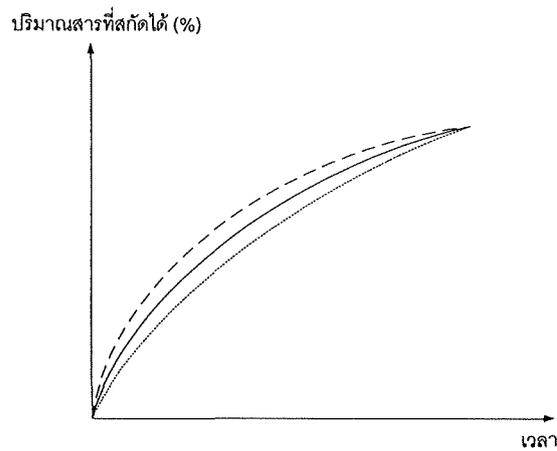


รูปที่ 6 ปริมาณสารที่สกัดได้เมื่อเพิ่มอัตราการใช้ของตัวทำละลายในกรณีที่ความสามารถในการละลายของสารที่ต้องการสกัดในตัวทำละลายถูกจำกัด ก) ปริมาณสารที่สกัดได้เทียบกับเวลา ข) ปริมาณสารที่สกัดได้เทียบกับปริมาตร

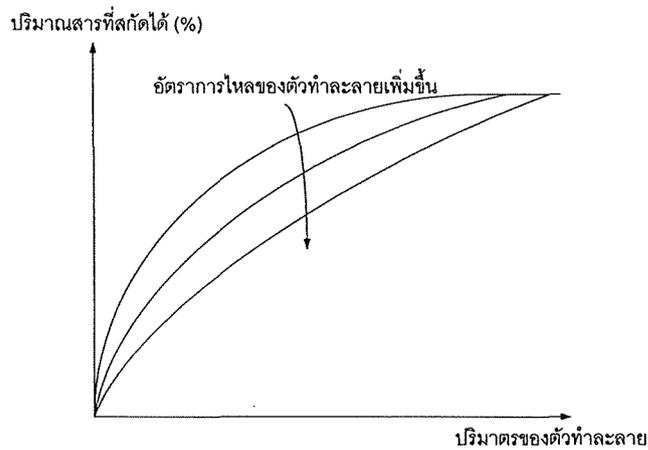
ขั้นตอนที่ 3 เป็นขั้นตอนควบคุมอัตราการใช้

เมื่อความสามารถในการกระจายตัวของสารที่ต้องการสกัดในตัวทำละลายเป็นสิ่งจำกัดอัตราการใช้ นั่นหมายความว่า เราจะสามารถสกัดสารที่ต้องการได้ปริมาณมากขึ้น เมื่อเพิ่มอัตราการใช้ของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด การเพิ่มอัตราการใช้ของตัวทำละลาย เท่ากับเป็นการเพิ่มปริมาตรของตัวทำละลายที่ผ่านเข้าสู่รูพรุนของมวลชีวภาพที่เวลาเดียวกัน ดังนั้นกราฟของปริมาณสารที่สกัดได้เทียบกับเวลาจะเป็นไปตามรูปที่ 6ก แต่เมื่อพิจารณาปริมาณของสารที่สกัดได้เทียบกับปริมาตรของตัวทำละลายที่ผ่านรูพรุนเท่านั้น จะต้องไม่ต่างกันไม่ว่าการสกัดจะดำเนินการที่อัตราการใช้ของตัวทำละลายต่างกัน ดังนั้นกราฟของปริมาณสารที่สกัดได้เทียบกับปริมาตรของตัวทำละลายจะเป็นไปตามรูปที่ 6ข ดังนั้นจะสรุปว่าขั้นตอนควบคุมอัตราการใช้จะเป็น

ขั้นตอนที่ 3



ก)



ข)

รูปที่ 7 ปริมาณสารที่สกัดได้เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของตัวทำละลายในกรณีที่มีความสามารถในการแพร่ของตัวทำละลายผ่านรูพรุนของสารชีวภาพถูกจำกัด ก) ปริมาณสารที่สกัดได้เทียบกับเวลา ข) ปริมาณสารที่สกัดได้เทียบกับปริมาตร

ขั้นตอนการแพร่เป็นขั้นตอนควบคุมการสกัด

เมื่อความสามารถในการแพร่ของตัวทำละลายผ่านรูพรุนของสารชีวภาพเป็นสิ่งจำกัด อัตราการสกัด แม้ว่าการเพิ่มอัตราการไหลของตัวทำละลาย จะทำให้ปริมาณของตัวทำละลายทั้งหมดที่ใช้ผ่าน Extractor มากขึ้นที่เวลาเดียวกัน แต่มีปริมาณของตัวทำละลายบางส่วนไม่สามารถแพร่ผ่านเข้าไปในรูพรุนของมวลชีวภาพ และบางส่วนของสารที่ต้องการสกัดที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายที่อยู่ภายในรูพรุน จะไม่สามารถแพร่ออกจากรูพรุนของมวลชีวภาพได้ ทำให้ปริมาณสารที่สกัดได้เมื่อใช้อัตราการไหลของตัวทำละลายต่างกันจะมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นกราฟของปริมาณสารที่สกัดได้เทียบกับเวลาจะเป็นไปตามรูปที่ 7ก ส่วนเมื่อพิจารณาปริมาณของสารที่

สกัดได้เทียบกับปริมาณที่เท่ากันของตัวทำละลายที่ผ่าน Extractor อัตราการไหลของตัวทำละลายที่สูงขึ้น จะทำให้ตัวทำละลายมีเวลาอยู่ใน Extractor น้อยลง ทำให้ปริมาณสารที่สกัดได้น้อยลง ดังนั้นกราฟของปริมาณสารที่สกัดได้เทียบกับปริมาตรของตัวทำละลายจะเป็นไปตามรูปที่ 7ข ดังนั้นจึงสรุปว่าขั้นตอนการแพร่เป็นขั้นตอนควบคุมการสกัด

3. วิธีทำการวิจัย

3.1 การเตรียมรากของต้นยอ

รากของต้นยอที่ใช้ในการทดลองเตรียมโดยการนำส่วนรากของต้นยอมาล้างดินที่ติดมาออกให้หมด

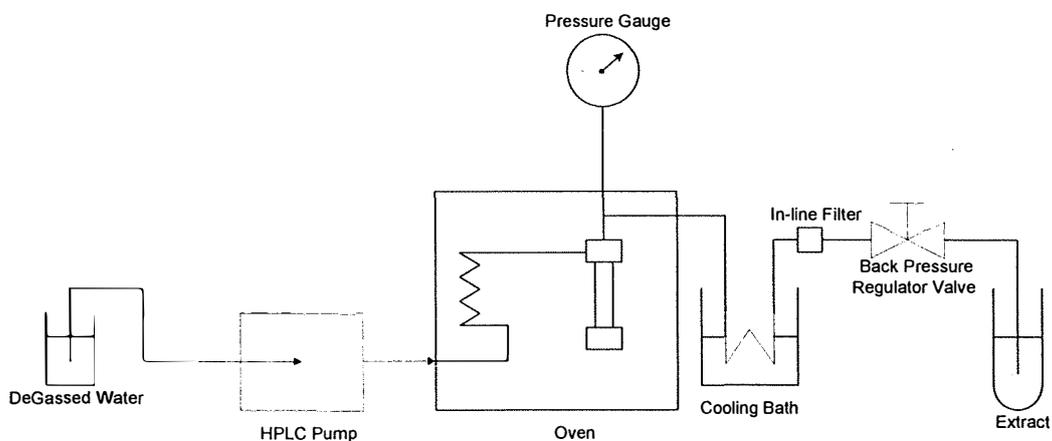
จากนั้นแยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นรากฝอย มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสาร และนำไปอบให้แห้งด้วยเตาอบที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสจนแห้ง รากแห้งที่เตรียมถูกเก็บในภาชนะที่ปราศจากความชื้น เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การสกัดสาร Alizarin จากรากของต้นยอโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์

รากจะถูกนำมาสกัดด้วยเอทานอล เพื่อใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับการสกัดสารแอนทราควิโนนส์

ด้วยน้ำกึ่งวิกฤต โดยนำรากของต้นยอ ปริมาณ 0.25 g (250 mg) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ พร้อมทั้งเติมเอทานอล ปริมาตร 40 ml ลงไป ปล่อยให้ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเปลี่ยนเอทานอลใหม่ โดยนำเอทานอลที่สกัดสารอินทรีย์มารอง เพื่อแยกส่วนที่เป็นรากของต้นยอออก แล้วนำรากของต้นยอที่กรองได้ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขวดใหม่ เติมเอทานอลปริมาตร 40 ml ลงไป ปล่อยให้ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 วัน แล้วทำซ้ำอีกครั้ง และนำเอทานอลที่ใช้ในการสกัดทั้ง 3 วันมารวมกันเพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดทั้งหมด

3.3 การสกัดสาร Alizarin จากรากของต้นยอด้วยน้ำกึ่งวิกฤต



รูปที่ 8 แผนผังการจัดวางอุปกรณ์เพื่อสกัดสาร Alizarin จากรากต้นยอด้วยน้ำกึ่งวิกฤต

การสกัดสาร Alizarin จากรากของต้นยอด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ทำได้โดยจะจัดวางอุปกรณ์ดังรูปที่ 8 เริ่มต้นสำหรับอุปกรณ์การสกัดด้วยน้ำร้อนที่ความดันสูงนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 8 โดยอุปกรณ์นี้จะประกอบไปด้วย บีม HPLC สองตัว อุปกรณ์สกัด (Extraction vessel) ตู้อบ และอุปกรณ์ควบคุมความดัน โดยอุปกรณ์แต่ละชิ้น ต่อกันด้วยท่อสแตนเลส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 1/16 นิ้ว การสกัดเริ่มจากการป้อนน้ำกลั่นเข้าสู่ระบบท่อด้วยบีมตัวแรก เมื่อน้ำกลั่นเข้ามาอยู่ในระบบท่อแล้ว เตาอบจะใช้ทำหน้าที่เพิ่มอุณหภูมิให้กับระบบท่อ โดยการขาดของระบบท่อจะทำให้มีน้ำกลั่นมีเวลาอยู่ในเตาอบนานขึ้น ก่อนที่น้ำกลั่นจะเข้าสู่อุปกรณ์สกัด เพื่อให้อุณหภูมิของน้ำกลั่นที่เข้าสู่อุปกรณ์สกัด มีค่าเท่ากับอุณหภูมิของเตาอบ หลังจากนั้น น้ำกลั่นก็จะทำการสกัดสารแอนทราควิโนนส์ ออกจากรากของต้นยอ โดยเมื่อออกจากเตาอบแล้ว สารตัวอย่างที่สกัดได้ จะถูกทำให้เย็นตัวลง จากนั้นสารที่สกัดได้จะผ่านอุปกรณ์ควบคุมความดัน (Back Pressure Regulator) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ปรับความดันภายในระบบท่อทั้งหมด หลังจากนั้นก็เก็บสารตัวอย่างที่ได้ลงในขวดเก็บสารเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

โดยการศึกษานี้จะพิจารณาผลจากปัจจัยต่างๆ เช่น ผลของ อุณหภูมิ ความดัน และอัตราการไหลของน้ำโดยมีช่วงการทดลองสรุปดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง

ตัวแปร	ค่าที่เลือกใช้ในการทดลอง
อุณหภูมิ	110, 170, 220 °C
ความดัน	30 , 70 บาร์
อัตราการไหล	2 , 4 , 6 มิลลิลิตรต่อนาที

หมายเหตุ ทุกการทดลองจะใช้รากของต้นยอปริมาณ 1 กรัม

3.4 การหาความสามารถในการละลาย (Solubility) ของสารแอนทราควิโนนส์ในน้ำกึ่งวิกฤต

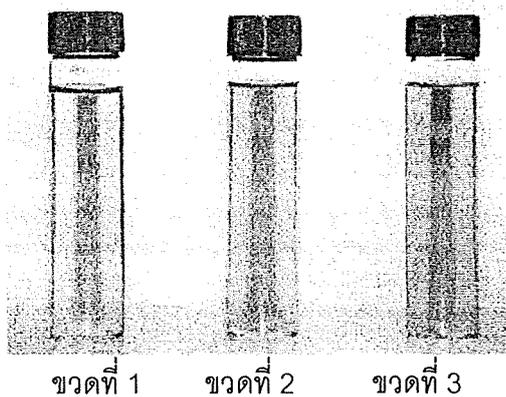
นอกจากการทดลองสกัดสาร Alizarin จากรากของต้นยอด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ที่สภาวะต่างๆ แล้ว ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความสามารถในการละลาย จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการอธิบายผลของการสกัด อีกทั้งยังสามารถที่จะคาดคะเนกลไกการสกัดสารได้อีกด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการหาความสามารถในการละลายของสารแอนทราควิโนนส์ในน้ำกึ่งวิกฤต การหาความสามารถในการละลายของสารแอนทราควิโนนส์ในน้ำกึ่งวิกฤต ทำได้โดยจัดวางอุปกรณ์เหมือนกันกับการสกัด¹⁶ ส่วนที่ต่างกัน ก็คือ สารที่บรรจุในอุปกรณ์สกัดจะเป็นสาร ออลิซาริน (Alizarin) ซึ่ง

เป็นตัวแทนของกลุ่มสารแอนทราควิโนนส์ที่ใช้ในการศึกษานี้ แทนการใส่รากของต้นยอ และ
จะต้องมีการผสมเม็ดแก้วลงไปด้วยเพื่อป้องกันไม่ให้สารอาลิซารินจับตัวกันเป็นก้อน

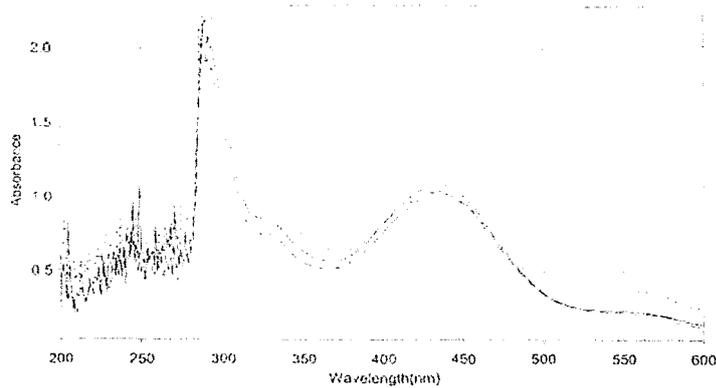
4. ผลของการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการทดลองขั้นต้น

โดยปกติแล้วสาร Anthraquinones จะมีสีเหลือง ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากรูปที่ 9 เมื่อสังเกตการสกัดด้วยน้ำกลั่นที่สภาวะปกติ (ขวดที่ 1) สารตัวอย่างที่สกัดได้ จะมีสีค่อนข้างใส จึงน่าจะมีปริมาณสารแอนทราควิโนนส์น้อยที่สุด ส่วนเมื่อสังเกตการสกัดด้วยเอทานอล (ขวดที่ 3) ที่สภาวะปกติ จะพบว่าสารตัวอย่างที่สกัดได้ มีสีเหลืองเข้ม จึงน่าจะมีปริมาณสารแอนทราควิโนนส์มากที่สุด และเมื่อสังเกตสารตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยน้ำกึ่งวิกฤต จะพบว่า มีสีเหลืองเกือบเข้ม จึงน่าจะมีปริมาณสารแอนทราควิโนนส์อยู่พอสมควร แสดงให้เห็นว่าน้ำกึ่งวิกฤตสามารถสกัดสารแอนทราควิโนนส์จากรากของต้นยอได้



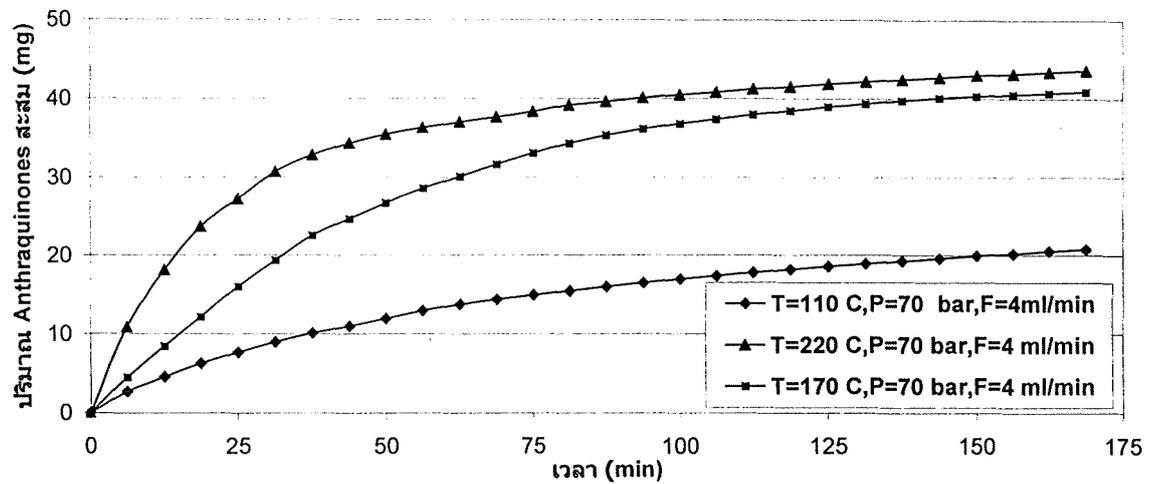
รูปที่ 9 สารตัวอย่างที่สกัดได้จากรากของต้นยอด้วยวิธีต่างๆ
ขวดที่ 1 ใช้ น้ำกลั่น ในการสกัดที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ
ขวดที่ 2 สกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ที่อุณหภูมิ 170 °C และความดัน 70 bar
ขวดที่ 3 ใช้เอทานอลในการสกัดที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ



รูปที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของสาร Anthraquinones โดยเปรียบเทียบระหว่างสาร Anthraquinones ก่อนอบ (เส้นทึบ) กับหลังอบที่อุณหภูมิ 110 ° C (เส้นประ) และ 220 ° C (จุด) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

แต่เนื่องจากการสกัดสารด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ต้องดำเนินการที่อุณหภูมิสูง ซึ่งอาจจะทำให้สารแอนทราควิโนนส์ เกิดการสลายตัว (Decomposition) ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบเบื้องต้น โดยการนำสารแอนทราควิโนนส์มาตรฐานมาผ่านการอบที่อุณหภูมิของการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต คือ อุณหภูมิ 110 °C และ 220 ° เพื่อตรวจสอบการสลายตัวของสารแอนทราควิโนนส์ที่อาจเกิดขึ้น ซึ่งจากรูปที่ 10 จะพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสาร แอนทราควิโนนส์ก่อนอบ (เส้นทึบ) และหลังอบที่อุณหภูมิ 110 ° C (เส้นประ) และ 220 ° C (จุด) จะมีลักษณะรูปภาพที่เหมือนกัน ซึ่งแสดงได้อย่างคร่าวๆว่าสารแอนทราควิโนนส์อาจไม่เกิดการสลายตัว (Decomposition) ในช่วงอุณหภูมิที่ดำเนินการทดลองสกัดสารอินทรีย์จากรากของต้นยอ โดยใช้ น้ำกึ่งวิกฤต (110° C - 220° C) อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการทดสอบการสลายตัวอย่างละเอียด โดยดูจากผลของ HPLC spectra และคุณสมบัติทางชีววิทยาของสารสกัดต่อไป

4.2 ผลของอุณหภูมิ



รูปที่ 11 กราฟแสดงปริมาณสาร Anthraquinones ที่สกัดได้จากรากของต้นยอเทียบกับเวลา ที่อุณหภูมิ 110 °C 170 °C และ 220 °C เมื่อใช้อัตราการไหลคงที่ 4 ml/min และความดันคงที่ 70 bar

จากรูปที่ 11 แสดงปริมาณสารแอนทราควิโนนส์ที่สกัดได้จากรากของต้นยอเทียบกับเวลาเมื่อใช้อัตราการไหลคงที่ 4 มิลลิลิตรต่อนาที และความดันคงที่ 70 บาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ กันที่ 110 °C 170 °C และ 220 °C โดยเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสูงขึ้น จะทำให้ปริมาณสารแอนทราควิโนนส์ที่สกัดได้ทั้งหมดเมื่อระบบเข้าสู่สภาวะคงตัว (Yield) มีค่ามากขึ้น เหตุผลเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลทำให้สภาพของน้ำกลั่นมีค่าความเป็นขั้วลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับสารแอนทราควิโนนส์ และความสามารถในการละลายของสารแอนทราควิโนนส์ในน้ำมีค่าสูงขึ้น

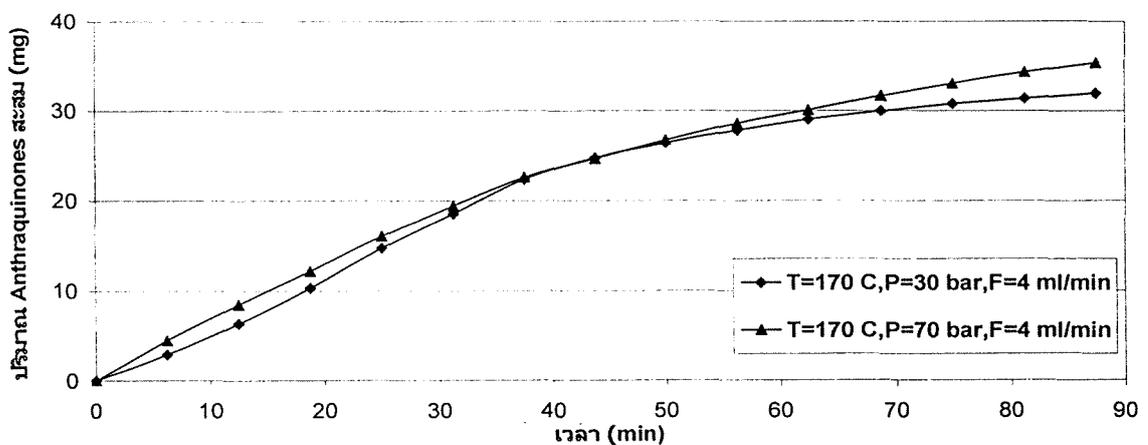
จากรูปที่ 11 ปริมาณสาร Alizarin ที่สกัดได้ทั้งหมดเมื่อใช้ปริมาณรากของต้นยอ 1 กรัม แสดงได้ดังตารางที่ 3 โดยปริมาณสาร Alizarin ที่สกัดได้ทั้งหมดเป็นเปอร์เซ็นต์ จะเทียบกับปริมาณสาร Alizarin ที่สกัดได้ทั้งหมด เมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ มีค่าเท่ากับ 44.6 มิลลิกรัม เมื่อใช้ปริมาณรากของต้น 1 กรัม

ตารางที่ 3 ตารางแสดงปริมาณสาร Alizarin ที่สกัดได้ทั้งหมดด้วยวิธี Subcritical Water เป็น มิลลิกรัมและเปอร์เซ็นต์ เทียบกับการสกัดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์

อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณสาร Anthraquinones ที่สกัดได้ทั้งหมด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร Anthraquinones ที่สกัดได้ทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)
110	20.8	46.6
170	41.1	92.8
220	43.6	98.8

เมื่อพิจารณาจากตารางที่ 3 จะพบว่าปริมาณสารที่สกัดทั้งหมด เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 170 °C และ 220 °C จะเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่าจากเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 110 °C และเมื่อพิจารณาการสกัดที่ อุณหภูมิ 220 °C น้ำสามารถสกัดสารได้เกือบทั้งหมดที่มีอยู่ในรากยอภายในเวลาเพียง 3 ชั่วโมง เทียบกับการสกัดโดยการแช่รากในเอทานอลซึ่งใช้เวลาในการสกัดถึง 3 วัน

4.3 ผลของความดัน



รูปที่ 12 กราฟแสดงปริมาณสาร Anthraquinones ที่สกัดได้จากรากของต้นยอ เทียบกับเวลาที่ ความดัน 30 bar และ 70 bar เมื่อใช้อัตราการไหลคงที่ 4 ml/min และอุณหภูมิคงที่ 170 °C

จากรูปที่ 12 จะพบว่า เมื่อความดันที่ใช้ในการสกัดเปลี่ยนไป การสกัดสารแอนทราควิโนนส์จากรากของต้นยอ จะมีค่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เหตุผลเนื่องจาก ความดันที่เปลี่ยนแปลงไปไม่ส่งผลต่อสภาพขั้วของสารของน้ำกึ่งวิกฤต ในช่วงอุณหภูมิที่ศึกษา ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความดันมี

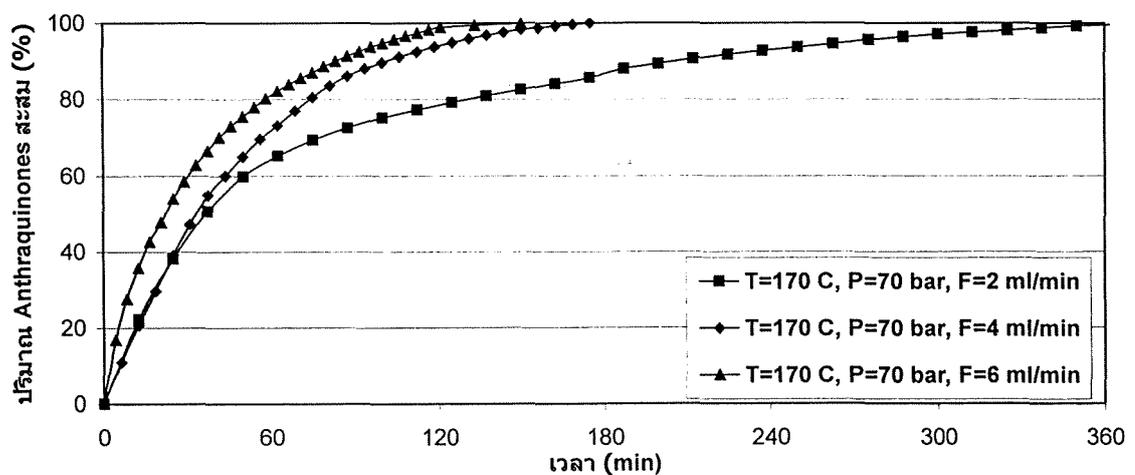
ผลกระทบต่อสารสกัดน้อยมาก ทำให้การสกัดสารแอนทราควิโนนส์ จากรากของต้นยอด้วยน้ำกึ่ง
วิกฤต ดำเนินการที่ความดันใดก็ได้ที่ยังทำให้น้ำกลับ ยังคงอยู่ในสถานะของเหลว

4.4 ผลของอัตราการไหลต่อการสกัด

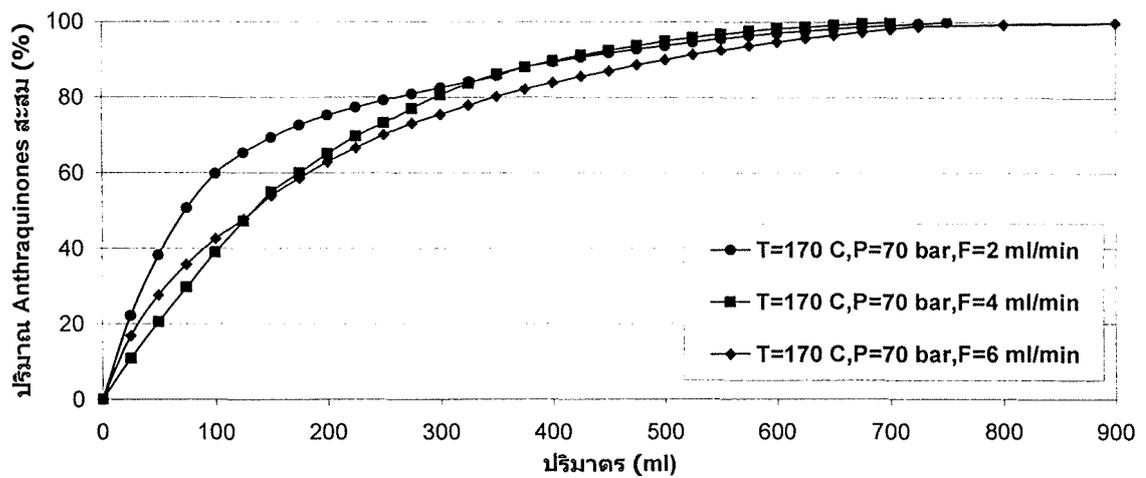
โดยทั่วไปแล้ว การศึกษาผลจากกราฟของปริมาณของสารแอนทราควิโนนส์ สะสม (%) ที่
สกัดได้เทียบกับเวลา และที่เทียบกับปริมาตรของตัวทำละลาย ที่อัตราการไหลของตัวทำละลาย
ต่างๆ อาจคาดคะเนถึงกลไกของการถ่ายเทมวลของสารในการสกัด ซึ่งโดยปกติแล้ว ขั้นตอนการ
ถ่ายเทมวลสารจะมีอยู่สามขั้นตอนหลักๆ คือ

1. การแพร่ของตัวทำละลายผ่านชั้นฟิล์มที่อยู่รอบๆผิวของมวลชีวภาพ
2. การแพร่ของตัวทำละลายผ่านรูพรุนของมวลชีวภาพ
3. การกระจายตัวของสารที่ต้องการสกัดเข้าสู่ตัวทำละลาย

ซึ่งโดยทั่วไป ความต้านทานต่อการแพร่ในขั้นตอนแรกจะมีค่าน้อยมาก และไม่ถือว่าเป็น
ขั้นตอนที่ควบคุมอัตราการสกัด ถ้าการสกัดถูกควบคุมด้วยขั้นตอนที่สอง จะได้ว่าอัตราการสกัด
สารไม่ขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของตัวทำละลาย แต่เมื่อเทียบปริมาณสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่
มีปริมาตรเท่ากัน การสกัดด้วยอัตราการไหลที่ต่ำกว่าจะได้สารสกัดปริมาณมากกว่า ในทาง
กลับกัน ถ้าการสกัดถูกควบคุมด้วยขั้นตอนที่สาม อัตราการสกัดจะแปรผันตามอัตราการไหลของ
ตัวทำละลาย แต่เมื่อเทียบปริมาณสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีปริมาตรเท่ากันจะได้
ปริมาณเท่ากัน



(ก)

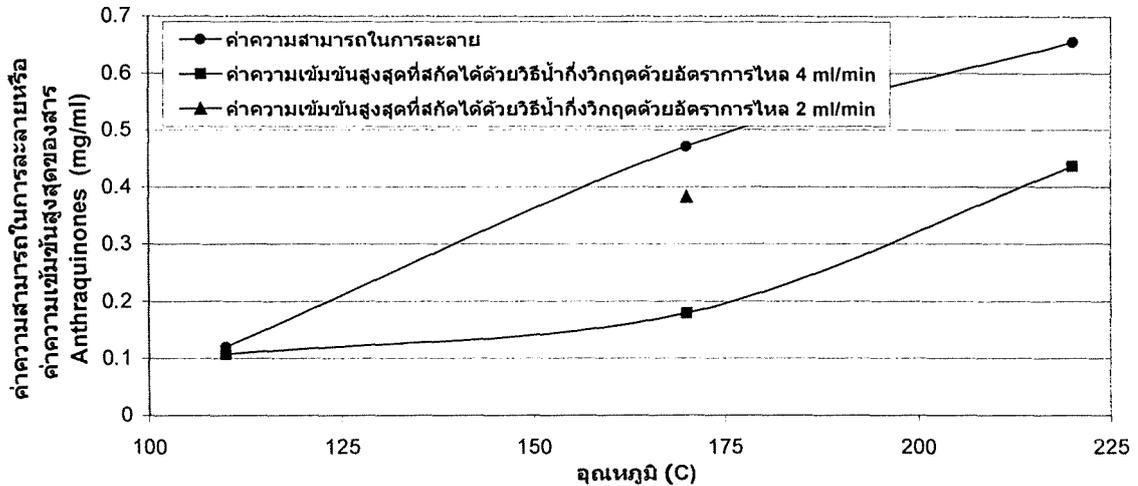


(ข)

รูปที่ 13 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์สาร Anthraquinones ที่สกัดได้ (ก) เทียบกับเวลา ที่อัตราการไหล 2 ml/min 4 ml/min และ 6 ml/min เมื่อใช้อุณหภูมิคงที่ 170 °C และความดันคงที่ 70 bar (ข) เทียบกับ ปริมาตรของตัวทำละลาย ที่อัตราการไหล 2 ml/min 4 ml/min และ 6 ml/min เมื่อใช้อุณหภูมิคงที่ 170 °C และความดันคงที่ 70 bar

จากรูปที่ 13ก จะเห็นว่าปริมาณสารที่สกัดได้มีค่ามากขึ้นเมื่ออัตราการไหลของตัวทำละลายมากขึ้น และเมื่อพิจารณาปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยปริมาตรตัวทำละลายที่เท่ากัน ดังแสดงในรูปที่ 6ข แนวโน้มโดยทั่วไป จะพบว่าปริมาณสารที่สกัดได้จะมีค่ามากขึ้นเมื่อใช้อัตราการไหลของตัวทำละลายต่ำลง ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ขั้นตอนที่สอง หรือขั้นตอนการแพร่ผ่านรูพรุนของมวลชีวภาพมีส่วนในการจำกัดอัตราการสกัด อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถสรุปจากผลการทดลองได้ว่า ขั้นตอนที่สองหรือขั้นตอนที่สามเป็นขั้นตอนควบคุมอัตราการสกัด ทั้งนี้เนื่องจากการถ่ายเทมวลสารในมวลชีวภาพมีความซับซ้อน จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

4.5 ผลของความสามารถในการละลายของสารแอนทราควิโนนส์



รูปที่ 14 ความสามารถในการละลายของสารแอนทราควิโนนส์ ในน้ำกึ่งวิกฤต เทียบกับ ปริมาณสารแอนทราควิโนนส์ ที่สกัดได้ด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (อัตราการไหลคงที่ 4 มิลลิลิตรต่อนาที และความดันคงที่ 70 บาร์) ที่อุณหภูมิ 110°C , 170°C และ 220°C

จากรูปที่ 14 เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จะพบว่าที่สภาวะกึ่งวิกฤต สารแอนทราควิโนนส์ มีความสามารถในการละลายในน้ำได้ดีกว่าที่สภาวะปกติมาก และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นสูงสุดของสารแอนทราควิโนนส์ ที่สกัดได้ด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อัตราการไหล 4 ml/min กับค่าความสามารถในการละลายของสาร Alizarin ในน้ำกึ่งวิกฤต จะพบว่าที่อุณหภูมิ 110 °C จะมีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากที่อุณหภูมิที่ 110 °C ค่าความสามารถในการละลายมีค่าน้อย จึงเป็นค่าที่ควบคุมความเข้มข้นสูงสุดของสารแอนทราควิโนนส์ ที่สกัดได้ ที่อุณหภูมิ 170 °C และ 220 °C ความเข้มข้นสูงสุดของสารแอนทราควิโนนส์ มีค่าน้อยกว่าค่าความสามารถในการละลายที่อุณหภูมินั้นมาก แสดงว่า ณ อุณหภูมินี้ การสกัดไม่ถูกควบคุมโดยความสามารถในการละลาย แต่ถูกควบคุมโดยการแพร่ สำหรับความเข้มข้นสูงสุดของสารแอนทราควิโนนส์ ที่สกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิ 170 °C ที่อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที (แสดงโดยจุดสามเหลี่ยมในรูปที่ 14) จะพบว่า เข้าใกล้ค่าความสามารถในการละลายของสารที่อุณหภูมินี้ แสดงว่า ณ อุณหภูมินี้ อัตราการไหลของตัวทำละลายที่เปลี่ยนไป ส่งผลต่อความสามารถในการสกัดสารแอนทราควิโนนส์ ซึ่งสนับสนุนผลการทดลองข้างต้นว่า การแพร่ของสารผ่านรูพรุนของมวลชีวภาพ เป็นขั้นตอนควบคุมการสกัด

6. เอกสารอ้างอิง

1. Atkinson N. 1956. Antibacterial substances from flowering plants. 3. Antibacterial activity of dried Australian plants by a rapid direct plate test. *Australian J Exper Biol.* 34: 17-26.
2. Umezawa K. Isolation of 1-methoxy-2-formyl-3-hydroxy-anthraquinone from *M. citrifolia* and neoplasm inhibitors containing the same. *Japan Kokai Tokyo Koho JP 06 87, 736 (94-87, 736) Appl 1992; 92/264, 311 07.*
3. Wang M.Y., West B. J., Jensen C. J., Nowicki D., Su C., Palu A. K., Anderson, G. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol. Sin.* 23: 1127-1141.
4. Hiramatsu T., Imoto M., Koyano, T., Umezawa K. 1993 Induction of normal phenotypes in ras-transfected cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*. *Cancer. Lett.* 73: 161-6.
5. King M. B. and Bott T. R. In: *Extraction of natural products using near-critical solvents.* Blackie Academic & Professional, eds King and Bott, 1993.
6. Jiménez-Carmona M.M, Ubea J. L., Castro L. D. 1999. Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of moringa essential oil. *J. Chromatograph. A.* 855: 625-632.7.
7. Kubátová A., Lagadec A. J. M., Miller D. J., Hawthorne S. B. 2001. Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water. *Flavor Fragr. J.* 16: 64-73.
8. Ayala R. G., Castro M.D. L. 2001. Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils, *Food Chem.* 75: 109-113.
9. Manila M. H., Kim H., Wai C. M., Supercritical carbon dioxide and high-pressure water extraction of bioactive compounds in *St. John's wort*. In: *Proceedings of Supergreen 2002*, Kyung Hee University, Korea.
10. Suomi J., Sirén H., Hartonen K., Riekkola M. L. 2000. Extraction of iridoid glycosides and their determination by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography A.* 868: 73-83.

11. Kubatova A., Miller D. J., Hawthorne S. B. 2001. Comparison of subcritical water and organic solvents for extracting kava lactones from kava root. *J. Chromatograph. A.* 923: 187-194.
12. Ong E. S. and Len S. M. 2003. Pressurized hot water extraction of berberine, baicalein, and glycyrrhizin in medicinal plants. *Analytica. Chimica. Acta.* 482: 81-89.
13. Ollanketo M., Peltoketo A., Hartonen K., Hiltunen R., Riekkola M. L. 2002. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. *Eur. Food. Res. Technol.* 215: 158-163.
14. ยอ พีชพื้นบ้านที่ผลิตสารมหัศจรรย์สำหรับสุขภาพ ศูนย์วิจัยแบคทีเรียและไวรัส มหาวิทยาลัย
15. Windholz and Martha. 1976. the Merck Index: An Encyclopedia of Chemical and Drug, Rahway.
16. Miller D. J. and Hawthorne S. B. 1998. Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water. *Anal. Chem.* 70: 1618-1621.

Output ที่ได้จากโครงการ

- Pongnaravane B., Goto M., Sasaki M., Anekpankul T., Pavasant P., Shotipruk A.
Extraction of Anthraquinones from Roots of *Morinda citrifolia* by Pressurized Hot Water: Antioxidant Activity of Extracts *Journal of Supercritical fluids*, 37, 390-396 (มี Impact factor 2004 เท่ากับ 2.275)
- Hemwimol S., Pavasant P., Shotipruk A. Ultrasound-Assisted Extraction of Anthraquinones from Roots of *Morinda citrifolia*, *Ultrasonics sonochemistry*, Inpress (มี Impact factor 2004 เท่ากับ 2.105)
- Shotipruk, A., Kiatsongserm J., Pavasant P., Motonobu G., Mitsuru S., Pressurized Hot Water Extraction of Anthraquinones from the Roots of *Morinda citrifolia*, *Biotechnology Progress*, 2004, 20, 1872-1875. (มี Impact factor 2004 เท่ากับ 1.635)
- Hemwimol, S., Pavasant P., Pitiphanpong, J., Shotipruk A. Microwave-Assisted Extraction of Antioxidative Anthraquinones from Roots of *Morinda citrifolia* Separation and Purification Technology (revised) (มี impact factor 2004 เท่ากับ 1.227)

ภาคผนวก

Pressurized Hot Water Extraction of Anthraquinones from the Roots of *Morinda citrifolia*

Artiwan Shotipruk,^{*,†} Jirapat Kiatsongserm,[†] Prasert Pavasant,[†] Motonobu Goto,[‡] and Mitsuru Sasaki[‡]

Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University, Patumwan, Payathai, Bangkok 10330, Thailand, and Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Kumamoto University, Kumamoto 860-8555, Japan

This study examines pressurized hot water extraction of anthraquinones from dried roots of *Morinda citrifolia* (Noni). The effects of various operating conditions such as water temperature (110, 170, and 220 °C), and water flow rate (2, 4, and 6 mL min⁻¹) on extraction yield and extraction rate were determined. At 220 °C, the extraction yield was the highest and was approximately 43.6 mg g⁻¹. Subcritical water extraction at 4 mL min⁻¹ or higher was found to be able to recover all the anthraquinones present in the roots within 3 h of extraction, even at 170 °C. Pressure had no significant effect on the results for the range of temperatures studied. The flow rate of 6 mL min⁻¹ resulted in the highest extraction rate, but the extraction efficiency, as measured by the amount of anthraquinones extracted per unit volume of water was lower than that of 4 mL min⁻¹. Anthraquinones solubility in pressurized hot water was determined. The results indicate a presence of a mass transfer limitation in the extraction process from solid matrix.

Introduction

For a long time, *Morinda citrifolia* (Noni) has been used in folk remedies to treat various kinds of diseases and symptoms. Whole parts of the plants, which include the fruits, leaves, bark, and roots have been shown to contain various biologically active compounds. A number of active components identified in the Noni plant are scopoletin, octoanoic acid, potassium, vitamin C, terpenoids, alkaloids, linoleic acid, amino acids, and anthraquinones, to name a few (1). This work, however, focuses on extraction of the roots for anthraquinones, which possess several therapeutic properties. They include antibacterial, antiviral, and anticancer activities, as well as analgesic effects, which make the roots potentially useful in several medical applications (2).

Conventionally, the compound is extracted with ethanol, followed by evaporation to separate solvent from the product. This method, however, leaves residual solvent in the product, which is unacceptable for use on humans. More benign alternative solvents have recently been investigated.

Recently, pressurized hot water or subcritical water has become of great interest as an alternative solvent for extraction of natural active compounds. Water is termed "subcritical" when its temperature is between its boiling point (100 °C) and its critical temperature (374.15 °C), and its pressure is high enough to maintain it in the liquid state. In this region, water's dielectric constant is greatly reduced from that at ambient conditions, thereby decreasing its polarity. This therefore results in an

increase in its solvent power for organic compound dissolution. Successful cases of pressurized hot water extraction of natural product have been reported for essential oils from majoram (3), savory and peppermint (4), and oregano (5). Other than essential oils, other bioactive compounds, have been extracted by this technique. They are hypericin and pseudohypericin from St. John's wort (6), iridoid glycosides from *Veronica lonifolia* (7), and kava lactones from kava roots (8). Despite its operation at rather high temperature, subcritical water has been shown to give extraction efficiency comparable to conventional methods for some thermal labile compounds, such as berberine from *Coptidis rhizoma*, glycyrrhizin from *Radix glycyrrhizae*, and liquorice and baicalin from *Scutellariae radix* (9). Moreover, Ollanketo et al. reported that pressurized hot water extraction of sage, *Salvia officinalis* L., was the most effective extraction procedure based on the capability of the extracts to scavenge the free radical in vitro (10).

In this paper, we investigate subcritical water extraction of anthraquinones using alizarin or 1,2-dihydroxyanthraquinone (Figure 1) as a standard compound. The objective of this study is to determine the effects of extraction temperature and water flow rate on extraction yield and rate of extraction. Furthermore, the solubility of alizarin in subcritical water at various temperatures was experimentally determined and discussed.

Materials and Methods

Plant Material and Chemicals. The roots of Noni were obtained from the plants (*M. citrifolia*) that were grown locally in Thailand. The plant roots were harvested, washed, and oven-dried at 313 K. The dried roots, whose moisture content was about 20%, were ground in a coffee grinder to small size. This method of sample preparation yielded small needlelike particles with an

* Corresponding author. Tel: 66-2-218-6868. Fax: 66-2-218-6877. E-mail: artiwan.s@chula.ac.th.

[†] Chulalongkorn University.

[‡] Kumamoto University.

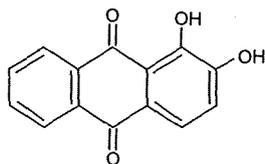


Figure 1. Chemical formula of alizarin (1,2-dihydroxyanthraquinones).

average length of about 5 mm and an average width of about 1 mm. Alizarin standard and HPLC-grade ethyl alcohol used in the experiments were obtained from Wako Chemicals.

Subcritical Water Extraction. A schematic diagram of a subcritical water extraction apparatus is presented in Figure 2. The system consists of two HPLC pumps (PU 980, JASCO), an oven, a stainless steel extraction vessel (10 mL, Thar Design), and a collecting flask. Water was purged for 2 h with nitrogen to remove dissolved oxygen prior to the extraction. With the first HPLC pump, the water was then delivered at a constant flow rate to the extractor preloaded with 1 g of ground Noni roots. The water was brought to a set temperature by means of the preheating coil inside the oven before entering the extractor. The extraction pressure was controlled by adjusting the back-pressure regulator (AKICO) connected to the outlet coil. A cooling water bath was used to cool the extract from the oven to a constant temperature close to 25 °C, thus avoiding losses of the products caused by the hot water. The second pump connected to the outlet coil was used to deliver ethyl alcohol to flush through any organic compounds that were precipitated in the coil as the temperature of the water was cooled. The extract was collected in fractions in collecting flasks. The extraction experiments were carried out to determine the effect of temperature, pressure, and water flow rate. The temperatures studied were 110, 170, and 220 °C, respectively. The flow rates used were 2, 4, and 6 mL/min. All runs were performed at least in duplicate. Any doubtful results were checked and the experiments were repeated up to four times.

Organic Solvent Extraction. To determine the amount of anthraquinones remaining in the plant materials after each subcritical water extraction, solvent extraction with ethanol was carried out. The root residue was taken out of the extractor and placed into a 125 mL Erlenmeyer flask, containing 20 mL of ethyl alcohol. It was then allowed to release the products into the solvent overnight. The solution was then replaced with 20 mL of fresh ethanol daily for 3 days. The concentration of the total ethanol extract was then measured by means of a spectrophotometer.

Solubility Determination. The solubility of alizarin in subcritical water was determined using the same apparatus used for subcritical water extraction. Instead of the root materials, 0.5 g of alizarin standard was loaded into the extractor. The water flow rate used in these experiments was 0.4 mL/min. This flow rate was slow enough to ensure that equilibrium was obtained. The solubility of alizarin was experimentally determined as described for the same water temperatures used in the extraction experiment, at 383, 443, and 493 °C. The equilibrium concentrations of the alizarin solutions were measured using a spectrophotometer (Genesys 20).

Analysis Method. The analysis method for determining the amount of anthraquinones was modified from that described by Zenk et al. (11). Because anthraquinones in the extract may not be in soluble form in ambient water after it exits the extraction system, ethanol was

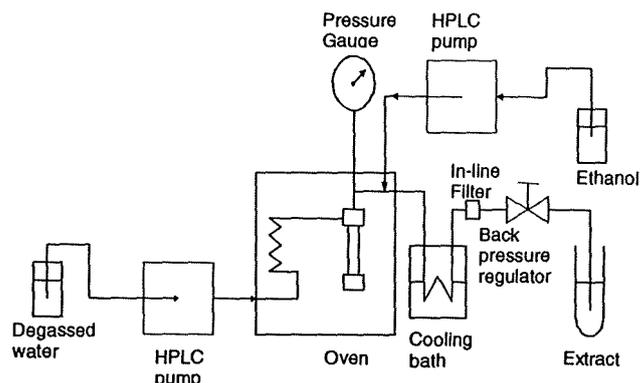


Figure 2. Schematic diagram of the subcritical water extraction apparatus.

added to the extract to keep the compound dissolved in the solvent mixture. The ratio of 1:4 (ethanol:water) was determined to be appropriate, as this is the amount of ethanol that was just sufficient to keep the extract soluble. The concentrations of these solutions were analyzed spectrophotometrically by measuring the absorbance at 435 nm, with Alizarin or 1,2-dihydroxyanthraquinone as a standard, and with ethanol/water (1:4 v/v) as a reference.

Results and Discussion

Preliminary Results. The release of anthraquinones from the roots can be seen readily by observing the yellow color of the extracts. Figure 3 shows the extracts obtained from extraction with ambient water, subcritical water, and ambient ethanol, respectively. As shown here, subcritical water shows a positive result as the extract appears yellow compared to the ambient water extraction. This is expected, because the increase in water temperature increases the solubility of the dissolve organic compound.

Because the subcritical water extraction is generally carried out at high temperatures, a preliminary check for any chemical decomposition was conducted with alizarin standard that has been exposed to high temperatures. Figure 4 shows the light absorption curves of alizarin-in-ethanol solutions, prepared from alizarin that had been exposed to 170 and 220 °C for 2 h, as compared to control standard, which was not exposed to high temperature. The result indicates that the chemical composition of alizarin might not change after the exposures. More detailed analysis on possible decomposition of the compound as a result of high temperatures such as tests for antioxidant and other biological activities are currently underway.

Effect of Extraction Temperatures. As shown in Figure 5, the amount of anthraquinones extracted increased with an increase in temperature. The yield of anthraquinones extracted with subcritical water at 110, 170, and 220 °C were 20.8, 40.1, and 43.6 mg g⁻¹ of dry roots, respectively. This temperature dependence of the yield is due to the increased solubility of anthraquinones in subcritical water as the water temperature increases. This result suggests that pressurized hot water extraction is greatly affected by extraction temperature. On the other hand, it should be noted that pressure does not affect the performance of subcritical water extraction as long as it is high enough for the water to maintain the liquid state.

Effect of Water Flow Rate. Generally, the plots of the amount of anthraquinones extracted versus time and



Figure 3. Comparison of anthraquinones extracted with (a) water at T_{atm} and P_{atm} , (b) subcritical water at $T = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 7\text{ MPa}$, and (c) ethanol at T_{atm} and P_{atm} .

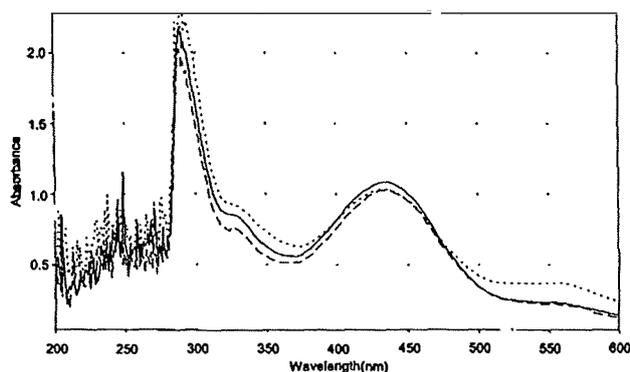


Figure 4. Spectrophotometric scan of alizarin exposed to high temperatures for 2 h: control at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (solid line), $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ (dashed line), and $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ (dotted line).

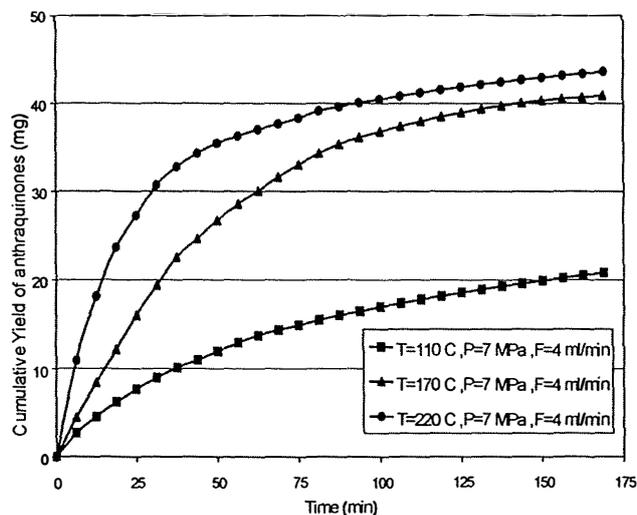


Figure 5. Effect of extraction temperature on the extraction curve.

versus solvent volume can give kinetic information about the relative importance of the steps in the extraction process. Typically, possible rate-limiting steps include (a) diffusion through a stagnant liquid film around the solid plant particles or external diffusion, (b) transport through the containing matrix by diffusion through the bulk material or down its pores, and (c) removal by partitioning into the flowing solvent. The effect of the first is typically small and often neglected. If the diffusion through plant material is limited, the rate of extraction is independent of the flow rate and the amount of extract should be higher for the same volume of solvent passed

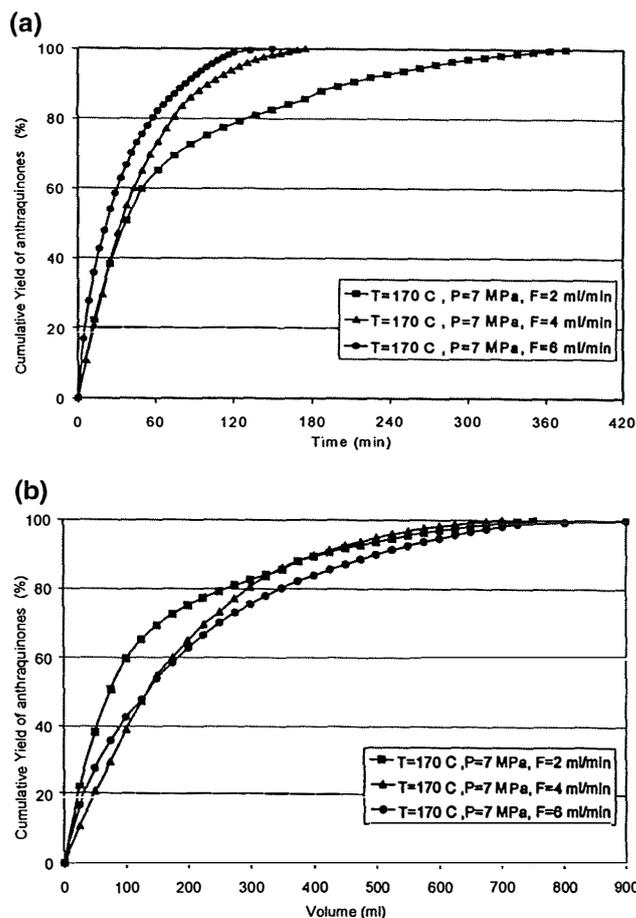


Figure 6. Effect of water flow rates on the extraction curve: (a) cumulative yield versus time and (b) cumulative yield versus volume of water.

when extraction occurs at lower flow rates. On the other hand, if the last of the three steps is a rate-determining step, the rate of extraction is proportional to flow rate, and if the amount extracted is plotted against the amount of solvent passed, the results for different flow rates fall on the same curve.

The plots of the amount of anthraquinones extracted by subcritical water extraction versus time and water flow rate are shown in Figure 6. As can be seen from Figure 6a, the amount extracted increases as the flow rate increases. When plotted against the volume of water passed as in Figure 6b, it was found that for the same amount of water passed, the amount of anthraquinones extracted was higher for lower flow rates. This suggests certain degree of mass diffusion limitation. The result, however, does not correspond strictly to any one of the cases mentioned above. Therefore, it cannot be concluded from this result that extraction is exclusively mass diffusion limited. This is because the mechanism of mass transfer in natural materials is in general quite complex, and more experimental data are required to further explain the extraction mechanism.

Solubility of Alizarin in Subcritical Water. Figure 7 shows that the solubility of alizarin in subcritical water increases as the extraction temperature increases. Plotted on the same figure, the maximum extracted concentrations obtained from extraction run at 4 mL min^{-1} were compared with the solubility data. It was found that at the low temperature of $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, the extracted concentration was close to the solubility. Thus, at this temperature, the extraction is limited by solubility. However, for the

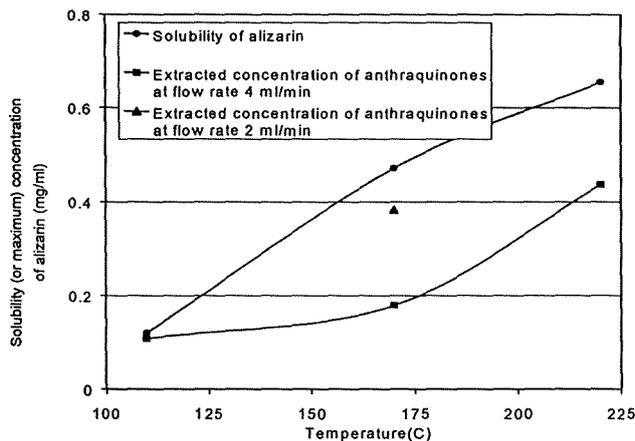


Figure 7. Solubility of alizarin in subcritical water.

temperatures of 170 and 220 °C, the maximum concentrations were much lower than the values of solubility. From this result, it can be concluded that mass transfer influences the extraction process at these temperatures, due to the solubility increase. The single data point on the graph is the maximum extract concentration resulting from the extraction at 170 °C at low flow rate of 2 mL min⁻¹, which was closer to the value of solubility. At this lower flow rate, the mass transfer problem was minimized and the extraction was conducted closer to equilibrium.

Conclusions

This study investigates the effect of extraction temperature, pressure, and water flow rate on extraction yield and rate of extraction. The results show that extraction yield increases as the temperature increases as a result of increased solubility, but on the other hand, the pressure does not affect the extraction yield. The plots of the amount extracted versus time and versus volume for various flow rates suggest that mass diffusion play a role in extraction, but the mechanism is still not clear. Finally, the solubility of alizarin in subcritical water increases with increasing temperature, and the lower extracted concentrations as compared to anthraquinones solubility data supports the previous conclusion about the importance of mass transfer limitation in this subcritical water extraction process.

Acknowledgment

The authors greatly appreciate Thailand–Japan Technology Transfer Project (TJTTP) and Thailand Research Fund (TRF) for financial support.

References and Notes

- (1) Wang, M.-Y.; West, B. J.; Jensen, C. J.; Nowicki, D.; Chen, S.; Paulu, A. K.; Anderson, G. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol. Sin.* **2002**, *12*, 1127–1141.
- (2) Hiramatsu, T.; Imoto, M.; Koyano, T.; Umezawa, K. Induction of Normal Phenotypes in Rat-transformed Cells by Damnacanthol from *Morinda citrifolia*. *Cancer Lett.* **1993**, *73*, 161–6.
- (3) Jiménez-Carmona, M. M.; Ubea, J. L.; Castro, L. D. Comparison of Continuous Subcritical Water Extraction and Hydrodistillation of Majoram Essential Oil. *J. Chromatogr. A* **2002**, *855*, 625–632.
- (4) Kubátová, A.; Lagadec, A. J. M.; Miller, J. D.; Hawthorne, S. B. Selective Extraction of Oxygenates from Savory and Peppermint using Subcritical Water. *Flavor. Fr. J.* **2001**, *16*, 64–73.
- (5) Ayala, R. G.; Castro, M. D. L. Continuous Subcritical Water Extraction as a Useful Tool for Isolation of Edible Essential Oils. *Food Chem.* **2001**, *75*, 109–113.
- (6) Mannila, M. H.; Kim, H.; Wai, C. M. Supercritical Carbon Dioxide and High-Pressure Water Extraction of Bioactive Compounds in St. John's Wort. In Proceedings of Supergreen 2002, Kyung Hee University, Korea.
- (7) Suomi, J.; Sirén, H.; Hartonen, K.; Riekkola, M. L. Extraction of Iridoid Glycosides and their Determination by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, *868*, 73–83.
- (8) Kubátová, A.; Miller, D. J.; Hawthorne B. S. Comparison of Subcritical Water and Organic Solvents for Extracting Kava Lactones from Kava Root. *J. Chromatogr. A* **2001**, *923*, 187–194.
- (9) Ong, E. S.; Len, S. M. Pressurized Hot Water Extraction of Berberine, Baicalcin, and Glycyrrhizin in Medicinal Plants. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *482*, 81–89.
- (10) Ollanketo, M.; Peltoketo, A.; Hartonen, K.; Hiltunen, R.; Riekkola, M. L. Extraction of Sage (*Salvia officinalis* L.) by Pressurized Hot Water and Conventional Methods: Antioxidant Activity of the Extracts. *Eur. Food. Res. Technol.* **2002**, *215*, 158–163.
- (11) Zenk, M. H.; El-Shagi, H.; Schulte, U. Anthraquinone Production by Cell Suspension Cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Med.* (Suppl.) **1975**, 79–101.

Received for review June 2, 2004. Accepted August 26, 2004.

BP049779X



Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*

Surasak Hemwimol, Prasert Pavasant, Artiwan Shotipruk *

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

Received 24 April 2005; received in revised form 22 September 2005; accepted 26 September 2005

Abstract

This study investigated the use of ultrasound-assisted extraction (UAE) to improve the extraction efficiency of the classical solvent extraction techniques such as maceration and soxhlet extraction to extract anti-oxidant activity compounds, anthraquinones, from the root of *Morinda citrifolia*. The effects of different extraction conditions were determined, i.e., temperature of (25, 45, 60 °C), ultrasonic power, solvent types, and compositions of ethanol in ethanol–water mixtures. The results show that the yield increases with increasing extraction times and extraction temperatures. The percent recovery of anthraquinones using ultrasound was found to be highly dependent on the type of solvents (acetone > acetonitrile > methanol > ethanol). Furthermore, the use of ethanol–water solution as extraction solvent increased the yield of anthraquinones due to the relative polarity, the swelling effect of plant tissue matrix by water, and increased sound absorption. To achieve the same recovery as that achieved by UAE, soxhlet extraction and maceration required much longer time.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Ultrasound; Extraction; *Morinda citrifolia*; Anthraquinones; UAE

1. Introduction

Morinda citrifolia (Noni), a plant which has been used in folk remedies for over 2000 years, has recently gained increased interest from the scientists and medical professionals. The true health benefits of these remedies are being investigated widely. All parts of the plants, which include the fruits, the leaves, the bark, and the roots have been shown to contain active compounds that have high medicinal values. Wang et al. [1] has recently published a review of Noni research, which summarizes the therapeutic effects of various compounds in this plant. Noni fruits and leaves are edible and have been used as a food and in herbal remedies to maintain overall health and to treat various diseases. The roots of Noni plants were used by Polynesians to produce yellow or red dye, but more importantly, they

contain medicinally active components, anthraquinones, which show several therapeutic effects. These include anti-bacterial, anti-viral, and anti-cancer activities as well as analgesic effects, which make the roots potentially useful in several medical applications [2,3]. However, making use of the roots is unlike making use of the fruits or the leaves. When the roots are harvested, the entire plants are generally destroyed, thus no longer offer medicinal value thereafter. It is therefore important that the most efficient extraction methods be utilized.

Recent studies have shown that ultrasound-assisted extraction (UAE) enhances the extraction efficiency by increasing the yield and by shortening the time of extraction of secondary metabolites from various plant tissues, such as excised leaves of tea, mint, sage, chamomile, ginseng, arnica, and gentian [4–8]. These studies demonstrated that ultrasound is capable of accelerating the extraction of organic compounds contained within the plant tissues by disrupting the cell walls and enhancing mass transfer of cell contents. The review of ultrasonic isolation of bioactive

* Corresponding author. Tel.: +662 218 6868; fax: +662 218 6877.
E-mail address: artiwan.s@chula.ac.th (A. Shotipruk).

compounds from plant materials can be found in a recent paper by Vinatoru et al. [9].

The enhancement of extraction efficiency of organic compounds by ultrasound is attributed to the phenomenon called acoustic cavitation. As ultrasound passes through a liquid, the expansion cycles exert negative pressure on the liquid, pulling the molecules away from one another. If the ultrasound intensity is sufficient, the expansion cycle can create cavities or micro-bubbles in the liquid. This occurs when the negative pressure exceeds the local tensile strength of the liquid, which varies with the type and purity of the liquid. Once formed, these bubbles will absorb the energy from the sound waves and grow during the expansion cycles and recompress during the compression cycle. The increase in pressure and temperature caused by the compression leads to the collapse of the bubbles, which causes shock wave that passes through the solvent, enhancing the mass transfer within the system [10–12].

Even though the effects of ultrasound have been studied in over hundreds of herbal species, to the author's knowledge, its effect on the UAE of this important plant, *M. citrifolia*, has not been investigated. The aim of this study was therefore to determine the extraction efficiency of anthraquinones from the roots of *M. citrifolia* by means of conventional ethanol extraction per se as compared with UAE. We specifically investigate the effects of times of ultrasonic treatment, temperature, ultrasonic power, and type and compositions of solvents on the release of anthraquinones.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials

Fresh roots of *M. citrifolia* were harvested, washed, and ground in liquid nitrogen to an average size of 0.2 μm in diameter. The ground samples were oven dried at 45 °C, and then kept in a dry place until use.

2.2. Maceration

The roots of *M. citrifolia* (0.1 g) was extracted in 10 ml of organic solvent in a 125 ml flask. The extract was then filtered with a filter paper (Whatman No.1). The concentration of anthraquinones was measured by a spectrophotometer. After extraction, the amount of anthraquinones remained in the sample residue was determined by extracting the residue repeatedly in three 10 ml volumes of solvent until the extract was clear.

2.3. Soxhlet extraction

A classical soxhlet apparatus was employed in which 2 g of sample was placed into the cartridge with 200 ml of solvent (ethanol) contained in a 500 ml round-bottom flask. Extraction was carried out for up to 4 h.

2.4. UAE

For the UAE experiments, an ultrasonic bath was used as an ultrasound source. The bath, 275DAE (Crest Ultrasonics, USA), was basically a rectangular container (23.5 cm \times 13.3 cm \times 10.2 cm), to which two 38.5 kHz transducers were annealed at the bottom. The bath power rating was 270 W on the scale of 0–9. The actual electrical power to the transducers was measured using a wattmeter (Energycheck 3000, Germany, a kind gift from Professor Eshtiagi), to be 15.7, 39.7, and 56.1 W, respectively for the setting of 3, 6, and 9 tested in this study. The extraction of anthraquinones was performed by adding 0.1 g of ground dried roots into 10 ml of solvent in a 28 ml tube. The tube was then partially immersed into the ultrasonic bath, which contains 2.2 l of water. The bottom of the flask was \approx 5 cm above the bottom of the bath. The solvent surface in the flask was kept at the level of the water in the ultrasonic bath. Water in the ultrasonic bath was circulated and regulated at constant desired temperatures to avoid the water temperature rise, caused by ultrasonic exposure. After extraction, the amount of anthraquinones remained in the sample residue was determined by extracting the residue repeatedly in three 10 ml volumes of solvent or until the extract was clear. Table 1 summarizes the ranges of variables investigated, within which anthraquinones were checked not to decompose by ultrasound. All the experiments in this study were performed in triplicate.

2.5. Measurement of anthraquinones concentration

The concentrations of anthraquinones extracts were analyzed by measuring the absorbance at 435 nm, following the spectroscopic method modified from Zenk et al. [13]. A calibration curves of Alizarin (or 1,2-dihydroxyanthraquinone) solutions in various solvents were used as reference.

3. Results and discussion

3.1. Effect of ultrasonication and its duration on extraction

Fig. 1 shows the effects of ultrasonication and its durations (15, 30, 45, 60, and 90 min) on the release of anthraquinones. The experiments were carried out at 25 °C and at the power of 15.7 W. The control experiments were performed using maceration without ultrasonic exposure at

Table 1
Ranges of experimental variables

Variables	Ranges
Temperature	25, 45, 60 °C
Power setting	3, 6, 9
Type of solvent	Ethanol, methanol, acetone, acetonitrile
Ethanol composition (%)	20, 50, 80
Time (min)	15, 30, 45, 60, 90

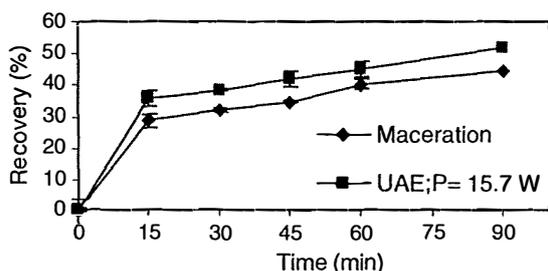


Fig. 1. Effect of ultrasonication and its duration on extraction at 25 °C.

the same temperature. Compared with maceration, UAE was found to enhance the extraction yield. This was due to the cavitation effects, which caused the intensification of mass transfer and thus closed interaction between the solvent and the plant tissues. The collapse of cavitation bubbles near tissue surfaces produces micro-jets, causing tissue disruption and a good penetration of the solvent into the tissue matrix [14]. As illustrated in the figure, the percent recovery increased with increasing duration of ultrasonic treatment as the contact time between liquid and solid plant materials was increased. The rate of anthraquinones extraction was high, during the first 15 min, and then decreased considerably thereafter. A reason for this was due to the large difference between the initial anthraquinones concentration of the extraction solvent and its solubility. Another reason for the initially high rate could be that anthraquinones located in the outer region of particle was more readily accessible than that in the inner part in which the plant tissues were more intact. The extraction from the outer part was attributed to external mass transfer, which in this case was convective since fluid motion was provided as a result of ultrasonic cavitation. At later time, anthraquinones from the inner part of the root particles must diffuse through the pores of the root materials, resulting in much slower extraction rate. The results in Fig. 1 also show that the application of ultrasound increased the extraction rate only in the first 15 min. The rate thereafter was similar to that of maceration. This suggests that ultrasound was needed only at the beginning to initialize the fast extraction process.

3.2. Effect of extraction temperature

The effect of UAE temperature on the release of anthraquinones is shown in Fig. 2. The comparison shown in this figure was made for extractions in ethanol at a power of 15.7 W at different temperatures: 25 °C, 45 °C, and 60 °C. Again, in all cases, the product was rapidly released within the first 15 min, after which the release rate decreased. The percent recovery was found to increase with increasing temperature due to the increased solubility of anthraquinones in ethanol. In addition, at higher temperature, the liquid viscosity and density decreased, and thus resulting in increased mass transfer. Furthermore, as a result of decreased solvent viscosity, cavitation bubbles within the

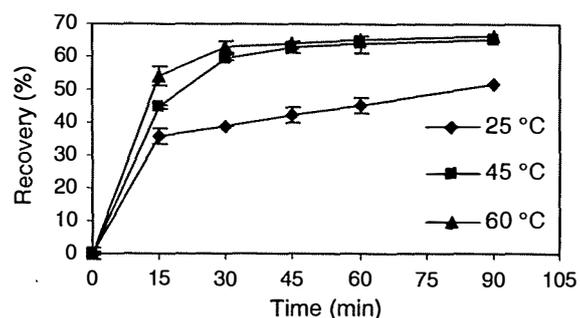


Fig. 2. Effect of extraction temperature for UAE in ethanol at power of 15.7 W.

fluid occurred more easily as the cohesive force, and thus the tensile strength of the liquid was reduced [10–12].

3.3. Effect of type of solvents

The effect of type of solvents on UAE of anthraquinones was determined for four commonly used solvents: acetone, ethanol, methanol, and acetonitrile. The UAE experiments were conducted at 25 °C and at the power of 15.7 W for 45 min and the results were compared with maceration at the same temperature as shown in Fig. 3. The choice of solvents used was made based on their polarity relative to anthraquinones. Because anthraquinones are slightly polar compounds, polar solvents were selected. Of these solvents, ethanol and acetone are acceptable for practical use as they were in compliance with good manufacturing practice (GMP). Other GMP solvents such as propane, butane, butyl acetate, ethyl acetate were not used due to the low solubility of the compounds in these solvents. Although methanol and acetonitrile are considered toxic solvents, they provide an insight into the effect of solvent properties in extraction.

As seen in the figure, for the case of maceration without ultrasonic irradiation, acetone gave the highest percent recovery, followed by methanol, ethanol, and acetonitrile. The different extraction efficiencies of these solvents are attributed to their differing polarities and viscosities. The values for certain properties of the solvents used in this study are listed in Table 2. Note that although the polarity indices of acetone, methanol, and ethanol are similar, acetone shares the most structural similarity with anthraqui-

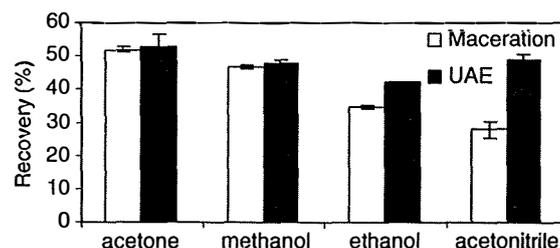


Fig. 3. Effect of type of solvents for maceration and UAE at 25 °C.

Table 2
Properties of solvent used in UAE (at 25 °C)

Type of solvents	Polarity index	Surface tension (mN/cm)	Vapor pressure (mmHg)	Viscosity (cP)
Acetone	5.1	23.7	229.52	0.32
Methanol	5.1	22.6	127.05	0.6
Ethanol	5.2	23.7	59.02	1.2
Acetonitrile	5.8	19.1	88.47	0.38
Water	9	72.8	23.8	0.89

ones in that both molecules contain the C=O functional groups. This probably explains why acetone gave the highest extraction efficiency. Furthermore, acetone has the lowest viscosity, which allows it to easily diffuse into the root matrix. Acetonitrile on the other hand has the lowest viscosity among the three solvents, but gave the lowest extraction efficiency. This could be due to the fact that the molecular structure of acetonitrile is most different from that of anthraquinones resulting in the lowest solubility compared with the other solvents.

When ultrasound was applied, acetone still extracted the highest percentage of anthraquinones, followed by acetonitrile, methanol, and ethanol. The results in Fig. 3 reveals that the extraction efficiency could generally be enhanced, by application of ultrasound, however the degree of enhancement differed depending on the type of solvent. As seen here, there was almost no increase in the extraction efficiency as a result of ultrasound for extraction in acetone and methanol. However, for ethanol and acetonitrile, the increase in the efficiency of extraction was significant. This was due to the influence of solvent properties on the occurrence and the intensity of cavitation. The solvent properties that impact the behavior of ultrasonic cavitation include vapor pressure, viscosities, and surface tension. Of these properties, medium vapor pressure is known to be most conducive to ultrasound activity [14]. Ultrasonication in low vapor pressure liquid produces few cavitation bubbles as a result of high cavitation threshold, however, the bubbles implode with relatively greater force, which enhances plant tissue disruption during extraction. High vapor pressure liquid on the other hand is not very effective—more bubbles are created, but they collapse with less intensity due to a smaller internal/external pressure differential. As for the influence of liquid viscosity, acoustic cavitation occurs more easily in the liquid with low viscosity because the ultrasonic intensity applied could more easily exceed the molecular forces of the liquid. Furthermore, the liquid with low viscosity has low density and high diffusivity, and can easily able to diffuse into the pores of the plant materials [14]. Surface tension of liquid also influences cavitation effects. Liquid having small surface tension requires lower energy to produce cavitation bubbles, thus cavitation occurs more readily. The values for vapor pressure, viscosity, and surface tension at ambient temperature for the solvents tested in this study are summarized in Table 2. Acetone, methanol, and ethanol have similar sur-

Table 3
Percent increase in anthraquinones recovery by UAE

Type of solvent	Recovery with maceration (%)	Recovery with UAE (%)	Increase in percent recovery
Acetone	51.94 ± 0.04	52.78 ± 3.95	0.84 ± 3.95
Methanol	46.68 ± 0.71	47.71 ± 1.23	1.03 ± 1.42
Ethanol	34.81 ± 0.62	42.17 ± 0.11	7.36 ± 0.63
Acetonitrile	27.87 ± 2.36	48.92 ± 1.93	21.05 ± 3.05

face tensions, but differing vapor pressures and viscosities. Although acetone and methanol have low viscosity, which makes cavitation occurs easily, they have high vapor pressure thus resulting in less violent cavitation collapses—more bubbles may be created, but they collapse with less intensity. Of all the solvents tested, the increase in the extraction efficiency of acetonitrile was found to be the greatest possibly because of its relatively low viscosity and surface tension. This increased the number cavitation bubbles, whose collapses were further intensified as a result of its relatively low vapor pressure. The effect of vapor pressure was also evident for the case of ethanol. Although ethanol has high viscosity, the intensity of cavitation collapses was violent due to its low vapor pressure.

Summarized in Table 3 is the percent increase in anthraquinones recovery as a result of ultrasonication in various solvents. It is clear that ultrasonication could enhance the extraction efficiency to the greatest extent in acetonitrile, followed by that in ethanol. However, acetonitrile is a highly toxic solvent, we therefore selected ethanol as extraction solvent for the subsequent investigation.

3.4. Effect of ultrasonic power

The effect of ultrasonic power was determined at 25 °C after 45 min of ultrasonic treatment. The results are shown in Fig. 4 which illustrates that the product recovery was increased with increasing ultrasonic power. An explanation for this is that the larger the amplitude of ultrasound wave traveling through a mass medium, the more violently the bubbles collapse. However, an increase in the extraction efficiency were not pronounced, possibly because only a small fraction of the electric energy to the transducer actually entered the extraction solvent in this ultrasonic bath system. For example, based on a calorimetric estimation for a 45 min irradiation at 15.7 W, only 56.8 J of 42 kJ of electrical energy was transferred into the 10 ml of ethanol. The rest was absorbed by the water in the bath and the sides of the metal bath. For this reason, ultrasonic power is not the key factor affecting the extraction efficiency in this case. The findings here therefore demonstrate that more efficient design of ultrasonic equipment is required for this specific application.

3.5. Effect of ethanol–water compositions

The effects of ethanol compositions on the anthraquinones recovery obtained after 45 min of maceration and

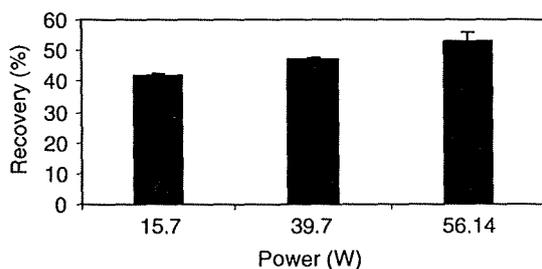


Fig. 4. Effect of ultrasonic power at 25 °C for 45 min duration.

UAE at ambient temperature are shown in Fig. 5. Let us consider first the maceration without ultrasonic irradiation, whose results demonstrate that the improvement of extraction efficiency observed with the addition of some amount of water. The percent product recovery increased with increasing percentage of water up to 50%. This was probably due to the relative polarity and the increase in effective swelling of the plant by water, which helped increase the surface area for solute–solvent contact [15]. Furthermore, the presence of water lowers the mixture viscosity, thus mass transfer was improved. At higher water concentration as in 20% ethanol however, the product recovery was the lowest because high content of water increased the mixture polarity to the degree that it no longer was favorable for extraction of anthraquinones.

When ultrasound (power 15.7 W, at 25 °C) was applied, extraction efficiency could generally be improved due to the effect of ultrasonic cavitation. The same trend was resulted as with maceration in which the extraction efficiency increased with the amount of water added until up to 50%. In the presence of water, the intensity of ultrasonic cavitation in the solvent mixture was also increased as the surface tension increased and the viscosity and the vapor pressure decreased [16]. Beside the cavitation effects, the increase in anthraquinones recovery could be explained by the sound absorption property by ethanol–water mixture. It is well established that absorption of sound in ethanol–water mixture increases with ethanol concentration up to 50%, after which it starts to decrease. In addition to these reasons, ultrasound has been shown to facilitate the hydration processes of dried materials

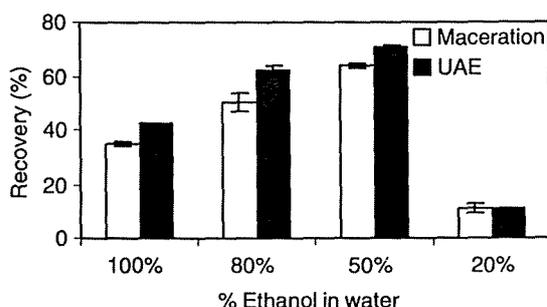


Fig. 5. Effect of ethanol compositions on extraction efficiency for maceration and UAE.

Table 4

Comparison of percent recovery and extraction times for each method

Methods	Time	Temperature	Type of solvent	Recovery (%)
Maceration	3 days	Ambient	EtOH	63.33 ± 2.73
Soxhlet	4 h	Boiling point	EtOH	97.74 ± 0.31
UAE	60 min	60 °C	EtOH	66.43 ± 0.48
UAE	60 min	60 °C	EtOH:water (50:50)	95.72 ± 0.53
UAE	60 min	60 °C	EtOH:water (80:20)	95.07 ± 1.49

which cause the plant materials to swell more readily. This rehydration was important to help regain the capacity of diffusion and osmosis that had been lost as a result of tissue desiccation that occurs during the drying process [10]. Despite, the high vapor pressure, surface tension, and low viscosity, no enhancement in extraction efficiency was observed when UAE was carried out in the mixture of 20% ethanol. This could be reasonably explained by the increased production of free radicals from the ultrasound dissociation of water. In the presence of these high energy species, oxidative reactions could cohabit with the extraction reactions [17].

3.6. Comparison of ultrasound-assisted extraction and conventional methods

The efficiency of extraction using ultrasound was compared with that of other classical methods. Table 4 summarizes the results. At the extraction temperature of 60 °C ultrasound with pure ethanol for 60 min gave the percent recovery of ≈65%. This was comparable to that resulted from maceration in pure ethanol at room temperature for 3 days. Clearly, by reducing the time required for extraction, UAE was proven to be a promising method that offers improved extraction efficiency. Soxhlet extraction for 4 h in ethanol was able to give higher yields than UAE at 60 °C as the extraction was carried out at the temperature closed to the boiling point of ethanol. The plant tissues were also continuously extracted with the fresh condensed solvent for extended time period, while UAEs on the other hand were conducted in a batch system. Nevertheless, using 80% ethanol as solvent in UAE could increase the percent recovery up to ≈96%, which was comparable to using soxhlet extraction in pure ethanol, but with shorter extraction time required.

4. Conclusions

UAE offers a promising alternative for efficient extraction of anthraquinones from the roots of *M. citrifolia*. The main mechanism for enhanced recovery anthraquinones with ultrasound-assisted extraction was acoustic cavitation, a phenomenon occurring in liquid medium under the influence of ultrasound which causes the root tissue disruption, thus enhancing the mass transfer of the solute into the solvents. The percent recovery of anthraquinones increased with increasing extraction time, temperature,

and ultrasonic power, and was affected considerably by the type and composition of solvents used.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Mohamad Naghi Eshtiaghi (Berlin University of Technology) for insightful discussion on the principle of ultrasound and its application and for the kind gift of the wattmeter. Research grant provided by Thailand Research Funds and the Commission of Higher Education was greatly appreciated.

References

- [1] M.Y. Wang, B.J. West, C.J. Jensen, D. Nowicki, *Acta Pharmacol. Sin.* 23 (12) (2002) 1127–1141.
- [2] T. Hiramatsu, M. Imoto, T. Koyano, K. Umezawa, *Cancer Lett.* 73 (1993) 161–166.
- [3] A.Y. Asahina, J.S.M. Ebesu, D. Ichinotsubo, J. Tongson, Y. Hokoma, In: *Proc. Int. Symp. of Ciguatera and Marine Natural Products*. (1994) 197–205.
- [4] T.J. Mason, Y. Zhao, *Ultrasonics* 32 (1994) 375–377.
- [5] H. Li, E. Ohdaira, M. Ide, *Jpn. J. Appl. Phys.* 33 (1994) 3085–3087.
- [6] M. Salisova, S. Toma, T.J. Mason, *Ultrason. Sonochem.* 4 (1997) 131–134.
- [7] M. Vinatoru, M. Toma, O. Radu, P.I. Filip, D. Lazurca, T.J. Mason, *Ultrason. Sonochem.* 4 (1997) 135–139.
- [8] Z. Hromádková, A. Ebringerová, P. Valachovič, *Ultrason. Sonochem.* 5 (1999) 163–168.
- [9] M. Vinatoru, M. Toma, T.J. Mason, Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents, in: T.J. Mason (Ed.), *Advances in Sonochemistry*, vol. 5, JAI Press, 1999, pp. 209–248.
- [10] M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk, T.J. Mason, *Ultrason. Sonochem.* 8 (2001) 137–142.
- [11] J. Wu, L. Lin, F. Chau, *Ultrason. Sonochem.* 8 (4) (2001) 347–352.
- [12] M. Palma, C.G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 119–130.
- [13] M.H. Zenk, H. El-Shagi, U. Schulte, *Plant Med. (Suppl.)* (1975) 78–101.
- [14] T.J. Mason, *Ultrason. Sonochem.* 3 (1996) 8253.
- [15] H. Li, L. Pordesimo, J. Weiss, *Food Res. Int.* 37 (7) (2004) 731–738.
- [16] M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1012 (2) (2003) 119–128.
- [17] L. Paniwnyk, E. Beaufoy, J.P. Lorimer, T.J. Mason, *Ultrason. Sonochem.* 8 (3) (2001) 299–301.



Extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by pressurized hot water: Antioxidant activity of extracts[☆]

Boonchai Pongnaravane^a, Motonobu Goto^b, Mitsuru Sasaki^b,
Thitiporn Anekpankul^a, Prasert Pavasant^a, Artiwan Shotipruk^{a,*}

^a Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University, Phayathai Rd., Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

^b Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Kumamoto University, Kumamoto 860-8555, Japan

Received 3 August 2005; received in revised form 22 November 2005; accepted 8 December 2005

Abstract

The effectiveness of pressurized hot water extraction (PHWE) of anthraquinones from *Morinda citrifolia* was evaluated by determining the capability of the extracts to scavenge the free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) in vitro, as compared with the extracts obtained by other conventional extraction methods such as ethanol extraction in stirred vessel, Soxhlet extraction, and ultrasound-assisted extraction (UAE). It was found that PHWE and solvent extraction with Soxhlet resulted in extracts that have the highest antioxidant activity. In addition, PHWE could recover similar amount of anthraquinones, compared with Soxhlet extraction, and is therefore proven to be a promising benign alternative to organic solvent extraction. In addition, the solubility of anthraquinones in pressurized hot water was determined and mathematically modeled. © 2006 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Pressurized hot water extraction; Anthraquinones; *Morinda citrifolia*; Antioxidant; Subcritical water; Solubility

1. Introduction

Morinda citrifolia (Noni), a plant originated in tropical Asia has, during the past decades, been gaining special interest as a source of natural medicines. Different parts of the plants, which include fruits, leaves, bark, and roots, have been shown to contain various biologically active compounds [1]. Some of the active components identified in the plant are terpenoids, alkaloids, and anthraquinones, to name a few [1]. Of particular interest in this study, is anthraquinones extracted from the roots, which has been found to possess several therapeutic properties including antiviral [2,3], anti-bacterial [4,5], as well as anti-cancer activities [6,7]. The antioxidant activity of the extracts derived from *M. citrifolia* was confirmed to contribute to the therapeutic properties of these compounds [8].

Conventionally, isolation of plant derived compounds involves extraction with organic solvent either with magnetic stirrer or by using Soxhlet apparatus. A more benign solvent

such as supercritical carbon dioxide has recently been investigated for extraction of several active compounds from natural materials. However, it is not appropriate solvent for extraction of relatively polar compounds such as anthraquinones. A small amount of polar cosolvent such as ethanol could be added to supercritical carbon dioxide to increase its polarity, however, the solvent must further be removed. Alternatively, pressurized hot water (PHW) has recently been investigated for extraction of various plant secondary metabolites. These include essential oils from various plants such as majoram [9], savory and peppermint [10], and oregano [11]. Extraction of other compounds including hypericin and pseudohypericin from St. John's wort [12], iridoid glycosides from *Veronica lonifolia* [13], and kava lactones from kava roots [14] were also investigated.

The present study follows the previous report [15], in which the feasibility of using PHW was investigated for extraction of anthraquinones from the roots of *M. citrifolia* as an alternative for the conventional solvent extraction with ethanol. The term "pressurized hot water" or "subcritical water" refers to water at the temperatures between its boiling temperature (373.15 K) and its critical temperature (547.3 K), and at the pressure high enough to maintain it in the liquid state. At such conditions, water dielectric constant decreases, and thereby decreasing its

[☆] Presented at International Symposium of Supercritical Fluids (ISSF 2005), Orlando, FL, USA (May 1–5, 2005).

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 6868; fax: +66 2 218 6877.

E-mail address: artiwan.s@chula.ac.th (A. Shotipruk).

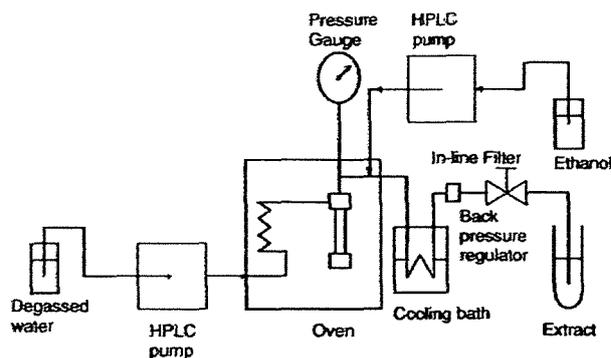


Fig. 1. Schematic diagram of PHWE apparatus.

polarity. As a result, the solubility of organic compounds in subcritical water increases.

In the previous study [15], the effects of water temperature and flow rate were investigated on the amount of anthraquinones extracted. However, because of the operation at rather high temperature, care must be taken to ensure that the quality, i.e. biological activity, is not lost during the process. As a result, the objective of this study was to determine the antioxidant activity of anthraquinones extracted with PHW and compare it with that of the extracts obtained by other conventional solvent extraction methods such as extraction in ethanol with magnetic stirrer, ultrasound-assisted extraction (UAE), and Soxhlet extraction. Furthermore, the solubility of anthraquinones in PHW was determined using a static method and compared with the values obtained using a dynamic method found in the previous study [15]. In addition, a mathematical model describing the solubility as a function of temperature was proposed. Lastly, extraction curves for PHWE at different temperatures and water flow rates were obtained and PHWE was compared to different solvent extraction methods.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and chemicals

The roots of Noni were obtained from the plants (*M. citrifolia*) that were grown locally in Thailand. The plant roots were harvested, washed, oven dried at 313 K, and then ground to small size in a mortar in liquid N₂. This preparation gives small spherical particles whose average diameter was 2 mm, measured by a particle size analyzer (Beckman Coulter Model LS230, Fullerton, CA, USA). Alizarin standard, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and HPLC-grade ethyl alcohol used in the experiments were obtained from Wako Chemicals, Chuo-ku, Osaka, Japan.

2.2. PHWE

A schematic diagram of a PHWE apparatus is presented in Fig. 1. The system consists of two HPLC pumps (PU 980, JASCO, Easton, MD, USA), an oven, a stainless steel extraction vessel (10 mL, Thar Design, Pittsburg, PA, USA), and a collect-

ing flask. Water was pumped by the first HPLC pump and passed through a degassing unit to rid air bubbles that could cause the flow to stop. The water was delivered at a constant flow rate to the extractor preloaded with 0.5 g of ground Noni roots, with 1-mm glass beads loaded to avoid the dead volume and to disperse the plant sample. The water was brought to a set temperature by means of the preheating coil inside the oven before entering the extractor. The extraction pressure (4 MPa) was controlled by adjusting the back-pressure regulator (AKICO, Tokyo, Japan) connected to the outlet coil. A cooling water bath was used to cool the extract from the oven to a constant temperature close to 25 °C, thus minimizing any product loss due to high temperature. The second pump connected to the outlet coil was used to deliver ethyl alcohol to flush through any organic compounds that were precipitated in the coil as the temperature of the water was cooled down. The extract was collected in fractions in collecting flasks over a fixed volume (25 mL) of water passing through the sample, and extraction continued for 4 h. The extraction temperatures studied were 150, 170, and 200 °C and the flow rates employed were 2, 3, 4, 5, and 6 mL min⁻¹.

2.3. Solvent extraction with magnetic stirrer

The roots of *M. citrifolia* (0.1 g) was extracted in 10 mL of ethanol in a 125 mL flask for 72 h with a magnetic stirrer. The extract was then filtered with a filter paper (Whatman no. 1, USA), and the concentration of anthraquinones was measured by a spectrophotometer.

2.4. Soxhlet extraction

In classical Soxhlet extraction, 2 g of sample was placed into a thimble and was extracted with 200 mL of ethanol. Extraction was carried out for 1–4 h with the approximate cycle of 7 cycles h⁻¹. The anthraquinones concentration was measured by a spectrophotometer.

2.5. Ultrasound-assisted extraction

For ultrasonic extraction experiments, an ultrasonic bath was used as an ultrasound source. The bath, 275DAE (Crest Ultrasonics, USA), was basically a rectangular container (23.5 cm × 13.3 cm × 10.2 cm), to which two 38.5 kHz transducers were annealed at the bottom, and the bath power output was 270 W. The extraction of anthraquinones was performed by adding 0.1 g of ground dried roots into 10 mL of ethanol in a 28 mL tube. The tube was then partially immersed into the ultrasonic bath, which contains 2.2 L of water. The bottom of the flask was approximately 5 cm above the bottom of the bath. The ethanol surface in the flask was kept at the level of the water in the ultrasonic bath. After 2 h of UAE, residual solids were removed by filtration through a filter paper (Whatman no. 1, Maidstone, Kent, UK).

All PHWE and conventional extractions were performed at least in triplicates. To determine the percent recovery, after each extraction, the sample residue was extracted in three 10-mL volumes of ethanol, or extracted until the extract was clear. The sum

of the amount of anthraquinones extracted by each extraction procedure, and that remained after each extraction account for the total anthraquinones in the root samples (100%). The percent recovery was calculated as the fraction of anthraquinones extracted divided by the total amount of anthraquinones.

2.6. Determination of anthraquinones concentration

The analysis method for determining the amount of anthraquinones was by spectrophotometry, modified from that described by Zenk et al. [16]. For samples extracted with ethanol, calibration curve of alizarin in pure ethanol was used for the quantification of the compound in the extracts. In case of PHWE, anthraquinones in the extract may not be in soluble form in ambient water after it exit the extraction system, ethanol was therefore added to the extract to keep the compound dissolved in the solvent mixture. The ratio of 1:4 (ethanol:water) was determined to be appropriate as this is the amount of ethanol was just sufficient to keep the extract soluble. In this case, the concentrations of these solutions were analyzed spectrophotometrically (Genesys 20, Thermo Electron Corporation, West Palm Beach, FL, USA) by measuring the absorbance at 435 nm, with Alizarin or 1,2-dihydroxyanthraquinone as a standard, and with ethanol/water (1:4, v/v) as a reference.

2.7. Antioxidant activity test

The antioxidant activity of the extracts was evaluated by measuring the ability of the extracts to scavenge the free radical DPPH *in vitro*. The assay method was modified from that described in Ollanketo et al. [17]. For the purpose of comparing the antioxidant activity in various extracts, concentration of sample producing 50% reduction of the radical absorbance (IC_{50}) was used as an index. To find this value, the extract was diluted in series with ethanol and 2 mL of each diluted extract was added to 2 mL of 110 μ M DDPH solution. The solutions were mixed using a vortex and the mixture was then incubated for 2 h in darkness at room temperature, after which the absorbance was measured at the wavelength of 517 nm using ethanol as a reference. The IC_{50} values were then found from a plot of percent inhibition (PI) versus the concentration of anthraquinones. The values of PI were calculated using the following equation:

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

where A_t and A_r are absorbance of test sample and absorbance of the DPPH reference, respectively. Analysis of variance and comparison of means were performed on these antioxidant results to compare the activity between the different methods.

2.8. Measurement of alizarin solubility

The solubility of alizarin in PHW was determined in a 100 mL closed pressure vessel (city, state, Japan), in which 0.5 g of alizarin standard and 15 mL of water were loaded. The vessel was then tightened and heated to a desired temperature by means of a heating jacket around it. The system was allowed

to reach equilibrium in which 20 min was proven to be sufficient for this purpose. For each of the temperatures tested, it was indeed found that a constant equilibrium concentration was achieved within 15 min. The solubility of alizarin was experimentally determined for the water temperatures of 125, 150, 175, and 200 °C. After the 20 min, the vessel was immersed into a water bath and sample solution was taken from the vessel and immediately measured for its concentration. Although, the solution temperature had returned to ambient temperature, it still gave accurate determination of solubility of alizarin in subcritical water when the measurements were measured immediately after each experiment. The equilibrium concentration of the solution was checked periodically after each experiment and it stayed constant for 6–7 h before it decreased and crystallization was observed. The equilibrium concentrations of alizarin solutions were measured using a spectrophotometer as described earlier.

3. Results and discussion

3.1. Comparison of PHW and conventional extraction techniques

The performance of PHWE was compared with different extraction methods in terms of anthraquinones recovery and time required for extraction. The results are shown in Table 1. To achieve approximately 80% recovery of anthraquinones, extraction in stirred vessel required extended time period (72 h). With ultrasound-assisted extraction at 60 °C, similar yield could be achieved within only 2 h due to enhanced mass transfer resulted from ultrasonic cavitation and the increase of solubility at higher temperature. More efficient extraction could be achieved using a Soxhlet extractor in which continuous extraction with fresh solvent was carried out at near solvent boiling temperature. For PHWE, the data presented in Table 1 are taken from the experimental runs at 5 mL min⁻¹. This flow rate was selected as it was found to be an optimal flow rate, which allowed efficient use of solvent and the extraction could be completed within a reasonable period of time. The comparison in Table 1 shows that PHWE gave comparable recovery to Soxhlet extraction after 2 h, the method is more favorable however as it does not involve the use of toxic organic solvents.

3.2. Antioxidant activity

The effect of extraction methods on the extract antioxidant activity was determined by measuring radical-scavenging activity of the extracts against DPPH radicals. The antioxidant activity of the sample as quantified by the IC_{50} values, for the extracts obtained by PHWE were compared with that by conventional organic solvent extraction including solvent extraction in a stirred vessel, UAE, and Soxhlet extraction as shown in Fig. 2. The highest IC_{50} value (lowest antioxidant activity) was obtained for the UAE in absolute ethanol, followed by extraction in stirred vessel. The IC_{50} values of PHWE were significantly lower and the antioxidant activity of the PHW extracts were similar to that obtained with solvent extraction using Soxh-

Table 1
Comparison of percent recovery and extraction time for different extraction methods

Extraction method	Temperature (°C)	Time (h)	Recovery (%)
Solvent extraction with magnetic stirrer	25	72	81.16 ± 2.70
UAE	60	2	79.62 ± 0.56
Soxhlet extraction	78.3	1	93.42 ± 0.58
		2	94.85 ± 0.85
		3	96.99 ± 0.77
		4	97.94 ± 0.70
Subcritical water extraction	150	1	81.07 ± 2.78
	170	2	92.55 ± 1.60
	200	1	78.79 ± 4.08
		2	91.89 ± 1.04
	200	1	82.13 ± 3.77
		2	96.41 ± 1.14

let apparatus. The IC_{50} values for all extracts obtained at all PHWE temperature tested (150, 170, and 200 °C) were comparable. This was confirmed by analysis of variance in which five observations were made for each of the three temperatures. The analysis of variance with confidence level $\alpha=0.01$ indicated that the temperatures tested did not have a significant effect on the antioxidant activity levels of the extracts. These results indicate that PHWE is a promising alternative for extraction of anthraquinones and that there was no significant difference in the antioxidant activity of the extracts obtained by PHWE in the temperature range studied. For extraction in a stirred vessel, the lower activity of the extract could have resulted from extended extraction time required, which led to prolong exposure to unfavorable conditions such as light and oxygen. However, analysis of means shows that only UAE resulted in lower antioxidant activity level ($p < 0.0001$). The analysis could not conclude there were differences in the other methods: PHWE, Soxhlet extraction, or solvent extraction with magnetic stirrer (tested with confidence level $\alpha = 0.01$). It is interesting to note that although UAE did not require extended extraction time, the antioxidant activity of the extracts was the most inferior. This is commonly known to be a result of ultrasonic cavitation, which potentially induces free radicals formation within the liquid medium, thus

causes oxidation and degradation of the anthraquinones product [18].

3.3. Solubility of anthraquinones in subcritical water

Knowledge of the solubility of the compound of interest in a solvent is important for successful design of extraction process. In generally, two common methods have been reported in the literature for determining the solute solubility in a solvent under given sub- and supercritical conditions. The first is static method in which the solubility of a compound is measured in a closed pressure cell. The second is a continuous flow technique in which the equipment similar to that described earlier for extraction is used, except the extraction vessel is loaded with the compound of interest instead of plant samples. In the continuous flow system, the solvent is pumped into the system by a high pressure pump at a small enough flow rate to maintain equilibrium condition. In this study, the solubility of alizarin in subcritical water was determined using a static method and the results were compared with those obtained with a dynamic system reported previously [15], as shown in Fig. 3. Both results demonstrated that the solubility increases with increasing temperature due to the decrease in water intermolecular interactions (dipole–dipole and hydrogen

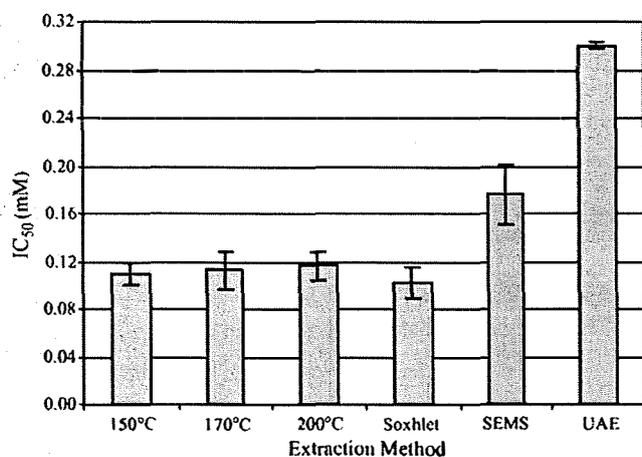


Fig. 2. IC_{50} of extracts derived from PHWE and conventional methods.

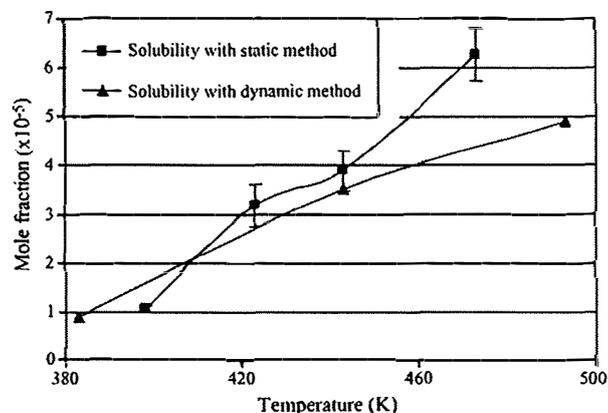


Fig. 3. Solubility of anthraquinones in subcritical water measured in static and dynamic systems.

Table 2
Solubility of standard alizarin in PHW

Temperature (K)	Mole fraction solubility (10^{-5})					
	Experimental	Eq. (2)	Eq. (3)	Eq. (4)	Eq. (5)	Eq. (6)
398	1.07 ± 0.065	1.07	1.07	1.07	0.15	1.31
423	3.18 ± 0.427	2.11	2.11	2.10	0.41	2.48
443	3.90 ± 0.418	3.42	3.50	3.41	0.85	3.94
473	6.26 ± 0.533	6.57	7.26	6.50	2.20	7.32
Average percent deviation		12.73	14.97	12.59	79.04	15.6

bonding) at high temperature, making it more likely to dissolve alizarin. For static measurement of solubility, the experiment was carried out in a 100 mL pressure vessel in which 0.5 g of alizarin and 15 mL of water were loaded. For safety reason, the overhead space was allowed to avoid over-pressurization. The pressures of the system were measured for different temperatures tested and were found to be approximately the steam table saturation pressures. When the dead volume was allowed, however, the volume of water changed with temperatures. The percentage of mass of vapor was calculated based on the steam table data for saturated steam to be 0.72, 1.42, 2.29, and 6.44% for 125, 150, 170, and 220 °C, respectively. At the end of the 20 min of each experiment, the closed vessel was cooled by immersion into a water bath. This fraction of vapor was expected to condense back to liquid water. Thus, the concentration of alizarin in the vessel would therefore be underestimated as it was diluted by the condensed water. Based on this line of reasoning, the experimental values for solubility (measured by static method) were corrected, and the corrected solubility data are shown in Fig. 3 and also in Table 2. The results in Fig. 3 demonstrated that the solubility values obtained from the two methods at lower temperatures have smaller absolute deviations compared to those at higher temperatures. The percentage deviation at lower temperatures are however the highest (54%), compared with 13, 9, and 21% deviation at subsequent temperatures. At the lower limit, the solubility of anthraquinones in water is low, and therefore was subjected to measurement errors. The discrepancy observed at high temperature on the other hand could be attributed to clogging within the apparatus tubing, which was encountered in the dynamic system, and thus giving underestimated values for solubility. Thus, at higher temperature, more accurate determination of solubility can be obtained with a static system and these data were therefore used for model correlation discussed in the next section.

3.4. Solubility model approximation

Various approximation models for predicting the solubility of polycyclic aromatic hydrocarbon in subcritical water have been proposed [19,20]. To a zeroth approximation, the following model was proposed:

$$\ln x_2(T) \approx \frac{T_0}{T} \ln x_2(T_0) \quad (2)$$

in which x_2 is the mole-fraction of organic compound of interest in water and T_0 represents ambient temperature. As suggested by Miller and Clifford [19], the development of this equation assumes the Gibbs function for solution does not change over the temperature range and there is no absorption of water by the solute. Eq. (2) can be used to approximate mole fraction solubility at any temperature, T , from known mole fraction solubility at a particular temperature. Taken T_0 to be 398 K, our data for anthraquinones solubility from static method can be fitted reasonably well to the zeroth approximation as shown in Fig. 4.

However, when the validity of the model was checked by plotting $T \ln x_2(T) - T_0 \ln x_2(T_0)$ versus temperature, the difference deviates significantly from zero. To correct this, Miller and Clifford [19] proposed an improved approximation model by adding a cubic term, $15[(T/T_0) - 1]^3$, into the base equation, Eq. (2). The first approximation becomes:

$$\ln x_2(T) \approx \frac{T_0}{T} \ln x_2(T_0) + 15 \left[\frac{T}{T_0} - 1 \right]^3 \quad (3)$$

It should be noted that Eqs. (2) and (3) do not contain the information regarding the molecular structure of the solute. That is, the equations give the same value of solubility in subcritical water for all organic compounds, and may therefore be used in this study for predicting the solubility of anthraquinones in PHW. The values predicted by Eqs. (2) and (3) are shown in Table 1. Judging by the percentage deviation, Eq. (2) however

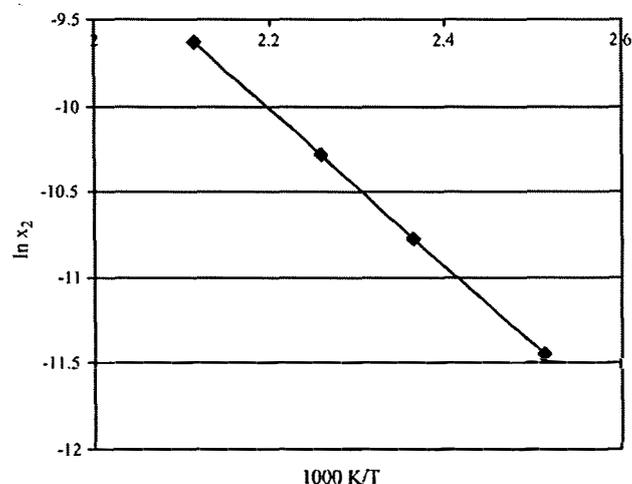


Fig. 4. Solubility data fitted to a zero-order approximation model.

gave better agreement with the experimental data than Eq. (3). Alternatively, based on the least square regression of equation to find a new parameter for Eq. (3), we propose an approximate equation in which the cubic term in Eq. (3) is replaced by $-1.624[(T/T_0) - 1]^3$ as:

$$\ln x_2(T) \approx \frac{T_0}{T} \ln x_2(T_0) - 1.624 \left[\frac{T}{T_0} - 1 \right]^3 \quad (4)$$

As shown in Table 1, closer approximation for solubility could be obtained with Eq. (4) than Eq. (3).

In addition, other approximation equation has been proposed, for instance, for the solubility of alkylbenzenes liquid organics in subcritical water [20]. The proposed equation contains an altered cubic term which takes the following form:

$$\ln x_2(T) \approx \frac{T_0}{T} \ln x_2(T_0) + 2 \left[\frac{T - T_0}{T_0} - 1 \right]^3 \quad (5)$$

Although Eq. (5) gave reasonable approximation of the data, when used to predict the experimental data for anthraquinones solubility however, it gave poor approximation. Thus, based on least square regression, we propose an approximate equation in which the cubic term in Eq. (5) was replaced by $-0.201[((T - T_0)/T_0) - 1]^3$ as

$$\ln x_2(T) \approx \frac{T_0}{T} \ln x_2(T_0) - 0.201 \left[\frac{T - T_0}{T_0} - 1 \right]^3 \quad (6)$$

Eq. (6) was found to give reasonable approximation of the anthraquinones solubility in PHW except at lower temperatures (Table 1). The calculation of the least square of the deviation indicates that of the five models, Eqs. (2) and (4) gave the closest approximation.

3.5. Extraction profiles of PHWE

The profiles of extraction were determined for the flow rate of 2, 3, 4, 5, and 6 mL min⁻¹ and for the temperatures of 150, 170, and 200 °C at the fixed pressure of 4 MPa. The results are plotted in Fig. 5, which shows that the rate of anthraquinones extracted increases with an increase in volumetric flow rate of up to 5 mL min⁻¹. This means that the extraction rate was influenced by external mass transfer only up to this flow rate. When the flow rate increases from 5 to 6 mL min⁻¹, the extraction process was no longer influenced by external mass transfer but might be limited by other factors such as intra-particle diffusion. The extraction profiles obtained in this study were similar to those found in Shotipruk et al. [15]. The present results however show more uniformity due to the different sample preparation used. The reason was that the preparation method used in the present study provides more uniformly distributed spherical sample, rather than non-uniform needle like the sample obtained in the previous study.

4. Conclusions

The results in this study suggest that organic solvent-free PHWE gave comparable amount and quality of the extracts, as

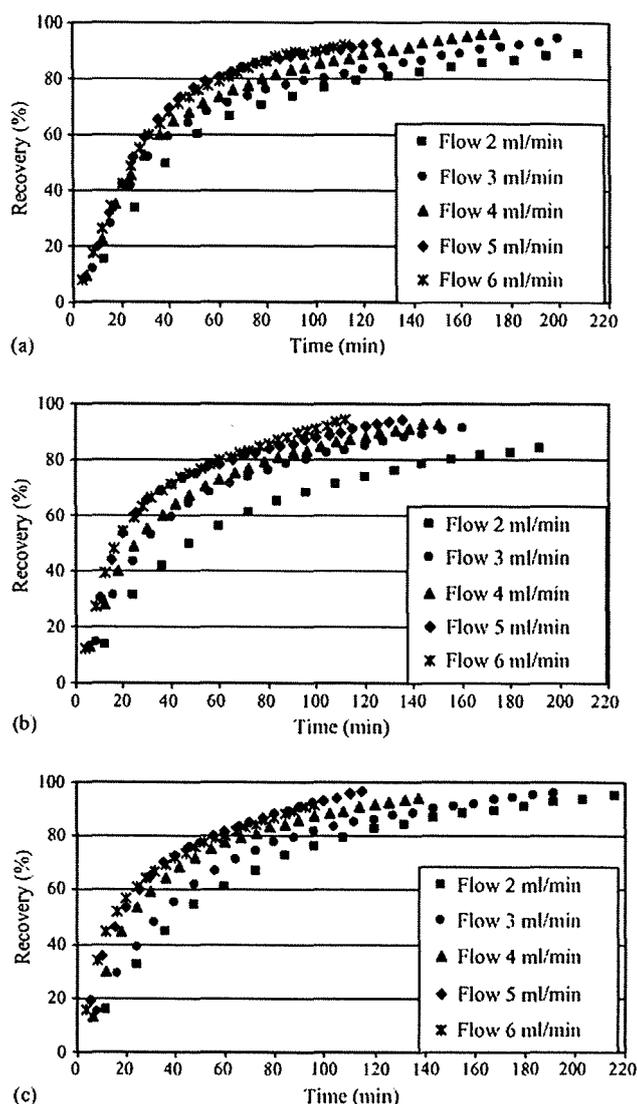


Fig. 5. Percent recovery vs. extraction time (a) 150 °C, (b) 170 °C, and (c) 200 °C.

determined from the antioxidant activity, compared with Soxhlet extraction. The method was found to be more effective than solvent extraction with magnetic stirrer, in which the extraction time required was longer. It is also more effective than UAE which gave the extract with lower antioxidant activity. In addition to the extraction experiments, the solubility of anthraquinones in PHW was determined and mathematical models were proposed to reasonably describe the experimental data. This provides useful information for the design of large scale production. In the future, attention would be focused on the scale-up of the extraction process and on the analysis of specific anthraquinone compounds in the extracts.

Acknowledgements

The author thanks Thailand Japan Technology Transfer Program and Thailand Research Funds for financial support.

References

- [1] M.Y. Wang, B.J. West, C.J. Jensen, D. Nowicki, C. Su, A.K. Palu, G. Anderson, *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol. Sin.* 23 1127–1141.
- [2] J. Koyama, I. Moritaa, K. Tagaharaa, O.T. Mukainakab, H. Tokudab, H. Nishinob, Inhibitory effects of anthraquinones and bianthraquinones, Epstein-Barr virus activation, *Cancer Lett.* 170 (2001) 179.
- [3] J.R. Taloua, M.C. Verbernea, R.A.B. Muljonoa, L.J.P. Tegelenc, B.G. Bernala, H.J.M. Linthorstb, G.J. Wullemsc, J.F. Bolb, R. Verpoortea, Isochorismate synthase transgenic expression in *Catharanthus roseus* cell suspensions, *Plant Physiol. Biochem.* 39 (2001) 595.
- [4] G. Loy, F. Cottiglia, D. Garau, D. Deidda, R. Pompei, L. Bonsignore, Chemical composition and cytotoxic and antimicrobial activity of *Calycotome villosa* (Poiret) Link leaves, *Il Farmaco.* 56 (2001) 433.
- [5] K.S. Babu, P.V. Srinivas, B. Praveen, K.H. Kishore, U.S. Murty, J.M. Rao, Antimicrobial constituents from the rhizomes of *Rheum emodi*, *Phytochemistry* 62 (2003) 203.
- [6] H. Sadeghi-Aliabadi, M. Tabarzadi, A. Zarghi, Synthesis and cytotoxic evaluation of two novel anthraquinone derivatives, *Il Farmaco.* (2004).
- [7] T. Hiramatsu, M. Imoto, T. Koyano, K. Umezawa, Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*, *Cancer Lett.* 73 (1993) 227.
- [8] Z.M. Zin, A. Abdul-Hamid, A. Osman, Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit, and leaf, *Food Chem.* 78 (2002) 2.
- [9] M.M. Jiménez-Carmona, J.L. Ubera, L.D. Castro, Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of majoram essential oil, *J. Chromatogr. A* 855 (2002) 625.
- [10] A. Kubátová, A.J.M. Lagadec, J.D. Miller, S.B. Hawthorne, Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water, *Flavor Fragr. J.* 16 (2001) 64.
- [11] R.G. Ayala, M.D.L. Castro, Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils, *Food Chem.* 75 (2001) 109.
- [12] M.H. Mannila, H. Kim, C.M. Wai, Supercritical carbon dioxide and high-pressure water extraction of bioactive compounds in St. John's wort, in: *Proceedings of Supergreen 2002*, Kyung Hee University, Korea, 2002.
- [13] J. Suomi, H. Sirén, K. Hartonen, M.L. Riekkola, Extraction of iridoid glycosides and their determination by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. A* 868 (2000) 73.
- [14] A. Kubátová, D.J. Miller, B.S. Hawthorne, Comparison of subcritical water and organic solvents for extracting kava lactones from kava root, *J. Chromatogr. A* 923 (2001) 187.
- [15] A. Shotipruk, J. Kiatsongserm, P. Pavasant, M. Goto, M. Sasaki, Subcritical water extraction of anthraquinones from the roots of *Morinda citrifolia*, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1872.
- [16] M.H. Zenk, H. El-Shagi, U. Schulte, Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*, *Planta Med. Suppl.* (1975) 79.
- [17] M. Ollanketo, A. Peltoketo, K. Hartonen, R. Hiltunen, M.L. Riekkola, Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts, *Eur. Food Res. Technol.* 215 (2002) 158.
- [18] M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 119.
- [19] D.J. Miller, A.A. Clifford, Solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcritical water from 298 to 498 K, *J. Chem. Eng. Data* 43 (1998) 1043.
- [20] J. Mathis, A.M. Gizir, Y. Yang, Solubility of alkylbenzenes and model for predicting the solubility of liquid organic in high-temperature water, *J. Chem. Eng. Data* 49 (2004) 1269.

Revised manuscripts

Microwave -Assisted Extraction of Antioxidative Anthraquinones from Roots of *Morinda citrifolia*

Surasak Hemwimon, Prasert Pavasant, and Artiwan Shotipruk*

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering,

Chulalongkorn University, Phayathai Rd, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

*To whom correspondence should be addressed: Artiwan Shotipruk, Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand Tel: 662-218-6868, Fax: 662-218-6877, Email: artiwan.s@chula.ac.th

Abstract

This study demonstrated promising results for microwave-assisted extraction (MAE) of antioxidant anthraquinones from roots of a medicinally important plant, *Morinda citrifolia*. The effects of temperature, ethanol compositions, and types of solvents on the percent recovery of the extract were determined. The extraction recovery and the antioxidant activity of the extract were compared with those of the extracts obtained from the conventional methods including ultrasound-assisted extraction (UAE). The percent recovery of anthraquinones was found to increase with increasing MAE time and temperature, and was highly dependent on the type of solvents used. Furthermore, the use of ethanol- water solution increased the yield of anthraquinones due to relative polarity and swelling of plant tissue matrix by water. To achieve the same recovery as with MAE, maceration, soxhlet extraction, and UAE require much longer time. In addition, the antioxidant activity of the MAE extracts was found to be the highest.

Key words: Microwave, extraction, *Morinda citrifolia*, anthraquinones, MAE

Introduction

Morinda citrifolia (Noni), a plant which grows prevalently in tropical region, has recently gained a great deal of interest by scientists and medical professionals due to the pharmaceutical values this plant offers. *Wang et al. (2002)* has recently published a review of Noni research, which summarizes the therapeutic effects of various compounds in this plant [1]. Traditionally, the roots of Noni plants were used by Polynesians to produce yellow or red dye, but more importantly, they are now known to contain medicinally active components, such as anthraquinones, which, due to its antioxidant activities, possess various therapeutic properties [2]. These include anti-bacterial, anti-viral, and anti-cancer activities as well as analgesic effects. This makes the compounds potentially useful in several medical applications [3-5]. Increasing number of studies is focusing on finding efficient methods for production and extraction of anthraquinones from these plants. Much of the literature found involves production of the compound in root culture of *Morinda citrifolia* [6-8]. Nevertheless, extraction of anthraquinones directly from plant roots is still more widely conducted and is conventionally performed by solvent extraction. Other techniques which include supercritical carbon dioxide extraction, subcritical water extraction, ultrasonic assisted extraction (UAE), and microwave assisted extraction (MAE) have also become of interest as alternatives for the conventional methods. Among these, MAE is the simplest and the most economical technique for extraction of many plant derived compounds [9].

The enhancement of product recovery by microwave is generally attributed to its heating effect, which occurs due to the dipole rotation of the solvent in the microwave field. This causes the solvent temperature to rise, which then increases the solubility of the

compound of interest. Specifically, solvent heating by microwave occurs when molecules of the polar solvent could not align themselves quickly enough to the high frequency electric field (typically 2450 MHz) of microwave. This discrepancy causes the solvent molecules to dissipate the absorbed energy in the form of heat.

Although many reports have been published on application of microwave heating for extraction of organic compounds from environmental matrices [10-11], microwave has only recently been applied to extraction of plant materials [12-15]. Some examples of these are extractions of glycyrrhizic from the licorice root, ginsenoside from ginseng root, artemisinin from *Artemisia annua* L [14-16]. Recently, Dabiri et al. (2005) reported their investigation on optimization of MAE of alizarin and purpurin from the roots of madder plants, a similar plant to *Morinda citrifolia* belonging to the Rubiaceae species [17]. In their work, the emphasis was placed on extraction of pigment compounds from the plant roots. In the present study, MAE of *Morinda citrifolia* roots was carried out, in which the biological activity of the extract as well as the amount of anthraquinones in the extract was concerned. Firstly, the effects of MAE time, temperature, types of solvents, and solvent compositions were determined on the percent extraction of anthraquinones. The extraction efficiency obtained with MAE was then compared with that from conventional methods such as maceration, soxhlet extraction, as well as UAE. Lastly, the antioxidant activities of the extracts obtained from various methods were compared.

Materials and Methods

Preparation of plant materials and conventional solvent extraction

Fresh roots of *Morinda citrifolia* were harvested, washed, and ground in liquid nitrogen to an average size of 0.2 mm in diameter. The ground samples were oven dried at 45 °C and kept in a dry place until use.

Two methods of conventional solvent extractions were used in this study: maceration and soxhlet extraction. In maceration, 0.1g of *Morinda citrifolia* was extracted in 10 ml of organic solvent in a 125 ml flask at 25 °C and 60 °C. The extract was then filtered with a filter paper (Whatman, no.1, USA). The concentration of anthraquinones was measured by a spectrophotometer. For solvent extraction using soxhlet apparatus, 2 g of root sample was placed into a thimble with 200 ml of solvent (ethanol) contained in a 250 ml round-bottom flask. Extraction was carried out for up to 4 hours.

UAE

For the UAE experiments, an ultrasonic bath was used as an ultrasound source. The bath, 275DAE (Crest Ultrasonics, USA), was basically a rectangular container (23.5 cm × 13.3 cm × 10.2 cm), to which two 38.5 kHz transducers were annealed at the bottom, and the bath power rating was 270 W. Extraction was carried out at the power setting of 3 which was measured to be 15.7 W with a wattmeter energy check 3000 (Votcraft, Germany). The extraction of anthraquinones was performed by adding 0.1 g of ground dried roots into 10 ml of solvent in a 28 ml tube. The tube was then partially immersed into the ultrasonic bath, which contains 2.2 L of water. The bottom of the flask was approximately 5 cm above the bottom of the bath. The solvent surface in the flask was kept at the level of the water in the ultrasonic bath. Extraction was conducted for up to 60 min at 60 °C. Water in the ultrasonic bath was circulated to control the temperature and to avoid the water temperature to rise, as a result of ultrasonic exposure.

MAE

MAE experiment were performed on a MARS 5 (1200 W, 2450 MHz), microwave accelerated reaction system from CEM corp. (Mathews, NC, USA) equipped with

twelve 100 ml closed PEEK vessels covered with special TFM sleeves. The extraction of anthraquinones was conducted by adding 0.1 g of ground dried roots into 10 ml of solvent in three of the vessels. The vessels were placed symmetrically in the microwave field. For all experiments, 60% of power output (60% of 1200 W) was used and the ramping time for all extraction runs was 2 minutes. Experiments were carried out to determine the effect of irradiation time, composition of solvent (ethanol:water), type of solvent, and temperature on MAE efficiency. The ranges of the variables studied are listed in Table 1. After microwave irradiation, the solution was filtered through a filter paper (Whatman, no.1, USA). The anthraquinones concentration was measured by a spectrophotometer.

To determine the percent recovery, the sample residue after each extraction was extracted repeatedly in three 10-ml volumes of ethanol or extracted until the extract was clear. The sum of the amount of anthraquinones extracted by each extraction procedure (UAE, MAE, or Soxhlet), and that remained after each extraction account for the total anthraquinones in the root samples (100%). The percent recovery was determined from the fraction of anthraquinones in the root samples that was extracted.

Measurement of anthraquinones concentration

The analysis method for determining the amount of anthraquinones was modified from that described by Zenk et al [7]. The concentrations of these solutions were analyzed spectrophotometrically (Genesys 20, USA) by measuring the absorbance at 435 nm, with Alizarin or 1, 2 dihydroxyanthraquinone as a standard.

Antioxidant activity measurement

Antioxidant activities of anthraquinones extracts obtained using UAE, MAE, and classical extraction methods were tested and compared by measuring the ability of the extracts to scavenge the free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) *in vitro*. The assay method was modified from that described in *Ollanketo et al.* [18]. For the purpose of comparing the antioxidant activity in various extracts, concentration of sample producing 50% reduction of the radical absorbance (IC₅₀) was used as an index. To find this value, the extract was diluted in series with ethanol and 2 ml of each diluted extract was added to 2 ml of 110 μM DDPH solution. The solutions were mixed using a vortex and the mixture was then incubated for 2 hours in darkness at room temperature, after which the absorbance was measured at the wavelength of 517 nm using ethanol as a reference.

IC₅₀ can be found from a plot of percent in inhibition (PI) versus the concentration of anthraquinones. The values of PI can be calculated using the following equation:

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

in which A_t and A_r are absorbance of test sample and absorbance of the DPPH reference, respectively.

Results and discussion

Effect of extraction times

Figure 1 shows the extraction profiles for MAE in comparison with other extraction methods such as maceration and UAE. As expected, the yield of anthraquinones obtained using MAE increased with increasing times of extraction. When compared with maceration conducted at 25 °C, MAE gave considerably higher percent recovery due to the heating effect. More importantly, when compared with maceration at 60 °C, MAE still resulted in

higher percent recovery after the same 60 minute extraction time. Although the solvent temperature employed in both cases was the same, microwave heating occurred at much faster rate. Because heating is known to affect the morphological changes in the plant sample matrix and thus enhances product mass transfer, faster heating in MAE should therefore be responsible for increased mass transfer, and thus anthraquinones release rate observed. Thus, in MAE, the effects of higher heating and mass transfer rates synergistically increase the reate of anthraquinones extraction. When MAE was compared with UAE (at 60 °C) in which mass transfer was enhanced by cavitational effect, MAE yet resulted in higher initial rate of extraction. The percent recoveries of the product for both methods however approached the same value after about 18 minutes. For maceration, on the other hand, one would expect to obtain the same recovery at much longer time period due to the mass transfer limitation in this system compared to MAE and UAE. The result here presented clear a advantage of MAE in shortening the time of extraction. The quality of the extract measured in terms of antioxidant activity will later be discussed.

Effect of extraction temperatures

Generally, the higher extracting temperature is profitable for extraction due to the increased solubility. In a closed microwave vessel used in this study, the temperature of the solvent could be increased above the boiling point temperature. As a result, the solubility of anthraquinones could greatly be enhanced. The effect of extraction temperature is shown in Figure 2 which clearly demonstrates that increasing the temperature of the solvent from 60 to 120 °C significantly increases the extraction efficiency. This is because higher temperature causes intermolecular interactions within the solvent to decrease, giving rise to higher molecular motion, and causing the solubility to increase. Moreover, at

high temperature, solvent viscosity decreases and the diffusivity increases, thus the efficiency of extraction increases [14, 19].

Effect of solvent type

The effect of the type of solvents on extraction efficiency of MAE was determined at 60 ° C. The percent anthraquinones recovery after 15 minutes of MAE was compared. The results in Figure 3, plotted together with those from maceration experiments (45 minutes of extraction times), demonstrate that methanol gave the highest extraction efficiency for MAE, followed by acetone, acetonitrile, and ethanol. As seen in this figure, solvents behave differently in MAE and in conventional extraction. In maceration without microwave irradiation, the extractability of different solvents depends mainly on the solubility of the compound in the solvent, the mass transfer kinetics of the product, and the strength of the solute/matrix interactions. Under the influence of microwave, heating rate plays an important role in extraction efficiency. Thus the success of MAE is also determined by the two other parameters defining the dielectric properties of the solvent. The first is dielectric constant, or relative permittivity, ϵ' . This parameter describes polarizability of the molecule to an electric field. It is a measure of the ability of a material to store electromagnetic radiation. The second parameter is the dielectric loss factor, ϵ'' , which measures the efficiency in which the absorbed microwave energy can be converted into heat inside a material when an electric field is applied. It is generally known that the solvent that heats up rapidly under microwave radiation typically have high dielectric constant and dielectric loss constant, δ , which is expressed mathematically by

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

The values for dielectric constants, dielectric loss constants, and dissipation factors for the solvents tested in this study are listed in Table 2 [20]. Methanol has relatively high dielectric constant and the highest dissipation factor, which means that it could absorb much of the microwave energy and transform it into heat better than the other solvents. Therefore, as was expected, the rate of microwave heating of methanol was the highest, and thus resulting in the highest extraction efficiency. Acetonitrile, on the other hand, despite its higher dielectric constant than methanol, the dissipation factor of the solvent is the lowest, the rate of heating and extraction efficiency was thus found to be relatively low. The results presented in Figure 3 also show that MAE of anthraquinones in acetone resulted in rather high extraction efficiency. Compared with ethanol, the solvent has comparable dielectric constant but has more than twice higher dissipation factor, thus acetone is expected to be more effective MAE solvent than ethanol.

From the above finding, although methanol was shown to give the highest extraction efficiency, it is highly toxic and is not practical for use in food and pharmaceutical processing. And although acetone and acetonitrile gave higher extraction MAE efficiency than ethanol, ethanol is often more preferred in practice due to its several advantages, such as being derived from natural sources and having lower cost. For these reasons, ethanol was chosen for subsequent investigation to determine the effect of different solvent to water composition on the efficiency of microwave extraction [21].

Effect of ethanol-water compositions

The effect of ethanol-water composition on percent recovery of anthraquinones is demonstrated in Figure 4 for MAE at 60 °C. From these results, it can be noted that the use of microwave clearly enhanced the product recovery across all compositions of solvents used. This was due to the increase in extraction temperature which is the key advantages of

MAE. MAE in 80% ethanol in water was found to give the highest percent recovery after 15 minutes of extraction, followed by 50% ethanolic solution. In both cases, more than 90% anthraquinones could be extracted within only 15 minutes. From these results, it is clear that the addition of some amount of water enhances the extraction efficiency. One possible reason for the increased efficiency with a presence of some water might be due to the increase in swelling of plant material by water, which increased the contact surface area between the plant matrix and the solvent [13, 21-22].

Another reasonable explanation could be due to the change in relative polarity of anthraquinones [13, 23]. The values for polarity index of a mixture of two solvents, P_m , can be calculated from the following equation [24]:

$$P_m = \phi_1 P_1 + \phi_2 P_2 \quad (3)$$

where ϕ_1 and ϕ_2 are the volume fractions of solvent 1, and solvent 2, respectively, and P_1 and P_2 are polarity indices of solvent 1 and solvent 2 respectively. The polarity indices of ethanol-water mixtures calculated from this equation are shown in Table 3, which indicate that the increase water content increases the polarity index of the mixture. This along with the extraction results in Figure 4 suggested that a certain degree of increase in the solvent polarity (up to 50 % water) could enhance the solubility of anthraquinones in the mixture. Furthermore, by addition of some amount of water, the mixture dielectric constants increase. This helps absorb microwave energy, thus increasing the extraction efficiency. The dielectric constant of a mixed solvent, ϵ_m , can generally be calculated from the following equation:

$$\epsilon_m^{1/3} = \sum (\phi_i) \times \epsilon_i^{1/3} \quad (4)$$

where ϕ_i is the volume fraction of i solvent and ϵ_i is the dielectric constant of i^{th} solvent [16]. The values of dielectric constants for various mixture compositions are also shown in

Table 3. It should be noted that although the addition of water into ethanol increases the mixture dielectric constant, the dissipation factor decreases. This means that although the solvent mixture is able to absorb high microwave energy compared to pure ethanol as a result of increased dielectric constant, the mixture would not be able to dissipate the heat as effectively. Based on this line of reasoning, there appears to be an optimal solvent composition for MAE. As found in this investigation, in a mixture with too high water content, i.e. 20% ethanolic solution, the extraction efficiency was low and unfavorable. It is, nevertheless, interesting to note here that, unlike maceration where lower recovery was obtained with 20 % ethanolic solution compared to that with pure ethanol, MAE with 20% ethanolic solution gave higher recovery. A possible reason for this could be due to the effect of microwave heating of the solvent within the plant matrix which caused the product to release more readily. In addition, high temperature may have given rise to structural changes in the plant matrix, which further increase the product mass transfer.

Comparison of MAE with classical methods

The efficiency of extraction using UAE and MAE was compared with that of the other classical methods. Table 4 summarizes these results. At the extraction temperature of 60 °C, UAE and MAE with pure ethanol for 30 min gave comparable recovery (approximately 65%). This was also comparable to that resulted from a 3 day maceration in pure ethanol at room temperature. Clearly, these findings demonstrate that UAE and MAE are promising extraction methods that offer improved efficiency by reducing the time required for extraction. When consider Soxhlet extraction for 4 hours in ethanol however, the results show that the method was able to give higher yields than UAE and MAE at 60 °C. The reason for this was due to the fact that Soxhlet extraction was carried out at the temperature closed to the boiling point of ethanol, and the plant tissues were

continuously extracted with the fresh condensed solvent for extended time period. UAE and MAE on the other hand were conducted in a batch system. Nevertheless, ethanol-water mixture enhances the percent recovery to up to approximately 96%, which was comparable to using soxhlet extraction in pure ethanol. At the same temperature, UAE and MAE gave comparable recovery percentage.

Antioxidant activity

Antioxidant activity of the extracts obtained by various methods are tested and compared using 1,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals. The reduction of the DPPH absorbance at 517 nm after 2 hour incubation with the sample in darkness was measured. For the purpose of comparing the antioxidant activity in various extracts, concentration of sample producing 50% reduction of the radical absorbance (IC_{50}) was used as an index. The IC_{50} values for various extracts are shown in Figure 5.

The results show that extracts obtained from MAE had higher antioxidant activity than those from UAE and maceration, and have comparable activity to that obtained by Soxhlet extraction. Lower activity of the maceration extract could be resulted from extended extraction time, hence exposure to unfavorable conditions such as light and oxygen. Although UAE did not require long extraction time, it is commonly known that ultrasonication could induce free radicals formation within the liquid medium, thus causing oxidation and degradation of the anthraquinones.

Conclusions

MAE gives the highest yields while requiring the shortest extraction times when compare with the other methods. The main mechanism for enhanced recovery of anthraquinones with MAE was the dipole rotation of the polar solvent in the microwave

field, which was highly influenced by the solvent dielectric constant and dissipation factor. The appropriate condition for MAE was extraction with 80% ethanol, at the extraction temperature of 60°C, and extraction times of 30 minutes. The antioxidant activity of the extracts obtained with Soxhlet extraction and MAE was found to be the highest, compared with those obtained with maceration and UAE. These results demonstrate the potential for new MAE to extract the antioxidative compounds, anthraquinones, from the roots of *Morinda citrifolia*.

Acknowledgements

The authors greatly appreciate Mr. Jesada Pitiphanpong for assistance in preparing the manuscript and Thailand Research Fund and the Commission of Higher Education for financial support.

References

- [1] M.Y. Wang, B. J. West, C.J. Jensen, *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research, *Acta Pharmaco. Sin.* 23 (2002) 1127-1141.
- [2] Z.M. Zin, A. Abdul-Hamid, A. Osman, Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit, and leaf, *Food Chem.* 78 (2002) 277-231.
- [3] T. Hiramatsu, M. Imoto, T. Koyano, K. Umezawa, Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*, *Cancer Lett.* 73 (1993) 161-166.
- [4] A.Y. Asahina, J.S.M Ebesu, D. Ichinotsubo, J. Tongson, Y. Hokoma, Effect of okadaic acid (OA) and Noni fruit extraction in the synthesis of tumor necrosis factor- α (TNF- α) by peripheral blood mononuclear (PBN) cells *in vitro*. In *Proc. Int. Symp. of Ciguatera and Marine Natural Products*, pp 197-205 (1994).

- [5] J.P. Farine, L. Legal, B. Moreteau, J.L.L. Quere, Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*, *Phytochem.* 41 (1996) 433-438.
- [6] L. Bassetti, J. Tramper, Increased anthraquinone production by *Morinda citrifolia* in a two-phase system with Pluronic F-68, *Enzyme Microb. Technol.* 17 (1994) 353–358.
- [7] M.H. Zenk, H. El-Shagi, U. Schulte, Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*, *Planta Med. Suppl.* (1975) 79–101.
- [8] L. Bassetti, M. Hagendoorn, J. Tramper, Surfactant induced non-lethal release of anthraquinones from suspension cultures of *Morinda citrifolia*, *J. Biotechnol.* 39 (1995) 149–155.
- [9] F. Zhang, B. Chen, S. Xiao, S. Yao, Optimization and comparison of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. *Sep. Purif. Technol.* 42 (2005) 283–290.
- [10] M. Al-Harashseh, S.W. Kingman, Microwave-assisted leaching—a review, *Hydrometallurgy* 73 (2004) 189-203.
- [11] R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 219-26.
- [12] X. Pan, G. Niu, H. Liu, Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves, *Chem. Eng. Process* 42 (2003) 129-133.
- [13] H. Li, C. Bo, Z. Zhang, S. Yao, Focused microwave-assisted solvent extraction and HPLC determination of effective constituents in *Eucommia ulmoides Oliv.* (*E. ulmoides*), *Talanta* 63 (2004) 659-665.
- [14] X. Pan, H. Liu, G. Jia, Y.Y. Shu, Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root, *Biochem. Eng. J.* 5 (2000) 173-177.

- [15] Y.Y. Shu, M.Y. Ko, Chang YS, Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root, *Microchem. J.* 74 (2003) 131-139.
- [16] J. Hao, W. Han, S.D. Huang, B.Y. Xue, X. Deng, Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L, *Sep. Purif. Technol.* 28 (2002) 191–196.
- [17] M. Dabiri, S. Salimi, A. Ghassempour, A. Rassouli, M. Talebi, Optimization of microwave-assisted extraction for alizarin and purpurin in Rubiaceae plants and its comparison with conventional extraction methods, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 387-396.
- [18] M. Ollanketo, A. Peltoketo, K. Hartonen, R. Hiltunen, M.L. Riekkola, Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts, *Eur. Food. Res. Technol.* 215 (2002) 158-163.
- [19] V. Camel, Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 229–248.
- [20] A. Zlotorzynski, The application of microwave radiation of analytical and environmental chemistry, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 25 (1995), 43-75.
- [21] Z. Guo, Q. Jin, G. Fan, Y. Duan, C. Qin, M. Wen, Microwave-assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*, *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 41–47.
- [22] M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso, Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 119-128.
- [23] Pan X, Niu G and Liu H, Microwave-assisted extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza bunge* with analysis by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogra. A* 922 (2001) 371-375.
- [24] CRC Handbook of Chemistry and Physics 73rd Ed (Ed. D. R. Lide) 1992 (CRC Press: Boca Raton, FL).

Table Captions

Table 1 Ranges of experimental variables.

Table 2 Dielectric constants and dissipation factors of different solvents [20].

Table 3 Polarity indices and dielectric constants of ethanol mixtures [24].

Table 4 Comparison of percent recovery and extraction time for different extraction methods.

Table 1

Variables	Ranges
Temperature (°C)	60, 80, 100, 120
Holding times	5, 10, 15, 20, 30
Types of solvent	EtOH, acetone, MeOH, acetonitrile
Compositions (water:EtOH)	20%, 50%, 80%

Table 2

Type of solvents	ϵ^a (F/m)	ϵ''^b	$\tan \delta^b$
Acetone	20.7	11.5	0.5555
Methanol	32.6	15.2	0.6400
Ethanol	24.3	6.1	0.2286
Acetonitrile	37.5	2.3	0.0620
Water	78.9	12	0.1500

^a Determined at 20 ° C

^b at 2450 MHz

Table 3

Percent Ethanol	Polarity index ^a	ϵ^b
100%	5.2	24.3
80%	5.96	32.13
50%	7.1	46.76
20%	8.24	65.27

a calculated from Equation (3)

b calculated from Equation (4), using values of ϵ from Table 2

Table 4

Extraction methods	Time	Temperature	Type of solvent	Recovery (%)
Maceration	60 min	60 °C	Ethanol	52.20±0.40
Maceration	60 min	Ambient	Ethanol	38.12±0.23
Maceration	3 days	Ambient	Ethanol	63.33 ± 2.73
Soxhlet	4 h	Boiling point	Ethanol	97.74 ± 0.31
UAE	60 min	60 °C	Ethanol	62.23 ± 0.48
MAE	30 min	60 °C	Ethanol	65.88 ± 0.60
MAE	15 min	60 °C	Ethanol:water (80:20)	95.91 ± 0.72

Figure captions

Figure 1 Effect of extraction times of maceration, UAE, and MAE on extraction efficiency.

Figure 2 Effect of extraction temperature of MAE.

Figure 3 Effect of solvent types on extraction efficiency of 15 min MAE at 60 °C and 45 min maceration at 25 °C.

Figure 4 Effect of ethanol compositions on extraction efficiency of MAE at 60 °C at 15 minutes.

Figure 5 Antioxidant activities of extracts obtained by various extraction methods.

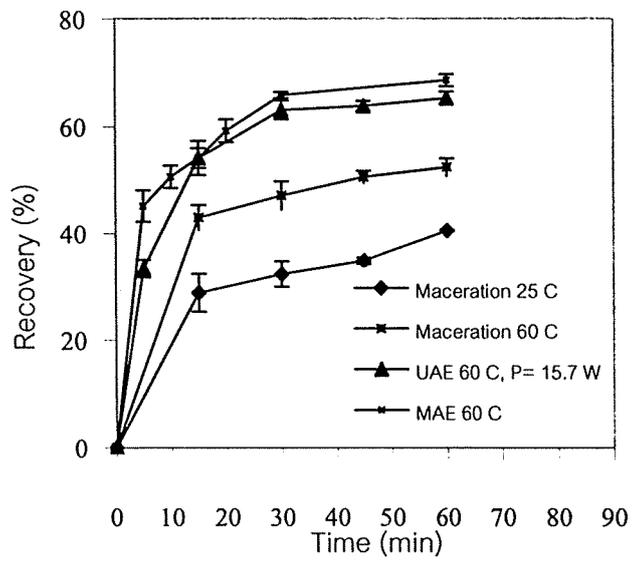


Figure 1

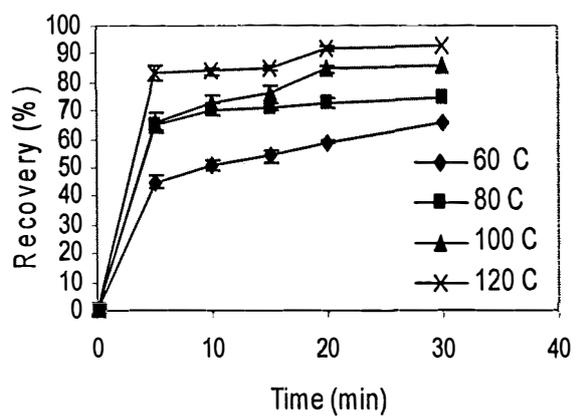


Figure 2

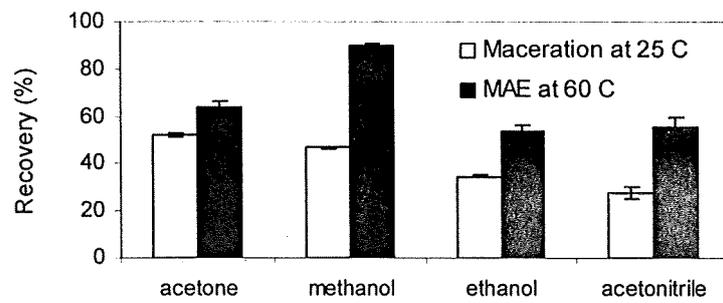


Figure 3

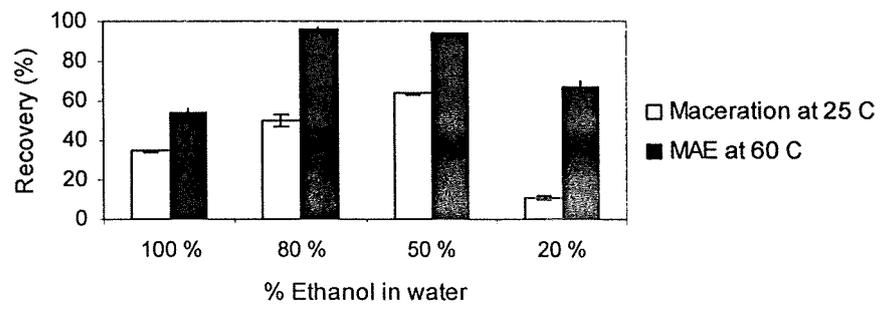


Figure 4

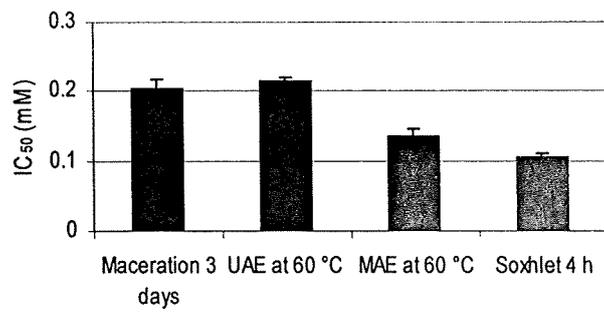


Figure 5