



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ นวัตกรรมสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด

Pharmaceutical-grade, high-throughput, continuous medicinal herbs extraction combining liquefied butane and supercritical carbon dioxide technologies

ดร.อาณัติ ตีพัฒนา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 59332 (711E93E0)

สัญญาเลขที่ 5.8/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการนวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทาง

เภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด

Pharmaceutical-grade, high-throughput, continuous medicinal herbs extraction combining

liquefied butane and supercritical carbon dioxide technologies

ดร.อาณัติ ดีพัฒนา

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปี
งบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา
5.8/2562

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า ดร.อาณัติ ดีพัฒนา ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) โครงการนวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด (ภาษาอังกฤษ) Pharmaceutical-grade, high-throughput, continuous medicinal herbs extraction combining liquefied butane and supercritical carbon dioxide technologies รหัสโครงการ 59332 (711E93E0) / สัญญาเลขที่ 5.8/2562 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 2,742,400 บาท (สองล้านเจ็ดแสนสี่หมื่นสองพันสี่ร้อยบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 2 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2561 – วันที่ 30 กันยายน 2563)

นวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด คณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาระบบการสกัดด้วยของไหลภายใต้สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤต (Subcritical Extraction) กระบวนการสกัดที่พัฒนาขึ้นสามารถแก้ไขปัญหาในการสกัดวัตถุดิบที่มีความอ่อนตัว เน่าเสียได้ง่าย ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ได้นำเสนอแนวทางการสกัดดอกมะลิสดจากสวนมะลิปลอดสาร โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพในด้านปริมาณฟีนอลรวมฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากดอกมะลิสดในส่วนที่ละลายน้ำมันมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากดอกมะลิสดในส่วนที่ละลายน้ำ ในโครงการวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือจาก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ในการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องสกัดจากกัญชาและกัญชง โดยได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดที่แตกต่างกันรวมถึงการเตรียมตัวอย่างกัญชากัญชงก่อนการสกัดส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโทรเมตรี พบว่า สารสกัดหยาบจากกัญชาตากแห้งเมื่อสกัดด้วย R22 มีปริมาณ CBD CBC THC CBN น้อยกว่าการสกัดด้วย Soxhlet เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาการสกัดพบว่าการสกัดด้วย Soxhlet ใช้ระยะเวลาสกัด 40 ชั่วโมง ในขณะที่การสกัดด้วย R22 ใช้ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง ดังนั้นวิธีการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยของไหลภายใต้สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤต โดย R22 และ R134a เป็นทางเลือกในการสกัดสารสกัดหยาบจากวัตถุดิบที่แตกต่างกัน ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่พัฒนาขึ้นโดยคนไทย ลดการพึ่งพาเทคโนโลยีหรือการนำเข้าเครื่องมือเครื่องจักรจากต่างประเทศ อีกทั้งระบบที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นในโครงการจะช่วยลดการใช้ตัวทำละลายที่มีการใช้กระบวนการสกัดโดยทั่วไป

บทคัดย่อ

นวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด คณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาระบบการสกัดด้วยของไหลภายใต้สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤต (Subcritical Extraction) กระบวนการสกัดที่พัฒนาขึ้นสามารถแก้ไขปัญหาในการสกัดวัตถุดิบสดที่มีความอ่อนตัว ง่ายเสียได้ง่าย ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ได้นำเสนอแนวทางการสกัดดอกมะลิสตจากสวนมะลิปลอดสาร โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพในด้านปริมาณพินอลรวม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากดอกมะลิสตในส่วนที่ละลายน้ำมันมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณพินอลรวมและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากดอกมะลิสตในส่วนที่ละลายน้ำ ในโครงการวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือจาก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ในการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องสกัดจากกัญชาและกัญชง โดยได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดที่แตกต่างกันรวมถึงการเตรียมตัวอย่างกัญชากัญชงก่อนการสกัดส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน จากผลการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีโดยโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโทรเมทรี พบว่า สารสกัดหยาบจากกัญชาดกแห้งเมื่อสกัดด้วย R22 มีปริมาณ CBD CBC THC CBN น้อยกว่าการสกัดด้วย Soxhlet เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาการสกัดพบว่าการสกัดด้วย Soxhlet ใช้ระยะเวลาสกัด 40 ชั่วโมง ในขณะที่การสกัดด้วย R22 ใช้ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง ดังนั้นวิธีการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยของไหลภายใต้สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤต โดย R22 และ R134a เป็นทางเลือกในการสกัดสารสกัดหยาบจากวัตถุดิบที่แตกต่างกัน ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่พัฒนาขึ้นโดยคนไทย ลดการพึ่งพาเทคโนโลยีหรือการนำเข้าเครื่องมือเครื่องจักรจากต่างประเทศ อีกทั้งระบบที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นในโครงการจะช่วยลดการใช้ตัวทำละลายที่มีการใช้กระบวนการสกัดโดยทั่วไป

คำสำคัญ: ระบบการสกัดด้วยของไหลภายใต้สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤต, ดอกมะลิสต, กัญชา, กัญชง, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Abstract

This research demonstrates the novel semi-continuous extraction technology from local medicinal herbs using subcritical extraction combined. The subcritical extraction works reasonably well with delicate raw material such as organic fresh jasmine from a local farm in Thailand. The extract properties were evaluated from total phenolic contents, antioxidant properties and antimicrobial properties. Oil-soluble extract had better total phenolic contents, antioxidant properties and antimicrobial properties than water-soluble extract. This project was also supported by Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai to study the extractor with marihuana and hemp for the relation between preparation process and extraction process with amount of yield. Chemical compounds in extracts were examined by a Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). It was found that CBD CBC THC CBN in crude extract from dry marihuana and hemp was slightly less than conventional soxhlet extract. However, in conventional extraction process with solvent could take up to 40 hours, while R22 extraction process required only 3 hours. Therefore, extraction process from subcritical R22 and subcritical R134a would be alternative extraction techniques that could reduce amount of solvent used in extraction process and did not require complicated machines from other countries.

Keywords: Subcritical fluid extraction system, Fresh jasmine, Marihuana, Hemp, Antioxidant Property and Antimicrobial Property

สารบัญเรื่อง

| | หน้า |
|---|------|
| กิตติกรรมประกาศ | I |
| บทสรุปสำหรับผู้บริหาร | II |
| บทคัดย่อ | III |
| สารบัญเรื่อง | V |
| สารบัญตาราง | VI |
| สารบัญรูป | VIII |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย | |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | |
| 1.3 ขอบเขตงานวิจัย | |
| บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา | 5 |
| 2.1 พีชสมุนไพร | |
| 2.2 การสกัดพีชสมุนไพร (herbal extraction) | |
| 2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | |
| บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงาน | 18 |
| 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ | |
| 3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ | |
| 3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของระบบที่พัฒนาขึ้น | |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ | 31 |
| 4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกมะลิสด | |
| 4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการสกัดสารสกัดหยาบจากกัญชงและกัญชา | |
| 4.3 การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่นักวิจัยและผู้สนใจ | |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง | 49 |
| ผลผลิต (output) | 50 |
| เอกสารอ้างอิง | 51 |
| ภาคผนวก (Appendix) | 57 |
| ประวัติคณะผู้วิจัย | 61 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 2.1 แสดงมูลค่าการส่งออกสินค้าที่สำคัญของไทย | 6 |
| ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติวิกฤตของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (Critical property data) | 13 |
| ตารางที่ 4.1.1 แสดงลักษณะของวัตถุดิบ สารสกัดหยาบ ปริมาณน้ำมัน ของลักษณะตัวอย่างมะลิสต์ที่แตกต่างกัน โดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a | 33 |
| ตารางที่ 4.1.2 ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบดอกมะลิสต์โดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a | 36 |
| ตารางที่ 4.1.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลทรีย์ ด้วยวิธี Disk Diffusion | 38 |
| ตารางที่ 4.2.1 แสดงปริมาณสารสกัดหยาบ ปริมาณสารสำคัญของตัวอย่างกัญชาและกัญชง ด้วยเทคนิคการสกัดที่แตกต่างกัน | 41 |
| ตารางที่ 4.2.2 ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบกัญชาและกัญชงโดยใช้เทคนิคการสกัดที่แตกต่างกัน | 45 |
| ตารางที่ 4.2.3 แสดงองค์ประกอบทางเคมีเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) | 46 |
| ตารางที่ A1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากดอกมะลิสต์ด้วยเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH | 58 |
| ตารางที่ A2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากดอกมะลิสต์ด้วยเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP | 58 |
| ตารางที่ A3 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากดอกมะลิสต์ด้วยเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH | 59 |
| ตารางที่ A4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากกัญชาและกัญชงด้วยเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a, R22 และเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH | 59 |
| ตารางที่ A5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากกัญชาและกัญชงด้วยเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a, R22 และเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP | 60 |

ตารางที่ A6 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากกัญชาและกัญชงด้วยเทคนิคการสกัด โดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a, R22 และเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด

สารบัญรูปภาพ

| | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 2.1 Soxhlet extraction | 8 |
| รูปที่ 2.2 Percolation | 8 |
| รูปที่ 2.3 แสดงแผนภาพระบบการสกัดด้วยตัวทำละลายความดันสูง (Pressurized solvent extraction, PSE) (1: Nitrogen tank, 2: Pressure vessel, 3: Valves, 4: Oven, 5: Extraction cell with filters, 6: Collector flask, 7: Manometer) | 9 |
| รูปที่ 2.4 แสดงคุณสมบัติเปรียบเทียบความหนาแน่นระหว่างของแข็ง ของเหลว ไอ และของไหลวิกฤตยิ่งยวด | 12 |
| รูปที่ 2.5A แสดงเฟสไดอะแกรมและสภาวะวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์ | 14 |
| รูปที่ 2.5B แสดงลักษณะสภาวะวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด โดยที่คาร์บอนไดออกไซด์ในภาพ | 14 |
| รูปที่ 2.6 แสดงแผนภาพการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดแบบกะ | 15 |
| รูปที่ 2.7 แสดงแผนภาพการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดแบบต่อเนื่อง | 15 |
| รูปที่ 2.8 แสดงแผนภาพระบบการสกัดโดยใช้เทคนิคของไหลวิกฤตยิ่งยวดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ | 16 |
| รูปที่ 3.1 ดอกมะลิสดปลอดสารจากสวนนครชัยศรี | 18 |
| รูปที่ 3.2 ตัวอย่างกัญชงก่อนการสกัด กัญชงอบแห้ง (ก) กัญชงอบแห้งแบบรวดเร็ว (ข) และกัญชงสด (ค) | 18 |
| รูปที่ 3.3 ตัวอย่างกัญชาอบแห้ง | 18 |
| รูปที่ 3.4 แสดงปฏิกิริยาของความสามารถการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบ [Fe(III) – (TPTZ) ₂] ³⁺ เปลี่ยนเป็นสารประกอบ [Fe(II) – (TPTZ) ₂] ²⁺ (Karina et.al., 2018) สารที่มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเท่ากับมีความสามารถในการรีดิวซ์ FRAP หรือสามารถสังเกตได้จากการการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 nm | 23 |
| รูปที่ 3.5 กลไกของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำปฏิกิริยากับอนุมูล DPPH | 26 |
| รูปที่ 3.6 การวางตำแหน่ง Disc สำหรับทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ โดย Disk Diffusion Assay | 30 |
| รูปที่ 4.1.1 สารสกัดหยาบจากดอกมะลิสดเมื่อทำการสกัดด้วยเทคโนโลยีการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด | 32 |
| รูปที่ 4.1.2 ดอกมะลิหลังสกัด ตำแหน่งวงกลมสีด้ายคงมีน้ำมันหอมระเหยอยู่ | 33 |
| รูปที่ 4.1.3 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบดอกมะลิ | 35 |
| รูปที่ 4.1.4 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบดอกมะลิเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP | 35 |

| | |
|--|----|
| รูปที่ 4.1.5 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาดดอกมะลิเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH | 36 |
| รูปที่ 4.2.1 แสดงลักษณะสารสกัดหยาดกัญชงอบแห้งเมื่อทำการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด SCCO ₂ (ก) และเทคนิคการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤตโดยใช้ตัวทำละลาย R134a (ข) และ R22 (ค) | 39 |
| รูปที่ 4.2.2 แสดงลักษณะสารสกัดหยาดกัญชงอบแห้งแบบรวดเร็วเมื่อทำการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด SCCO ₂ (ก) และเทคนิคการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤตโดยใช้ตัวทำละลาย R134a (ข) และ R22 (ค) | 40 |
| รูปที่ 4.2.3 แสดงลักษณะสารสกัดหยาดกัญชงสดเมื่อทำการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤตโดยใช้ตัวทำละลาย R134a (ก) และ R22 (ข) | 40 |
| รูปที่ 4.2.4 แสดงลักษณะสารสกัดหยาดกัญชาอบแห้งเมื่อทำการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด SCCO ₂ (ก) และเทคนิคการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤตโดยใช้ตัวทำละลาย R134a (ข) และ R22 (ค) | 40 |
| รูปที่ 4.2.5 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาดกัญชา กัญชง ด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน | 43 |
| รูปที่ 4.2.6 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาดกัญชา กัญชง เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP | 44 |
| รูปที่ 4.2.7 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาดกัญชา กัญชง เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH | 44 |
| รูปที่ 4.3 ผศ.ดร.อลักษณ์ ทิพย์รัตน์ และทีมงาม บรรยาย เรื่อง “การสกัดสารสำคัญออกฤทธิ์รักษาโรคจากสมุนไพรสดด้วยวิธี Supercritical Carbon dioxide (SCCO ₂) และ Subcritical Solvents (SCSO)” | 47 |
| ณ วิทยาลัยการศึกษาและการจัดการทางทะเล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดสมุทรสาคร เมื่อวันที่ 8 พฤศจิกายน 2562 | |
| รูปที่ 4.4 ผศ.ดร.อลักษณ์ ทิพย์รัตน์ และทีมงาม ร่วมบรรยายและสาธิต เรื่อง “การทดสอบเทคโนโลยีการสกัดสารสำคัญ THC และ CBD ในพืชสกุล Cannabis” ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) เมื่อวันที่ 13-24 มกราคม 2563 | 48 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

เทคโนโลยีการสกัดผลิตภัณฑ์พืชผลทางการเกษตรโดยเฉพาะสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาให้มีคุณภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนับเป็นเรื่องสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมการสกัดสมุนไพรของไทยเป็นอย่างมาก การเลือกใช้เทคโนโลยีที่ล้ำสมัยในการแปรรูปสมุนไพร ทำให้ได้สารสกัดหรือตัวยาออกฤทธิ์ที่มีคุณภาพต่ำ ความร้อนหรือปฏิกิริยาออกซิเดชันรวมถึงวิธีการสกัดที่ไม่เหมาะสมทำให้สารออกฤทธิ์ต่างๆ เหล่านี้เสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วและในกรณีที่สารเหล่านี้มีปริมาณต่ำมากอาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบหรือสกัดสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูง (มีราคาสูง) ได้ ส่งผลกระทบโดยตรงต่อภาพรวมของคุณภาพของสินค้าและผลิตภัณฑ์ของสมุนไพรไทยที่นำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอาหารเสริมหรือยาสมุนไพรสำหรับแพทย์ทางเลือก อันเนื่องมาจากวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมที่มีการใช้ความร้อนเป็นระยะเวลาอันยาวนานจะมีผลทำลายสารที่ไม่ทนความร้อน (thermolabile substances) ส่งผลให้สารที่ไม่ทนความร้อนในสารสกัดหยาดมีความเข้มข้นลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) จากการรายงานของสำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร (2558) และการวิเคราะห์จุดอ่อนของประเทศไทยในธุรกิจสมุนไพรตามมุมมองของสถาบันวิจัยสมุนไพร พบว่าเทคโนโลยีการผลิตยังคงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ประเทศไทยมีอัตราการขยายตัวในการส่งออกสารสกัดสมุนไพรต่ำเมื่อเทียบกับประเทศเพื่อนบ้านอื่นๆ เนื่องมาจากการเลือกใช้เทคโนโลยีการสกัดที่มีประสิทธิภาพต่ำ ถ้าหลัง ไม่ทันสมัยทำให้อัตราการผลิตต่ำไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดโลก อีกทั้งปริมาณสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหรือตัวยาออกฤทธิ์ที่สกัดออกมาได้ไม่สอดคล้องต่อปริมาณวัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ กล่าวคือ เทคโนโลยีที่ใช้ในการสกัดไม่สามารถสกัดสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หมดจึงทำให้มีการใช้ปริมาณวัตถุดิบตั้งต้นปริมาณมากเกินความจำเป็นซึ่งเป็นการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างไม่มีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาเทคนิคทั่วไปที่นิยมใช้การสกัดสารสกัดพืชสมุนไพรสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดแบบซอกซ์เลต (Soxhlet extraction) การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) การกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) และการสกัดของแข็งด้วยของเหลว (solid-liquid extraction) เป็นต้น วิธีเหล่านี้มี ความสามารถในการทำซ้ำค่อนข้างต่ำ ใช้ระยะเวลาในการสกัดนาน รวมถึงต้องใช้พืชสมุนไพร ตัวดูดซับ (sorbent) และตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในปริมาณมาก จึงส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการสกัดสูงขึ้นและก่อให้เกิดปัญหาในการกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การใช้ตัวทำ

ละลายอินทรีย์ในปริมาณมากยังเป็นการทำลายสิ่งแวดล้อมและเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์อีกด้วย (ชุตินา และ สนทยา, 2555)

ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการสกัดพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพสูงโดยการเลือกใช้เทคโนโลยีสีเขียวเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (eco-friendly technology) มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการสกัดพืชสมุนไพร จึงเป็นหนึ่งในกลไกที่สำคัญในการขับเคลื่อนโครงการเดินทางส่งเสริมการใช้การแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกในระบบบริการสาธารณสุขทุกระดับ ซึ่งจะทำให้ประเทศไทยและคนไทยมียาสมุนไพรที่มีมาตรฐานและผ่านการศึกษาวิจัยด้านคุณภาพและความปลอดภัย ใช้รักษาอาการเจ็บป่วยได้หลากหลายมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบันที่มีมูลค่าการนำเข้าสูงถึงปีละกว่า 130,000 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 35 ของค่าใช้จ่ายสุขภาพทั้งหมด ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่สูงกว่าประเทศพัฒนาแล้ว (กองยาแผนไทยและสมุนไพร)

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ในการสกัดภายใต้หลักการการสกัดด้วยตัวทำละลายความดันสูง (pressurized liquid extraction) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดพืชสมุนไพรเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม อีกทั้งปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ก็น้อยเนื่องจากการใช้อุณหภูมิและความดันสูงในการสกัดทำให้เกิดการสกัดอย่างรวดเร็วมีอัตราการสกัดสูง ทั้งนี้การสกัดที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลายที่ความดันบรรยากาศจะมีผลในการเพิ่มความสามารถในการละลายของสารที่ต้องการสกัดและคุณสมบัติการถ่ายเทมวล (mass transfer property) และ/หรือ การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction) ซึ่งการสกัดด้วยเทคนิคนี้จะเป็นสถานะที่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าสารนั้นอยู่ในสถานะก๊าซหรือของเหลว เมื่อคาร์บอนไดออกไซด์ถูกอัดภายใต้แรงดันและให้ความร้อนผ่านจุดวิกฤตที่ความดัน 73.7 บาร์ (critical pressure; Pc) และอุณหภูมิ 31.1 องศาเซลเซียส (critical temperature; Tc) จะทำให้ของไหลวิกฤตยิ่งยวดมีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (physiochemical properties) อยู่ระหว่างก๊าซกับของเหลว ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ในสถานะนี้จะมีคุณสมบัติในการแพร่ (diffusivity) ที่ดีเยี่ยมซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถในการแทรกผ่านและสกัดสารที่ต้องการออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดของวิธีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ต้องใช้ความดันสูงในกระบวนการสกัดจึงไม่สามารถสกัดวัตถุดิบที่มีความอ่อนตัว หรือมีความบอบบาง เช่น ดอกไม้ ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนากระบวนการสกัดด้วยของไหลภายใต้สถานะต่ำกว่าจุดวิกฤตเพื่อเข้ามาแก้ไขข้อจำกัดของกระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด โดยทำการเลือกดอกมะลิสดปลอดสารเป็นวัตถุดิบเป้าหมายเพื่อมาทดสอบประสิทธิภาพของกระบวนการสกัด ในโครงการวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ในการทดสอบประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดโดยใช้ตัวอย่างกัญชาและกัญช ในโครงการวิจัยนี้จะทำการออกแบบ และพัฒนา

กระบวนการสกัดต้นแบบในการสกัดพืชสมุนไพรด้วยกระบวนการสกัดด้วยของไหลภายใต้สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤต การทดสอบประสิทธิภาพจะทำการเลือกใช้พืชสมุนไพรต้นแบบ ได้แก่ ดอกมะลิ กัญชาและกัญชง เป็นต้น ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้ในแต่ละเทคนิคต่อ ประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อจุลชีพ

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อออกแบบ พัฒนาและสร้างระบบต้นแบบการสกัดพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ทางยาด้วยระบบการสกัดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

1.2.2 ศึกษาแนวทางการสกัดโดยใช้วัตถุดิบสดในการสกัด และทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบเบื้องต้น

1.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพของระบบที่ทำการพัฒนาขึ้น โดยการศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในด้านการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านเชื้อจุลชีพ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ออกแบบ พัฒนาและนำเสนอกระบวนการสกัดต้นแบบการสกัดพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ทางยา โดยพัฒนาระบบการสกัดให้มีสถานะในการสกัดที่อุณหภูมิต่ำ โดยใช้ความดันร่วม และเป็นเทคโนโลยีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

1.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการสกัดในกลุ่มวัตถุดิบเป้าหมาย ได้แก่ ดอกมะลิสด กัญชาและกัญชง

1.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของระบบที่ทำการพัฒนาขึ้น โดยการศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในด้านการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการวิเคราะห์ด้วย DPPH และ FRAP ปริมาณฟีนอลรวม และการต้านเชื้อจุลินทรีย์ 14 ชนิด

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

2.1 พืชสมุนไพร

ปัจจุบันกระแสนิยมในเรื่องสุขภาพและความงามกำลังเป็นที่นิยมไปทั่วโลก ส่งผลให้สมุนไพรเพื่อสุขภาพและความงามเป็นที่ต้องการของตลาดโลกมากขึ้น โดยทางสมาคมสุขภาพและความงามแห่งประเทศไทย จึงใช้โอกาสนี้เร่งผลักดันสมุนไพรในกลุ่มสุขภาพและความงามได้แก่ กวาวเครือขาว บัวบก กระจับปี่ และไพล เพื่อส่งเสริมให้สมุนไพรเหล่านี้เป็นที่นิยมของชาวต่างชาติ ซึ่งทางสมาคมสุขภาพและความงามแห่งประเทศไทย ต้องการผลักดันให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ดี มีคุณค่า เพื่อยกระดับสมุนไพรไทยสู่ตลาดโลกและสามารถแข่งขันกับคู่แข่งได้

สมุนไพร (Herbs) ตามพระราชบัญญัติยา หมายถึง "ยาที่ได้จากพืช สัตว์ หรือแร่ ซึ่งยังไม่ได้ผสมปรุงหรือเปลี่ยนแปลง" เช่น พืชก็ยังเป็นส่วนของ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ ซึ่งยังไม่ได้ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใด ๆ แต่ในทางการค้าสมุนไพรมักจะถูกดัดแปลงในรูปต่าง ๆ เช่น ถูกล้างให้แห้งเป็นชิ้นเล็กกลบดเป็นผงละเอียด หรืออัดเป็นแท่ง อย่างไรก็ตามในความรู้สึกของคนทั่ว ๆ ไปเมื่อกล่าวถึงสมุนไพร มักจะนึกถึงเฉพาะต้นไม้ที่นำมาใช้เป็นยาเท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าสัตว์หรือแร่ มีการนำมาใช้น้อย และใช้ในโรคบางชนิดเท่านั้น ดังนั้น พืชสมุนไพรหมายถึงพันธุ์ไม้ต่าง ๆ ที่สามารถนำมาใช้ปรุงหรือประกอบเป็นยารักษาโรคต่าง ๆ ใช้ในการส่งเสริมสุขภาพร่างกายได้

พืชสมุนไพร เป็นสิ่งที่อยู่คู่คนไทยมาตั้งแต่อดีต แต่เมื่อการแพทย์แผนปัจจุบันเริ่มเข้ามามีบทบาทในบ้านเรา สรรพคุณและคุณค่าของสมุนไพรอันเป็นที่เรียกได้ว่าภูมิปัญญาโบราณก็เริ่มถูกบดบังไปเรื่อยๆ และถูกกลืนหายไปตามกาลเวลา หากมองย้อนกลับไปดูตามตำรับอาหารไทยต่างๆ ก็จะพบว่า มีส่วนผสมของพืชสมุนไพรแทบทุกรายการ การกระตุ้นโดยภาครัฐด้วยการแถลงนโยบายต่อรัฐสภาไว้เมื่อวันที่ 21 ตุลาคม 2535 ว่า "ให้มีการผสมผสานการแพทย์แผนไทยและสมุนไพรเข้ากับระบบบริการสาธารณสุขของชุมชนอย่างเหมาะสม" การผลักดันสมุนไพรที่มีชื่อเสียงของไทยสู่ตลาดโลกในหลายๆหน่วยงาน ได้แก่ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกพร้อมด้วยภาคีเครือข่าย ได้มีการคัดเลือกสมุนไพรไทยที่ได้รับความนิยม 5 ชนิด ได้แก่ กวาวเครือขาว บัวบก กระจับปี่ ไพลและลูกประคบ โดยพิจารณาจากความสามารถปลูกได้ง่าย เป็นที่รู้จักทั่วโลก และมีอนาคตเนื่องจากการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ที่จะนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ออกจำหน่าย

จากข้อมูลกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ ระบุว่าปัจจุบันมูลค่าการส่งออกสมุนไพรอยู่ประมาณแสนล้านบาท โดยกลุ่มผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีมูลค่าการใช้และการส่งออกรวมกว่า 80,000

ล้านบาท สปาและผลิตภัณฑ์สปา มีมูลค่าประมาณ 10,000 ล้านบาท กลุ่มยาแผนโบราณตามกฎหมายการแพทย์ไทย มีมูลค่าประมาณ 10,000 ล้านบาท โดยที่สมุนไพร 5 ชนิด ที่ตลาดโลกมีความต้องการสูงและมีโอกาสเติบโตในอนาคต ได้แก่ กระจายดำ ไพล ขมิ้นชัน กวาวเครือขาว และบัวบก จากผลสำรวจพบว่าในตลาดโลกสมุนไพรไทยนำมาพัฒนาเป็นสินค้าใน 5 กลุ่มหลัก ได้แก่ สินค้าเพื่อลดน้ำหนัก สินค้าบำรุงผิว กลุ่มสินค้าลotion ริวรอยและดีทีออกซ์ สินค้ากลุ่มบำรุงสมอง และสินค้าเพื่อรักษาโรค (กุลชญา, สถาบันวิจัยสมุนไพร)

ตารางที่ 2.1 แสดงมูลค่าการส่งออกสินค้าที่สำคัญของไทย

| รายการ | มูลค่าการส่งออกสินค้าสำคัญของไทย (ล้านบาท) | | | |
|---------------------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 2552 (ม.ค.- พ.ค.) | 2553 (ม.ค.- พ.ค.) | 2554 (ม.ค.- พ.ค.) | 2555 (ม.ค.- พ.ค.) |
| การส่งออกทั้งหมด | 6,176,302.06 | 6,896,541.07 | 2,827,202.20 | 2,849,429.38 |
| สินค้าเกษตรกรรม | 679,718.64 | 892,269.28 | 366,368.88 | 307,669.22 |
| ข้าว | 168,193.06 | 196,117.05 | 86,830.38 | 57,645.88 |
| ผักสดแช่เย็น แช่แข็งและ แห้ง | 6,579.14 | 7,315.97 | 3,527.80 | 3,408.18 |
| เครื่องเทศและสมุนไพร | 2,577.72 | 2,571.16 | 1,070.20 | 1,350.55 |
| - สมุนไพร | 325.28 | 350.90 | 164.42 | 185.37 |
| - สารสกัดจากสมุนไพร | 117.69 | 139.08 | 43.77 | 66.02 |

ที่มา: <http://www.ryt9.com/s/beco/1568026>

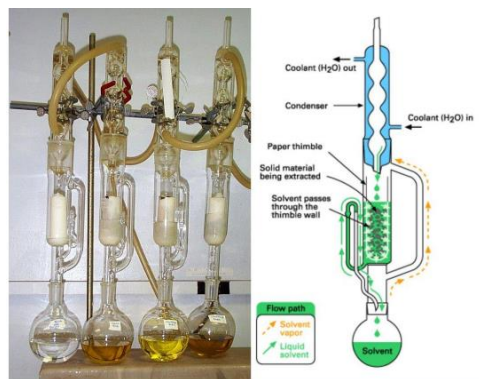
2.2 การสกัดพืชสมุนไพร (herbal extraction)

การสกัดพืชสมุนไพร ทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดแบบซอกซ์เลต (Soxhlet Extraction) การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) การกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam Distillation) และการสกัดของแข็งด้วยของเหลว (Solid-Liquid Extraction) เป็นต้น วิธีเหล่านี้มีความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility) ค่อนข้างต่ำ ใช้ระยะเวลาในการสกัดนาน รวมถึงต้องใช้พืชสมุนไพร ตัวดูดซับ (Sorbent) และตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic Solvent) ในปริมาณมากด้วย จึงส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการสกัดสูงขึ้นและก่อให้เกิดปัญหาในการกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากยังเป็นการทำลายสิ่งแวดล้อมและเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์อีกด้วย (ชุตินาและสนทยา, 2555) วิธีการสกัดที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการสกัดสารที่มี

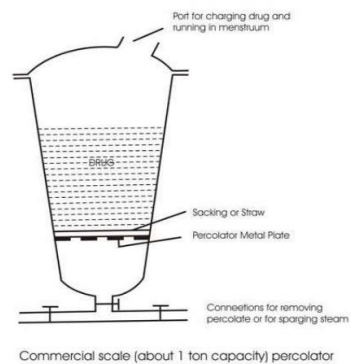
ประโยชน์ที่มีฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระ วิธีการสกัดแบบดั้งเดิมเป็นวิธีการสกัดที่ง่ายแต่สิ้นเปลืองตัวทำละลาย (ดวงกมล, 2557) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดนาน

2.2.1 วิธีการสกัดสารแบบดั้งเดิม (Conventional Extraction methods)

- การฝน (Sanding) คือเทคนิคการเอาสมุนไพรมาฝนด้วยหินบดยา แล้วชะด้วยน้ำธรรมดาแล้วกรองเอาน้ำไปรับประทาน
- การชง (Infusion) คือเทคนิคการสกัดโดยแช่สมุนไพรด้วยน้ำร้อนหรือน้ำเย็นในช่วงเวลาสั้น สารสกัดที่ได้จะเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิไม่สูงมาก
- การต้ม (Decoction) คือเทคนิคการสกัดสารที่ละลายได้ดีในน้ำและสามารถทนความร้อนได้ดี โดยการต้มสมุนไพรในน้ำจนเดือดแล้วต้มต่อไปอีกประมาณ 15 นาที
- การตุ๋น (Digestion) เป็นวิธีการสกัดโดยใช้ความร้อนอ่อนๆ อุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานมากกว่าการต้ม
- การหมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดโดยนำสมุนไพรหมักกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด ทิ้งไว้ 3-7 วัน เขย่าหรือคนบ่อยๆ แล้วกรองเอาสารสกัดไปใช้ ข้อดีคือสารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก และมักไม่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเนื่องจากจะทำให้บูด
- การหมักแบบต่อเนื่อง (Percolation) เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยการนำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆบรรจุผงยาที่ละน้อย และเติมตัวทำละลายลงไปในระดับที่สูงเหนือสมุนไพร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วจึงเริ่มไซสารออกโดยค่อยๆเติมตัวทำละลายลงไปอย่าให้แห้ง
- การสกัดด้วย Soxhlet เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ ใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน Flask ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมา จนถึงจุดหนึ่งก็จะไหลกลับลงไป ใน flask ใหม่ โดยใช้วิธีกาลักน้ำ แล้วกลั่นตัวขึ้นไปใหม่จนสกัดได้หมดโดยสามารถสังเกตจากสีของตัวทำละลายใน thimble ที่ใสขึ้น การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อน จึงอาจทำให้สารสำคัญบางชนิดสลายตัวได้



รูปที่ 2.1 Soxhlet extraction



รูปที่ 2.2 Percolation

2.2.2 วิธีการสกัดสารแบบสมัยใหม่ (Non- Conventional Extraction Methods)

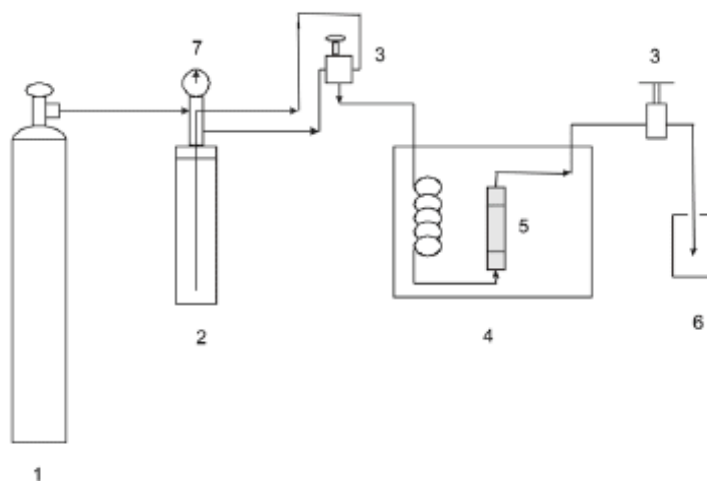
วิธีการสกัดสารแบบสมัยใหม่จะมีการคำนึงถึงการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีสีเขียวเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีการลดปริมาณการใช้ตัวทำละลาย สารสังเคราะห์ หรือสารเคมีอินทรีย์ อีกทั้งยังมีการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสามารถคัดเลือกชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสมุนไพรได้ อีกทั้งยังสามารถลดระยะเวลาในการสกัด ปริมาณสารสกัดสูง (ผลผลิต) รวมถึงคุณภาพของสารสกัดที่มีความสม่ำเสมอกว่าเทคนิคการสกัดแบบดั้งเดิม (Azmir et al., 2013; ชูติมาและสนทยา, 2555) วิธีการสกัดสารแบบสมัยใหม่ได้แก่ Ultrasound, Pulsed Electric Field, Enzyme Digestion, Extrusion, Microwave Heating, Ohmic Heating, Supercritical Fluids, Accelerated Solvents (ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะการสกัดด้วยของไหลความดันสูงและการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด)

- การสกัดด้วยของไหลความดันสูง (Pressurized Liquid Extraction, PLE)

เทคนิคการสกัดด้วยของไหลความดันสูงถูกค้นพบในปีค.ศ. 1996 โดย Richter และคณะ โดยมีชื่อเรียกทั่วไปเช่น Pressurized Fluid Extraction (PFE), Accelerated Fluid Extraction (ASE), Enhanced Solvent Extraction (ESE), High Pressure Solvent Extraction (HSPE)

PLE เป็นเทคนิคการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเป็นเฟสของเหลวโดยสกัดที่อุณหภูมิและความดันสูง การสกัดที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลายที่ความดันบรรยากาศจะมีผลเพิ่มทั้งการละลายของสารที่ต้องการสกัดและคุณสมบัติการถ่ายเทมวล (Mass Transfer Property) การสกัดด้วยเทคนิค PLE มีการใช้ปริมาณตัวทำละลายที่น้อยเนื่องจากการใช้อุณหภูมิและความดันสูงในการสกัดทำให้เกิดการสกัดอย่างรวดเร็ว (อัตราการสกัดสูง) เมื่อเปรียบเทียบการสกัดด้วยเทคนิค PLE และเทคนิคการสกัดแบบดั้งเดิมโดย

การใช้เทคนิค Soxhlet พบว่าเทคนิค PLE สามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดและปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดได้ (Azmir et al., 2013)



รูปที่ 2.3 แสดงแผนภาพระบบการสกัดด้วยตัวทำละลายความดันสูง (Pressurized Solvent Extraction, PSE) (1: Nitrogen Tank, 2: Pressure Vessel, 3: Valves, 4: Oven, 5: Extraction Cell with Filters, 6: Collector Flask, 7: Manometer)

ที่มา: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532009000500016

พารามิเตอร์ของการสกัด (Extraction Parameters)

- อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิในระหว่างการสกัดมีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) ของการสกัดด้วยเทคนิค PLE อุณหภูมิสูงจะเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดและช่วยขัดขวางการจับกันระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับเมทริกซ์ของตัวอย่าง ซึ่งเป็นการจับกันด้วยแรงหรือพันธะอ่อนๆ เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van Der Waals Force) แรงดึงดูดระหว่างขั้ว (Dipole–Dipole Interaction) และพันธะไฮโดรเจน พลังงานความร้อน (Thermal Energy) จะทำลายการจับกันระหว่างโมเลกุลชนิดเดียวกัน (Cohesive Interactions) และการจับกันระหว่างโมเลกุลที่ต่างกัน (Adhesive Interactions) ในกรณีหลังนี้จะหมายถึงการจับกันระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับเมทริกซ์ของตัวอย่าง ซึ่งการทำลายการจับกันในลักษณะเช่นนี้เกิดขึ้นจากการลดลงของพลังงานกระตุ้น (Activation Energy) ซึ่งจำเป็นต่อกระบวนการปลดปล่อย (Desorption Process) สารออกจากเมทริกซ์ ยิ่งไปกว่านั้นอุณหภูมิที่สูงขึ้นยังช่วยลดแรงตึงผิวของตัวทำละลาย ตัวถูกละลาย (Solute) และเมทริกซ์ได้อีกด้วย จึงช่วยเพิ่มการทำให้เปียกด้วยตัวทำละลาย (Solvent Wetting) ที่มีต่อเมทริกซ์ของตัวอย่าง การลดลงของแรงตึงผิวของตัวทำละลายจะทำให้สารที่

ต้องการสกัดละลายได้ง่ายในตัวทำละลาย การเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลลดความหนืดของตัวทำละลายที่เป็นของเหลว จึงช่วยเพิ่มการซึมผ่าน (Penetration) ของตัวทำละลายเข้าสู่อนุภาคของเมตริกซ์ ส่งผลให้การสกัดมีประสิทธิภาพดีขึ้น ข้อดีอีกอย่างหนึ่งของการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอุณหภูมิสูง คือ การเพิ่มขึ้นของอัตราการแพร่ (Diffusion Rate) ซึ่งจะมีผลเพิ่มการถ่ายเทมวลของสารที่ต้องการสกัดไปสู่ตัวทำละลาย ทำให้อัตราเร็วในการสกัดเพิ่มขึ้นในทางตรงกันข้ามเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นสารอื่นๆ ที่ไม่ต้องการก็จะถูกสกัดออกมาด้วย ส่งผลให้ความจำเพาะเจาะจงในการสกัดลดลง นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงอาจมีผลทำลายสารประกอบที่ไม่ทนความร้อน โดยทำให้สารเกิดการแตกตัวหรือถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) หลักสำคัญประการหนึ่งของการสกัดด้วยเทคนิค PLE คือการเพิ่มการแพร่ของสารที่ต้องการสกัดในตัวทำละลายที่เป็นของเหลว โดยใช้ตัวทำละลายในปริมาณต่ำ ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจะช่วยเพิ่มอัตราการแพร่ของสารในระหว่างการสกัดได้

- ความดัน (Pressure)

การเพิ่มความดันในกระบวนการสกัดจะส่งผลดีต่อการสกัดเมื่ออุณหภูมิในระหว่างการสกัดมีค่าสูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลาย เพราะความดันจะทำให้ตัวทำละลายยังคงอยู่ในสถานะของเหลว การเพิ่มความดันที่อุณหภูมิสูงและการลดแรงตึงผิวของตัวทำละลายจะช่วยผลักดันให้ตัวทำละลายเข้าสู่พอร์ของเมตริกซ์ของตัวอย่างได้มากขึ้น จึงทำให้ตัวทำละลายสัมผัสกับสารที่ต้องการสกัดได้ดีขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการสกัดดีขึ้น การเพิ่มความดันในระหว่างกระบวนการสกัดจะทำให้เมตริกซ์ของตัวอย่างแตกออก ซึ่งจะมีผลเพิ่มการถ่ายเทมวลของสารที่ต้องการสกัดออกจากเมตริกซ์ไปสู่ตัวทำละลาย การควบคุมความดันในระหว่างกระบวนการสกัดมีความสัมพันธ์กับฟองอากาศ (Air Bubble) ที่อยู่ในเมตริกซ์ของตัวอย่าง ซึ่งฟองอากาศจะมีผลขัดขวางการสัมผัสระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับตัวทำละลาย การสัมผัสกันนี้จะช่วยเพิ่มการละลายของสารและเพิ่มอัตราการปลดปล่อยสารออกจากเมตริกซ์ของตัวอย่างอย่างไรก็ตามในการสกัดน้ำมันหอมระเหย (Essential Oil) จากพืชสมุนไพรบางชนิดพบว่าความดันมีผลน้อยมากต่อเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของการสกัด

- สารเพิ่มประสิทธิภาพ (Additives)

การเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพลงไปในกระบวนการสกัดด้วยเทคนิค PLE จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดได้ ตัวอย่างเช่น การสกัดชะเอมเทศ (Glycyrrhiza Glabra) และหมาหวง (Ephedra Sinica) ด้วยเทคนิค PLE โดยใช้ส่วนผสมสารลดแรงตึงผิว Sodium Dodecylsulfate และ Triton X-100 มีประสิทธิภาพในการสกัดดีเท่ากับหรือดีกว่าการสกัดด้วยเมทานอลร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง การสกัดที่ทำให้เกิดไมเซลล์โดยใช้น้ำผสมสารลดแรงตึงผิวสามารถลดการสลายตัวของสารสำคัญได้ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำเพียง

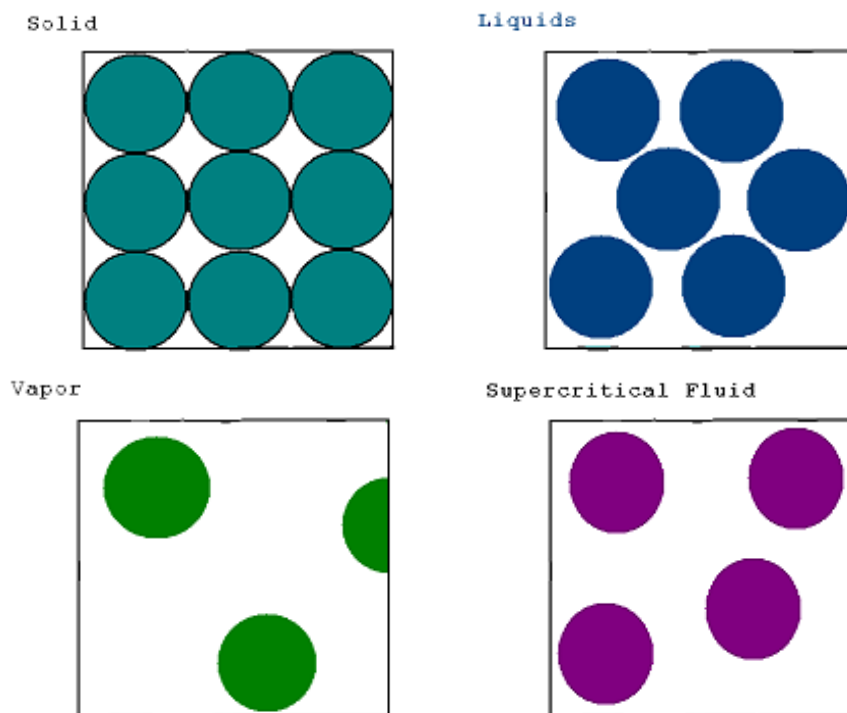
อย่างเดียว นอกจากนี้การเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพชนิดอื่นๆ เช่น สารต้านออกซิเดชัน โดยเฉพาะกรดแอสคอร์บิก(ascorbic acid) หรือบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated Hydroxytoluene, BHT) จะช่วยลดการสลายตัวของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ในบางครั้งการสกัดจะเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปเพื่อให้ น้ำมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารบางชนิดได้

- **การสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction: SFE)**

ความตระหนักของผู้บริโภคในปัจจุบันที่ต้องการจะหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในอาหารและหันมาบริโภคเลือกใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติส่งผลให้ผู้ผลิต อุตสาหกรรมเกิดการพัฒนาไปในทิศทางของเทคโนโลยีสีเขียว (Green Technology) เทคโนโลยีการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction: SFE) เป็นนวัตกรรมเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการสกัดสารที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Eco-Friendly) นิยมใช้ในการสกัดน้ำมัน หรือสารจากพืชและสัตว์ ตัวอย่างของตัวทำละลายที่ใช้ในกระบวนการนี้ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล น้ำ เป็นต้น การเลือกใช้คาร์บอนไดออกไซด์เข้ามาเป็นตัวทำละลายในการสกัดเนื่องจากไม่ต้องกังวลกับเรื่องการบำบัดของเสียที่อาจมีพิษของสารเคมีปนอยู่รวมไปถึงระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด คุณภาพของสารสกัดที่เหนือกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม คือ การกลั่นด้วยไฮดร หรือ การสกัดแบบของเหลว-ของแข็ง (Fornari และคณะ, 2012, Harde และคณะ 2013)

หลักการ

ของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid: SCF) หมายถึงสถานะที่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าสารนั้นอยู่ในสถานะก๊าซหรือของเหลว เมื่อก๊าซหรือของเหลวเหล่านั้นถูกอัดภายใต้แรงดันและให้ความร้อนผ่านจุดวิกฤต (Critical Point) ซึ่งจะเข้าสู่เฟส supercritical phase และสารที่อยู่ในเฟสนั้นจะเรียกว่า ของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid: SCF) อุณหภูมิวิกฤต (Critical Temperature; T_c) และความดันวิกฤต (Critical Pressure; P_c) ของไหลวิกฤตยิ่งยวดมีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (Physiochemical Properties) อยู่ระหว่างก๊าซกับของเหลว



รูปที่ 2.4 แสดงคุณสมบัติเปรียบเทียบความหนาแน่นระหว่างของแข็ง ของเหลว ไอ และของไหลวิกฤตยิ่งยวด

ที่มา:

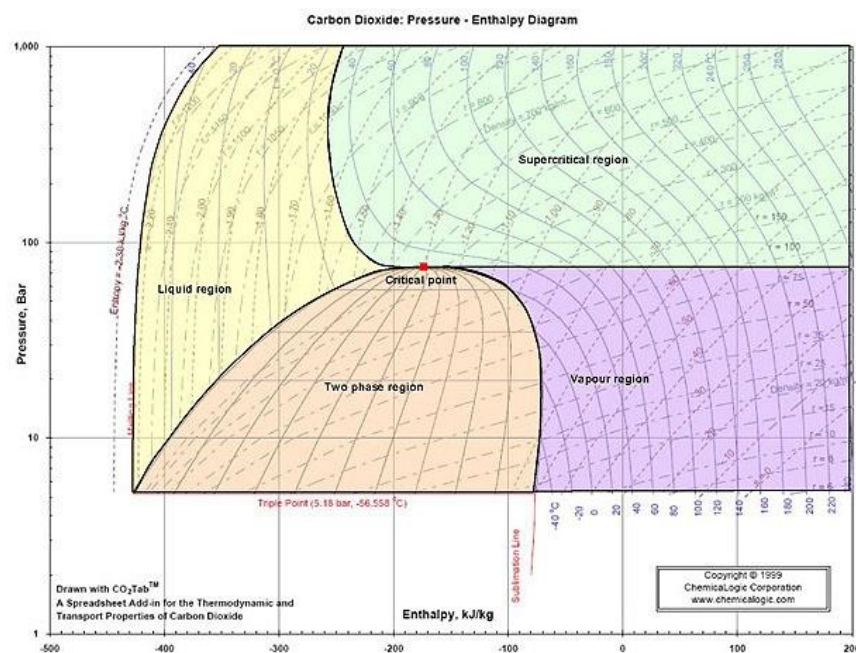
http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Physical_Chemistry/Physical_Properties_of_Matter/States_of_Matter/Supercritical_Fluids

คุณสมบัติที่สำคัญของ SCF คือ ความหนาแน่น (Density) ความหนืด (Viscosity) ความสามารถในการแพร่ (Diffusivity) ค่าความจุความร้อน (Heat Capacity) และค่าการนำความร้อน (Thermal Conductivity) การปรับอุณหภูมิหรือความดันเหนือจุดวิกฤตจะส่งผลต่อคุณสมบัติข้างต้นและจะช่วยเพิ่มความสามารถของ SCF ในการแทรกผ่านและสกัดสารที่เราต้องการ

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติวิกฤตของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (Critical Property Data) (นภดล มนตรี, 2549)

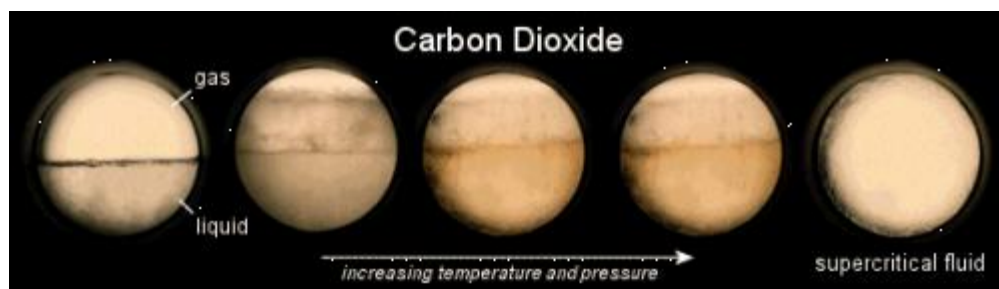
| ชนิดตัวทำละลาย | อุณหภูมิวิกฤต Critical Temperature (°K) | ความดันวิกฤต Critical Pressure (MPa) | ความหนาแน่นวิกฤต Critical Density (g/cm ³) |
|----------------|---|--|--|
| Methane | 190.6 | 4.60 | 0.162 |
| Carbon dioxide | 304.2 | 7.38 | 0.468 |
| Propane | 369.8 | 4.24 | 0.217 |
| Acetone | 508.1 | 4.70 | 0.278 |
| Methanol | 512.6 | 8.09 | 0.272 |
| Toluene | 591.7 | 4.11 | 0.292 |
| Water | 647.3 | 22.00 | 0.322 |

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงคุณสมบัติวิกฤตของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ โดยในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการเลือกใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลายที่จะนำมาใช้ของไหลวิกฤตยิ่งยวด เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์มีอุณหภูมิวิกฤตและความดันวิกฤตที่มีค่าต่ำ ไม่เป็นพิษ มีความเฉื่อย ไม่ติดไฟ อีกทั้งคาร์บอนไดออกไซด์มีความบริสุทธิ์สูงในราคาที่จับต้องได้ คาร์บอนไดออกไซด์มีความสามารถในการละลายตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้ว (Non-Polar Solutes) ไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างระหว่างกระบวนการสกัดและผลิตภัณฑ์ที่ได้ (Engelhardt และ Gross, 1991)



รูปที่ 2.5A แสดงเฟสไดอะแกรมและสภาวะวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์

ที่มา: <https://hub.globalccsinstitute.com/publications/co2-liquid-logistics-shipping-concept-llsc-%E2%80%93-business-model-report/appendix-1-co2>

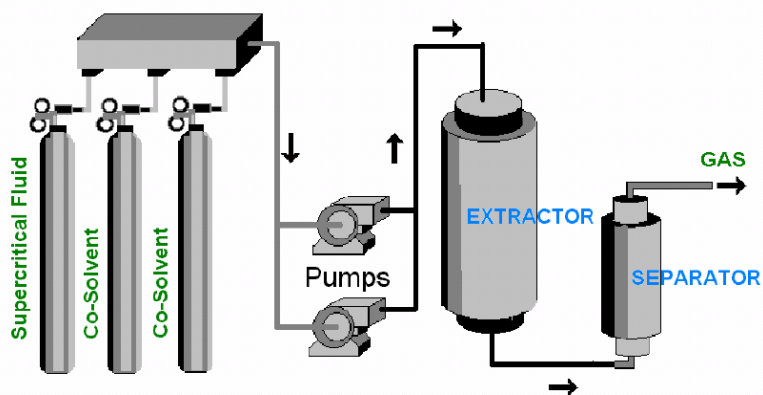


รูปที่ 2.5B แสดงลักษณะสภาวะวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด โดยที่คาร์บอนไดออกไซด์ในภาพแรกจะประกอบด้วย 2 เฟส คือก๊าซและของเหลว ในขณะที่เมื่อเพิ่มความดันและอุณหภูมิจนถึงค่าวิกฤต คาร์บอนไดออกไซด์จะไม่สามารถแยกได้ว่าอยู่ในสภาวะของก๊าซหรือของเหลว

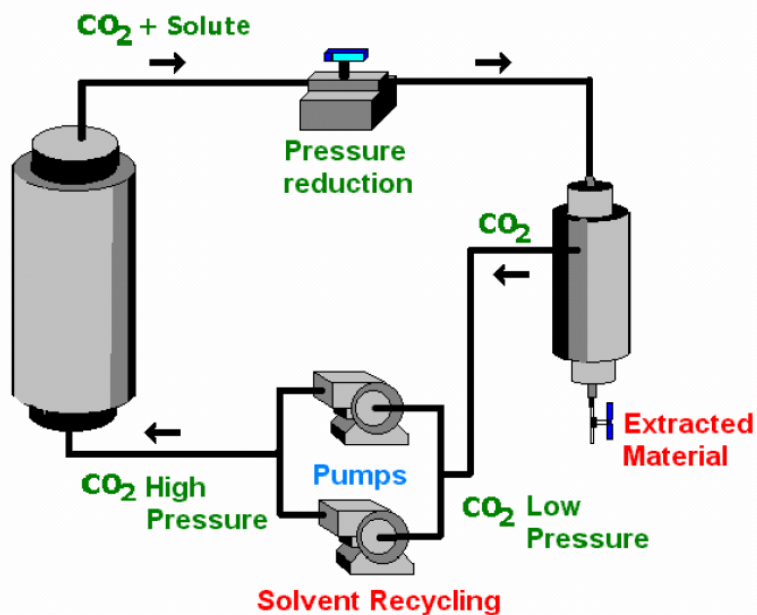
ที่มา: <http://www.nasa.gov/vision/earth/technologies/harvestingmars.html>

การนำมาใช้ประโยชน์

ในอุตสาหกรรมอาหารและยาใช้เพื่อสกัดสาร เช่น สารให้กลิ่นรส (Flavoring Agent) สารให้สี (Coloring Agent) น้ำมันหอมระเหย (Essential Oil) คาเฟอีน (Caffeine) วิตามิน คอลเลสเตอรอล เป็นต้น สารสกัดที่ได้จากวิธีการนี้ มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคมากกว่าวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อาจไม่สามารถแยกตัวทำละลายออกมาได้หมดโดยสมบูรณ์ จึงอาจทำให้มีตัวทำละลายตกค้าง นักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่จึงเลือกใช้วิธีการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดมาสกัดสาร

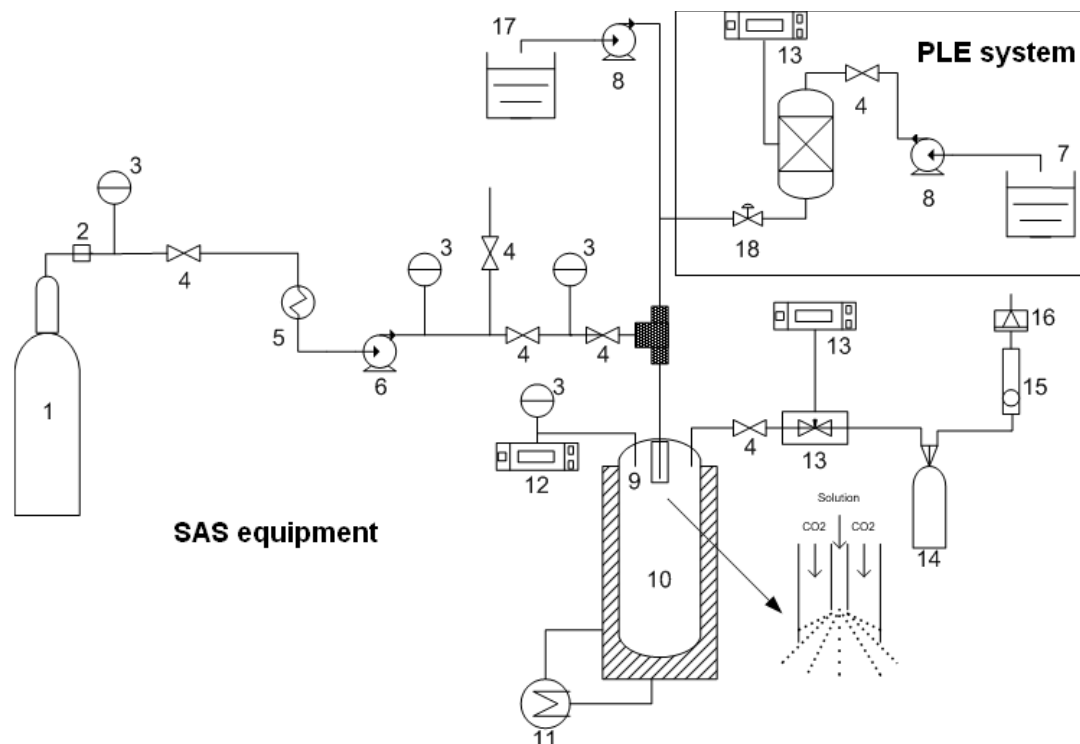


รูปที่ 2.6 แสดงแผนภาพการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดแบบกะ



รูปที่ 2.7 แสดงแผนภาพการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดแบบต่อเนื่อง

ที่มา: Mohamed และ Mansoori (2002)



รูปที่ 2.8 แสดงแผนภาพระบบการสกัดโดยใช้เทคนิคของไหลวิกฤตยิ่งยวดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (1 CO₂ Cylinder; 2 CO₂ Filter; 3 Manometers; 4 Blocking Valves; 5 Thermostatic bath; 6 CO₂ Pump; 7 Extracting solvent reservoir; 8 HPLC pumps; 9 Thermocouple; 10 Precipitation vessel; 11 Heating bath; 12 Temperature controllers; 13 Micrometric valve with a heating system; 14 Glass flask; 15 Glass float rotameter; 16 Flow totalizer; 17 Carrier or surfactant solution reservoir; 18 Back Pressure regulator)

ที่มา: Santos และคณะ, 2012

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระบวนการฆ่าเชื้อจุลชีพโดยใช้สารเคมี เช่น บนผลไม้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษามีการศึกษาโดยกลุ่มนักวิจัยมาอย่างต่อเนื่อง ทั้งการใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (Sulfur dioxide, SO₂) ร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน (Chitosan) (Zhang, J., et al., 2017), คลอรีนไดออกไซด์ (Chlorine dioxide, ClO₂) (Zhang, X.-m. and M.-r. Fu, 2018) และ 1- เมทิลไซโคลโพรพีน (1-methylcyclopropene, 1-MCP) ร่วมกับการคลอรีนไดออกไซด์ (Yang, X., et al., 2018) แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีอาจทำให้เหลือสารตกค้างหลังจากการฆ่าเชื้อจุลชีพ เช่นซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่หลงเหลือเกินค่ามาตรฐานแม้จะผ่านไปแล้วกว่า 40 วัน หรือการเตรียมคลอรีนไดออกไซด์ที่ต้องใช้สารตั้งต้นจากโซเดียมคลอไรท์ (Sodium Chlorite, NaClO₂) และก๊าซคลอรีน (Cl₂) ซึ่งเป็นอันตรายจึงต้องอาศัยมาตรฐานการป้องกันและการขนส่งระดับสูง

นอกจากสารเคมีข้างต้นแล้ว ยังพบว่าสารจำพวกน้ำมันหอมระเหย (Essential oil) จากสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้เช่นกัน ดังเช่นงานวิจัยของ Bevilacqua และคณะ ในปี 2014 และการใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรต่างๆ ในการยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ (Bosquez-Molina, E., et al., 2010; Mehdi, M., et al., 2010; Singh, P., et al., 2011) ดังนั้น การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การสกัดโดยไม่ใช้ความร้อนเพื่อเป็นการคงไว้ซึ่งคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

การสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรโดยส่วนใหญ่จะใช้วิธีการทางความร้อน เช่น การใช้ไอน้ำ หรือสารที่มีฤทธิ์ในการทำลาย เช่น เฮกเซน (Hexane) ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่เนื่องจากเป็นกรรมวิธีการสกัดที่ไม่ซับซ้อนจึงเป็นที่นิยมนำมาอย่างเนิ่นนาน อย่างไรก็ตามในงานศึกษาของ Sang และคณะได้นำเสนอและเปรียบเทียบกระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด (Supercritical carbon dioxide) และเตตระฟลูออโรอีเทน (1,1,1,2-tetrafluoroethane) เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิต่ำ ไม่ระเบิด ไม่ติดไฟ ไม่เป็นพิษ และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Sang, J., et al., 2017) สภาพการทำงานของคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดจะเกิดขึ้นที่ความดันสูงกว่า 73.8 เท่าของบรรยากาศ และอุณหภูมิสูงกว่า 31.1 องศาเซลเซียสซึ่งถูกใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์จากเมล็ดกาแฟ (Araújo, J.M. and D. Sandi, 2007; Getachew, A.T., et al., 2018) แต่เนื่องจากการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดต้องเกิดขึ้นที่ความดันสูง ทำให้ต้องอาศัยระบบที่ซับซ้อนและอุปกรณ์ที่มีราคาแพง ดังนั้นจึงส่งผลให้ต้นทุนของการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดสูงไปด้วย งานวิจัยจากหลายแห่งจึงเลือกที่จะใช้การสกัดด้วยสารในกลุ่มสารทำความเย็น เช่น เตตระฟลูออโรอีเทน (Tan, L., L. Zhu, and Z. Feng, 2018) หรือบิวเทน (Genovese, S., et al., 2020) ในขณะที่สารทำความเย็นอีกหลายชนิดเช่น คลอโรไดฟลูออโรมีเทน (Chlorodifluoromethane, R22) และไดฟลูออโรมีเทนผสมเพนตะฟลูออโรอีเทน (Difluoromethane/Pentafluoroethane, R410a) ยังไม่ได้มีการศึกษาเพื่อนำมาเป็นตัวทำละลายในกระบวนการสกัดมากนัก

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงาน

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุดิบ:

ดอกมะลิสดปลอดสารจากสวนนครชัยศรี

กัญชาและกัญชง จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)



รูปที่ 3.1 ดอกมะลิสดปลอดสารจากสวนนครชัยศรี



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 3.2 ตัวอย่างกัญชงก่อนการสกัด กัญชงอบแห้ง (ก) กัญชงอบแห้งแบบรวดเร็ว (ข) และ กัญชงสด (ค)



รูปที่ 3.3 ตัวอย่างกัญชาอบแห้ง

3.1.2 เชื้อแบคทีเรีย 14 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. diphtheriae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. tarda*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. typhimurium*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica*

3.1.3 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ Autoclave (รุ่น HICLAVE HVE - 50 บริษัท BEC THAI ประเทศญี่ปุ่น)

3.1.4 ตู้บ่ม (รุ่น Contherm polar 1000c บริษัท Memmert สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

3.1.5 ตู้เขี่ยเชื้อ Biosafety Cabinet Class II (รุ่น NANA-164300 บริษัท PKR SCIENCE & SERVICES ประเทศไทย)

3.1.6 Vortex (รุ่น S0200 บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.1.7 เครื่องวัดความชื้น (รุ่น DEN-1 บริษัท Labnet international สาธารณรัฐลัตเวีย)

3.1.8 เครื่อง Microplate reader (รุ่น M965+ บริษัท Metertech ประเทศไทยไต้หวัน)

3.1.9 เครื่องชั่งสาร (รุ่น ME204 บริษัท METTLER TOLEDO ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.1.10 เครื่องวัด pH (รุ่น pH 700 บริษัท EUTECH ประเทศสิงคโปร์)

3.1.11 เครื่อง Karl Fischer (รุ่น V30S Compact Volumetric KF Titrator บริษัท METTLER TOLEDO ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.1.12 เครื่อง Gas chromatography (รุ่น GC126N บริษัท INESA สาธารณรัฐประชาชนจีน)

3.1.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง Centrifuge (รุ่น CF-10 บริษัท witeg GERMANY สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

3.1.14 ดิสก์ขนาด 6 มิลลิเมตร (Whatman™ บริษัท Bang Trading สาธารณรัฐประชาชนจีน)

3.1.15 Cotton swab เบอร์ M (รุ่น SOFTIP บริษัท Longmed ประเทศไทย)

3.1.16 จานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90mm x 15mm

3.1.17 กล้องถ่ายภาพไฟล่าง

3.1.18 กล้องถ่ายภาพไฟบน

3.1.19 96 well plate

3.2 สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 สารเคมี: Sodium acetate (AR grade บริษัท LOBA chemie), Glacial acetic acid (AR grade บริษัท QRèC), 37% Hydrochloric acid (AR grade บริษัท QRèC), TPTZ (2,4,6-tripyridyl-5-triazine) (AR grade บริษัท Sigma), Iron(II) sulphate heptahydrate (AR grade บริษัท QRèC), Iron(III) chloride hexahydrate (AR grade บริษัท QRèC), Ethyl alcohol (AR grade บริษัท QRèC), Methyl alcohol (AR grade บริษัท QRèC), DMSO (Dimethyl sulphoxide) (AR grade บริษัท LOBA chemie), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (AR grade บริษัท Sigma), L-ascorbic acid (AR grade บริษัท LOBA chemie), Gallic acid (AR grade บริษัท ACROS), Sodium carbonate anhydrous (AR grade บริษัท LOBA chemie), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (AR grade บริษัท LOBA chemie)

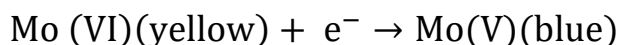
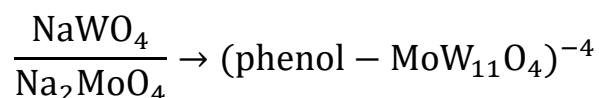
3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ: Mueller Hilton Agar (Himedia@Laboratories Pvt. Ltd., สาธารณรัฐอินเดีย), Mueller Hilton Broth (Himedia@Laboratories Pvt. Ltd., สาธารณรัฐอินเดีย),

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของระบบที่พัฒนาขึ้น

3.3.1 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบ

3.3.1.1 วิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระประเภทสารประกอบพอลิฟีนอลโดยรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557) (กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ, 2553)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดในพืชผักผลไม้ หรือสารต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ โดยจะอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ในการทำให้เกิดปฏิกิริยา โดยสารเคมีที่ใช้ คือน้ำยา Folin-Ciocalteu ประกอบไปด้วย โซเดียมทังสเตน (Sodium tungstate ; Na_2WO_4) โซเดียมโมลิบเดต (Sodium molybdate ; Na_2MoO_4) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) และโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) การวิเคราะห์โดยวิธีนี้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงสีจากปฏิกิริยาของไอออน M(VI) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ M(V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน ดังสมการ



การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยจะรายงานเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่เป็นกรดพีนอล สารที่นิยมใช้ คือสารมาตรฐานกรดแกลลิก เนื่องจากมักจะพบในตัวอย่างพืชทั่วไป

สารเคมี

- Sodium carbonate anhydrous
- Gallic acid
- Ethyl alcohol
- DMSO (Dimethyl sulphoxide)
- Folin-Ciocalteu's phenol reagent

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายในการตรวจวัดสารประกอบพอลิฟีนอลโดยรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

- เตรียม 7% (w/v) Sodium carbonate ปริมาตร 50 ml

| | |
|----------------------------|-------|
| Sodium carbonate anhydrous | 3.5 g |
| DI water (type II) | 50 ml |

2. สร้างกราฟมาตรฐานในการทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard) ที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP assay

- เตรียม stock 1 mg/ml Gallic acid ปริมาตร 1 ml

| | |
|----------------------------|------|
| Gallic acid | 1 mg |
| DMSO (Dimethyl sulphoxide) | 1 ml |

จากนั้นนำ Stock 1 mg/ml Gallic acid มาเจือจางเป็น 2-fold dilution โดยนำสารละลาย 1 mg/ml Gallic acid มา 2.5 ml เจือจางด้วย DMSO 2.5 ml (500 µg/ml) แล้วใช้เป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างกัน โดยเจือจางเป็น 2-fold dilution ที่ความเข้มข้น 250, 125, 62.5, และ 31.25 µg/ml ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดลองสร้างกราฟมาตรฐาน

1. นำสารตัวอย่าง Gallic acid แต่ละความเข้มข้น 125 µl ผสมกับ Folin-Ciocalteu's phenol reagent 125 µl และ DI water 500 µl ในหลอด 15 ml
2. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 6 นาที
3. เติม 7% (w/v) Sodium carbonate 1.25 ml และ DI water อีก 1 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 90 นาที
4. เมื่อครบเวลานำสารจากหลอด ใส่ลง 96 well plate หลอดละ 200 µl อย่างละ 3 หลุม
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

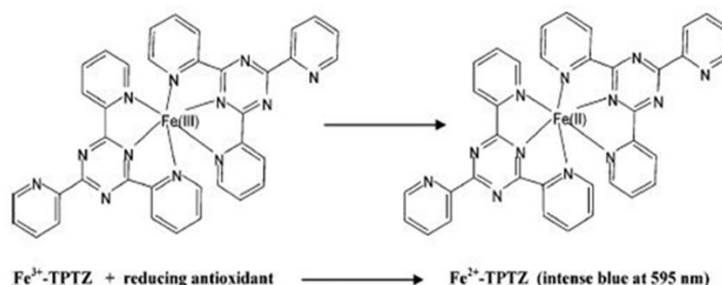
ชั่งสารสกัด 10 mg ละลายด้วย Ethyl alcohol 1 ml [10 mg/ml] ใช้เป็น stock สารแล้วทำการเจือจางด้วย Ethyl alcohol เป็น 2-fold dilution ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 mg/ml ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 125 μ l ผสมกับ Folin-Ciocalteu's phenol reagent 125 μ l และ DI water 500 μ l ในหลอด 15 ml
2. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 6 นาที
3. เติม 7% (w/v) Sodium carbonate 1.25 ml และ DI water อีก 1 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 90 นาที
4. เมื่อครบเวลานำสารจากหลอด ใส่ลง 96 well plate หลอดละ 200 μ l อย่างละ 3 หลุม
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร
6. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับค่าจากกราฟมาตรฐาน

3.3.1.2 วิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP assay) (ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557)

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) เป็นการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชันหรือวัดความสามารถการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยหลักการดังนี้ สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนสารประกอบ $[\text{Fe(III)} - (\text{TPTZ})_2]^{3+}$ เปลี่ยนเป็นสารประกอบ $[\text{Fe(II)} - (\text{TPTZ})_2]^{2+}$ จึงจัดว่าสารนั้นเป็นสารที่มีความสามารถรีดิวซ์ (Reducing agent)



รูปที่ 3.4 แสดงปฏิกิริยาของความสามารถการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบ $[\text{Fe(III)} - (\text{TPTZ})_2]^{3+}$ เปลี่ยนเป็นสารประกอบ $[\text{Fe(II)} - (\text{TPTZ})_2]^{2+}$ (Karina et.al., 2018) สารที่มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเท่ากับมีความสามารถในการรีดิวซ์ FRAP หรือสามารถสังเกตได้จากการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 nm

สารเคมี

- Sodium acetate
- Glacial acetic acid
- 37% Hydrochloric acid
- TPTZ (2,4,6-tripyridyl-5-triazine)
- Iron(II) sulphate heptahydrate
- Iron(III) chloride hexahydrate
- Ethyl alcohol
- DMSO (Dimethyl sulphoxide)

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายในการตรวจวัด FRAP assay

- เตรียม 0.28 mM Acetate buffer (pH 3.6) ปริมาตร 100 ml

Sodium acetate 2.3 g
 Glacial acetic acid 7.6 g
 ปรับ pH ด้วย 5N HCl จนได้ pH = 3.6

- เตรียม 40 mM Hydrochloric Acid (HCl) ปริมาตร 100 ml
 37% Hydrochloric Acid (HCl) 0.33 ml
 DI water (type II) 99.67 ml
- เตรียม TPTZ : 2, 4, 6-tripyridyl-5-triazine ปริมาตร 800 μ l
 TPTZ : 2, 4, 6-tripyridyl-5-triazine 2.5 mg
 40 mM Hydrochloric Acid (HCl) 800 μ l
- เตรียม Iron(III) chloride hexahydrate ปริมาตร 1 ml
 Iron(III) chloride hexahydrate 5 mg
 DI water (type II) 1 ml

หมายเหตุ : เตรียมสาร TPTZ และ Iron(III) chloride hexahydrate ใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง

- เตรียมสารละลาย FRAP reagent
 0.28 mM Acetate buffer (pH 3.6) 7 ml
 2,4, 6-tripyridyl-5-triazine (TPTZ) 700 μ l
 Iron(III) chloride hexahydrate 700 μ l

หมายเหตุ : เตรียมสารละลาย FRAP reagent ใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง เก็บให้พ้นแสงและความร้อน

2. สร้างกราฟมาตรฐานในการทดสอบด้วยวิธี FRAP assay

เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard) ที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP assay

- เตรียม 5,000 μ M Iron(II) sulphate heptahydrate ปริมาตร 1 ml
 Iron(II) sulphate heptahydrate 1.4 mg
 DI water (type II) 1 ml

จากนั้น นำ Stock 5,000 μ M Iron(II) sulphate heptahydrate มา dilute 10 เท่า โดยนำสารละลาย 5,000 μ M Iron (II) sulphate heptahydrate มา 100 μ l เจือจางด้วย DI water 900 μ l (500 μ M) แล้วใช้เป็น

stock สาร เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างกัน เจือจางเป็น 2-fold dilution ที่ความเข้มข้น 250, 125, 62.5, 31.25 และ 15.625 μM ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดลองสร้างกราฟมาตรฐาน

1. นำสารตัวอย่าง Iron(II) Sulphate แต่ละความเข้มข้น 20 μl ผสมกับ FRAP reagent 180 μl
2. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี FRAP assay

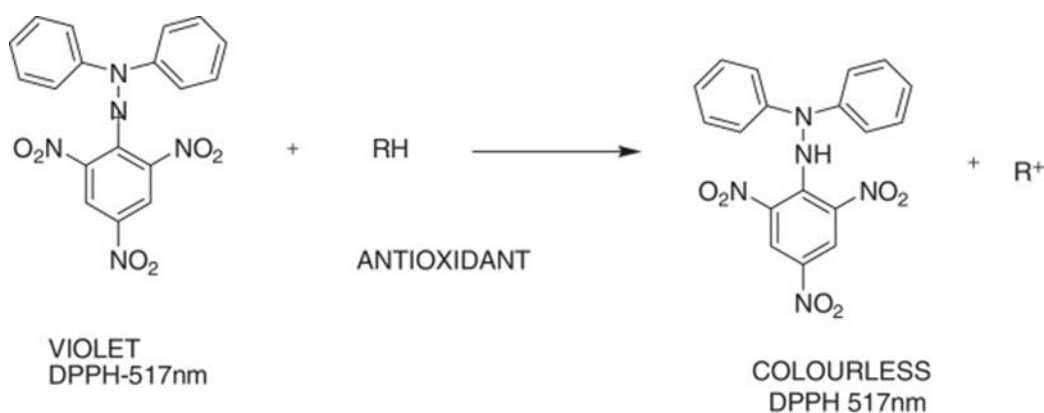
ซึ่งสารสกัด 10 mg ละลายด้วยไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 1 ml [10 mg/ml] ใช้เป็น stock สารแล้วทำการเจือจางด้วย DMSO เป็น 2-fold dilution ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 mg/ml ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 20 μl ผสมกับ FRAP reagent 180 μl
2. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
4. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับค่าจากกราฟมาตรฐาน

3.3.1.3 วิเคราะห์ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH Free Radical Scavenging Method (ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557) (กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ, 2553)

เป็นการทดสอบกิจกรรมหรือฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและมีสีม่วง เมื่อ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมจากสารต้านอนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนเป็น DPPH-H ซึ่งไม่มีสีแสดงดังรูปที่ 3.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างสารที่ใช้ในการทดสอบมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลาย DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเข้ม และค่อยๆ ลดลงตามความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมของสารทดสอบ ซึ่งถ้าหากมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง



รูปที่ 3.5 กลไกของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำปฏิกิริยากับอนุมูล DPPH (Pattusamy Nithya and Changa Madhavi, 2017)

สารเคมี

- DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
- Methyl alcohol
- Gallic acid
- L-ascorbic acid
- DMSO (Dimethyl sulphoxide)

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายในการตรวจวัด DPPH assay

- เตรียม 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ปริมาตร 20 ml

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) | 0.00157 g |
| Methyl alcohol | 20 ml |

หมายเหตุ : เตรียมสารละลาย DPPH reagent ใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดลอง เก็บให้พ้นแสงและความร้อน

2. สร้างกราฟมาตรฐานในการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Gallic acid) ที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay

- เตรียม 1 mg/ml Gallic acid ปริมาตร 1 ml

| | |
|----------------|------|
| Gallic acid | 1 mg |
| Methyl alcohol | 1 ml |

จากนั้น นำ 1 mg/ml Gallic acid มา dilute 10 เท่า โดยนำสารละลาย 1 mg/ml Gallic acid มา 10 μ l เจือจางด้วย Methyl alcohol 990 μ l (10 μ g/ml) เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างกัน เจือจางเป็น 2-fold dilution ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 μ g/ml ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดลองสร้างกราฟมาตรฐาน

1. นำสาร Gallic acid แต่ละความเข้มข้น 50 μ l ผสมกับ DPPH reagent 100 μ l
2. ทำ blank เพื่อมาลบกับตัวอย่าง โดยนำสาร Gallic acid แต่ละความเข้มข้น 50 μ l ผสมกับ Methyl alcohol 100 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร
4. นำค่าที่ได้ไปคำนวณ %Scavenging และสร้างกราฟมาตรฐาน

2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน (L-ascorbic acid) ที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay

- เตรียม 5,000 μ g/ml L-ascorbic acid ปริมาตร 1 ml

| | |
|--------------------|------|
| L-ascorbic acid | 5 mg |
| DI water (type II) | 1 ml |

จากนั้น นำ 5,000 μ g/ml L-ascorbic acid มา dilute โดยนำสารละลาย 5,000 μ g/ml L-ascorbic acid มา 5 μ l และ 8 μ l เจือจางด้วย DI water (type II) 995 μ l (25 μ g/ml) และ 992 μ l (40 μ g/ml) ตามลำดับ นำ 40 μ g/ml L-ascorbic acid มาเจือจางเป็น 2-fold dilution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ความเข้มข้น 20, 10, 5 และ 2.5 μ g/ml ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดลองสร้างกราฟมาตรฐาน

1. นำสาร L-ascorbic acid แต่ละความเข้มข้น 50 μ l ผสมกับ DPPH reagent 100 μ l

2. ทำ blank เพื่อมาลบกับตัวอย่าง โดยนำสาร L-ascorbic acid แต่ละความเข้มข้น 50 µl ผสมกับ Methyl Alcohol 100 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปป้อนที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

4. นำค่าที่ได้ไปคำนวณ %Scavenging และสร้างกราฟมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH assay

ซึ่งสารสกัด 10 mg ละลายด้วยไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 1 ml [10 mg/ml] ใช้เป็น stock สารแล้วทำการเจือจางด้วย DMSO เป็น 2-fold dilution ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 mg/ml ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 50 µl ผสมกับ DPPH reagent 100 µl

2. ทำ blank เพื่อมาลบกับตัวอย่าง โดยนำสารสกัด แต่ละความเข้มข้น 50 µl ผสมกับ Methyl Alcohol 100 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปป้อนที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

4. นำค่าที่ได้ไปคำนวณ %Scavenging และสร้างกราฟ

ใช้ Gallic acid และ L-ascorbic acid เป็นสารควบคุมทางบวก ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH (\%Scavenging)} = \left[\frac{(A-B)(C-D)}{(A-B)} \right] (100)$$

โดย

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH 100 µl กับ DI water หรือ DMSO หรือ Methyl alcohol 50 µl

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Methyl alcohol 100 µl กับ DI water หรือ DMSO หรือ Methyl alcohol 50 µl

C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนสกัด 50 µl กับ DPPH 100 µl

D คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Methyl alcohol 100 µl กับส่วนสกัด 50 µl

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

3.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

3.3.2.1 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดย Disk Diffusion Assay (EUCAST Version 7.0, 2019)

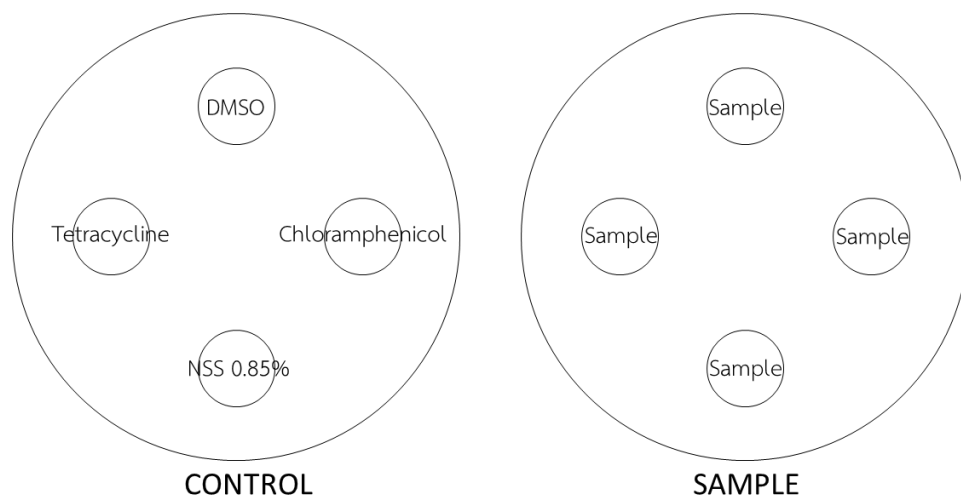
การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. diphtheriae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* และแกรมลบ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. tarda*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. typhimurium*, *S. marcescens*, *P. mirabillis*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica*

โดยเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานจาก American Type Culture Collection (ATCC) และศูนย์รวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMST Culture Collection) นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Muller Hinton Agar โดยการเชยเชื้อ 4-5 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller Hinton Broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland Standard No. 0.5 โดยให้มีจำนวนเชื้อ 1.5×10^8 CFU/ml สำหรับแบคทีเรีย และ No. 0.5 โดยให้มีจำนวนเชื้อ 1.5×10^6 CFU/ml สำหรับยีสต์ ปรับความขุ่นให้ใกล้เคียงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Muller Hinton Broth

การทดสอบ

นำไม้พินสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ มาทำการ Spread เชื้อที่เตรียมไว้ลงบน Muller Hinton Agar ให้ทั่ว วางอาหารเลี้ยงเชื้อที่ Spread แล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ใช้ปากคีบปลายแหลม จุ่ม 70 % แอลกอฮอล์ ลนไฟ รอจนกระทั่งปากคีบเย็นดีแล้วจึงคีบ Antibiotic Disc ชนิดต่าง ๆ วางลงบนผิวหน้าอาหาร (เว้นระยะห่างระหว่างแผ่นดิสก์ และระยะห่างระหว่างขอบจานให้เหมาะสม) กดเบา ๆ ด้วยปากคีบให้แผ่นดิสก์แนบติดกับผิวหน้าอาหารที่เตรียมไว้บน Muller Hinton Agar ที่มีเชื้ออยู่ นำ Plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ วัด Zone of Inhibition ที่เกิดรอบ Paper Disc ของสารสกัด เปรียบเทียบกับตัวควบคุม ดิสก์ยามาตรฐาน Tetracycline, Chloramphenical (Positive control) และ DMSO 100%, NSS 0.85% (Negative control)



รูปที่ 3.6 การวางตำแหน่ง Disc สำหรับทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ โดย Disk Diffusion Assay

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

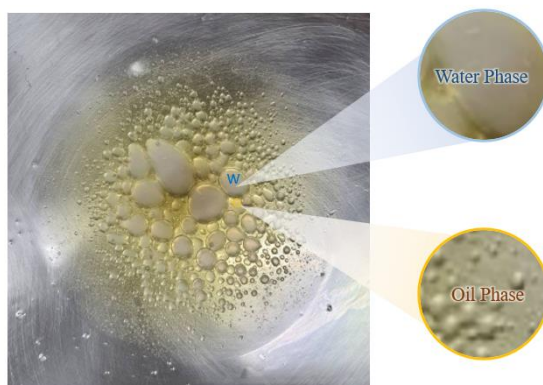
โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนานวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูง และได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด โดยโครงการในปีที่ 2 ได้ทำการพัฒนาระบบการสกัดพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลายจุดเดือดต่ำ ร่วมกับความดัน โดยไม่ใช้ความร้อนเข้ามาเสริมประสิทธิภาพในกระบวนการสกัด ทำให้สามารถสกัดพืชสมุนไพรทั้งแบบสดและแบบแห้งได้

การพัฒนากระบวนการสกัดด้วยระบบการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤต (Subcritical) จะช่วยแก้ไขจุดอ่อนของวิธีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด ที่ใช้สภาวะในการสกัดร่วมกับความดันสูง (จุดวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิวิกฤต (Critical Temperature, T_c) ความดันวิกฤต (Critical Pressure, P_c) ความหนาแน่นวิกฤต (Critical Density, D_c) เท่ากับ 31.1 องศาเซลเซียส 73.8 บาร์ และ 0.468 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ) ทำให้ไม่สามารถที่จะนำมาสกัดกลุ่มพืชสมุนไพรที่มีความอ่อนตัว รวมไปถึงระบบความปลอดภัยของกระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ต้องใช้วัสดุ อุปกรณ์ที่ทนต่อแรงดันสูง ยากต่อการนำคาร์บอนไดออกไซด์วนกลับมาใช้ซ้ำ ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาต่อยอดระบบการสกัดในสภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤตเพื่อเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการสกัดพืชสมุนไพรทั้งแบบแห้งและแบบสดให้มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงขึ้น

โครงการวิจัยนี้จะทำการทดสอบประสิทธิภาพของระบบโดยการสกัดพืชสมุนไพรที่มีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกัน และทำการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบเบื้องต้นในด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลรวม การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบบที่เรื้อย และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS)

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกมะลิสด

การทดสอบประสิทธิภาพระบบการสกัดที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคโนโลยีการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical) โดยการเลือกใช้ดอกมะลิสดเป็นวัตถุดิบเป้าหมายเพื่อสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกมะลิสดปลอดสารจากสวนมะลิปลอดสารนครชัยศรี โดยทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (R134a) ดอกมะลิสดปลอดสารถูกบรรจุในคอลัมน์สกัดที่ซึ่งมีการสกัดด้วยตัวทำละลาย R134a ภายใต้สภาวะการสกัดต่ำกว่า 20 บาร์ และมีการวนตัวทำละลายกลับมาใช้ซ้ำ ดอกมะลิจะถูกเก็บจากสวนในช่วงบ่ายเพื่อให้มีกลิ่นความหอมของดอกมะลิมากที่สุดและทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สภาวะในการสกัดจะศึกษาเปรียบเทียบการสกัดดอกมะลิแบบมีก้าน และแบบไม่มีก้าน รวมถึงการสกัดร่วมกับน้ำมันอัลมอนต์ในการกักเก็บสารสำคัญของดอกมะลิ หลังผ่านกระบวนการสกัด สารสกัดหยาดดอกมะลิจะแยกออกมาเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ละลายน้ำ และส่วนที่ละลายน้ำมัน ดังรูปที่ 4.1.1 โดยส่วนที่ละลายน้ำหรือเฟสน้ำ เป็นน้ำที่อยู่ในดอกมะลิสดซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดและศึกษาคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ในกลุ่มมีชีวะ ในขณะที่ส่วนที่ละลายน้ำมันสามารถนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นน้ำมันหอมระเหยเข้มข้นเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เครื่องหอม รวมไปถึงการบำบัดรักษาความตึงเครียดด้วยสุคนธบำบัด



รูปที่ 4.1.1 สารสกัดหยาดจากดอกมะลิสดเมื่อทำการสกัดด้วยเทคโนโลยีการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด

ตัวอย่างดอกมะลิสดหลังการสกัดพบว่า ดอกมะลิที่ผ่านการสกัดกลีบดอกมีความใสโปร่งและมีลักษณะอ่อนตัวลงเมื่อเทียบกับดอกมะลิสดก่อนการสกัด เมื่อทำการทดสอบกลิ่นด้วยการดมพบว่า ไม่มีกลิ่นหอมของดอกมะลิเหลืออยู่ในกาก กลิ่นหอมของดอกมะลิสดจะอยู่ในสารสกัดที่ทำการสกัดออกมาได้ ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการสกัดสามารถพิจารณาได้จากกากของดอกมะลิหลังการสกัด กล่าวคือ หากประสิทธิภาพในการสกัดสูงกากของกลีบดอกมะลิจะมีความโปร่งใสทั้งหมดและไม่มีกลิ่นหอมของดอกมะลิค้างอยู่ที่กาก ในขณะที่หากประสิทธิภาพในการสกัดต่ำกากของกลีบดอกมะลิจะยังคงมีสีขาวขุ่นและมีกลิ่นหอมของดอกมะลิสดติดอยู่ที่กาก ดังรูปที่ 4.1.2







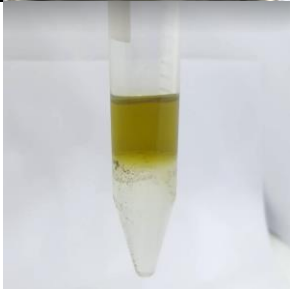

รูปที่ 4.1.2 ดอกมะลิหลังสกัด ตำแหน่งวงกลมสีดำยังคงมีน้ำมันหอมระเหยอยู่

4.1.1 ปริมาณสารสกัดหยาบ

ปริมาณสารสกัดหยาบของดอกมะลิสดเมื่อทำการเปรียบเทียบการเตรียมดอกมะลิแบบตัดก้าน ไม่ตัดก้าน และการสกัดแบบไม่ตัดก้านร่วมกับน้ำมันอัลมอนต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1.1 พบว่าการสกัดดอกมะลิสดแบบไม่ตัดก้านจะมีปริมาณสารสกัดหยาบน้ำมันมากที่สุด คือ ร้อยละ 0.30 ในขณะที่การสกัดดอกมะลิสดแบบตัดก้านจะให้ปริมาณสารสกัดหยาบ ร้อยละ 0.22 ซึ่งเท่ากับการสกัดดอกมะลิสดไม่ตัดก้านร่วมกับน้ำมันอัลมอนต์ เมื่อพิจารณากลิ่นของสารสกัดหยาบน้ำมันด้วยวิธีการดมพบว่า การสกัดดอกมะลิสดตัดก้านให้กลิ่นที่มีความหอมเข้มข้นเหมือนดอกมะลิสดมากกว่าการสกัดดอกมะลิสดแบบไม่ตัดก้าน ทั้งนี้เนื่องมาจากก้านของดอกมะลิมีลักษณะเป็นยางและมีกลิ่นเขียวปนมาในสารสกัดหยาบจึงทำให้กลิ่นของสารสกัดหยาบมีกลิ่นขี้

ตารางที่ 4.1.1 แสดงลักษณะของวัตถุดิบ สารสกัดหยาบ ปริมาณน้ำมัน ของลักษณะตัวอย่างมะลิสดที่แตกต่างกัน โดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a

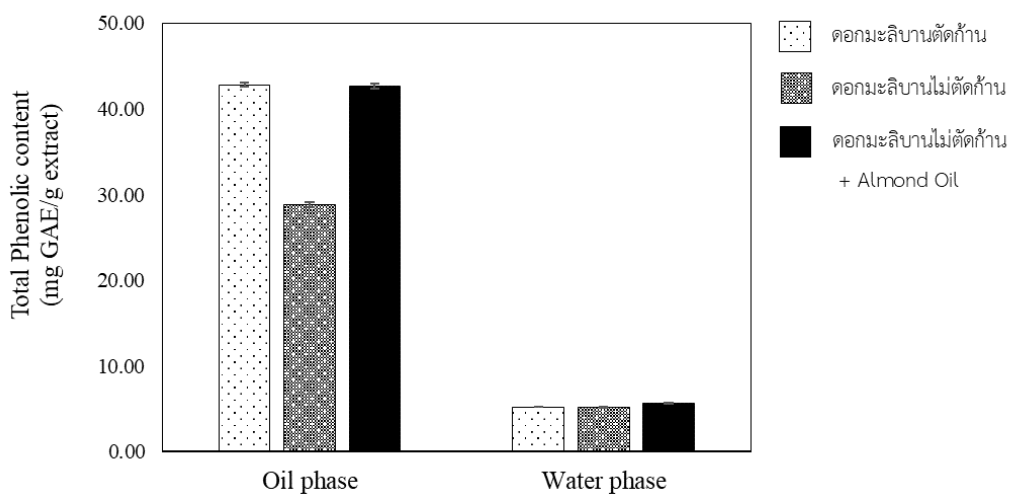
| | มะลิสดดอกบาน ตัดก้าน | มะลิสดดอกบาน ไม่ตัดก้าน | มะลิสดดอกบานไม่ตัดก้าน ร่วมกับน้ำมันอัลมอนต์ |
|------------------------------|---|--|---|
| วัตถุดิบก่อนเข้า ระบบสกัด |  |  |  |

| | มะลิสต์ดอกบาน ตัดก้าน | มะลิสต์ดอกบาน ไม่ตัดก้าน | มะลิสต์ดอกบานไม่ตัดก้าน ร่วมกับน้ำมันอัลมอนต์ |
|--|---|--|---|
| ลักษณะสาร สกัดหยาบ |  |  |  |
| สารสกัดหยาบ หลังจากปั่นเหวี่ยง เพื่อทำให้แยกชั้น |  |  |  |
| ปริมาณน้ำมัน (กรัม) | 0.697 | 1.7556 | 2.8950 (รวมน้ำมันอัลมอนต์ 1 กรัม) |
| ปริมาณน้ำมัน (ร้อยละ) | 0.22% | 0.30% | 0.22% (ไม่รวมน้ำมันอัลมอนต์) |

4.1.2 ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ

4.1.2.1 ปริมาณฟีนอลรวม

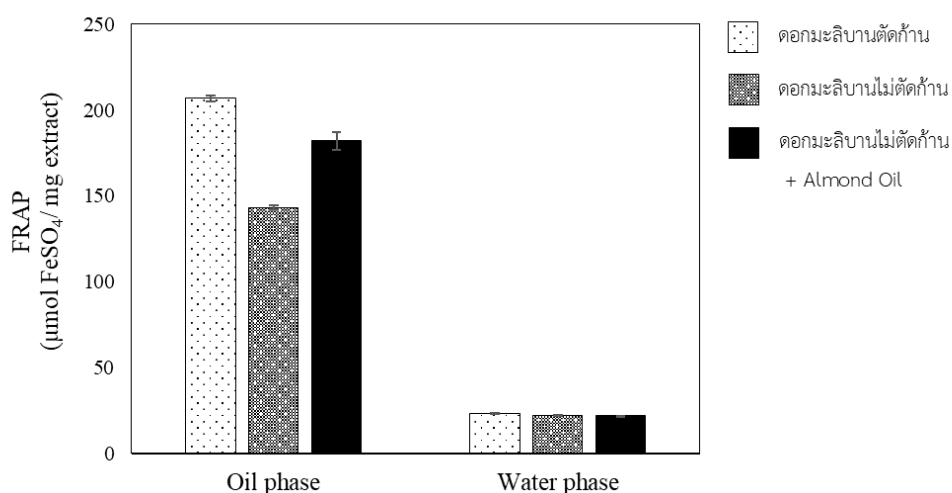
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเทคโนโลยีการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวดโดยใช้ตัวทำละลาย R134a ในด้านการทดสอบหาปริมาณฟีนอลรวมในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบสารสกัดหยาบจากดอกมะลิในส่วนที่ละลายน้ำและละลายในน้ำมัน พบว่าสารสกัดหยาบจากดอกมะลิในส่วนที่ละลายในน้ำมันให้ปริมาณฟีนอลรวมอยู่ในช่วง 28.81 ± 0.28 ถึง 42.83 ± 0.20 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของสารสกัด และมีปริมาณสูงสุดเมื่อมีการเตรียมตัวอย่างแบบตัดก้าน หรือ ตัวอย่างแบบไม่ตัดก้านร่วมกับการใช้น้ำมันอัลมอนต์ จากการทดลองพบว่าการสกัดร่วมกับการใช้น้ำมันอัลมอนต์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดได้ร้อยละ 48 (ปริมาณฟีนอลในน้ำมันอัลมอนต์เท่ากับ 0.42 ± 0.00 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของสารสกัด) ในขณะที่สารสกัดหยาบจากดอกมะลิในส่วนที่ละลายน้ำมีปริมาณฟีนอลรวมอยู่ในช่วง 5.20 ± 0.00 ถึง 5.65 ± 0.03 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก สมมูลต่อกรัมของสารสกัด ดังรูปที่ 4.1.3



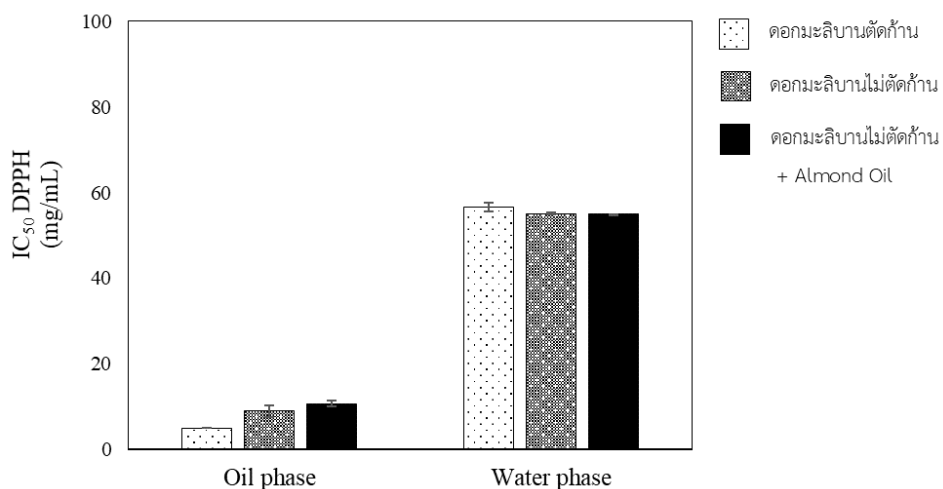
รูปที่ 4.1.3 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาดดอกมะลิ

4.1.2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบประสิทธิภาพของระบบการสกัดด้วยเทคโนโลยีการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด โดยใช้ตัวทำละลาย R134a ในการสกัดสารสกัดหยาดจากดอกมะลิสดในด้านการอนุมูลอิสระ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี FRAP และ DPPH พบว่า สารสกัดหยาดดอกมะลิสดในส่วนที่ละลายน้ำมันของตัวอย่างดอกมะลิบานตัดก้านมีความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรับอิเล็กตรอนอิสระ (Reducing Agent) FRAP เท่ากับ $206.79 \pm 1.75 \mu\text{mol FeSO}_4/\text{mg extract}$ และฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH มากที่สุด



รูปที่ 4.1.4 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาดดอกมะลิเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP



รูปที่ 4.1.5 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาดดอกมะลิเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

ตารางที่ 4.1.2 ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาดดอกมะลิสดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a

| ตัวอย่าง | Phase | Antioxidant properties | | Total Phenolic Content (mg GAE/ g extract) |
|--|-------|---|-----------------------------------|--|
| | | FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{mg extract}$) | IC ₅₀ of DPPH (mg/ mL) | |
| มะลิสดดอกบานตัดก้าน | Oil | 206.79 \pm 1.75 | 5.40 \pm 0.25 | 42.83 \pm 0.20 |
| มะลิสดดอกบานไม่ตัดก้าน | Phase | 143.31 \pm 0.99 | 8.96 \pm 1.37 | 28.81 \pm 0.28 |
| มะลิสดดอกบานไม่ตัดก้าน ร่วมกับน้ำมันอัลมอนด์ | | 182.05 \pm 5.14 | 10.75 \pm 0.69 | 42.65 \pm 0.34 |
| มะลิสดดอกบานตัดก้าน | Water | 23.26 \pm 0.21 | 56.70 \pm 1.00 | 5.20 \pm 0.00 |
| มะลิสดดอกบานไม่ตัดก้าน | Phase | 22.20 \pm 0.16 | 55.11 \pm 0.27 | 5.23 \pm 0.05 |
| มะลิสดดอกบานไม่ตัดก้าน ร่วมกับน้ำมันอัลมอนด์ | | 21.88 \pm 0.08 | 54.95 \pm 0.07 | 5.65 \pm 0.03 |
| น้ำมันอัลมอนด์ | | 5.59 \pm 0.44 | 63.84 \pm 10.00 | 0.42 \pm 0.00 |

หมายเหตุ:

ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm Standard Error of Mean โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ค่าความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ของสารสกัดจะแสดงในรูปของค่า IC_{50} ซึ่งคือค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถดักจับอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 หากค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาดตัวใดมีค่าสูงแสดงว่ามีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ ในทางกลับกันหากค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาดตัวใดมีค่าต่ำแสดงว่ามีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ค่า IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid และ Gallic Acid มีค่าเท่ากับ 14.88 ± 0.19 และ 4.22 ± 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาดจากดอกมะลิสดไม่ตัดก้านในส่วนที่ละลายน้ำมันมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.40 ± 0.25 mg/mL ในขณะที่สารสกัดหยาดดอกมะลิสดในส่วนที่ละลายน้ำ มีค่า FRAP อยู่ในช่วง 21.88 ± 0.08 ถึง 23.26 ± 0.21 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{mg extract}$ และ IC_{50} อยู่ในช่วง 54.95 ± 0.07 ถึง 56.70 ± 1.00 mg/mL ดังตารางที่ 4.1.2

4.1.3 การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Disk Diffusion

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาดดอกมะลิสดด้วยวิธี Disk Diffusion โดยทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 6 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 8 สายพันธุ์ เทียบกับสารควบคุมเชิงบวก 0.85% Normal Saline และ 100% DMSO โดยมี Chloramphenical และ Tetracycline เป็นชุดยาควบคุม

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดหยาดจากดอกมะลิพบว่า สารสกัดหยาดจากดอกมะลิสดในส่วนที่ละลายน้ำไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ในขณะที่สารสกัดหยาดจากดอกมะลิในส่วนที่ละลายในน้ำมันมีฤทธิ์การต้านเชื้อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ดังแสดงในตารางที่ 4.1.3 สารสกัดหยาดจากดอกมะลิตัดก้าน และสารสกัดจากดอกมะลิไม่ตัดก้านร่วมกับน้ำมันอัลมอนด์จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด กล่าวคือ สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ในทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดลอง ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงการเพิ่มประสิทธิภาพด้วยน้ำมันอัลมอนด์จะช่วยเสริมฤทธิ์การต้านเชื้อเพิ่มขึ้นเนื่องจากในน้ำมันอัลมอนด์มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อทั้งในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก

ตารางที่ 4.1.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลทรีย์ ด้วยวิธี Disk Diffusion

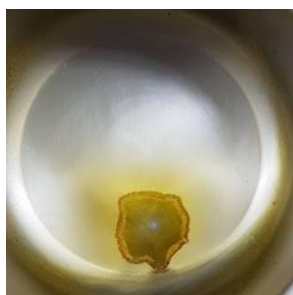
| Microbial strain | Zone of inhibition (mm) | | | | | | | |
|--------------------------|-------------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------------|-----------------------|---------------------------------|
| | Negative control | | Antibiotic control | | Almond Oil 100% | Oil Phase 50% | | |
| | NSS 0.85% | DMSO 100% | Chloramphenical | Tetracycline | | ดอกมะลิ ตัดก้าน | ดอกมะลิ ไม่ตัดก้าน | ดอกมะลิไม่ตัดก้าน Almond Oil |
| Gram-positive | | | | | | | | |
| <i>C. diphtheriae</i> | NI | NI | 38 | 35 | NI | 11 | NI | 11 |
| <i>E. faecalis</i> | NI | NI | 24 | 20 | 8 | 19 | 13 | 19 |
| <i>E. faecium</i> | NI | NI | 29 | 30 | 7 | 12 | 10 | 16 |
| <i>L. innocua</i> | NI | NI | 33 | 40 | NI | 10 | NI | 17 |
| <i>L. monocytogenes</i> | NI | NI | 33 | 39 | 7 | 12 | 12 | 18 |
| <i>S. aureus</i> | NI | NI | 26 | 33 | 7 | 14 | 12 | 17 |
| Gram-negative | | | | | | | | |
| <i>E. tarda</i> | NI | NI | 21 | 15 | 8 | 14 | 11 | 15 |
| <i>E. coli</i> | NI | NI | 21.3 | 11 | NI | 14 | 11 | 17 |
| <i>K. pneumonia</i> | NI | NI | 25 | 20 | 10 | 12 | 11 | 19 |
| <i>S. typhimurium</i> | NI | NI | 26 | 26 | 9 | 16 | 13 | 18 |
| <i>S. marcescens</i> | NI | NI | 22 | 13 | 9 | 12 | 10 | 15 |
| <i>P. mirabilis</i> | NI | NI | 20 | NI | 10 | 10 | 8 | 13 |
| <i>P. aeruginosa</i> | NI | NI | 18 | 17 | 8 | 12 | 11 | 17 |
| <i>Y. enterocolitica</i> | NI | NI | 22 | 24 | NI | 25 | 23 | 19 |

หมายเหตุ: NI = No Inhibition Zone

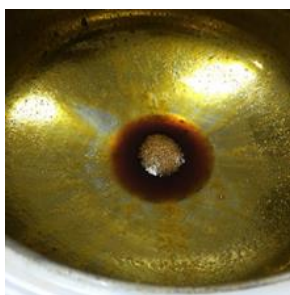
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการสกัดสารสกัดหยาบจากกัญชงและกัญชา

ทางคณะผู้วิจัย ได้รับความร่วมมือจากสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) และบริษัท วาทิน จำกัด ในการบรรยายและสกัดสารสำคัญจากกัญชง และกัญชา ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ โดยได้ทำการสกัดกัญชงและกัญชาทั้งในรูปแบบแห้งและแบบสด ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมด้วยเทคนิค Soxhlet เทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (SCCO₂) และเทคนิคการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤต โดยทำการเลือกใช้ตัวทำละลาย R134a และ R22

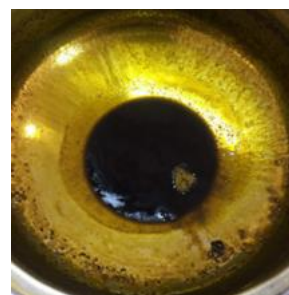
จากผลการทดลองพบว่าเทคนิคการสกัดที่แตกต่างกันส่งผลต่อลักษณะของสารสกัดหยาบที่แตกต่างกัน สารสกัดหยาบจากกระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (SCCO₂) จะมีลักษณะเหนียวข้นและมีปริมาณของสารสกัดหยาบน้อยกว่าการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤต และวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมด้วยเทคนิค Soxhlet ในขณะที่สารสกัดหยาบจากกระบวนการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤตโดยใช้ตัวทำละลาย R134a พบว่าลักษณะของสารสกัดหยาบมีความใส เป็นน้ำมันสีอ่อนกว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย R22 ซึ่งสารสกัดหยาบที่ได้จากเทคนิคการสกัดนี้ จะมีความข้นหนืดและมีสีคล้ำหรือสีเขียวของตัวอย่าง ดังรูปที่ 4.2.1 - 4.2.4



(ก)

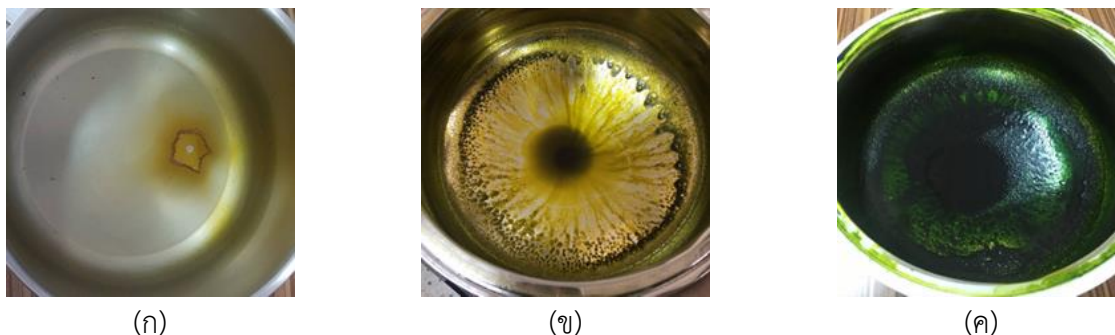


(ข)

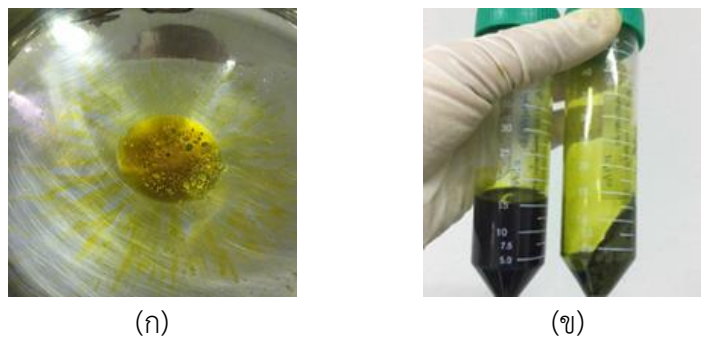


(ค)

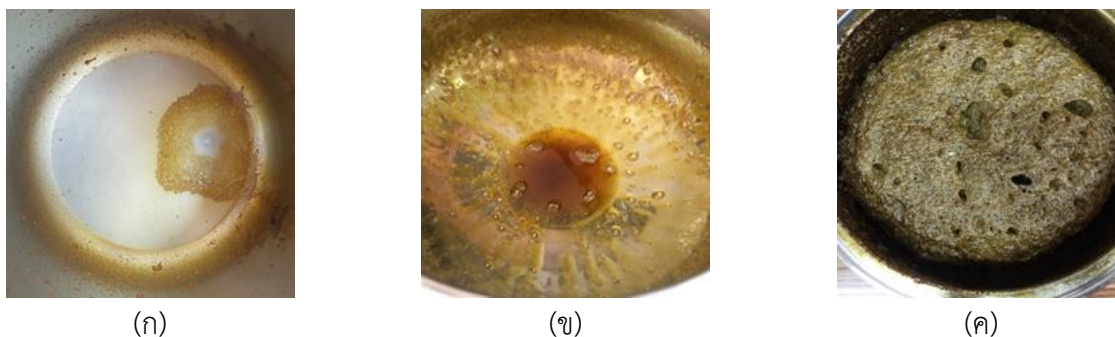
รูปที่ 4.2.1 แสดงลักษณะสารสกัดหยาบกัญชงอบแห้งเมื่อทำการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด SCCO₂ (ก) และเทคนิคการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤตโดยใช้ตัวทำละลาย R134a (ข) และ R22 (ค)



รูปที่ 4.2.2 แสดงลักษณะสารสกัดหยาบกับขงอบแห้งแบบรวดเร็วเมื่อทำการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด SCCO_2 (ก) และเทคนิคการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤตโดยใช้ตัวทำละลาย R134a (ข) และ R22 (ค)



รูปที่ 4.2.3 แสดงลักษณะสารสกัดหยาบกับขงสดเมื่อทำการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤตโดยใช้ตัวทำละลาย R134a (ก) และ R22 (ข)



รูปที่ 4.2.4 แสดงลักษณะสารสกัดหยาบกับขงอบแห้งเมื่อทำการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด SCCO_2 (ก) และเทคนิคการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤตโดยใช้ตัวทำละลาย R134a (ข) และ R22 (ค)

4.2.1 ปริมาณสารสกัดหยาบ

การศึกษาประสิทธิภาพของระบบการสกัดทางด้านปริมาณสารสกัดหยาบและปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม Cannabinoids ได้แก่ Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD) และ Cannabinol (CBN) ดังแสดงในตารางที่ 4.2.1 สารสกัดหยาบกัญชงจากกระบวนการสกัดด้วยของไหลต่ำกว่าจุดวิกฤตโดยใช้ตัวทำละลาย R134a และ R22 ไม่พบ THC และ CBN ในสารสกัดหยาบ ปริมาณ CBD ในตัวอย่างกัญชงอบแห้งสูงขึ้นเมื่อทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย R22 และ R13a โดยมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 7.82 และ 1.42 ตามลำดับ วิธีการเตรียมตัวอย่างกัญชงก่อนการสกัดส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญ กล่าวคือ กัญชงสดและกัญชงอบแห้งแบบรวดเร็วไม่พบสารสำคัญ THC CBD และ CBN

ปริมาณสารสำคัญ THC, CBD และ CBN ในตัวอย่างสารสกัดหยาบจากกัญชงอบแห้งพบ THC มากที่สุดเมื่อทำการสกัดด้วย R134a, Soxhlet และ R22 ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณ CBD สูงสุดเมื่อทำการสกัดด้วย Soxhlet, R134a และ R22 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2.1 แสดงปริมาณสารสกัดหยาบ ปริมาณสารสำคัญของตัวอย่างกัญชาและกัญชงด้วยเทคนิคการสกัดที่แตกต่างกัน

| ตัวอย่าง | เทคนิคการสกัด | ระยะเวลาการสกัด | ร้อยละปริมาณสารสกัดหยาบ | ปริมาณสารสำคัญ (ร้อยละ w/w) | | |
|---------------|---------------|-----------------|-------------------------|-----------------------------|------|-------|
| | | | | THC | CBD | CBN |
| กัญชงแห้งอบ | SCCO2 | 3 ชั่วโมง | <0.1 | - | - | - |
| | R134a | 3 ชั่วโมง | 2.16 | ND | 1.42 | ND |
| | R22 | 3 ชั่วโมง | 7.20 | ND | 7.82 | ND |
| กัญชงแห้งเร็ว | SCCO2 | 3 ชั่วโมง | <0.1 | - | - | - |
| | R134a | 3 ชั่วโมง | 2.00 | ND | 0.53 | ND |
| | R22 | 3 ชั่วโมง | 1.25 | ND | ND | ND |
| กัญชงสด | SCCO2 | - | - | - | - | - |
| | R134a | 3 ชั่วโมง | 0.80 | ND | ND | ND |
| | R22 | 3 ชั่วโมง | 3.2 | ND | ND | ND |
| กัญชาแห้ง | SCCO2 | 3 ชั่วโมง | <0.1 | - | - | - |
| | R134a | 3 ชั่วโมง | 2.38 | 57.50 | 2.20 | 18.04 |
| | R22 | 3 ชั่วโมง | 19 | 22.54 | 0.98 | 10.82 |

| ตัวอย่าง | เทคนิค การสกัด | ระยะเวลา การสกัด | ร้อยละ ปริมาณสาร สกัดหยาบ | ปริมาณสารสำคัญ (ร้อยละ w/w) | | |
|----------|-------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------------|------|------|
| | | | | THC | CBD | CBN |
| | Soxhlet | 40 ชั่วโมง | 19.81 | 16.36 | 2.37 | 3.83 |

หมายเหตุ:

ND = Not Detected

ปริมาณสารสำคัญ ได้รับความอนุเคราะห์ผลการวิเคราะห์จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 จังหวัด
เชียงใหม่

เมื่อพิจารณาปริมาณสารสกัดหยาบจากกัญชาแห่งพบว่า เทคนิคการสกัดแบบดั้งเดิมด้วย Soxhlet สามารถสกัดสารสกัดหยาบได้ปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ R22 และ R134a ตามลำดับ แต่เมื่อทำการพิจารณาปริมาณสารสกัดหยาบร่วมกับระยะเวลาในการสกัดพบว่า เทคนิคการสกัดด้วย Soxhlet ในระยะเวลาในการสกัด 40 ชั่วโมง ในขณะที่การสกัดด้วย R134a และ R22 ใช้เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมง ดังนั้นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการสกัดกัญชาอบแห้งให้มีปริมาณสูงด้วยระยะเวลาที่เหมาะสมคือ การสกัดด้วย R22

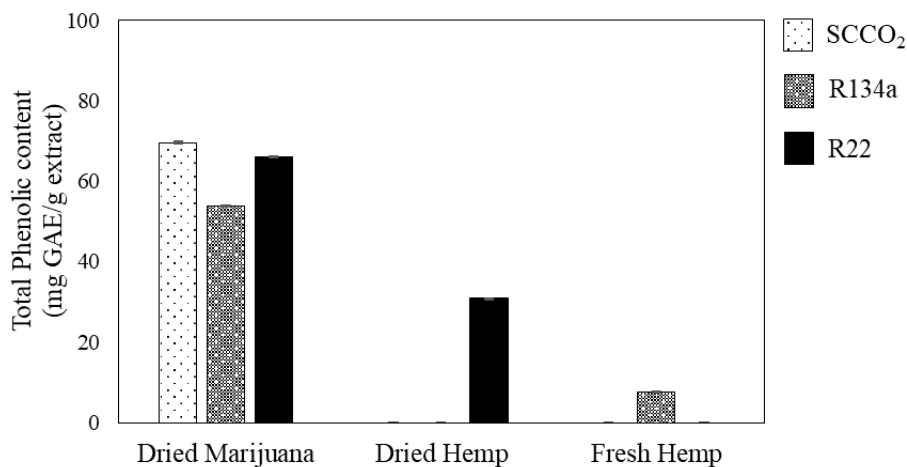
4.2.2 ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ

การทดสอบประสิทธิภาพด้านปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบกัญชาและกัญชงด้วยเทคนิคการสกัดที่แตกต่างกัน ทางคณะผู้วิจัยได้เดินทางไปทดสอบการสกัด ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ด้วยระยะเวลาที่จำกัด และข้อจำกัดในการนำสารสกัดหยาบกัญชากัญชงออกนอกพื้นที่ ทำให้ทางคณะผู้วิจัยไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ในทุกตัวอย่างที่ทำการสกัด ดังนั้น ผลการทดลองและวิจารณ์ในส่วนของปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงทำการเปรียบเทียบเฉพาะในส่วนที่ได้มีการวิเคราะห์เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปประยุกต์พัฒนาและศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในอนาคต

4.2.2.1 ปริมาณฟีนอลรวม

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบกัญชาและกัญชงที่ได้ผ่านการสกัดด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกันพบว่า ในตัวอย่างกัญชาแห่งมีปริมาณฟีนอลรวมสูงกว่าตัวอย่างกัญชงแห้งและกัญชงสด โดยตัวอย่างกัญชาแห่งมีปริมาณฟีนอลรวมอยู่ในช่วง 53.75 ± 0.18 ถึง 69.56 ± 0.26 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของสารสกัด

ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบกัญชาแห้งสูงสุดเมื่อทำการสกัดด้วยเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด R22 และ R134a ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.2.5



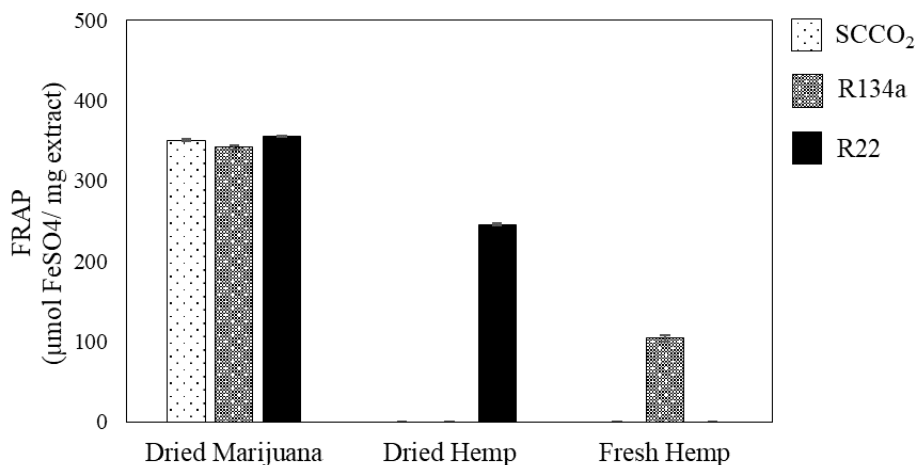
รูปที่ 4.2.5 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบกัญชา กัญชง ด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน

หมายเหตุ: กัญชงแห้ง สกัดด้วยวิธี SCCO₂ และ R134a ไม่ได้ทดสอบปริมาณฟีนอลรวม

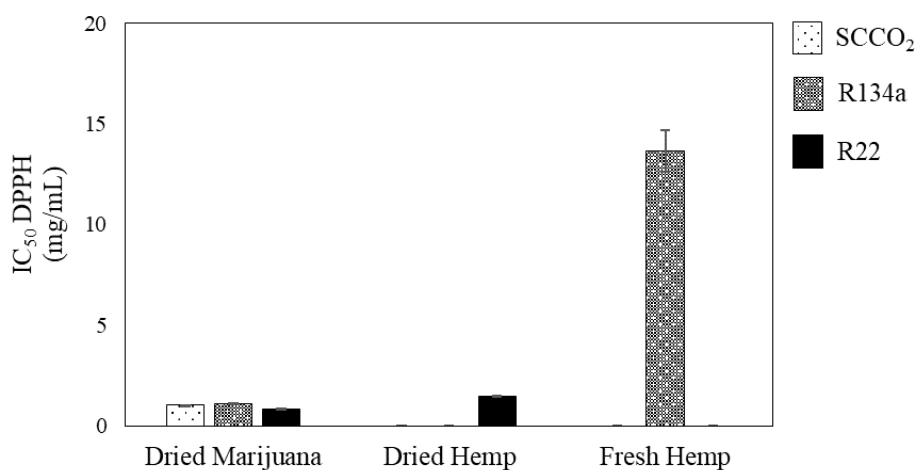
กัญชงสด สกัดด้วยวิธี SCCO₂ และ R22 ไม่ได้ทดสอบปริมาณฟีนอลรวม

4.2.2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบ FRAP และ DPPH ของสารสกัดหยาบจากกัญชาและกัญชงพบว่า สารสกัดหยาบจากกัญชาแห้งมีฤทธิ์ในด้านการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดหยาบจากกัญชงอบแห้งและกัญชงสดของทั้งสองวิธีการทดสอบ ดังรูปที่ 4.2.6 และ 4.2.7 เมื่อพิจารณาวิธีการที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบกัญชาแห้งด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดและการสกัดด้วยของไหล R134a และ R22 ในสถานะต่ำกว่าจุดวิกฤต ไม่พบความแตกต่างของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ DPPH โดยมีค่าอยู่ในช่วง 342.00 ± 2.51 ถึง 355.22 ± 0.42 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{mg extract}$ และ IC₅₀ 0.83 ± 0.01 ถึง 1.12 ± 0.02 mg/mL ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2.2



รูปที่ 4.2.6 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบกัญชา กัญชง เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP
 หมายเหตุ: กัญชงแห้ง สกัดด้วยวิธี SCCO₂ และ R134a ไม่ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay)
 กัญชงสด สกัดด้วยวิธี SCCO₂ และ R22 ไม่ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay)



รูปที่ 4.2.7 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบกัญชา กัญชง เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH
 หมายเหตุ: กัญชงแห้ง สกัดด้วยวิธี SCCO₂ และ R134a ไม่ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH assay)
 กัญชงสด สกัดด้วยวิธี SCCO₂ และ R22 ไม่ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH assay)

ตารางที่ 4.2.2 ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบกัญชาและกัญชงโดยใช้เทคนิคการสกัดที่แตกต่างกัน

| ตัวอย่าง | เทคนิคการสกัด | Antioxidant properties | | Total Phenolic Content (mg GAE/ g extract) |
|---------------|-------------------|---|-----------------------------------|--|
| | | FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{mg extract}$) | IC ₅₀ of DPPH (mg/ mL) | |
| กัญชงแห้งอบ | SCCO ₂ | - | - | - |
| | R134a | - | - | - |
| | R22 | 245.39 \pm 1.25 | 1.48 \pm 0.04 | 30.86 \pm 0.07 |
| กัญชงแห้งเร็ว | SCCO ₂ | - | - | - |
| | R134a | - | - | - |
| | R22 | - | - | - |
| กัญชงสด | SCCO ₂ | - | - | - |
| | R134a | 104.14 \pm 3.83 | 13.65 \pm 1.02 | 7.64 \pm 0.088 |
| | R22 | - | - | - |
| กัญชาแห้ง | SCCO ₂ | 350.56 \pm 1.12 | 1.02 \pm 0.01 | 69.56 \pm 0.26 |
| | R134a | 342.00 \pm 2.51 | 1.12 \pm 0.02 | 53.75 \pm 0.18 |
| | R22 | 355.22 \pm 0.42 | 0.83 \pm 0.01 | 66.01 \pm 0.18 |
| | Soxhlet | - | - | - |

4.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด ด้วยเทคโนโลยีการสกัดที่แตกต่างกันโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบได้รับความอนุเคราะห์ข้อมูลจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่ จากการวิเคราะห์พบว่ากัญชาอบแห้งมีสารองค์ประกอบมากที่สุด รองลงมาคือกัญชงอบแห้ง กัญชงอบแห้งแบบรวดเร็ว และกัญชงสด ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสารองค์ประกอบในกัญชาอบแห้งที่ปริมาณมากที่สุด คือ D9-THC รองลงมาคือ CBN, CBD, β -Caryophyllene, CBC เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 4.2.3

ตารางที่ 4.2.3 แสดงองค์ประกอบทางเคมีเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)

| Compound | MW | RT (min.) | RRt ¹ | % Area | | | | | | | | |
|---|--------|--------------|------------------|-------------|-------|---------|-------------|-------|---------------|------|---------|-----|
| | | | | กัญชาอบแห้ง | | | กัญชงอบแห้ง | | กัญชงแห้งเร็ว | | กัญชงสด | |
| | | | | R134a | R22 | Soxhlet | R134a | R22 | R134a | R22 | R134a | R22 |
| α -Pinene ² | 136.13 | 5.27 | 1.00 | ND | 0.23 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| β -Caryophyllene ³ | 204.19 | 23.73 | 1.00 | 1.68 | 0.84 | 0.33 | ND | 0.37 | ND | ND | ND | ND |
| α -farnesene (α Bergamotene) ³ | 204.19 | 24.29 | 1.02 | 0.34 | 0.13 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| b-farnesene ³ | 204.19 | 25.12 | 1.06 | 0.1 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| a-Humulene ³ | 204.19 | 25.20 | 1.06 | 0.49 | 0.17 | 0.14 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| b-Selinene ³ | 204.19 | 26.55 | 1.12 | 0.19 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Caryophyllene oxide ³ | 220.18 | 30.21 | 1.27 | 0.15 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| a-Bergamotene ³ | 204.19 | 34.11 | 1.44 | 0.2 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| THCV ⁴ | 286.19 | 53.86 | 2.27 | ND | ND | ND | ND | ND | 0.63 | ND | ND | ND |
| Cannabispiran ⁴ | 246.13 | 55.29 | 2.33 | ND | ND | ND | 0.54 | 0.51 | ND | ND | ND | ND |
| CBD ⁴ | 314.23 | 56.68 | 2.39 | 2.94 | 2.5 | 3.14 | 1.6 | 12.05 | 0.71 | 0.72 | ND | ND |
| CBC ⁴ | 314.23 | 57.07 | 2.41 | 0.52 | 0.72 | 0.76 | ND | 0.32 | ND | ND | ND | ND |
| D9-THC ⁴ | 314.23 | 59.38 | 2.50 | 58.82 | 43.39 | 67.91 | ND | ND | 0.09 | 0.13 | ND | ND |
| CBN ⁴ | 310.19 | 60.95 | 2.57 | 23.54 | 26.56 | 26.2 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

หมายเหตุ:

¹ RRT relative retention time to β -Caryophyllene, ² known to be monoterpenoids, ³ known to be sesquiterpenoids, ⁴ known to be cannabinoids

ND = Not Detected

องค์ประกอบทางเคมี ได้รับความอนุเคราะห์ผลการวิเคราะห์จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่

4.3 การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่นักวิจัยและผู้สนใจ

4.3.1 บรรยาย เรื่อง “การสกัดสารสำคัญออกฤทธิ์รักษาโรคจากสมุนไพรสดด้วยวิธี Supercritical Carbon dioxide (SCCO₂) และ Subcritical Solvents (SCSO)” ณ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อวันที่ 4 พฤศจิกายน 2562

4.3.2 บรรยาย เรื่อง “การสกัดสารสำคัญออกฤทธิ์รักษาโรคจากสมุนไพรสดด้วยวิธี Supercritical Carbon dioxide (SCCO₂) และ Subcritical Solvents (SCSO)” ณ วิทยาลัยการศึกษาและการจัดการทางทะเล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดสมุทรสาคร เมื่อวันที่ 8 พฤศจิกายน 2562

4.3.3 ร่วมบรรยายและสาธิต เรื่อง “การทดสอบเทคโนโลยีการสกัดสารสำคัญ THC และ CBD ในพืชสกุล Cannabis” ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) เมื่อวันที่ 13-24 มกราคม 2563



รูปที่ 4.3 ผศ.ดร.อลักษณ์ ทิพยรัตน์ และทีมงาม บรรยาย เรื่อง “การสกัดสารสำคัญออกฤทธิ์รักษาโรคจากสมุนไพรสดด้วยวิธี Supercritical Carbon dioxide (SCCO₂) และ Subcritical Solvents (SCSO)” ณ วิทยาลัยการศึกษาและการจัดการทางทะเล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดสมุทรสาคร เมื่อวันที่ 8 พฤศจิกายน 2562



รูปที่ 4.4 ผศ.ดร.อลักษณ์ ทิพย์รัตน์ และทีมงาน ร่วมบรรยายและสาธิต เรื่อง “การทดสอบเทคโนโลยีการสกัดสารสำคัญ THC และ CBD ในพืชสกุล Cannabis” ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) เมื่อวันที่ 13-24 มกราคม 2563

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

นวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด ผลการดำเนินโครงการในปีที่ 2 ได้ทำการพัฒนาระบบการสกัดด้วยของไหลภายใต้สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤต (Subcritical Extraction) โดยทำการเลือกใช้ตัวทำละลาย R134a และ R22 กระบวนการสกัดที่พัฒนาขึ้นสามารถแก้ไขปัญหาในการสกัดวัตถุดิบสดที่มีความอ่อนตัว เน่าเสียได้ง่าย ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ได้นำเสนอแนวทางการสกัดดอกมะลิสตจากสวนมะลิลอดสาร โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพในด้านปริมาณฟีนอลรวม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหายาจากดอกมะลิสตในส่วนที่ละลายน้ำมันมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดหายาจากดอกมะลิสตในส่วนที่ละลายน้ำ ในโครงการวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือจาก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ในการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องสกัดจากกัญชาและกัญชง โดยได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดที่แตกต่างกันรวมถึงการเตรียมตัวอย่างกัญชากัญชงก่อนการสกัดส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน กล่าวคือ กัญชาดกแห้งให้ผลในด้านปริมาณฟีนอลรวม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และสารสำคัญ ได้แก่ CBD THC CBN สูงกว่ากัญชาดกแห้งแบบรวดเร็ว และกัญชาสกัดสด จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโทรเมตรี พบว่า สารสกัดหายาจากกัญชาดกแห้งเมื่อสกัดด้วย R22 มีปริมาณ CBD CBC THC CBN น้อยกว่าการสกัดด้วย Soxhlet เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาการสกัดพบว่าการสกัดด้วย Soxhlet ใช้ระยะเวลาสกัด 40 ชั่วโมง ในขณะที่การสกัดด้วย R22 ใช้ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง ดังนั้นวิธีการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยของไหลภายใต้สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤต โดย R22 และ R134a เป็นทางเลือกในการสกัดสารสกัดหายาจากวัตถุดิบที่แตกต่างกัน ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่พัฒนาขึ้นโดยคนไทย ลดการพึ่งพาเทคโนโลยีหรือการนำเข้าเครื่องมือเครื่องจักรจากต่างประเทศ อีกทั้งระบบที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นในโครงการจะช่วยลดการใช้ตัวทำละลายที่มีการใช้กระบวนการสกัดโดยทั่วไป

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ
อยู่ระหว่างดำเนินการ

2. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการประยุกต์ใช้โดยภาครัฐกิจ
หรือบุคคลทั่วไป)

โครงการนวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด มีการสาธิตให้กับกลุ่มผู้สนใจ ดังนี้

- คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
- วิทยาลัยการศึกษาและการจัดการทางทะเล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดสมุทรสาคร
- ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)

3. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ผลงานจากโครงการวิจัยนี้จะช่วยลดการใช้ตัวทำละลายที่ไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้งานระบบที่ไม่ต้องสูดดมตัวทำละลายที่มีโอกาสเป็นพิษทำลายระบบทางเดินหายใจภายในร่างกาย รวมไปถึงผู้บริโภคได้รับผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีสารเคมีตกค้าง

เอกสารอ้างอิง

กล่าวขวัญ ศรีสุข ปรีดาวรรณ สาลี เยาวลักษณ์ เจริญสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. 2553. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย, 2 (ฉบับพิเศษ), 143-150

กุลชญา ไชยราช. สถาบันวิจัยสมุนไพร.สมุนไพรสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน การเปลี่ยนแปลงและพัฒนา. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/Plant/Mpri2013/pdf/26-6-58_kulchaya.pdf. เข้าถึงเมื่อ 30 มิถุนายน 2559

ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ และสนทยา ลิ้มมัทวาทิรต์. 2555. การสกัดพืชสมุนไพรโดยการสกัดด้วยของไหลความดันสูง (Herbal extraction by pressurized liquid extraction: PLE). วารสารไทยเภัชขนิพนธ์ (ฉบับการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์) มศก. ปีที่ 7 ฉบับเดือนมกราคม –เดือนธันวาคม 2555

ฐานข้อมูลเครื่องยาไทย. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร...ชิง. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=39>. เข้าถึงเมื่อ 29 มิถุนายน 2560

ดวงกมล เรือนงาม. 2557. การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ (Extraction of antioxidants). วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง ปีที่ 23 ฉบับที่ 2 เดือนกรกฎาคม- ธันวาคม 2557

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญจนบุตร และสาธิต พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มข. ครั้งที่ 9 “สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้”. 11-12 มิถุนายน 2551

ภิชณี วิจันท์ก และมารุต ตั้งวัฒนาจุลีพร. 2019. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส. Thammasat Medical Journal, Vol. 19, No, 1, pp. 79-89.

ศิริธร ศิริอมรพรรณ. 2557. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร. สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร (Antioxidants in Food). (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพมหานคร : โอเดียนสโตร์

สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร. 2558. “สถานการณ์การผลิตและการตลาดพืชสมุนไพร”. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.agriman.doe.go.th/home/news2/JOB/318_58-032.pdf. เข้าถึงเมื่อ 30 มิถุนายน 2560

Araújo, J.M. and D. Sandi, 2007, “Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide”, *Food Chemistry*, 101(3): p. 1087-1094.

Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahural, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., and Omar, A.K.M., 2013, “Techniques for extraction of bioactive compounds from plant material: A review”. *J FOOD ENG*, Vol. 117, pp. 426-436.

Badalyan, A.G., Wilkinson, G., and Chun B.S., 1998, “Extraction of Australian ginger root with carbon dioxide and ethanol entrainer”. *J SUPERCRIT FLUID*, Vol.13, pp. 319-324.

Bevilacqua, A., et al., 2017, “Bioactivity of essential oils towards fungi and bacteria: mode of action and mathematical tools”, *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety*, p. 231-246.

Bosquez-Molina, E., et al., 2010, “Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings”, *Postharvest Biology*, 57(2): p. 132-137.

Capeletto, C., Conterato, G., Scapinello, J., Rodrigues, F.S., Copini, M.S., Kuhn, F., Tres, M.V., and Magro, J.D., 2016, “Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of guavirova (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) seed extracts obtained by supercritical CO₂ and compressed n-butane”. *J SUPERCRIT FLUID*, Vol.110, pp. 32-38.

Care and living. 2014. ชื่อสมุนไพรได้มาอย่างไร “พืชสมุนไพรต่างๆของไทย”. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.careandliving.com>. เข้าถึงเมื่อ 25 มิถุนายน 2559

Catchpole, O.J., Perry, N.B., Silva, B.M.T., Grey, J.B., and Smallfield, B.M., 2002, "Supercritical extraction of herbs I: Saw Palmello, St John's Wort, Kava Root, and Echinacea". J SUPERCRIT FLUID, Vol.22, pp. 129-138.

Engelhardt, H., and Gross, A., 1991, "Supercritical fluid extraction and chromatography: potential and limitations". Trends in analytical chemistry, Vol. 10, no. 2, pp.64-70.

Fornari, T., Vicente, G., Vazquez, E., Garca-Risco, M.R., and Reglreo, G., 2012, "Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction", J CHROMATOGR A, Vol. 1250, pp. 34-48.

Genovese, S., et al., 2020, "A novel and efficient subcritical butane extraction method and UHPLC analysis of oxyprenylated phenylpropanoids from grapefruits peels", p. 113185.

Getachew, A.T., et al., 2018, "Concurrent extraction of oil from roasted coffee (*Coffea arabica*) and fucoxanthin from brown seaweed (*Saccharina japonica*) using supercritical carbon dioxide", 25: p. 137-146.

Global CCS institute. Appendix A-1: CO2 thermodynamics. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <https://hub.globalccsinstitute.com/publications/co2-liquid-logistics-shipping-concept-llsc-%E2%80%93-business-model-report/appendix-1-co2>. เข้าถึงเมื่อ 25 สิงหาคม 2559

Harde, S.M., Kagliwal, L.D., Singhal, R.S., and Patravale, V.B., 2013, "Supercritical fluid extraction of forskolin from *Coleus forskohlii* roots", J FOOD ENG, Vol. 117, pp. 443-449.

JSP Herbal Center. 2559. "บทความเกี่ยวกับสมุนไพร: แนวน้ำมันสมุนไพร ปัจจุบัน และอนาคต เป็นอย่างไร". (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.jspherbalcenter.net/articleherbal8.html>. เข้าถึงเมื่อ 30 มิถุนายน 2559

K. Pérez-Cruz., M. Moncada-Basualto., J. Morales-Valenzuela., G. Barriga-González., P. Navarrete-Encina., L. Núñez-Vergara., J.A. Squella., C. Olea-Azar. (2018). Synthesis and antioxidant study of new polyphenolic hybrid-coumarins. *Arabian Journal of Chemistry*, Vol.11, pp.525-537.

Laboureur, L., Ollero, M., and Touboul, D., 2015, "Lipidomics by Supercritical Fluid Chromatography" *Int.J.Mol.Sci.*, Vol.16, pp. 13868-13884.

Mehdi, M., et al., 2010, "Effect of cinnamon oil on incidence of anthracnose disease and postharvest quality of bananas during storage", *International Journal of Agriculture*, 12(4): p. 516-520.

Mohamed, R.S., and Mansoori, G.A., 2002, "The Use of Supercritical Fluid Extraction Technology in Food Processing", *Food Technology Magazine*.

NASA. 2008. A NASA-supported scientist is learning how to use carbon dioxide--the main gas in Mars' atmosphere--to harvest rocket fuel and water from the red planet. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.nasa.gov/vision/earth/technologies/harvestingmars.html>

Nithya, P., & Madhavi, C., 2017, Antioxidant activity of 3-arylidene-4-piperidones in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl scavenging assay. *Journal of Taibah University for Science*, 11:40-45

Sajidah BMY 3101. 2014. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://sajidahbmy3101.blogspot.com/2014_12_01_archive.html. เข้าถึงเมื่อ 25 สิงหาคม 2559

Salgm, U., 2007, "Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ethanol mixture in green and high-tech separation process". *J SUPERCRIT FLUID*, Vol.39, pp. 330-337.

Sang, J., et al., 2017, "Comparison and modelling of rutin solubility in supercritical carbon dioxide and subcritical 1, 1, 1, 2-tetrafluoroethane", *Journal of CO₂ Utilization*, 21: p. 1-8.

Santos, D.T., Barbosa, D.F., Broccolo, K., Gomes, T.M.S., Vardanega, R., and Meireles, M.A.A., 2012, “ Pressurized organic solvent extraction with on-line particle formation by supercritical anti solvent processes”. *Food and Public Health*, Vol. 2(6), pp. 231-240.

Singh, P., et al., 2011, “Preservation of *Buchnanian lanzan* Spreng. seeds by *Ocimum canum* Sims. essential oil”, *Annals of Plant Protection Sciences*, 19(2): p. 407-410.

Tan, L., L. Zhu, and Z. Feng, 2018, “Technical Study on Extraction of Procyanidins in *Lycium ruthenicum* Murr. Using Sub-critical Fluid 1, 1, 1, 2-Tetrafluoroethane (R134a) and Content Determination from Different Producing Areas”, *Medicinal Plant*, 9(5): p. 36-44.

UCDAVIS Chemwiki. Supercritical fluids. (ออนไลน์). แหล่งที่มา

http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Physical_Chemistry/Physical_Properties_of_Matter/States_of_Matter/Supercritical_Fluids. เข้าถึงเมื่อ 12 กรกฎาคม 2559

WellnessWest, 2005, “Supercritical Fluid Extraction: an upcoming “green” technology”, *Technology Watch*, Vol.2 (1).

Wesolowska, A., Jadczyk, D., and Grzeszczuk, M., 2011, “Chemical composition of the pepper fruit extracts of hot cultivars *Capsicum annuum* L.”, *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, Vol. 10 (1), pp. 171-184.

Yang, X., et al., 2018, “Chlorine dioxide fumigation generated by a solid releasing agent enhanced the efficiency of 1-MCP treatment on the storage quality of strawberry”, *Journal of food science*, 55(6): p. 2003-2010.

Zhang, J., et al., 2017, “Effect of chitosan coating combined with sulfur dioxide fumigation on the storage quality of fresh areca nut”, *Journal of Food Processing Preservation*, 41(3): p. 12974.

Zhang, X.-m. and M.-r. Fu, 2018, "Inhibitory effect of chlorine dioxide (ClO₂) fumigation on growth and patulin production and its mechanism in *Penicillium expansum*", LWT, 96: p. 335-343.

ภาคผนวก
(Appendix)

ตารางที่ A1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากดอกมะลิสดด้วยเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

| | Treatment | IC ₅₀ DPPH (mg/mL) | | | | |
|-------------|---------------------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | X1 | X2 | X3 | AV | SEM |
| Oil phase | ดอกมะลิบานตัดก้าน | 4.99 | 4.99 | 4.99 | 4.99 | 0.00 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน | 7.97 | 11.67 | 7.25 | 8.96 | 1.37 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน+Almond oil | 10.08 | 10.04 | 12.12 | 10.75 | 0.69 |
| Water phase | ดอกมะลิบานตัดก้าน | 54.84 | 58.27 | 56.99 | 56.70 | 1.00 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน | 55.65 | 54.84 | 54.84 | 55.11 | 0.27 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน+Almond oil | 54.95 | 55.07 | 54.84 | 54.95 | 0.07 |
| | น้ำมัน Almond | 55.52 | 52.24 | 83.75 | 63.84 | 10.00 |

ตารางที่ A2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากดอกมะลิสดด้วยเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP

| | Treatment | FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{mg extract}$) | | | | |
|-------------|---------------------------------|---|--------|--------|--------|------|
| | | X1 | X2 | X3 | AV | SEM |
| Oil phase | ดอกมะลิบานตัดก้าน | 207.85 | 209.15 | 203.38 | 206.79 | 1.75 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน | 143.00 | 141.77 | 145.15 | 143.31 | 0.99 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน+Almond oil | 178.15 | 192.23 | 175.77 | 182.05 | 5.14 |
| Water phase | ดอกมะลิบานตัดก้าน | 22.96 | 23.14 | 23.67 | 23.26 | 0.21 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน | 22.43 | 22.29 | 21.89 | 22.20 | 0.16 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน+Almond oil | 22.03 | 21.86 | 21.74 | 21.88 | 0.08 |
| | น้ำมัน Almond | 6.38 | 4.85 | 5.54 | 5.59 | 0.44 |

ตารางที่ A3 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากดอกมะลิสดด้วยเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

| | Treatment | Total Phenolic content (mg GAE/g extract) | | | | |
|-------------|---------------------------------|---|-------|-------|-------|------|
| | | X1 | X2 | X3 | AV | SEM |
| Oil phase | ดอกมะลิบานตัดก้าน | 42.62 | 43.23 | 42.65 | 42.83 | 0.20 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน | 28.51 | 29.38 | 28.54 | 28.81 | 0.28 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน+Almond oil | 42.27 | 43.33 | 42.36 | 42.65 | 0.34 |
| Water phase | ดอกมะลิบานตัดก้าน | 5.20 | 5.20 | 5.20 | 5.20 | 0.00 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน | 5.20 | 5.16 | 5.32 | 5.23 | 0.05 |
| | ดอกมะลิบานไม่ตัดก้าน+Almond oil | 5.64 | 5.61 | 5.71 | 5.65 | 0.03 |
| | น้ำมัน Almond | 0.42 | 0.42 | 0.42 | 0.42 | 0.00 |

ตารางที่ A4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากกัญชาและกัญชงด้วยเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a, R22 และเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

| | Treatment | IC ₅₀ DPPH (mg/mL) | | | | |
|-----------|-----------|-------------------------------|-------|-------|-------|------|
| | | X1 | X2 | X3 | AV | SEM |
| กัญชาแห้ง | SCCO2 | 1.01 | 1.02 | 1.04 | 1.02 | 0.01 |
| | R134a | 1.09 | 1.15 | 1.12 | 1.12 | 0.02 |
| | R22 | 0.82 | 0.84 | 0.82 | 0.83 | 0.01 |
| กัญชงแห้ง | R22 | 1.48 | 1.42 | 1.54 | 1.48 | 0.04 |
| กัญชงสด | R134a | 12.52 | 12.72 | 15.69 | 13.65 | 1.02 |

ตารางที่ A5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากกัญชาและกัญชงด้วยเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a, R22 และเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP

| | Treatment | FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{mg extract}$) | | | | |
|-----------|-----------|---|--------|--------|--------|------|
| | | X1 | X2 | X3 | AV | SEM |
| กัญชาแห้ง | SCCO2 | 352.33 | 348.50 | 350.83 | 350.56 | 1.12 |
| | R134a | 339.83 | 339.17 | 347.00 | 342.00 | 2.51 |
| | R22 | 355.83 | 355.42 | 354.42 | 355.22 | 0.42 |
| กัญชงแห้ง | R22 | 242.92 | 247.00 | 246.25 | 245.39 | 1.25 |
| กัญชงสด | R134a | 97.33 | 104.50 | 110.58 | 104.14 | 3.83 |

ตารางที่ A6 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากกัญชาและกัญชงด้วยเทคนิคการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดต่ำกว่าจุดวิกฤตยิ่งยวด (Subcritical Extraction) ด้วยตัวทำละลาย R134a, R22 และเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด

| | Treatment | Total Phenolic content (mg GAE/g extract) | | | | |
|-----------|-----------|---|-------|-------|-------|------|
| | | X1 | X2 | X3 | AV | SEM |
| กัญชาแห้ง | SCCO2 | 70.07 | 69.40 | 69.21 | 69.56 | 0.26 |
| | R134a | 54.10 | 53.59 | 53.56 | 53.75 | 0.18 |
| | R22 | 66.16 | 66.22 | 65.65 | 66.01 | 0.18 |
| กัญชงแห้ง | R22 | 30.98 | 30.85 | 30.75 | 30.86 | 0.07 |
| กัญชงสด | R134a | 7.70 | 7.47 | 7.76 | 7.64 | 0.09 |