รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ นวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด

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

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2561A10803019
สัญญาเลขที่ 102/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการนวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด

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

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์
สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์

ธันวาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 102/2561

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร
(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์ 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 2561A10803019 / สัญญาเลขที่ 102/2561 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 1,825,000 บาท (หนึ่งล้านแปดแสนสองหมื่นห้าพันบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 2 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2560 – วันที่ 15 กันยายน 2562)

นวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด ได้ทำการพัฒนากระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดให้มีช่วงอุณภูมิในการสกัดระหว่าง 35 ถึง 82 องศาเซลเซียส ที่ความดันมากกว่า 73.8 บาร์ โดยการออกแบบห้องสกัดแบบคู่ขนาน ทำให้สามารถสกัดสารสกัดหยาบเป้าหมายได้ในระบบกึ่งต่อเนื่อง อีกทั้งได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของระบบการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ได้มีการพัฒนาขึ้นในโครงการนี้โดยการใช้กาแฟคั่วเป็นวัตถุดิบทดสอบทำการศึกษาความสามารถในการสกัดสารสกัดหยาบของกาแฟที่ความดัน 200 บาร์ อุณหภูมิในการสกัดระหว่าง 45 ถึง 82 องศาเซลเซียส และเปรียบเทียบจำนวนรอบในการสกัด จากการทดลองพบว่า เมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้นส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้น และปริมาณฟีนอลรวมสูงขึ้น อีกทั้งสารสกัดหยาบจากกาแฟคั่วมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium, Escherichia coli* (ESBL), *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ *Candida albicans* ในโครงการวิจัยนี้ได้นำเสนอแนวทางกระบวนการสกัดพืชสมุนไพรด้วยบิวเทน โดยได้ทำการสกัดพืชสมุนไพรกลุ่มเป้าหมายเบื้องต้นได้แก่ ใบเตยตะไคร้ รวมไปถึงการสกัดดอกไม้สด ได้แก่ ใบเตยสด ดอกจำปีสด ดอกมะลิสด เพื่อเป็นแนวทางในการสกัดพืชสมุนไพรและดอกไม้ โดยให้ยังคงสีและกลิ่นได้ดี

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่พัฒนาขึ้นโดยคนไทย ลดการพึ่งพาเทคโนโลยีหรือการนำเข้าเครื่องมือเครื่องจักรจากต่างประเทศ ผู้ดำเนินโครงการวิจัยได้นำผลงานในโครงการวิจัยนี้ไปจดอนุสิทธิบัตร อีกทั้งระบบที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นในโครงการจะช่วยลดการใช้ตัวทำละลายที่มีการใช้กระบวนการสกัดโดยทั่วไป

บทคัดย่อ

นวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด ได้ทำการพัฒนากระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดให้มีช่วงอุณภูมิในการสกัดระหว่าง 35 ถึง 82 องศาเซลเซียส ที่ความดันมากกว่า 73.8 บาร์ โดยการออกแบบห้องสกัดแบบคู่ขนาน ทำให้สามารถสกัดสารสกัดหยาบเป้าหมายได้ในระบบกึ่งต่อเนื่อง อีกทั้งได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของระบบการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ได้มีการพัฒนาขึ้นในโครงการนี้โดยการใช้กาแฟคั่วเป็นวัตถุดิบทดสอบทำการศึกษาความสามารถในการสกัดสารสกัดหยาบของกาแฟที่ความดัน 200 บาร์ อุณหภูมิในการสกัดระหว่าง 45 ถึง 82 องศาเซลเซียส และเปรียบเทียบจำนวนรอบในการสกัด จากการทดลองพบว่า เมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้นส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้น และปริมาณฟีนอลรวมสูงขึ้น อีกทั้งสารสกัดหยาบจากกาแฟคั่วมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium, Escherichia coli* (ESBL), *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ *Candida albicans*

ในโครงการวิจัยนี้ได้นำเสนอแนวทางกระบวนการสกัดพืชสมุนไพรด้วยบิวเทน โดยได้ทำการสกัดพืชสมุนไพรกลุ่มเป้าหมายเบื้องต้นได้แก่ ใบเตย ตะไคร้ รวมไปถึงการสกัดดอกไม้สด ได้แก่ ใบเตยสด ดอกจำปีสด ดอกมะลิสด เพื่อเป็นแนวทางในการสกัดพืชสมุนไพรและดอกไม้ โดยให้ยังคงสีและกลิ่นได้ดี

คำสำคัญ: การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด, การสกัดด้วยบิวเทน, กาแฟคั่วโรบัสต้า,
ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

This research demonstrates the novel semi-continuous extraction technology of local medicinal herbs using High Pressure Butane Extraction (HPBE) combined with Supercritical Carbon dioxide Extraction (SCE). The developed extractors for both HPBE and SCE perform well in extracting essential oils from plant material on both efficacy and quality to soon meet pharmaceutical standards. For the SCE, the machine covers the temperature range between 35 and 82 degree Celsius with pressure well above 73.8 Bar. The twin column design enables the crude extraction semi-continuously. A few plant samples were used in this study. Commercially-available roasted coffee beans were extracted at 200 Bar at 45-82 degree Celsius and the effect of extracting cycles were investigated. The results show the increase of extracting temperature played a subtle role in increasing the anti-free radical property and the total polyphenol content of the coffee bean extract. This extract is effective in suppressing the growth of several bacteria and yeast used in this study, including *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* (ESBL), *Staphylococcus aureus* (MRSA), and *Candida albicans*.

The potential uses of this technology were extended leafy plants (i.e., Pandan, Lemongrass) and other fragrant flowers (i.e., White Champaka, Jasmine). Several trails run to extract the fragrant essential oils from these plant materials were investigated and used to improve the original design of the machine. The crude extracts of these samples showed intense aroma and light color oil. Hence, the future application of this technology to extract flowery essential oils seems promising.

Keywords: Supercritical Carbon dioxide Extraction, Butane Extraction, Robusta Roasted Coffee Bean, Antimicrobial properties, and Antioxidant properties

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	II
บทคัดย่อ	III
สารบัญเรื่อง	V
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	
1.2 วัตถุประสงค์	
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	5
2.1 พืชสมุนไพร	
2.2 การสกัดพืชสมุนไพร (herbal extraction)	
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงาน	18
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	
3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	
3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของระบบที่พัฒนาขึ้น	
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	31
4.1 การพัฒนาระบบกระบวนการสกัดพืชสมุนไพรด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด	
4.2 การพัฒนากระบวนการสกัดพืชสมุนไพรด้วยบิวเทน	
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	50
ผลผลิต (output)	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก (Appendix)	56
ประวัติคณะผู้วิจัย	77

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 แสดงมูลค่าการส่งออกสินค้าที่สำคัญของไทย	6
ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติวิกฤตของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (Critical property data)	13
ตารางที่ 4.1 น้ำหนักของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัดและจำนวนรอบการสกัดแตกต่างกันเมื่อเวลาในการสกัดเท่ากัน	35
ตารางที่ 4.2 ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay และ DPPH	37
ตารางที่ 4.3 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์จากสารสกัดหยาบกาแฟคั่ว	39
ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าเมื่อทำการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่ความดัน 200 บาร์ อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้ในการสกัดแต่ละรอบของการสกัด	41
ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากตะไคร้สดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay และ DPPH	44
ตารางที่ 4.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากตะไคร้สดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay	45
ตารางที่ 4.7 ตารางแสดงผลการยับยั้งทางด้านจุลชีววิทยาของสารสกัดหยาบจากตะไคร้สดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง โดยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย Agar disc diffusion	46
ตารางที่ 4.8 ตารางแสดงผลการยับยั้งทางด้านจุลชีววิทยาของสารมาตรฐาน Tetracycline โดยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย Agar disc diffusion control	47
ตารางที่ 4.9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดตะไคร้ที่สามารถยังยั้งเชื้อได้ (MIC) ทดสอบโดย Macrobroth dilution	47
ตารางที่ A1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 45 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH	57
ตารางที่ A2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 55 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH	58
ตารางที่ A3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH	59

หน้า

ตารางที่ A4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 75 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH 60

ตารางที่ A5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 82 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH 61

ตารางที่ A6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 45 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH 62

ตารางที่ A7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 55 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH 63

ตารางที่ A8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH 64

ตารางที่ A9 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 75 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH 65

ตารางที่ A10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 82 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH 66

ตารางที่ A11 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 45 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ 67

ตารางที่ A12 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 55 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ 68

ตารางที่ A13 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ 69

ตารางที่ A14 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 75 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ 70

หน้า

ตารางที่ A15 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 82 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ 71

ตารางที่ A16 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 45 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ 72

ตารางที่ A17 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 55 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ 73

ตารางที่ A18 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ 74

ตารางที่ A19 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 75 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ 75

ตารางที่ A20 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 82 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ 76

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 แสดงแผนภาพการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยิ่งยวดแบบกะ	15
รูปที่ 2.7 แสดงแผนภาพการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดแบบต่อเนื่อง	15
รูปที่ 2.8 แสดงแผนภาพระบบการสกัดโดยใช้เทคนิคของไหลวิกฤตยิ่งยวดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์	16
รูปที่ 3.1 แสดงปฏิกิริยาของความสามารถการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบ [Fe(III) – (TPTZ)2]3+ เปลี่ยนเป็นสารประกอบ [Fe(II) – (TPTZ)2]2+ (Karina et.al., 2018) สารที่มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเท่ากับมีความสารถในการรีดิวซ FRAP หรือสามารถสังเกตได้จากการการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 nm	22
รูปที่ 3.2 กลไกของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำปฏิกิริยากับอนุมูล DPPH	25
รูปที่ 3.3 การวางตำแหน่ง Disc สำหรับทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์โดย Disk Diffusion Assay	29
รูปที่ 3.4 แผนภาพอย่างย่อแสดงขั้นตอนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibition Concentration: MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยวิธี Broth Microdilution	30
รูปที่ 4.1 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารในสถานะของแข็ง ของเหลว และไอ โดยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความดันของคาร์บอนไดออกไซด์ (Pressure-Temperature phase diagram of CO_2)	33
รูปที่ 4.2 แสดงแผนผังอย่างย่อของระบบการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ได้พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้	33
รูปที่ 4.3 วัตถุดิบเป้าหมายในการทดสอบประสิทธิภาพของระบบการสกัด กาแฟคั่วโรบัสต้า (ก) เมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้า (ข) และ เมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าเมื่อผ่านการเพิ่มพื้นที่ผิว (ค)	34

หน้า

รูปที่ 4.4 สารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าเมื่อทำการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่ความดัน 200 บาร์ จำนวนการสกัด 3 รอบ และเปรียบเทียบอุณหภูมิในการสกัดที่ 45 องศาเซลเซียส (ก) 55 องศาเซลเซียส (ข) 65 องศาเซลเซียส (ค) 75 องศาเซลเซียส (ง) และ 82 องศาเซลเซียส (จ) ตามลำดับ 34

รูปที่ 4.5 สารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าเมื่อทำการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่ความดัน 200 บาร์ จำนวนการสกัด 1 รอบ และเปรียบเทียบอุณหภูมิในการสกัดที่ 45 องศาเซลเซียส (ก) 55 องศาเซลเซียส (ข) 65 องศาเซลเซียส (ค) 75 องศาเซลเซียส (ง) และ 82 องศาเซลเซียส (จ) ตามลำดับ 35

รูปที่ 4.6 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด ที่ความดัน 200 บาร์ สกัดต่อเนื่องจำนวน 1 รอบ ที่อุณหภูมิในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH 36

รูปที่ 4.7 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด ที่ความดัน 200 บาร์ สกัดต่อเนื่องจำนวน 3 รอบ ที่อุณหภูมิในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH 37

รูปที่ 4.8 ตัวอย่างลักษณะการเกิด Inhibition zone ของ *Bacillus subtilis* เมื่อทดสอบด้วย NSS, DMSO, Chloramphenical และ Tetracycline (ก) และ *Staphylococcus aureus* เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากกาแฟคั่ว (ข) โดยใช้ไฟล่างในการถ่ายภาพ 38

รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะสีของสารสกัดจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าเมื่อทำการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่ความดัน 200 บาร์ อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส เมื่อทำการสกัดครั้งที่ 1 (ก) ครั้งที่ 2 (ข) ครั้งที่ 3 (ค) ครั้งที่ 4 (ง) และครั้งที่ 5 (จ) 40

รูปที่ 4.10 แสดงภาพวัตถุดิบใบเตยแห้งที่ใช้ในการทดสอบการสกัดด้วยระบบบิวเทน (ก) และน้ำมันใบเตยเมื่อผ่านการสกัดด้วยระบบบิวเทน (ข) 42

รูปที่ 4.11 ตะไคร้สดก่อนทำการปั่น (ก) ตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 1 (ข) ตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 2 (ค) ก่อนนำไปสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง 43

รูปที่ 4.12 สารสกัดหยาบจากตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 1 โดยการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง 43

รูปที่ 4.13 สารสกัดหยาบจากตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 2 โดยการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง 43

รูปที่ 4.14 สารสกัดหยาบจากตะไคร้สดปั่นละเอียดร่วมกับน้ำมันพืช (อัตราส่วน 1:1) โดยการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง 44

รูปที่ 4.15 แสดงภาพใบเตยก่อนทำการสกัด (ก) น้ำมันใบเตยหลังการสกัด (ข) และ (ค) โดยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้แรงดันสูง 48

หน้า

รูปที่ 4.16 แสดงภาพดอกจำปีก่อนทำการสกัด (ก) ดอกจำปีหลังการสกัด (ข) และสารสกัดหยาบจากดอกจำปี (ค) โดยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้แรงดันสูง 48

รูปที่ 4.17 แสดงภาพดอกมะลิก่อนทำการสกัด (ก) ดอกมะลิหลังการสกัด (ข) และสารสกัดหยาบจากดอกมะลิ (ค) โดยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้แรงดันสูง 49

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

เทคโนโลยีการสกัดผลิตภัณฑ์พืชผลทางการเกษตรโดยเฉพาะสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาให้มีคุณภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนับเป็นเรื่องสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมการสกัดสมุนไพรของไทยเป็นอย่างมาก การเลือกใช้เทคโนโลยีที่ล้าสมัยในการแปรรูปสมุนไพร ทำให้ได้สารสกัดหรือตัวยาออกฤทธิ์ที่มีคุณภาพต่ำ ความร้อนหรือปฏิกิริยาออกซิเดชั่นรวมถึงวิธีการสกัดที่ไม่เหมาะสมทำให้สารออกฤทธิ์ต่างๆเหล่านี้เสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วและในกรณีที่สารเหล่านี้มีปริมาณต่ำมากอาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบหรือสกัดสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูง (มีราคาสูง) ได้ ส่งผลกระทบโดยตรงต่อภาพรวมของคุณภาพของสินค้าและผลิตภัณฑ์ของสมุนไพรไทยที่นำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอาหารเสริมหรือยาสมุนไพรสำหรับแพทย์ทางเลือก อันเนื่องมาจากวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมที่มีการใช้ความร้อนเป็นระยะเวลานานจะมีผลทำลายสารที่ไม่ทนความร้อน (thermolabile substances) ส่งผลให้สารที่ไม่ทนความร้อนในสารสกัดหยาบมีความเข้มข้นลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) จากการรายงานของสำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร (2558) และการวิเคราะห์จุดอ่อนของประเทศไทยในธุรกิจสมุนไพรตามมุมมองของสถาบันวิจัยสมุนไพร พบว่าเทคโนโลยีการผลิตยังคงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ประเทศไทยมีอัตราการขยายตัวในการส่งออกสารสกัดสมุนไพรต่ำเมื่อเทียบกับประเทศเพื่อนบ้านอื่นๆ เนื่องมาจากการเลือกใช้เทคโนโลยีการสกัดที่มีประสิทธิภาพต่ำ ล้าหลัง ไม่ทันสมัยทำให้อัตราการผลิตต่ำไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดโลก อีกทั้งปริมาณสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหรือตัวยาออกฤทธิ์ที่สกัดออกมาได้ไม่สอดคล้องต่อปริมาณวัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ กล่าวคือ เทคโนโลยีที่ใช้ในการสกัดไม่สามารถสกัดสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หมดจึงทำให้มีการใช้ปริมาณวัตถุดิบตั้งต้นปริมาณมากเกินความจำเป็นซึ่งเป็นการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างไม่มีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาเทคนิคทั่วไปที่นิยมใช้การสกัดสารสกัดพืชสมุนไพรสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดแบบซอกห์เลต (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 (ชุติมา และ สนทยา, 2555)

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

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ในการสกัดภายใต้หลักการการสกัดด้วยตัวทำละลายความดันสูง (pressurized liquid extraction) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดพืชสมุนไพรเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม อีกทั้งปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้น้อยเนื่องจากการใช้อุณหภูมิและความดันสูงในการสกัดทำให้เกิดการสกัดอย่างรวดเร็วมีอัตราการสกัดสูง ทั้งนี้การสกัดที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลายที่ความดันบรรยากาศจะมีผลในการเพิ่มความสามารถในการละลายของสารที่ต้องการสกัดและคุณสมบัติการถ่ายเทมวล (mass transfer property) และ/หรือ การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction) ซึ่งการสกัดด้วยเทคนิคนี้จะเป็นสภาวะที่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าสสารนั้นอยู่ในสถานะก๊าซหรือของเหลว เมื่อคาร์บอนไดออกไซด์ถูกอัดภายใต้แรงดันและให้ความร้อนผ่านจุดวิกฤตที่ความดัน 73.7 บาร์ (critical pressure; Pc) และอุณหภูมิ 31.1 องศาเซลเซียส (critical temperature; Tc) จะทำให้ของไหลวิกฤตยิ่งยวดมีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (physiochemical properties) อยู่ระหว่างก๊าซกับของเหลว ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะนี้จะมีคุณสมบัติในการแพร่ (diffusivity) ที่ดีเยี่ยมซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถในการแทรกผ่านและสกัดสารที่ต้องการออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพรวมถึงการเลือกใช้ตัวทำละลายร่วม (co-solvent) ในการเลือกชนิดของสารออกฤทธิ์ไม่ว่าจะเป็นในกลุ่มมีขั้ว และไม่มีขั้ว อีกทั้งการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบการสกัดแบบครบวงจรโดยมีการออกแบบ ศึกษา และติดตั้งระบบการนำสารละลายที่ใช้ในการสกัดพืชสมุนไพรกลับมาใช้ซ้ำ (solvent recovery) ถือเป็นอีกหนึ่งเทคโนโลยีที่ช่วยลดปริมาณของเสียอันเนื่องมาจากการใช้ตัวทำละลาย และลดปริมาณการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศ

ในโครงการวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือของคณะเภสัชศาสตร์ และคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และภาคเอกชน ทั้งผู้ผลิตเครื่องจักร (บจก.เรโน เทค, บจก.วาทิน) การตลาด และอุตสาหกรรมอาหารและยาที่จะนำผลิตภัณฑ์ไปใช้งานจริง (บจก. มิลลิเมด) ได้เริ่มทำวิจัยร่วมระหว่างสถาบันการศึกษาและภาคเอกชนเพื่อเป็นกลไกในการขับเคลื่อนนำงานวิจัยที่ได้จากห้องปฏิบัติการไปประยุกต์ใช้จริงในอุตสาหกรรม ในโครงการวิจัยนี้จะทำการออกแบบ และพัฒนาเครื่องต้นแบบในการสกัดพืชสมุนไพร โดยวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายความดันสูง และ/หรือ การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด การทดสอบประสิทธิภาพจะทำการเลือกใช้พืชสมุนไพรต้นแบบ ได้แก่ กาแฟ เป็นต้น ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้ในแต่ละเทคนิคต่อประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อจุลชีพ โดยทำการประมวลผลการตรวจสอบด้วยภาพดิจิตอลที่มีกำลังขยายสูง (Digital image processing) เพื่อลดระยะเวลาการบ่มและสามารถตรวจวัดขนาดส่วนใสเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อออกแบบ พัฒนาและสร้างระบบต้นแบบการสกัดพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ทางยาด้วยระบบการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด

1.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของระบบที่ทำการพัฒนาขึ้น โดยการศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในด้านการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านเชื้อจุลชีพ โดยทำการประมวลผลการตรวจสอบด้วยภาพดิจิตอลที่มีกำลังขยายสูง

1.2.3 ศึกษาแนวทางการสกัดด้วยบิวเทน โดยใช้วัตถุดิบสดในการสกัด และทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบเบื้องต้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ออกแบบ พัฒนาและสร้างระบบต้นแบบการสกัดพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ทางยาด้วยระบบการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด โดยพัฒนาระบบการสกัดให้มีสภาวะในการสกัดที่อุณหภูมิและความดันมากกว่า 35 องศาเซลเซียส และ 73.1 บาร์ ตามลำดับ

1.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของระบบที่ทำการพัฒนาขึ้น โดยการศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในด้านการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการวิเคาะห์ด้วย DPPH และ FRAP ปริมาณฟีนอลรวม และการต้านเชื้อจุลชีพ 10 ชนิด และทำการประมวลผลการตรวจสอบด้วยภาพดิจิตอลที่มีกำลังขยายสูง

1.3.3 นำเสนอแนวทางการสกัดด้วยบิวเทน โดยใช้วัตถุดิบสดในการสกัด ได้แก่ ดอกมะลิ ดอกจำปี และทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบเบื้องต้น

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

2.1 พืชสมุนไพร

ปัจจุบันกระแสนิยมในเรื่องสุขภาพและความงามกำลังเป็นที่นิยมไปทั่วโลก ส่งผลให้สมุนไพรเพื่อสุขภาพและความงามเป็นที่ต้องการของตลาดโลกมากขึ้น โดยทางสมาพันธ์สุขภาพและความงามแห่งประเทศไทยจึงใช้โอกาสนี้เร่งผลักดันสมุนไพรในกลุ่มสุขภาพและความงามได้แก่ กวาวเครือขาว บัวบก กระชายดำ และไพล เพื่อส่งเสริมให้สมุนไพรเหล่านี้เป็นที่นิยมของชาวต่างชาติ ซึ่งทางสมาพันธ์สุขภาพและความงามแห่งประเทศไทยต้องการผลักดันให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ดูดี มีคุณค่า เพื่อยกระดับสมุนไพรไทยสู่ตลาดโลกและสามารถแข่งขันกับคู่แข่งได้

สมุนไพร (Herbs) ตามพระราชบัญญัติยา หมายถึง "ยาที่ได้จากพืช สัตว์ หรือแร่ ซึ่งยังไม่ได้ผสม ปรุง หรือเปลี่ยนสภาพ" เช่น พืชก็ยังเป็นส่วนของ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ ซึ่งยังไม่ได้ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใด ๆ แต่ในทางการค้าสมุนไพรมักจะถูกดัดแปลงในรูปต่าง ๆ เช่น ถูกหั่นให้เป็นชิ้นเล็กลงบดเป็นผงละเอียด หรืออัดเป็นแท่ง อย่างไรก็ตามในความรู้สึกของคนทั่ว ๆ ไปเมื่อกล่าวถึงสมุนไพร มักจะนึกถึงเฉพาะต้นไม้ที่นำมาใช้เป็นยาเท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าสัตว์หรือแร่ มีการนำมาใช้น้อย และใช้ในโรคบางชนิดเท่านั้น ดังนั้น พืชสมุนไพรหมายถึงพันธุ์ไม้ต่าง ๆที่สามารถนำมาใช้ปรุงหรือประกอบเป็นยารักษาโรคต่าง ๆ ใช้ในการส่งเสริมสุขภาพร่างกายได้

พืชสมุนไพร เป็นสิ่งที่อยู่คู่คนไทยมาตั้งแต่อดีต แต่เมื่อการแพทย์แผนปัจจุบันเริ่มเข้ามามีบทบาทในบ้านเรา สรรพคุณและคุณค่าของสมุนไพรอันเป็นสิ่งที่เรียกได้ว่าภูมิปัญญาโบราณก็เริ่มถูกบดบังไปเรื่อยๆ และถูกกลืนหายไปตามกาลเวลา หากมองย้อนกลับไปดูตามตำรับอาหารไทยต่างๆก็จะพบว่า มีส่วนผสมของพืชสมุนไพรแทบทุกรายการ การกระตุ้นโดยภาครัฐด้วยการแถลงนโยบายต่อรัฐสภาไว้เมื่อวันที่ 21 ตุลาคม 2535 ว่า "ให้มีการผสมผสานการแพทย์แผนไทยและสมุนไพรเข้ากับระบบบริการสาธารณสุขของชุมชนอย่างเหมาะสม" การผลักดันสมุนไพรที่มีชื่อเสียงของไทยสู่ตลาดโลกในหลายๆหน่วยงาน ได้แก่ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกพร้อมด้วยภาคีเครือข่าย ได้มีการคัดเลือกสมุนไพรไทยที่ได้รับความนิยม 5 ชนิด ได้แก่ กวาวเครือขาว บัวบก กระชายดำ ไพลและลูกประคบ โดยพิจารณาจากความสามารถปลูกได้ง่าย เป็นที่รู้จักทั่วโลกและมีอนาคตเนื่องจากมีการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ที่จะนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ออกจำหน่าย

จากข้อมูลกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ ระบุว่าปัจจุบันมูลค่าการส่งออกสมุนไพรอยู่ประมาณแสนล้านบาท โดยกลุ่มผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีมูลค่าการใช้และการส่งออกรวมกว่า 80,000

ล้านบาท สปาและผลิตภัณฑ์สปา มีมูลค่าประมาณ 10,000 ล้านบาท กลุ่มยาแผนโบราณตามภูมิปัญญาการแพทย์ไทย มีมูลค่าประมาณ 10,000 ล้านบาท โดยที่สมุนไพร 5 ชนิด ที่ตลาดโลกมีความต้องการสูงและมีโอกาสเติบโตในอนาคต ได้แก่ กระชายดำ ไพล ขมิ้นชัน กวาวเครือขาว และบัวบก จากผลสำรวจพบว่าในตลาดโลกสมุนไพรไทยนำมาพัฒนาเป็นสินค้าใน 5 กลุ่มหลัก ได้แก่ สินค้าเพื่อลดน้ำหนัก สินค้าบำรุงผิว กลุ่มสินค้าลบเลือนริ้วรอยและดีท๊อกซ์ 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 แช่แข็งและแห้ง	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

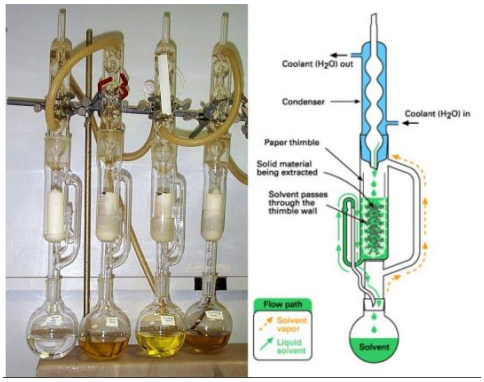
2.2 การสกัดพืชสมุนไพร (herbal extraction)

การสกัดพืชสมุนไพร ทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดแบบซอกห์เลต (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 (ชุติมาและสนทยา, 2555) วิธีการสกัดที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการสกัดสารที่มี

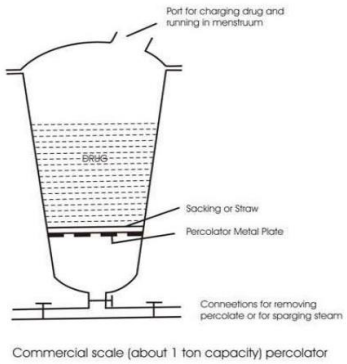
ประโยชน์ที่มีฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระ วิธีการสกัดแบบดั้งเดิมเป็นวิธีการสกัดที่ง่ายแต่สิ้นเปลืองตัวทำละลาย (ดวงกมล, 2557) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดนาน

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 เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆบรรจุผงยาทีละน้อย และเติมตัวทำละลายลงไปในระดับที่สูงเหนือสมุนไพร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วจึงเริ่มไขสารออกโดยค่อยๆเติมตัวทำละลายลงไปอย่าให้แห้ง
- การสกัดด้วย Soxhlet เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ ใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน Flask ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมา จนถึงจุดหนึ่งก็จะไหลกลับลงไปใน 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)

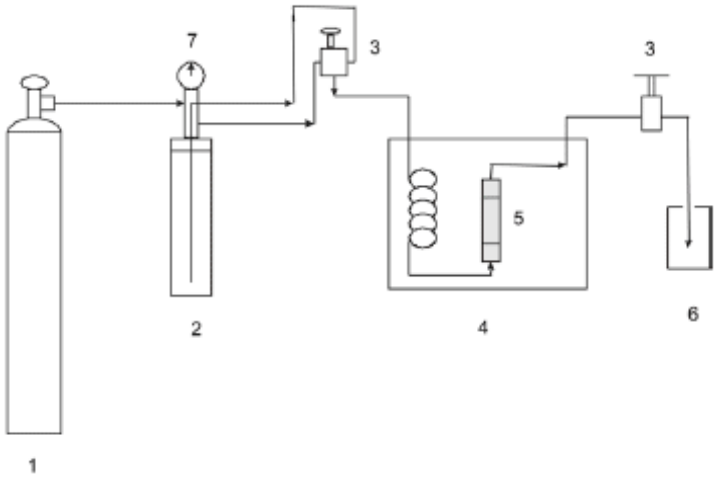
วิธีการสกัดสารแบบสมัยใหม่จะมีการคำนึงถึงการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีสีเขียวเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีการลดปริมาณการใช้ตัวทำละลาย สารสังเคราะห์ หรือสารเคมีอินทรีย์ อีกทั้งยังมีการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสามารถคัดเลือกชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสมุนไพรได้ อีกทั้งยังสามารถลดระยะเวลาในการสกัด ปริมาณสารสกัดสูง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

- **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 เป็นเทคนิคการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเป็นเฟสของเหลวโดยสกัดที่อุณหภูมิและความดันสูงการสกัดที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลายที่ความดันบรรยากาศจะมีผลเพิ่มทั้งการละลายของสารที่ต้องการสกัดและคุณสมบัติการถ่ายเทมวล (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 อุณหภูมิสูงจะเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดและช่วยขัดขวางการจับกันระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับเมตริกซ์ของตัวอย่าง ซึ่งเป็นการจับกันด้วยแรงหรือพันธะอ่อนๆ เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van Der Waals Force) แรงดึงดูดระหว่างขั้ว (Dipole–Dipole Interaction) และพันธะไฮโดรเจน พลังงานความร้อน (Thermal Energy) จะทำลายการจับกันระหว่างโมเลกุลชนิดเดียวกัน (Cohesive Interactions) และการจับกันระหว่างโมเลกุลที่ต่างกัน (Adhesive Interactions) ในกรณีหลังนี้จะหมายถึงการจับกันระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับเมตริกซ์ของตัวอย่าง ซึ่งการทำลายการจับกันในลักษณะเช่นนี้เกิดขึ้นจากการลดลงของพลังงานกระตุ้น (Activation Energy) ซึ่งจำ เป็นต่อกระบวนการปลดปล่อย (Desorption Process) สารออกจากเมตริกซ์ ยิ่งไปกว่านั้นอุณหภูมิที่สูงขึ้นยังช่วยลดแรงตึงผิวของตัวทำละลาย ตัวถูกละลาย (Solute) และเมตริกซ์ได้อีกด้วย จึงช่วยเพิ่มการทำให้เปียกด้วยตัวทำละลาย (Solvent Wetting) ที่มีต่อเมตริกซ์ของตัวอย่าง การลดลงของแรงตึงผิวของตัวทำละลายจะทำให้สารที่

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

- *ความดัน (Pressure)*

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

- *สารเพิ่มประสิทธิภาพ (Additives)*

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

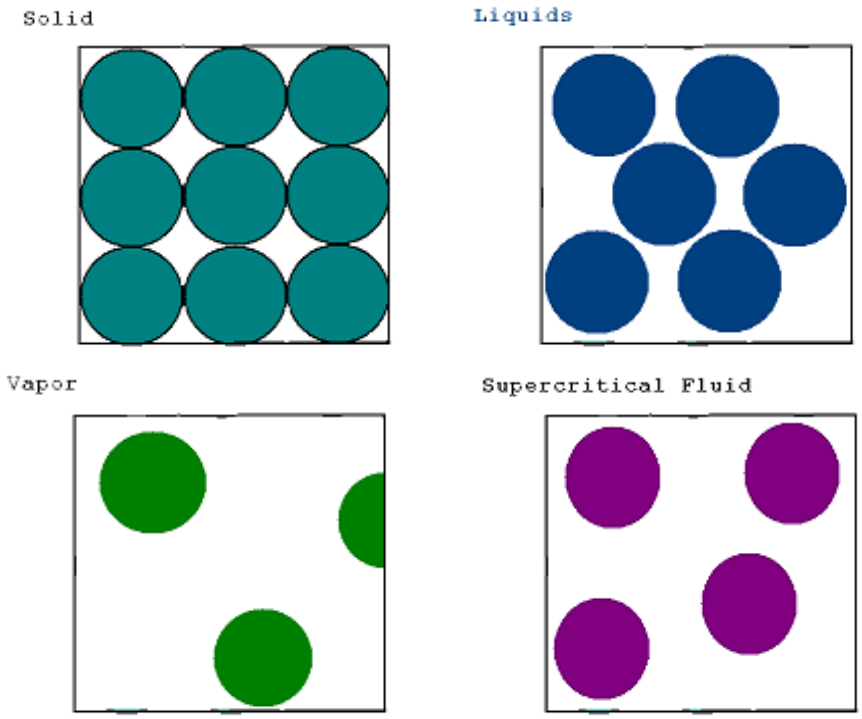
อย่างเดียว นอกจากนี้การเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพชนิดอื่นๆ เช่น สารต้านออกซิเดชัน โดยเฉพาะกรดแอสคอร์บิก(ascorbic acid) หรือบิวทิเลเตดไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated Hydroxytoluene, BHT) จะช่วยลดการสลายตัวของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ในบางครั้งการสกัดจะเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปเพื่อทำให้น้ำมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย 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 การเลือกใช้คาร์บอนไดออกไซด์เข้ามาเป็นตัวทำละลายในการสกัดเนื่องจากไม่ต้องกังวลกับเรื่องการบำบัดของเสียที่อาจมีพิษของสารเคมีปนอยู่ รวมไปถึงระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด คุณภาพของสารสกัดที่เหนือกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม คือ การกลั่นด้วยไฮโดร หรือ การสกัดแบบของเหลว-ของแข็ง (Fornari และคณะ, 2012, Harde และคณะ 2013)

<u>หลักการ</u>

ของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid: SCF) หมายถึงสภาวะที่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าสสารนั้นอยู่ในสถานะก๊าซหรือของเหลว เมื่อก๊าซหรือของเหลวเหล่านั้นถูกอัดภายใต้แรงดันและให้ความร้อนผ่านจุดวิกฤต (Critical Point) ซึ่งจะเข้าสู่เฟส supercritical phase และสารที่อยู่ในเฟสนั้นจะเรียกว่า ของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid: SCF) อุณหภูมิวิกฤต (Critical Temperature; Tc) และความดันวิกฤต (Critical Pressure; Pc) ของไหลวิกฤตยิ่งยวดมีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (Physiochemical Properties) อยู่ระหว่างก๊าซกับของเหลว



รูปที่ 2.4 แสดงคุณสมบัติเปรียบเทียบความหนาแน่นระหว่างของแข็ง ของเหลว ไอ และของไหลวิกฤตยิ่งยวด

ที่มา:

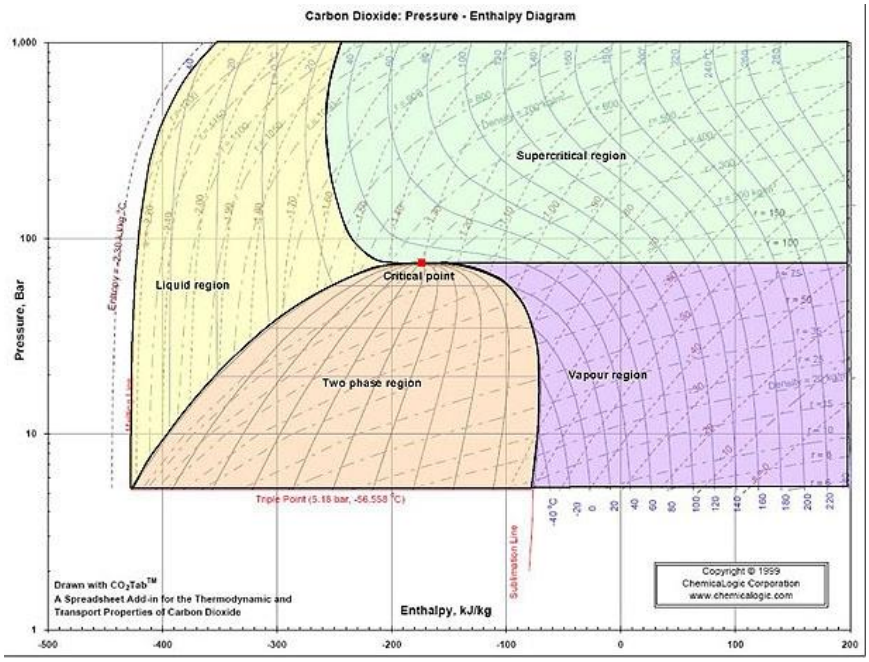
http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Physical_Chemistry/Physical_Properties_of_Matter/States_of_Matter/Supercritical_Fluids

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

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติวิกฤตของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (Critical Property Data) (นภดล มนตรี, 2549)

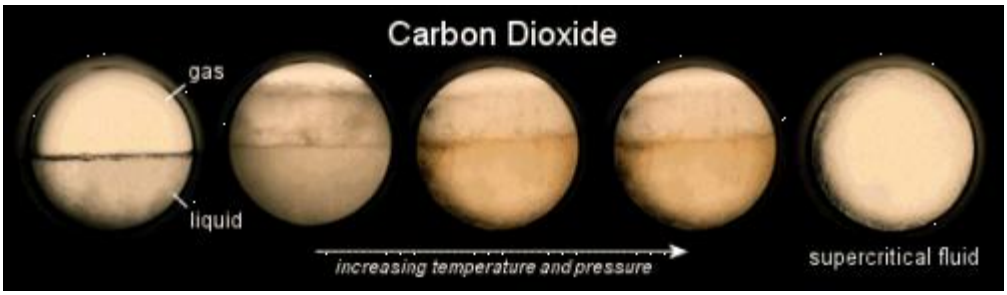
ชนิดตัวทำละลาย	อุณหภูมิวิกฤต Critical Temperature (°K)	ความดันวิกฤต Critical Pressure (MPa)	ความหนาแน่นวิกฤต Critical Density (g/cm^3)
Methane	190.6	4.60	0.162
Carbon dioxide	304.2	7.38	0.468
Propane	369.8	4.24	0.217
Acetone	508.1	4.70	0.278
Methanol	512.6	8.09	0.272
Toluene	591.7	4.11	0.292
Water	647.3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



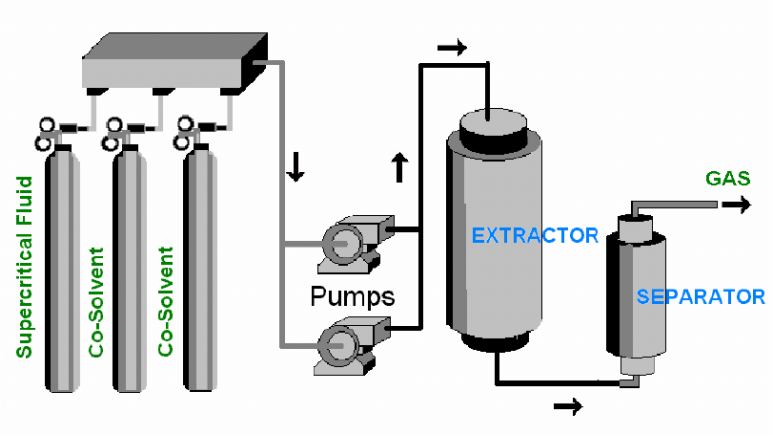
รูปที่ 2.5B แสดงลักษณะสภาวะวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด โดยที่คาร์บอนไดออกไซด์ในภาพแรกจะประกอบด้วย 2 เฟส คือก๊าซและของเหลว ในขณะที่เมื่อเพิ่มความดันและอุณหภูมิจนถึงค่าวิกฤตคาร์บอนไดออกไซด์จะไม่สามารถแยกได้ว่าอยู่ในสภาวะของก๊าซหรือของเหลว

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

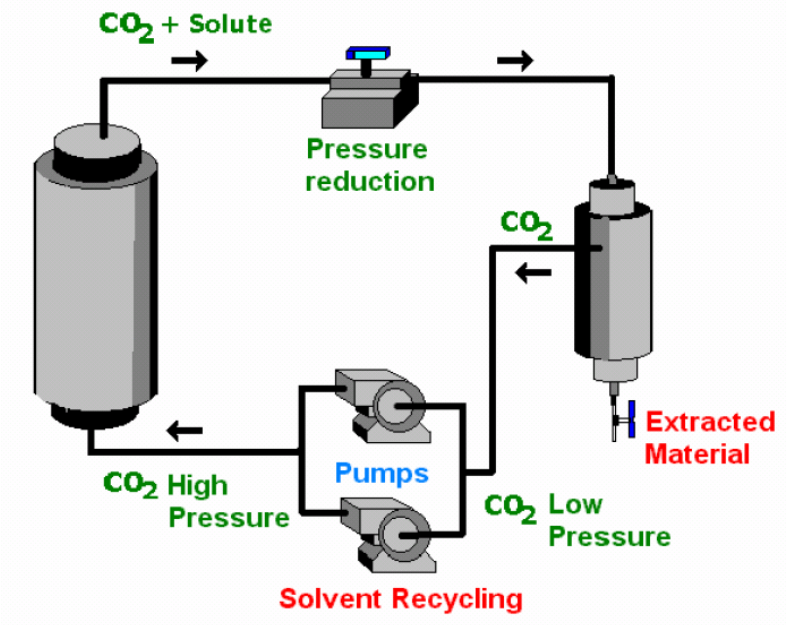
การนำมาใช้ประโยชน์

ในอุตสาหกรรมอาหารและยาใช้เพื่อสกัดสาร เช่น สารให้กลิ่นรส (Flavoring Agent) สารให้สี (Coloring Agent) น้ำมันหอมระเหย (Essential Oil) คาเฟอีน (Caffeine) วิตามิน คลอเลสเตอรอลเป็นต้น

สารสกัดที่ได้จากวิธีการนี้ มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคมากกว่าวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อาจไม่สามารถแยกตัวทำละลายออกมาได้หมดโดยสมบูรณ์ จึงอาจทำให้มีตัวทำละลายตกค้าง นักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่จึงเลือกใช้วิธีการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดมาสกัดสาร

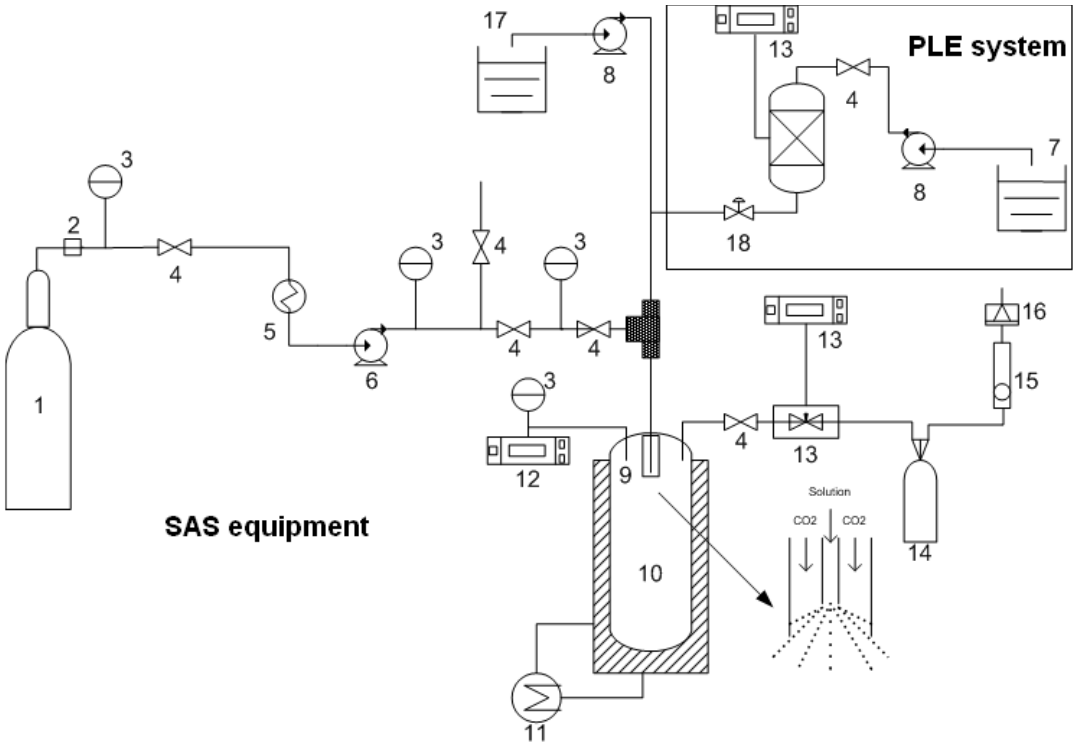


รูปที่ 2.6 แสดงแผนภาพการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยิ่งยวดแบบกะ



รูปที่ 2.7 แสดงแผนภาพการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดแบบต่อเนื่อง

ที่มา: Mohamed และ Mansoori (2002)



รูปที่ 2.8 แสดงแผนภาพระบบการสกัดโดยใช้เทคนิคของไหลวิกฤตยิ่งยวดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์
(1 CO_2 Cylinder; 2 CO_2 Filter; 3 Manometers; 4 Blocking Valves; 5 Thermostatic bath; 6 CO_2 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

การสกัดสารในกลุ่ม Gingerol-Related Compounds ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากขิง (Zingiber officinale) ด้วยเทคนิค PLE โดยใช้ไบโอเอทานอล (Bioethanol) เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำเป็นตัวทำละลาย ความดัน 1,500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สกัดเป็นระยะเวลานาน 20 นาที พบว่าให้ปริมาณสารสกัดและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใกล้เคียงกับการสกัดแบบซอกห์เลต ที่ต้องใช้ระยะเวลาในการสกัดนานถึง 8 ชั่วโมงและใช้เอทานอลที่ปราศจากน้ำ (Absolute Ethanol) เป็นตัวทำละลาย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค PLE ช่วยประหยัดทั้งเวลา ค่าใช้จ่าย และลดการทำลายสิ่งแวดล้อม (ชุติมาและสนทยา, 2555)

Capeletto และคณะ (2016) เปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วย Supercritical CO_2 และการสกัดด้วย Compressed n-Butane ในตัวอย่างเมล็ด Guavirova (Campomanesia Xanthocarpa Berg) พบว่าการสกัดด้วย Supercritical CO_2 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 250 บาร์ จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการสกัดด้วย Compressed n-Butane ในขณะที่การสกัดด้วย Compressed n-Butane จะมีปริมาณสารสกัดที่เยอะกว่าและมีความสามารถในการเป็น Antioxidant สูงกว่า โดยสภาวะที่ใช้ในการสกัดคือ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 70 บาร์

Badalyan และคณะ (1998) ทำการศึกษาวิธีการสกัดขิงด้วยการใช้ Supercritical CO_2 และ Supercritical CO_2+ Ethanol แทนการใช้วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม เช่น การสกัดด้วยไอน้ำซึ่งวิธีการสกัดแบบนี้จะมีปริมาณการใช้พลังงานอย่างสิ้นเปลืองและไม่มีประสิทธิภาพ ในงานวิจัยนี้ได้มีการเปรียบเทียบสภาวะในการสกัดดังนี้ อุณหภูมิในช่วง 9-35องศาเซลเซียส ความดัน 9-35 MPa รวมไปถึงอัตราความเร็วของ CO_2

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงาน

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ:

กาแฟคั่วโรบัสต้า (Northern Robusta โครงการเกษตรที่สูงชาวไทยภูเขา)

ใบเตย

ตะไคร้

ดอกมะลิ

ดอกจำปี

3.1.2 เชื้อแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Escherichia coli* (ESBL), *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Candida tropicalis* และ *Candida albicans*

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 บริษัทPKR SCIENCE & SERVICES ประเทศไทย)

3.1.6 Vortex (รุ่น S0200 บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)

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

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

3.1.9 เครื่องชั่งสาร (รุ่น ME204 บริษัท METTLER TOLEDO ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.1.10 เครื่องวัด pH (รุ่น pH 700 บริษัท EUTECH ประเทศสิงค์โปร์)

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 กล่องถ่ายภาพไฟล่าง

3.1.18 กล่องถ่ายภาพไฟบน

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 QRëC), 37% Hydrochloric acid (AR grade บริษัท QRëC), TPTZ (2,4,6-tripyridyl-5-triazine) (AR grade บริษัท Sigma), Iron(II) sulphate heptahydrate (AR grade บริษัท QRëC), Iron(III) chloride hexahydrate (AR grade บริษัท QRëC), Ethyl alcohol (AR grade บริษัท QRëC), Methyl alcohol (AR grade บริษัท QRëC), 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-Clocalteu'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 โซเดียมทังเสตน (Sodium tungstate ; Na_2WO_4) โซเดียมโมลิบเดต (Sodium molybdate ; Na_2MoO_4) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) และโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) การวิเคราะห์โดยวิธีนี้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงสีจากปฏิกิริยาของไอออน M(VI) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Mo(V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน ดังสมการ

$$\frac{\mathrm{NaWO_4}}{\mathrm{Na_2MoO_4}} \rightarrow (\mathrm{phenol - MoW_{11}O_4})^{-4}$$

$$\mathrm{Mo\ (VI)(yellow) + \ e^- \rightarrow Mo(V)(blue)}$$

การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยจะรายงานเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่เป็นกรดฟีนอล สารที่นิยมใช้ คือสารมาตรฐานกรดแกลลิก เนื่องจากมักจะพบในตัวอย่างพืชทั่วไป

<u>สารเคมี</u>

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

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

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

<u>เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard) ที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP assay</u>

- 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

<u>ขั้นตอนการทดลองสร้างกราฟมาตรฐาน</u>

1. นำสารตัวอย่าง Gallic acid แต่ละความเข้มข้น 125 µl ผสมกับ Folin-Clocalteu'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

<u>ขั้นตอนการทดลอง</u>

1. นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 125 µl ผสมกับ Folin-Clocalteu'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

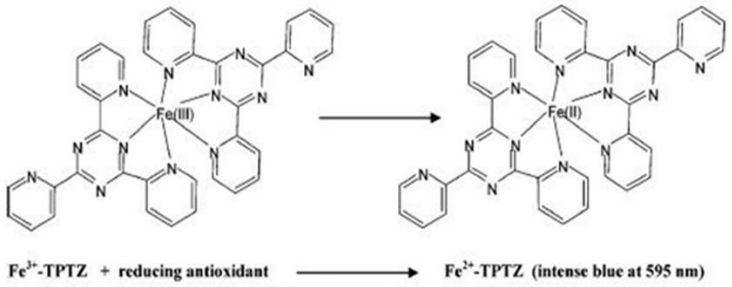
4. เมื่อครบเวลานำสารจากหลอด ใส่ลง 96 well plate หลอดละ 200 µl อย่างละ 3 หลุม

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

6. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับค่าจากกราฟมาตรฐาน

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

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



รูปที่ 3.1 แสดงปฏิกิริยาของความสามารถการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบ $[Fe(III) – (TPTZ)_2]^{3+}$ เปลี่ยนเป็นสารประกอบ $[Fe(II) – (TPTZ)_2]^{2+}$ (Karina et.al., 2018) สารที่มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเท่ากับมีความสารถในการรีดิวซ์ FRAP หรือสามารถสังเกตได้จากการการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 nm

<u>สารเคมี</u>

- 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)

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

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 µl
  TPTZ : 2, 4, 6–tripyridyl-5-triazine 2.5 mg
  40 mM Hydrochloric Acid (HCl) 800 µl

- 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 ใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

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

หมายเหตุ : เตรียมสารละลาย FRAP reagent ใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง เก็บให้พ้นแสงและความร้อน

2. สร้างกราฟมาตรฐานในการทดสอบด้วยวิธี FRAP assay

<u>เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard) ที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP assay</u>

- เตรียม 5,000 µM 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 µM Iron(II) sulphate heptahydrate มา dilute 10 เท่า โดยนำสารละลาย 5,000 µM Iron (II) sulphate heptahydrate มา 100 µl เจือจางด้วย DI water 900 µl (500 µM) 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

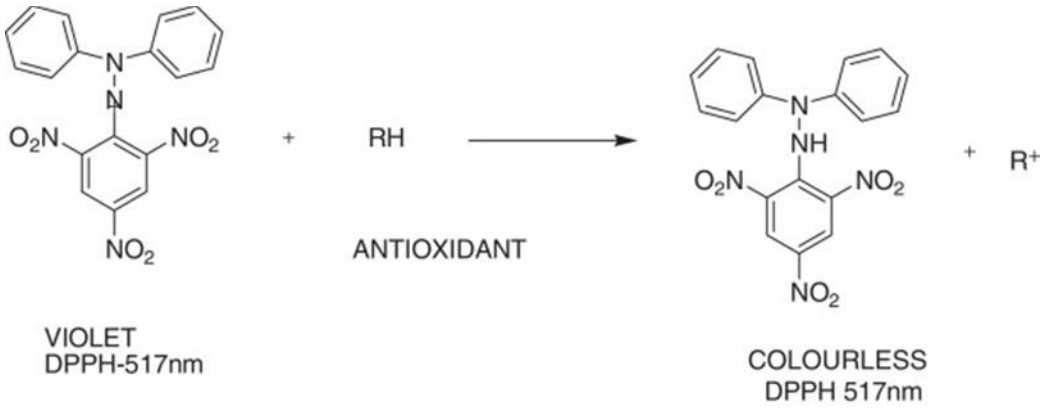
ชั่งสารสกัด 10 mg ละลายด้วยไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 1 ml [10 mg/ml] ใช้เป็น stock สารแล้วทำการเจือจางด้วย DMSO เป็น 2-fold dilution ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 mg/ml ตามลำดับ

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-พิคริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและมีสีม่วง เมื่อDPPH ได้รับอิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมจากสารต้านอนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนเป็น DPPH-H ซึ่งไม่มีสีแสดงดังรูปที่ 3.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างสารที่ใช้ในการทดสอบมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลาย DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเข้ม และค่อยๆ ลดลงตามความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมของสารทดสอบ ซึ่งถ้าหากมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง



รูปที่ 3.2 กลไกของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำปฏิกิริยากับอนุมูล DPPH (Pattusamy Nithya and Changa Madhavi, 2017)

<u>สารเคมี</u>

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

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

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 ใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง 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 100 เท่า โดยนำสารละลาย 1 mg/ml Gallic acid มา 10 µl เจือจางด้วย Methyl alcohol 990 µl (10 µg/ml) เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างกัน เจือจางเป็น 2-fold dilution ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 µg/ml ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดลองสร้างกราฟมาตรฐาน

1. นำสาร Gallic acid แต่ละความเข้มข้น 50 µl ผสมกับ DPPH reagent 100 µl

2. ทำ blank เพื่อมาลบกับตัวอย่าง โดยนำสาร Gallic acid แต่ละความเข้มข้น 50 µl ผสมกับ Methyl alcohol 100 µl 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 µg/ml L-ascorbic acid ปริมาตร 1 ml

  L-ascorbic acid 5 mg

  DI water (type II) 1 ml

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

ขั้นตอนการทดลองสร้างกราฟมาตรฐาน

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

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

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

4. นำค่าที่ได้ไปคำนวณ %Scavenging และสร้างกราฟมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH assay

ชั่งสารสกัด 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

<u>ขั้นตอนการทดลอง</u>

1. นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 50 µl ผสมกับ DPPH reagent 100 µl

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

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

4. นำค่าที่ได้ไปคำนวณ %Scavenging และสร้างกราฟ

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

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

โดย

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

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

C คือ คาการดูดกลืนแสงของส่วนสกัด 50 µl กับ DPPH 100 µl

D คือ คาการดูดกลืนแสงของ Methyl alcohol 100 µl กับส่วนสกัด 50 µl

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

3.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

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

<u>การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์</u>

นำเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ชนิดต่าง ๆ จำนวน 10 สายพันธุ์ คือ

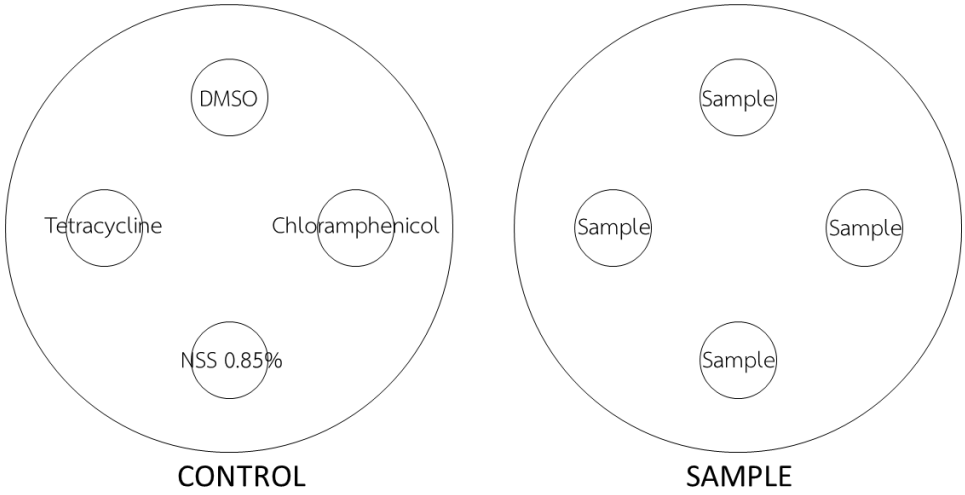
1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
2. *Escherichia coli* ATCC 25922
3. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
4. *Salmonella typhimurium* ATCC 13311
5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
6. *Proteus mirabilis* ATCC 8212
7. *Escherichia coli* (ESBL)
8. *Staphylococcus aureus* (MRSA)
9. *Candida tropicalis*
10. *Candida albicans*

โดยเชื้อสายพันธุ์ที่ 1-6 เป็นสายพันธุ์มาตรฐานจาก American Type Culture Collection (ATCC) และศูนย์รวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMST Culture Collection) นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Muller Hinton Agar โดยการเขี่ยเชื้อ 4-5 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller Hinton Broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland Standard No. 0.5 โดยให้มีจำนวนเชื้อ $1.5x10^8$ CFU/ml สำหรับแบคทีเรีย และ No. 0.5 โดยให้มีจำนวนเชื้อ $1.5x10^6$ CFU/ml สำหรับยีสต์ ปรับความขุ่นให้ใกล้เคียงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Muller Hinton Broth

<u>การทดสอบ</u>

นำไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ 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

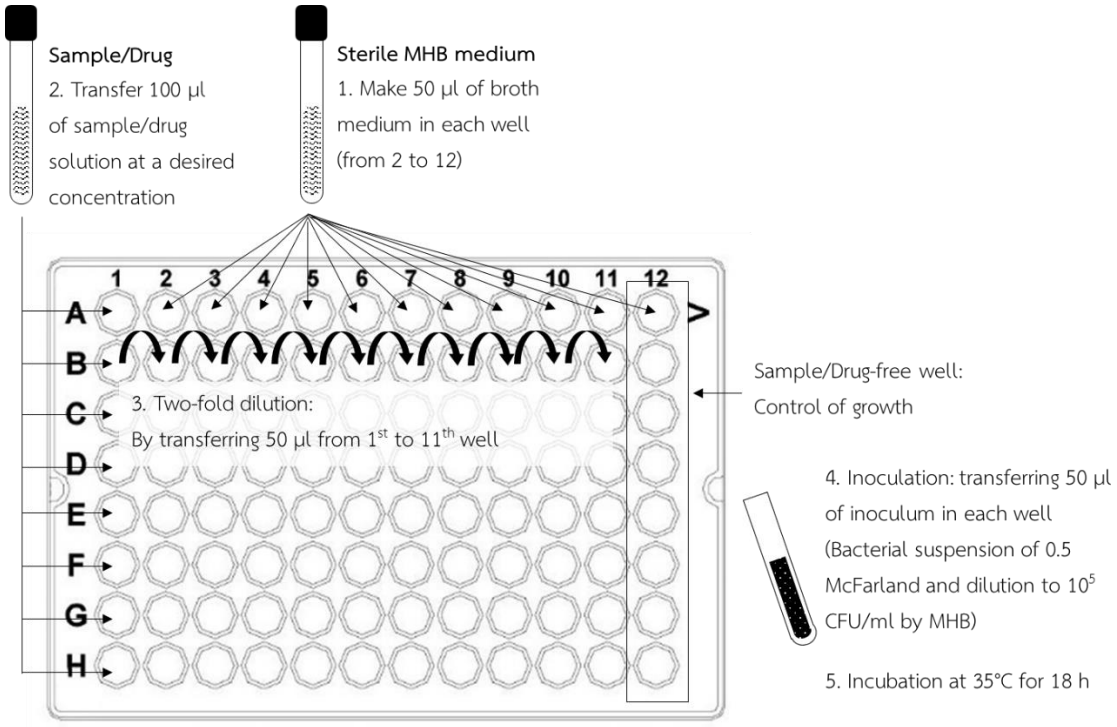
Paper Disc ของสารสกัด เปรียบเทียบกับตัวควบคุม ดิสก์ยามาตรฐานTetracycline, Chloramphenical (Positive control) และ DMSO 100%, NSS 0.85% (Negative control)



รูปที่ 3.3 การวางตำแหน่ง Disc สำหรับทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ โดย Disk Diffusion Assay

3.3.2.2 ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibition Concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) โดยวิธี Broth Microdilution (ดัดแปลงจาก Balouiri และคณะ, 2016)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยวิธี Broth Microdilution โดยการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB ปริมาตร 50 µl ลงไปในทุกหลุมของ 96 well plate ตั้งแต่แถวที่ 2-12 (ยกเว้นแถวที่ 1) หลังจากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยสารละลาย DMSO และ MHB ดูดใส่ในแถวที่ 1 ปริมาตรหลุมละ 100 µl จากนั้นทำการเจือจางแบบ 2 ไปเรื่อย ๆ จนถึงแถวที่ 11 จะได้ 10 ความเข้มข้น หลังจากนั้นเติม Bacterial suspension ที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml ปริมาตร 50 µl ลงในทุกหลุมของ 96 well plate บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เวลา 18 ชั่วโมง (ดังรูปที่ 3.4) ทำการอ่านค่า MIC โดยการเติม 0.18% resazurin ปริมาตร 10 µl บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เวลา 4 ชั่วโมง แล้วอ่านผล โดยถ้าสี resazurin กลายเป็นสีชมพู-บานเย็น แสดงว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย หากสี resazurin ยังคงมีสีเดิม คือ สีน้ำเงิน-ม่วง แสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย นำหลุมที่มีสีน้ำเงินมาเขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เวลา 24 ชั่วโมง เพื่ออ่านค่า MBC



รูปที่ 3.4 แผนภาพอย่างย่อแสดงขั้นตอนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibition Concentration: MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยวิธี Broth Microdilution

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเทคโนโลยีการสกัดพืชสมุนไพรโดยการประยุกต์ใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด รวมถึงการใช้บิวเทนในการสกัดสารสำคัญในพืชเป้าหมาย เทคโนโลยีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ทำการพัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้เป็นการต่อยอดและเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดแบบปัจจุบันที่มีการใช้งานอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมยา อาหารเสริม เครื่องสำอาง เป็นต้น ซึ่งโดยส่วนใหญ่เทคโนโลยีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดต้องมีการนำเข้าเครื่องมือเครื่องจักรจากต่างประเทศ และเครื่องจักรมีขนาดใหญ่ ทำให้อุตสาหกรรมขนาดเล็กรวมถึงการพัฒนาทางด้านงานวิจัยไม่สามารถเข้าถึงเทคโนโลยีนี้ได้มากนัก ทั้งนี้ทางคณะผู้ดำเนินโครงการวิจัยได้นำเสนอเทคโนโลยีการสกัดโดยการใช้บิวเทนที่มีการใช้งานอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เพื่อเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการพัฒนาและศึกษาผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของประเทศต่อไป ในโครงการวิจัยนี้จะทำการทดสอบประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดโดยใช้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบ และการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการประมวลผลการตรวจสอบด้วยภาพดิจิตอลที่มีกำลังขยายสูง (Digital image processing) เพื่อลดระยะเวลาการบ่มและสามารถตรวจวัดขนาดส่วนใสเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว

4.1 การพัฒนาระบบกระบวนการสกัดพืชสมุนไพรด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด

การพัฒนาระบบกระบวนการสกัดพืชสมุนไพรด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด ทางคณะผู้ดำเนินโครงการวิจัยได้ทำการออกแบบกระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดให้มีช่วงอุณภูมิในการสกัดระหว่าง 35 ถึง 82 องศาเซลเซียส ที่ความดันมากกว่า 73.8 บาร์ (จุดวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่ออุณหภูมิวิกฤต (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 ดังรูปที่ 4.1)

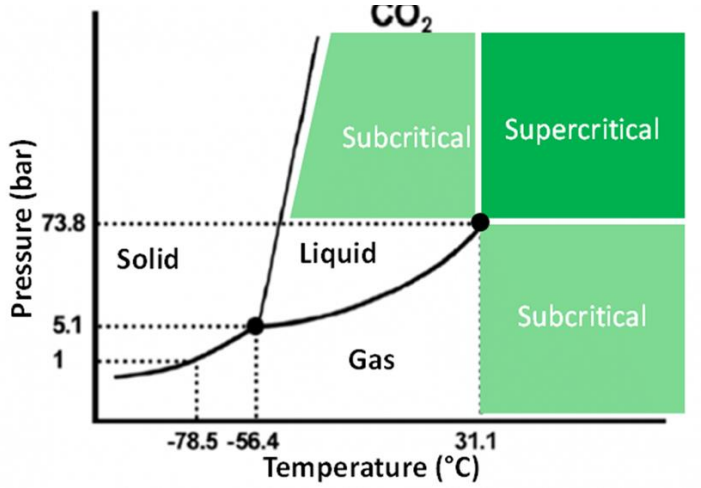
โดยระบบที่ทำการพัฒนาขึ้นประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก ดังนี้

- ระบบสร้างความดันสูง:
  ระบบสร้างความดันสูงให้กับคาร์บอนไดออกไซด์จากถังคาร์บอนไดออกไซด์ความดันต่ำจะถูกอัดเข้าไปเซลล์สกัดให้มีความดันมากกว่า 73.8 บาร์ ร่วมกับการทำงานของระบบความร้อนเพื่อให้เซลล์สกัดมีอุณหภูมิสูงกว่า 31.1 องศาเซลเซียส โดยในการทำงานร่วมกันนี้จะส่งผลให้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ความดันต่ำมีความดันและอุณหภูมิสูงขึ้นจนอยู่ในช่วงจุดวิกฤตของ

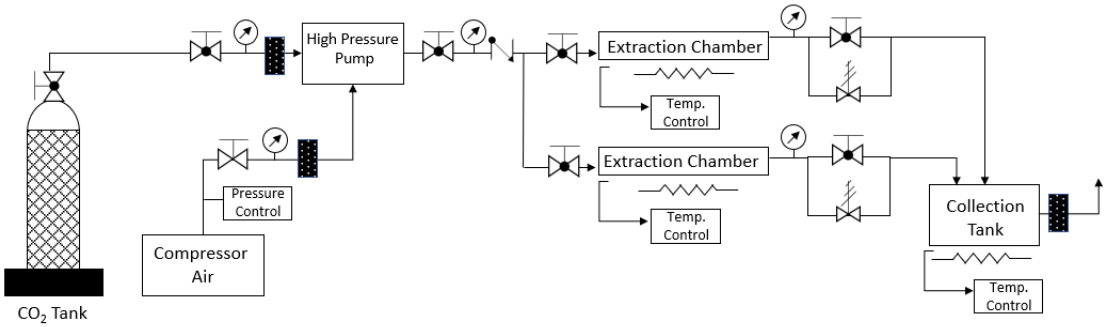
คาร์บอนไดออกไซด์ (โดยระบบสร้างความดันสูงได้รับความร่วมมือจากภาคอุตสาหกรรมในการยืมเครื่องมือสร้างความดันสูงเพื่อการใช้งานในโครงการวิจัยนี้)

- เซลล์สกัดหรือห้องสกัด:
  เซลล์สกัดหรือห้องสกัดทำจากสเตนเลส ซึ่งสามารถรองรับแรงดันได้สูง โดยเลือกใช้การปิด-เปิดตัวเซลล์แบบเกลียว เพื่อให้ใส่สารที่ต้องการสกัดได้ง่าย ทั้งนี้ในห้องสกัดจะมีการติดระบบตัวกรองทั้งสองด้านของหัวและท้ายของห้องสกัด เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างพืชเป้าหมายที่ทำการสกัดปนเปื้อนไปกับสารสกัดหยาบที่สกัดออกมาได้ในระบบเก็บสารสกัดหยาบ การออกแบบห้องสกัดแบบคู่ขนาน จำนวน 2 ห้องสกัด สามารถเลือกใช้งานห้องสกัดได้พร้อมกัน หรือสามารถเลือกใช้ทีละห้องสกัดเพื่อรองรับตัวอย่างวัตถุดิบต้นแบบที่มีปริมาณน้อยและง่ายต่อการใช้งาน โหมดการเลือกใช้งานทีละห้องสกัดสามารถออกแบบระบบการใช้งานให้เป็นแบบกึ่งต่อเนื่องได้ กล่าวคือ เมื่อทำการสกัดในห้องสกัดที่ 1 ผู้ใช้งานสามารถเตรียมตัวอย่างการสกัดครั้งต่อไปในห้องสกัดที่ 2 เมื่อการสกัดในห้องสกัดที่ 1 เรียบร้อยแล้ว ผู้ใช้งานสามารถเปิดระบบการสกัดในห้องสกัดที่ 2 ได้ทันที
- ระบบเก็บสารสกัดหยาบ:
  ทางเลือกที่ 1 ระบบเก็บสารสกัดหยาบโดยใช้ภาชนะแก้วที่เจาะรูบนฝาภาชนะเพื่อให้สารสกัดหยาบและคาร์บอนไดออกไซด์ของแข็งที่ออกมากับสารสกัดหยาบระเหิดออกให้เหลือเพียงสารสกัดหยาบ แต่ในระบบนี้พบปัญหาคือ ตัวอย่างสารสกัดหยาบและคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยออกมามีแรงดันสูงทำให้ภาชนะที่เก็บสารสกัดหยาบไม่สามารถทนต่อแรงดันได้
  ทางเลือกที่ 2 ระบบเก็บสารสกัดหยาบโดยใช้ถุงพลาสติกที่มีการออกแบบให้สามารถระบายคาร์บอนไดออกไซด์ที่แรงดันสูงให้เหลือเป็นน้ำแข็งแห้งโดยไม่ทำให้สารสกัดหยาบที่สกัดออกมาได้หลุดออกไปกับคาร์บอนไดออกไซด์ อย่างไรก็ตามระบบเก็บสารสกัดหยาบที่ได้มีการพัฒนาขึ้นในทางเลือกที่ 2 ยังพบปัญหาในขั้นตอนการขูดสารสกัดหยาบออกจากถุงพลาสติก และการจับตัวแข็งเนื่องจากความเย็นของคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณข้อต่อระหว่างจุดปล่อยตัวอย่างและถุงพลาสติกทำให้ในระหว่างการปล่อยสารสกัดหยาบมีการหลุดของภาชนะเก็บตัวอย่าง
  ทางเลือกที่ 3 ระบบเก็บสารสกัดหยาบโดยใช้ภาชนะทนแรงดันและมีวาล์วระบายร่วมกับอุณหภูมิในการช่วยการระเหิดของคาร์บอนไดออกไซด์แข็งที่ออกมากับสารสกัดหยาบในขั้นตอนการปล่อยสารสกัดหยาบ ทำให้สามารถแก้ปัญหาระบบเก็บตัวอย่างจากทางเลือกที่ 2 ได้เป็นอย่างดี

- ระบบควบคุมอุณหภูมิ ความดัน และเวลา:
  ระบบควบคุมอุณหภูมิ ความดัน และเวลา โดยระบบการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ได้พัฒนาขึ้น สามารถเลือกอุณหภูมิในการสกัดได้ระหว่าง 35 ถึง 75 องศาเซลเซียส ที่ความดันระหว่าง 75 ถึง 200 บาร์ โดยสามารถตั้งเวลาในการสกัดได้



รูปที่ 4.1 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารในสถานะของแข็ง ของเหลว และไอ โดยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความดันของคาร์บอนไดออกไซด์ (Pressure-Temperature phase diagram of CO_2) (Laboureur และคณะ, 2015)



รูปที่ 4.2 แสดงแผนผังอย่างย่อของระบบการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ได้พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้

หมายเหตุ ระบบการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ได้พัฒนาขึ้นจะทำการทดสอบด้วยแรงดันน้ำ (Hydrostatic Test) ที่ความดัน 200 บาร์ ก่อนที่มีการใช้งานของระบบสกัด โดยได้รับความร่วมมือการทดสอบจากภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

4.1.1 การทดสอบประสิทธิภาพของระบบกระบวนการสกัดพืชสมุนไพรด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด

ระบบต้นแบบการสกัดพืชสมุนไพรด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (ดังแผงผังการทำงานของ รูปที่ 4.2) การทดสอบประสิทธิภาพจะทำการเลือกใช้พืชสมุนไพรต้นแบบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้แก่ พืชวงศ์เข็ม หรือ พืชวงศ์รูเบียซีอี (Rubiaceae) ซึ่งทางคณะผู้ดำเนินโครงการได้ทำการเลือกใช้กาแฟโรบัสต้า เป็นสารสกัดเป้าหมาย

(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 4.3 วัตถุดิบเป้าหมายในการทดสอบประสิทธิภาพของระบบการสกัด กาแฟคั่วโรบัสต้า (ก) เมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้า (ข) และ เมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าเมื่อผ่านการเพิ่มพื้นที่ผิว (ค)

(ก) (ข) (ค) (ง) (จ)

รูปที่ 4.4 สารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าเมื่อทำการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่ความดัน 200 บาร์ จำนวนการสกัด 3 รอบ และเปรียบเทียบอุณหภูมิในการสกัดที่ 45 องศาเซลเซียส (ก) 55 องศาเซลเซียส (ข) 65 องศาเซลเซียส (ค) 75 องศาเซลเซียส (ง) และ 82 องศาเซลเซียส (จ) ตามลำดับ

(ก) (ข) (ค) (ง) (จ)

รูปที่ 4.5 สารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าเมื่อทำการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่ความดัน 200 บาร์ จำนวนการสกัด 1 รอบ และเปรียบเทียบอุณหภูมิในการสกัดที่ 45 องศาเซลเซียส (ก) 55 องศาเซลเซียส (ข) 65 องศาเซลเซียส (ค) 75 องศาเซลเซียส (ง) และ 82 องศาเซลเซียส (จ) ตามลำดับ

สารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าเมื่อทำการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่ความดัน 200 บาร์ ที่อุณหภูมิในการสกัดแตกต่างกัน พบว่า เมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้น จาก 45, 55, 65, 75 และ 82 องศาเซลเซียส ลักษณะของสารสกัดหยาบของทั้งจำนวนการสกัด 3 รอบ (รูปที่ 4.4) และ 1 รอบ (รูปที่ 4.5) จะมีความเข้มข้นมากขึ้นและปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้มีแนวโน้มลดลง ดังตารางที่ 4.1 เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะของสารสกัดหยาบ เมื่อจำนวนรอบของการสกัดที่แตกต่างกันโดยให้เวลาในการสกัดเท่ากัน พบว่าลักษณะของสารสกัดหยาบที่ได้จากจำนวนการสกัด 3 รอบ มีลักษณะเป็นครีมข้นและมีความเป็นเนื้อเดียวกันมากกว่าการสกัดจำนวน 1 รอบ ซึ่งมีการแยกระหว่างเนื้อครีมและของเหลว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดส่งผลต่อลักษณะของสารสกัดหยาบ

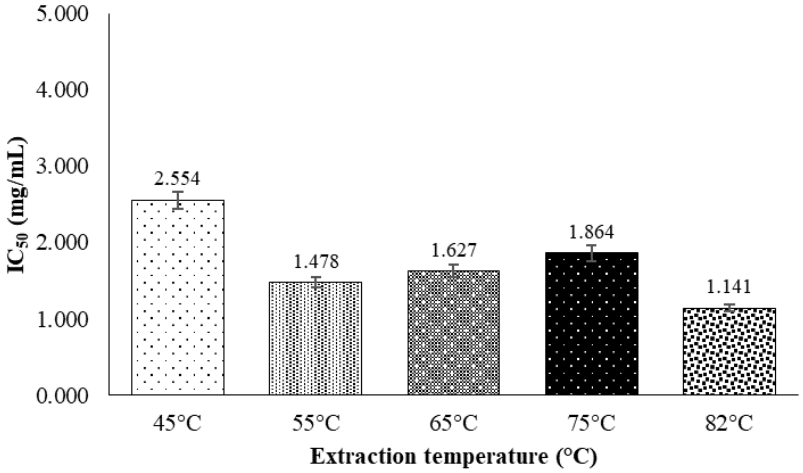
ตารางที่ 4.1 น้ำหนักของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัดและจำนวนรอบการสกัดแตกต่างกัน เมื่อเวลาในการสกัดเท่ากัน

อุณหภูมิการสกัด (องศาเซลเซียส)	**น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)**	
	จำนวน 3 รอบของการสกัด	**จำนวน 1 รอบของการสกัด**
45	2.423	0.985
55	1.762	0.547
65	0.670	0.519
75	0.470	0.621
82	0.126	0.427

4.1.1.1 ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay และ DPPH

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด ดังตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วที่อุณหภูมิในการสกัด 75 องศาเซลเซียส จำนวนรอบการสกัด 3 รอบ พบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH มากที่สุด ในขณะที่การวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรับอิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) FRAP assay มากที่สุดเมื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส ที่จำนวนรอบการสกัด 1 รอบ

จากการทดสอบปริมาณฟีนอลรวมจากสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้า ที่อุณหภูมิและจำนวนรอบในการสกัดแตกต่างกันพบว่า สารสกัดหยาบมีปริมาณของฟีนอลรวมอยู่ในช่วง 58.47±0.77 ถึง 181.87±1.65 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของสารสกัด และ 97.63±1.23 ถึง 192.13±1.70 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของสารสกัด เมื่อสกัดที่จำนวนรอบ 3 และ 1 รอบ ตามลำดับ โดยที่แนวโน้มของปริมาณของฟีนอลรวมเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดมากขึ้น โดยปริมาณของฟีนอลรวมจะมีค่าสูงสุดเมื่อทำการสกัดที่ 82 องศาเซลเซียส จำนวนรอบในการสกัด 1 รอบ

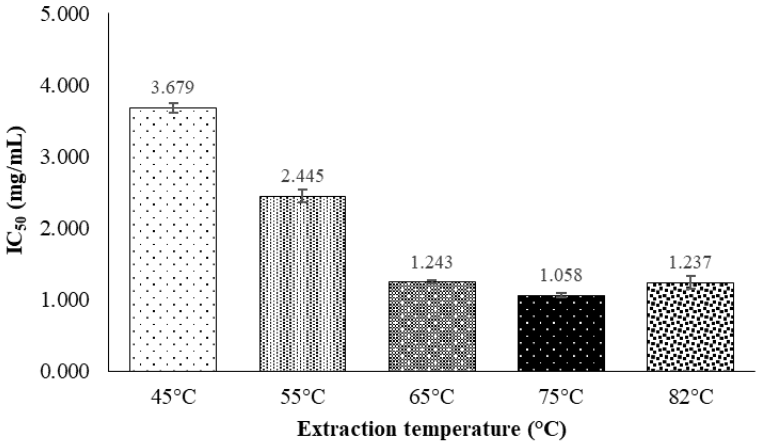


รูปที่ 4.6 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด ที่ความดัน 200 บาร์ สกัดต่อเนื่องจำนวน 1 รอบ ที่อุณหภูมิในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

ตารางที่ 4.2 ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay และ DPPH

จำนวนรอบในการสกัด	อุณหภูมิการสกัด (องศาเซลเซียส)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่าง ๆ		Total Phenolic Content (mg GAE/ g)
		FRAP assay (μmol_{FE2+}/mg)	IC_{50} of DPPH (mg/ml)	
3 รอบ	45	1,025.76±7.89	3.679±0.065	58.47±0.77
	55	1,208.86±4.28	2.445±0.084	73.15±2.77
	65	1,963.22±7.82	1.243±0.027	141.36±2.31
	75	2,088.70±4.80	**1.058±0.026**	161.70±1.96
	82	2,284.50±15.01	1.237±0.090	181.87±1.65
1 รอบ	45	1,367.41±7.18	2.554±0.109	97.63±1.23
	55	2,222.31±8.81	1.478±0.061	148.13±4.08
	65	2,009.71±7.21	1.627±0.083	159.32±0.78
	75	1,620.23±5.38	1.864±0.105	125.29±2.40
	82	**2,524.25±13.14**	1.141±0.045	**192.13±1.70**

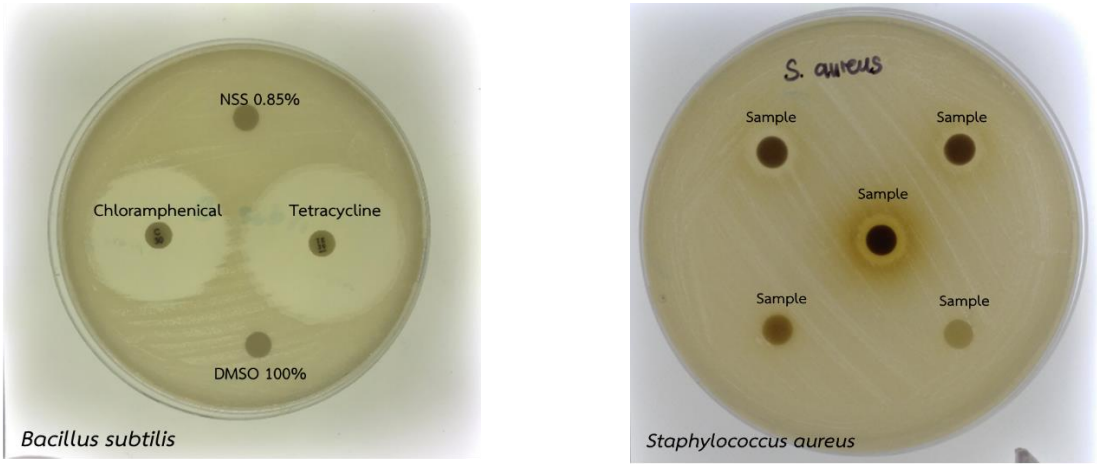
หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน โดยแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.7 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด ที่ความดัน 200 บาร์ สกัดต่อเนื่องจำนวน 3 รอบ ที่อุณหภูมิในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

4.1.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion

จากการทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบกาแฟโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดมาทำการทดสอบเบื้องต้นในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ โดยเลือกสภาวะในการสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสที่จำนวนรอบการสกัด 3 รอบ โดยการนำสารสกัดหยาบมาทำการเจือจางด้วย DMSO ในอัตราส่วน 1:1 และทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ 10 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Escherichia coli* (ESBL)*, Staphylococcus aureus* (MRSA)*, Candida tropicalis* และ *Candida albicans* ที่ความเข้มข้น 50% ของสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli* (ESBL) และ *Staphylococcus aureus* (MRSA) เมื่อนำสารสกัดหยาบกาแฟคั่วที่สภาวะในการสกัด 82 องศาเซลเซียสที่จำนวนรอบการสกัด 1 รอบ ที่ความเข้มข้น 25% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 6 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium, Escherichia coli* (ESBL)*, Staphylococcus aureus* (MRSA) และ *Candida albicans* ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.8



(ก) (ข)

รูปที่ 4.8 ตัวอย่างลักษณะการเกิด Inhibition zone ของ *Bacillus subtilis* เมื่อทดสอบด้วย NSS, DMSO, Chloramphenical และ Tetracycline (ก) และ *Staphylococcus aureus* เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากกาแฟคั่ว (ข) โดยใช้ไฟล่างในการถ่ายภาพ

ตารางที่ 4.3 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์จากสารสกัดหยาบกาแฟคั่ว

เชื้อจุลชีพ	**แกรม**	**สารสกัดหยาบ**		**DMSO**	**NSS**	**Antibiotic control**	
		45°C 3รอบ	**82°C 1รอบ**	**100%**	**0.85%**	**Tetracycline**	**Chloramphenical**
Staphylococcus aureus	+	10.00±0.00	9.67±0.58	NI	NI	39.18±0.78	32.44±1.25
Escherichia coli	-	NI	NI	NI	NI	35.35±0.19	35.75±0.39
Bacillus subtilis	+	8.00±0.00	9.33±2.31	NI	NI	38.37±0.67	32.57±0.17
Salmonella typhimurium	-	NI	8.00±0.00	NI	NI	32.78±0.00	35.40±0.16
Pseudomonas aeruginosa	-	NI	NI	NI	NI	16.95±0.17	8.66±0.17
Proteus mirabilis	-	NI	NI	NI	NI	NI	11.68±0.65
Escherichia coli (ESBL)	-	9.00±0.00	9.00±0.00	NI	NI	10.22±0.00	30.58±0.14
Staphylococcus aureus (MRSA)	+	8.67±0.58	8.00±0.00	NI	NI	15.80±0.99	29.98±0.33
Candida tropicalis	Yeast	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Candida albicans	Yeast	NT	11.33±0.58	NI	NI	NI	NI

แสดงค่าเป็น Inhibition zone ± S.E.M. หน่วยเป็นมิลลิเมตร (n=3)

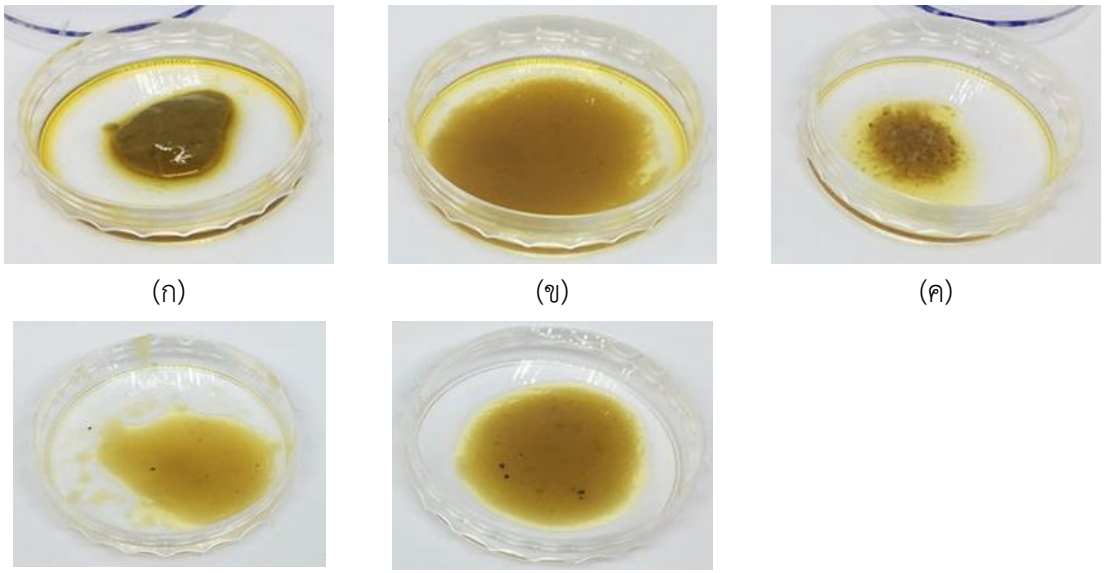
NI = no inhibition zone: เส้นผ่านศูนย์กลางของดิสก์เท่ากับ 6 มิลลิเมตร

ND = not determine

NT = not tested

4.1.2 การศึกษาปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้ในระบบการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด

เมื่อทำการพิจารณาความสามารถในการสกัดสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าที่ความดัน 200 บาร์ อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส ต่อลักษณะของสารสกัดหยาบและปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้ในการสกัดเมื่อจำนวนรอบในการสกัดต่าง ๆ จำนวน 5 รอบการสกัด ดังรูปที่ 13 และ ตารางที่ 4.4 พบว่าปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้ในการสกัดรอบแรกมีปริมาณสูงที่สุด และจะเริ่มคงที่เมื่อทำการสกัดในรอบต่อไป



(ก) (ข) (ค)

(ง) (จ)

รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะสีของสารสกัดจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าเมื่อทำการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่ความดัน 200 บาร์ อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส เมื่อทำการสกัดครั้งที่ 1 (ก) ครั้งที่ 2 (ข) ครั้งที่ 3 (ค) ครั้งที่ 4 (ง) และครั้งที่ 5 (จ)

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าเมื่อทำการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่ความดัน 200 บาร์ อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้ในการสกัดแต่ละรอบของการสกัด

รอบการสกัด	**น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)**	**ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้ในการสกัด (กก.)**	**ลักษณะสารสกัดหยาบ**
ครั้งที่ 1	0.6363	1.60	สีน้ำตาลของเหลวคล้ายครีมปนน้ำมันกลิ่นหอมกาแฟเข้มข้น
ครั้งที่ 2	0.4816	0.86	สีน้ำตาลอ่อนของเหลวคล้ายครีมปนน้ำมันกลิ่นหอมกาแฟเข้มข้น
ครั้งที่ 3	0.2193	0.73	สีน้ำตาลอ่อนของเหลวคล้ายครีมปนน้ำมันกลิ่นหอมกาแฟเข้มข้น
ครั้งที่ 4	0.2911	0.70	สีน้ำตาลอ่อนของเหลวคล้ายน้ำมันกลิ่นหอมกาแฟเข้มข้น
ครั้งที่ 5	0.1895	0.76	สีน้ำตาลอ่อนของเหลวคล้ายน้ำมันกลิ่นหอมกาแฟเข้มข้น

4.2 การพัฒนาแนวทางกระบวนการสกัดพืชสมุนไพรด้วยบิวเทน

ผลการดำเนินงานที่ผ่านมา ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการออกแบบและสร้างเครื่องต้นแบบในการสกัดพืชสมุนไพรด้วยเทคนิคการใช้บิวเทน โดยได้ทำการสกัดแบบขนาดเล็กและทำการเลือกใบเตยเป็นสมุนไพรต้นแบบในการทดลองเนื่องจากใบเตยมีราคาถูก ดังรูปที่ 4.10 (ก) นำใบเตยมาทำการทำแห้งและผ่านการสกัดโดยใช้บิวเทน หลังจากสกัดพบว่า สารสกัดต้นแบบมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวเข้ม ดังรูปที่ 4.10 (ข) และมีกลิ่นเช่นเดียวกับกลิ่นของวัตถุดิบเริ่มต้นในที่นี้คือใบเตยแห้ง

(ก) (ข)

รูปที่ 4.10 แสดงภาพวัตถุดิบใบเตยแห้งที่ใช้ในการทดสอบการสกัดด้วยระบบบิวเทน (ก) และน้ำมันใบเตยเมื่อผ่านการสกัดด้วยระบบบิวเทน (ข)

เมื่อนำสารสกัดใบเตยที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณ ด้วยเครื่อง Karl Fischer (Mettler Toledo) โดยการไทเทรตตัวอย่างที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบด้วยสารละลายไอโอดีนในเมทานอล ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide) และไพริดีน (pyridine) โดยไอโอดีนจะทำปฏิกิริยากับน้ำ เมื่อน้ำทำปฏิกิริยาจนหมด การไทเทรตสิ้นสุดสีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของไอโอดีนอิสระ วัดปริมาตรของไอโอดีนที่ใช้ในการไทเทรตพบว่าสารสกัดใบเตยตัวอย่างมีปริมาณน้ำอยู่ที่ร้อยละ 1.86

4.2.1 แนวทางการสกัดสมุนไพรสดโดยการใช้เทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง

การศึกษาผลของขนาดวัตถุดิบเริ่มต้นต่อสารสกัดหยาบจากตะไคร้สด

(ก) (ข) (ค)

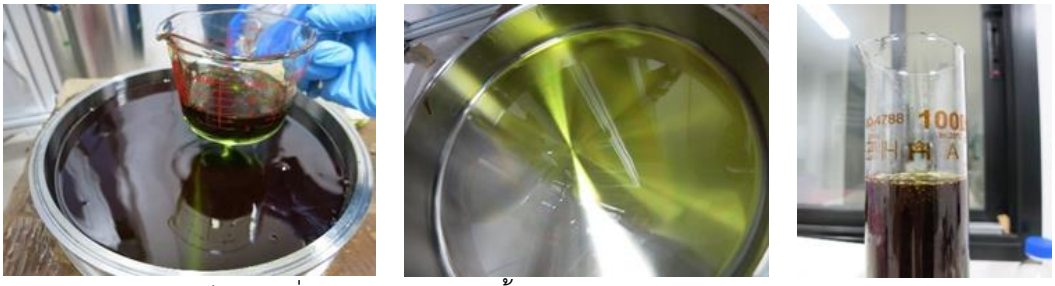
รูปที่ 4.11 ตะไคร้สดก่อนทำการปั่น (ก) ตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 1 (ข) ตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 2 (ค) ก่อนนำไปสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง

รูปที่ 4.12 สารสกัดหยาบจากตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 1 โดยการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง

รูปที่ 4.13 สารสกัดหยาบจากตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 2 โดยการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง

จากการศึกษาการเปรียบเทียบผลของขนาดของวัตถุดิบตั้งต้นต่อปริมาณของสารสกัดหยาบ พบว่าสารสกัดจากใบตะไคร้สดที่ทำการปั่นละเอียดในระดับ 1 และระดับ 2 ดังรูปที่ 4.12 และ 4.13 ตามลำดับ ที่ผ่านการสกัดด้วยบิวเทน มีลักษณะสีเขียวเข้ม เนื้อสารเหลว มีกลิ่นหอมของตะไคร้เข้มข้น โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สดปั่นละเอียดในระดับ 2 (รูปที่ 4.13) มีความเข้มของสีเขียวมากกว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สดปั่นละเอียดใน

ระดับ 1 (รูปที่ 4.12) เนื่องจากใบตะไคร้สดที่ปั่นละเอียดในระดับ 2 มีการปั่นตะไคร้ให้ละเอียดมากกว่าในระดับ 1 ทำให้เซลล์ภายในใบของตะไคร้แตกมากขึ้น จึงส่งผลให้สีของสารสกัดเข้มกว่า และน้ำหนักสารสกัดที่มากกว่าการปั่นตะไคร้ในระดับ 1 ดังตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.14 สารสกัดหยาบจากตะไคร้สดปั่นละเอียดร่วมกับน้ำมันพืช (อัตราส่วน 1:1) โดยการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง

สารสกัดใบตะไคร้สดร่วมกับน้ำมันพืช อัตราส่วน 1:1 ที่ผ่านการสกัดด้วยบิวเทน (Butane extraction) มาแล้ว 1 รอบ พบว่าสารสกัดมีลักษณะสีเขียว เนื้อสารเหลวเป็นน้ำมัน มีกลิ่นหอมของตะไคร้อ่อนมาก มีกลิ่นหืนของน้ำมันพืช และยังพบว่ามีบิวเทนเหลือเป็นจำนวนมากในสารสกัด ซึ่งต้องใช้เวลานานในการระเหยบิวเทนออกจากสารสกัด โดยในการสกัดด้วยวิธีบิวเทน (Butane extraction) เมื่อใช้น้ำมันร่วมด้วย จะได้สารสกัดที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากบิวเทนจัดอยู่ในสารกลุ่มที่มีขั้วต่ำ และน้ำมันที่มีขั้วต่ำเช่นกันจึงจะช่วยดึงสารประเภทที่มีขั้วต่ำในตัวอย่างที่ใช้สกัดออกมากได้มากขึ้น ดังนั้นสารสกัดที่ได้ผ่านการสกัดมาแล้ว 1 รอบ จึงยังคงมีสีเขียวที่เข้มอยู่ ดังรูปที่ 4.14

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากตะไคร้สดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay และ DPPH

ชนิดตัวอย่าง	**น้ำหนักสารสกัดหยาบ(กรัม)**	**ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่าง ๆ**	
		FRAP assay (10 mg/ml)	**IC_{50} of DPPH (mg/ml)**
ตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 1	4.6135	1,028.024	4.534
ตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 2	5.5674	790.37	5.276
น้ำมันตะไคร้ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด		979.75	-

จากผลการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของกรดแกลลิกซึ่งเป็นสารควบคุมแบบบวกที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.402 ± 1.1432 mg/ml สารสกัดหยาบจากตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 1 และ ระดับ 2 ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง พบว่า สารสกัดหยาบจากตะไคร้สดปั่นละเอียดในระดับ 2 พบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH มากกว่าสารสกัดหยาบจากตะไคร้สดปั่นละเอียดในระดับ 1 ดังตารางที่ 4.5 และเมื่อทำการวิเคราะห์การวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรับอิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) FRAP assay โดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method พบว่า สารสกัดหยาบจากตะไคร้สดปั่นละเอียดในระดับ 1 ที่ผ่านการสกัดด้วยระบบบิวเทน มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการรับอิเล็กตรอนอิสระได้ดีกว่า น้ำมันตะไคร้ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดด้วยเทคนิคการกลั่นด้วยไอน้ำ และสารสกัดหยาบจากตะไคร้สดปั่นละเอียดในระดับ 2 ที่ผ่านการสกัดด้วยระบบบิวเทนตามลำดับ

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำ (moisture content) ในตัวอย่างตะไคร้สดปั่นหยาบด้วยเครื่อง Karl Fischer method โดยอาศัยการไทเทรตตัวอย่างที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบด้วยสารละลายไอโอดีนในเมทานอล ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide) และไพริดีน (pyridine) โดยไอโอดีนจะทำปฏิกิริยากับน้ำ เมื่อน้ำทำปฏิกิริยาจนหมดการไทเทรตสิ้นสุด สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของไอโอดีนอิสระ วัดปริมาตรของไอโอดีนที่ใช้ในการไทเทรต พบว่าตะไคร้สดปั่นละเอียดก่อนทำการสกัดมีปริมาณน้ำร้อยละ 46.62 ± 1.46 และเมื่อทำการสกัดด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงพบว่า ปริมาณน้ำในตัวอย่างตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 1 และระดับ 2 มีปริมาณน้ำร้อยละ 2.11 ± 0.0๒ และ 2.03 ± 0.07 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากตะไคร้สดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (mg/ml)	**Fe_2SO_4 evaluation (μM/ml)**		
		เทคนิคการสกัดด้วยบิวเทน	
	น้ำมันตะไคร้ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด	**สารสกัดน้ำมันตะไคร้จากตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 1**	**สารสกัดน้ำมันตะไคร้จากตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 2**
0.625	63.086 ± 1.048	80.741 ± 2.052	62.593 ± 0.878
1.250	125.926 ± 1.979	169.012 ± 1.998	151.852 ± 4.933
2.500	259.012 ± 2.884	332.593 ± 3.546	239.012 ± 2.401

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (mg/ml)	Fe_2SO_4 evaluation (μM/ml)		
		เทคนิคการสกัดด้วยบิวเทน	
	น้ำมันตะไคร้ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด	สารสกัดน้ำมันตะไคร้จากตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 1	สารสกัดน้ำมันตะไคร้จากตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 2
5.000	485.432 ± 6.356	594.815 ± 7.675	452.593 ± 3.223
10.000	979.753 ± 9.735	1028.025 ± 5.223	790.370 ± 7.432

ตารางที่ 4.7 ตารางแสดงผลการยับยั้งทางด้านจุลชีววิทยาของสารสกัดหยาบจากตะไคร้สดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง โดยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย Agar disc diffusion

สารทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 80 mg/ml 20 ไมโครลิตร/ดิสก์ (Zone Diameter mm)								
	S. aureus ATCC 25922			*E. coli ATCC 25922*			*P. aeruginosa*		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
สารสกัดน้ำมันตะไคร้จากตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 1			8.5			3.5			3
สารสกัดน้ำมันตะไคร้จากตะไคร้สดปั่นละเอียดระดับ 2			12			3.5			3

ตารางที่ 4.8 ตารางแสดงผลการยับยั้งทางด้านจุลชีววิทยาของสารมาตรฐาน Tetracycline โดยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย Agar disc diffusion control

สารทดสอบ	Tetracycline 30ไมโครกรัม/ดิสก์ (Zone Diameter mm)								
	S. aureus ATCC 25922			*E. coli ATCC 25922*			*P. aeruginosa*		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Tetracycline	28				19			15	

ตารางที่ 4.9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดตะไคร้ที่สามารถยังยั้งเชื้อได้ (MIC) ทดสอบโดย Macrobroth dilution

เชื้อทดสอบ	สาร	ค่าความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้ mg/ml							NC	GC	ค่าMIC
		0.15	0.3	1.2	2.5	5	10	20			
E. coli	1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	NI
	2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	NI
S. aureus	1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	NI
	2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	NI
P.	1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	NI
aeruginoa	2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	NI

หมายเหตุ+ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อทดสอบ - หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบ

NG หมายถึง Negative control GC หมายถึง Growth control

NI หมายถึง No Inhibition

1 หมายถึง สารสกัดน้ำมันตะไคร้จากตะไคร้ปั่นหยาบและสกัดด้วยบิวเทน

2 หมายถึง สารสกัดน้ำมันตะไคร้จากตะไคร้ปั่นละเอียดและสกัดด้วยบิวเทน

จากผลการทดลองฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบจากตะไคร้โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ Agar disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากตะไคร้ที่ผ่านการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูงทั้งในตัวอย่างตะไคร้สดที่ปั่นละเอียดระดับ 1 และระดับ 2 ก่อนทำการสกัด มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. Aeruginosa*) โดยการเลือกใช้ Tetracycline เป็นสารมาตรฐาน

4.2.2 แนวทางการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากวัตถุดิบสดโดยการใช้เทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้ความดันสูง

การสกัดน้ำมันหอยระเหยจากวัตถุดิบสด ได้แก่ สมุนไพรสด ดอกไม้สด เพื่อให้ได้ซึ่งกลิ่นและฤทธิ์ในทางเภสัชวิทยานับเป็นเรื่องที่น่าสนใจสำหรับอุตสาหกรรมน้ำมันหอมระเหย ในการยกระดับคุณภาพสินค้าด้วยเทคโนโลยีการสกัดที่ความร้อนต่ำ ในโครงการวิจัยนี้จึงได้นำเสนอแนวทางการประยุกต์ใช้ระบบการสกัดด้วยบิวเทนที่ความดันสูงในสภาวะการสกัดที่อุณหภูมิต่ำเข้ามาเพิ่มมูลค่าสินค้าทางการเกษตรของไทย ที่มีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะทั้งในด้านกลิ่นของน้ำมันของระเหย สีของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ดังรูปที่ 4.15 ถึง 4.18

(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 4.15 แสดงภาพใบเตยก่อนทำการสกัด (ก) น้ำมันใบเตยหลังการสกัด (ข) และ (ค) โดยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้แรงดันสูง

(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 4.16 แสดงภาพดอกจำปีก่อนทำการสกัด (ก) ดอกจำปีหลังการสกัด (ข) และสารสกัดหยาบจากดอกจำปี (ค) โดยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้แรงดันสูง

(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 4.17 แสดงภาพดอกมะลิก่อนทำการสกัด (ก) ดอกมะลิหลังการสกัด (ข) และสารสกัดหยาบจากดอกมะลิ (ค) โดยเทคนิคการสกัดด้วยบิวเทนภายใต้แรงดันสูง

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

นวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด ผลการดำเนินโครงการในปีที่ 1 ได้ทำการพัฒนากระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดให้มีช่วงอุณภูมิในการสกัดระหว่าง 35 ถึง 82 องศาเซลเซียส ที่ความดันมากกว่า 73.8 บาร์ โดยการออกแบบห้องสกัดแบบคู่ขนาน ทำให้สามารถสกัดสารสกัดหยาบเป้าหมายได้ในระบบกึ่งต่อเนื่อง อีกทั้งได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของระบบการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ได้มีการพัฒนาขึ้นในโครงการนี้โดยการใช้กาแฟคั่วเป็นวัตถุดิบทดสอบ ทำการศึกษาความสามารถในการสกัดสารสกัดหยาบของกาแฟที่ความดัน 200 บาร์ อุณหภูมิในการสกัดระหว่าง 45 ถึง 82 องศาเซลเซียส และเปรียบเทียบจำนวนรอบในการสกัด จากการทดลองพบว่า เมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้นส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้น และปริมาณฟีนอลรวมสูงขึ้น อีกทั้งสารสกัดหยาบจากกาแฟคั่วมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium, Escherichia coli (ESBL), Staphylococcus aureus (MRSA) และ Candida albicans* อย่างไรก็ตามกระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่พัฒนาขึ้นในปีที่ 1 ไม่เหมาะสำหรับการสกัดดอกไม้ที่มีความบอบบางเนื่องจากแรงดันที่ใช้ในการสกัดจะส่งผลให้ตัวอย่างประเภทดอกไม้สดมีความช้ำได้ง่าย ทั้งนี้ผู้ดำเนินโครงการได้นำเสนอแนวทางกระบวนการสกัดพืชสมุนไพรด้วยบิวเทน โดยได้ทำการสกัดพืชสมุนไพรกลุ่มเป้าหมายเบื้องต้นได้แก่ ใบเตย ตะไคร้ รวมไปถึงการสกัดดอกไม้และตัวอย่างสด ได้แก่ ใบเตยสด ดอกจำปีสด ดอกมะลิสด เพื่อเป็นแนวทางในการสกัดพืชสมุนไพรและดอกไม้ โดยให้ยังคงสีและกลิ่นได้ดี

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่พัฒนาขึ้นโดยคนไทย ลดการพึ่งพาเทคโนโลยีหรือการนำเข้าเครื่องมือเครื่องจักรจากต่างประเทศ ผู้ดำเนินโครงการวิจัยได้นำผลงานในโครงการวิจัยนี้ไปจดอนุสิทธิบัตร อีกทั้งระบบที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นในโครงการจะช่วยลดการใช้ตัวทำละลายที่มีการใช้กระบวนการสกัดโดยทั่วไป

ผลผลิต (Output)

1. **การจดอนุสิทธิบัตร**

   กรรมวิธีการสกัดกาแฟโดยวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อน และผลิตภัณฑ์จากกรรมวิธีการดังกล่าว

2. **ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจหรือบุคคลทั่วไป)**

   โครงการนวัตกรรมการสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพสูงและได้มาตรฐานการผลิตทางเภสัชกรรมด้วยระบบบิวเทนภายใต้ความดันสูงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด มีการนำผลงานในปีที่ 1 ไปนำเสนอให้กับภาคอุตสาหกรรมการผลิตยา อาหารเสริม และเครื่องสำอาง โดยได้รับความสนใจในการร่วมพัฒนาระบบให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เนื่องจากโดยปัจจุบันทางบริษัทที่สนใจ (ไม่ประสงค์ออกนาม) มีการนำเข้าสารสกัดเข้มข้นโดยการใช้เทคโนโลยีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่มีราคาแพง และไม่สามารถสร้างความโดดเด่นในผลิตภัณฑ์ได้ ทางบริษัทจึงมีความสนใจในการพัฒนาสูตรของทางบริษัทให้มีความแตกต่างจากการนำเข้าสารสกัดเข้มข้นจากต่างประเทศ

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 ลิ้มมัทวาภิรัติ์ และสนทยา ลิ้มมัทวาภิรัติ์. 2555. การสกัดพืชสมุนไพรโดยการสกัดด้วยของไหลความดันสูง (Herbal extraction by pressurized liquid extraction: PLE). วารสารไทยไภษัชยนิพนธ์ (ฉบับบการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์) มศก. ปีที่ 7 ฉบับเดือนมกราคม –เดือนธันวาคม 2555

ฐานข้อมูลเครื่องยาไทย. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร...ขิง. (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- ธันวามคม 2557

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

ภิษณี วิจันทึก และมารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร. 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.doae.go.th/home/news2/JOB/318_58-032.pdf. เข้าถึงเมื่อ 30 มิถุนายน 2560

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.

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.

Global CCS institute. Appendix A-1: CO2 thernodynamics. (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: แนวโน้มสมุนไพร ปัจจุบัน และอนคต 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.

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.

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.

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., Jadczak, 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.

ภาคผนวก
(Appendix)

ตารางที่ A1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 45 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

	A	B	C						D					
Blank	Et+DPPH	Et+Mt	0+DPPH	0.625+DPPH	1.25+DPPH	2.5+DPPH	5+DPPH	10+DPPH	0+Mt	0.625+Mt	1.25+Mt	2.5+Mt	5+Mt	10+Mt
	0.508	0.038	0.508	0.420	0.365	0.282	0.150	0.098	0.038	0.038	0.039	0.040	0.044	0.049
Test 1	0.503	0.039	0.503	0.424	0.370	0.275	0.137	0.100	0.039	0.038	0.039	0.041	0.045	0.049
	0.500	0.038	0.500	0.435	0.361	0.279	0.142	0.099	0.038	0.038	0.039	0.040	0.043	0.050
	0.503	0.038	0.503	0.431	0.391	0.303	0.165	0.098	0.038	0.038	0.039	0.040	0.043	0.046
Test 2	0.542	0.039	0.542	0.475	0.427	0.301	0.189	0.102	0.039	0.039	0.040	0.041	0.043	0.047
	0.505	0.038	0.505	0.469	0.401	0.309	0.160	0.104	0.038	0.038	0.039	0.040	0.043	0.048
	0.504	0.038	0.504	0.440	0.381	0.288	0.164	0.101	0.038	0.038	0.040	0.041	0.044	0.048
Test 3	0.497	0.038	0.497	0.433	0.379	0.280	0.148	0.098	0.038	0.039	0.042	0.044	0.048	0.049
	0.495	0.038	0.495	0.445	0.397	0.282	0.171	0.108	0.038	0.039	0.040	0.042	0.044	0.049
	0.506	0.038	0.506	0.441	0.386	0.289	0.158	0.101	0.038	0.038	0.040	0.041	0.044	0.048
A-B	0.468													

		Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
			-0.403512936	18.3954	30.3584	48.3029	77.3558	89.5324
			0.878234038	17.5409	29.2903	50.0119	80.3465	89.1052
			1.305483029	15.1911	31.2129	48.9437	78.8512	89.5324
			0.664609542	16.0456	24.8042	43.8168	73.9378	88.8915
			-7.453121291	6.85972	17.3273	44.4576	68.8108	88.2507
			0.237360551	7.92784	22.6679	42.535	75.0059	88.037
			0.450985046	14.123	27.154	47.2347	74.3651	88.6779
			1.946356516	15.8319	28.0085	49.5846	78.6376	89.5324
			2.373605507	13.2685	23.7361	48.7301	72.8697	87.3962
		Average	1.45563E-14	13.9093	26.0622	47.0686	75.5756	88.7728
		STDEV.s	2.922138789	4.0179	4.40456	2.75604	3.59848	0.75612
		n	9	9	9	9	9	9
		SEM	0.974046263	1.3393	1.46819	0.91868	1.19949	0.25204

ตารางที่ A2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 55 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

	A	B	C						D					
	Et+DPPH	Et+Mt	0.625+DPPH	0.625+DPPH	1.25+DPPH	2.5+DPPH	5+DPPH	10+DPPH	0+Mt	0.625+Mt	1.25+Mt	2.5+Mt	5+Mt	10+Mt
	0.528	0.038	0.528	0.430	0.346	0.222	0.102	0.101	0.038	0.038	0.041	0.046	0.048	0.051
Test 1	0.486	0.038	0.486	0.367	0.294	0.169	0.094	0.096	0.038	0.039	0.040	0.044	0.045	0.052
	0.541	0.038	0.541	0.423	0.353	0.226	0.107	0.102	0.038	0.043	0.042	0.042	0.046	0.052
	0.484	0.038	0.484	0.381	0.313	0.200	0.096	0.096	0.038	0.039	0.040	0.042	0.045	0.051
Test 2	0.493	0.037	0.493	0.385	0.305	0.178	0.095	0.097	0.037	0.039	0.041	0.042	0.046	0.051
	0.496	0.037	0.496	0.384	0.309	0.181	0.094	0.098	0.037	0.039	0.040	0.042	0.046	0.054
	0.527	0.038	0.527	0.408	0.326	0.193	0.102	0.104	0.038	0.039	0.039	0.042	0.046	0.053
Test 3	0.527	0.037	0.527	0.405	0.314	0.182	0.100	0.103	0.037	0.039	0.043	0.043	0.046	0.053
	0.474	0.037	0.474	0.357	0.276	0.150	0.095	0.099	0.037	0.038	0.040	0.041	0.046	0.054
	0.506	0.038	0.506	0.393	0.315	0.189	0.098	0.100	0.038	0.039	0.041	0.043	0.046	0.052
A-B	0.46867													

		Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
			-4.55192	16.3585	34.92176	62.44666	88.47795	89.33144
			4.40967	30.0142	45.8037	73.32859	89.54481	90.61166
			-7.32575	18.9189	33.64154	60.73969	86.98435	89.33144
			4.83642	27.027	41.74964	66.28734	89.11807	90.39829
			2.7027	26.1735	43.66999	70.98151	89.54481	90.18492
			2.06259	26.3869	42.60313	70.34139	89.75818	90.61166
			-4.33855	21.266	38.76245	67.78094	88.05121	89.11807
			-4.55192	21.9061	42.17639	70.34139	88.47795	89.33144
			6.75676	31.9346	49.64438	76.74253	89.54481	90.39829
		Average	-2.7E-15	24.4429	41.44144	68.77667	88.83357	89.92413
		STDEV.s	5.17178	5.16015	5.047156	5.071777	0.917745	0.629154
		n	9	9	9	9	9	9
		SEM	1.72393	1.72005	1.682385	1.690592	0.305915	0.209718

ตารางที่ A3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

	A	B	C						D					
	Et+DPPH	Et+Mt	0+DPPH	0.625+DPPH	1.25+DPPH	2.5+DPPH	5+DPPH	10+DPPH	0+Mt	0.625+Mt	1.25+Mt	2.5+Mt	5+Mt	10+Mt
	0.504	0.038	0.504	0.399	0.314	0.197	0.099	0.097	0.038	0.038	0.039	0.040	0.043	0.050
Test 1	0.500	0.039	0.500	0.386	0.311	0.186	0.093	0.094	0.039	0.039	0.044	0.042	0.044	0.049
	0.507	0.038	0.507	0.435	0.356	0.226	0.105	0.099	0.038	0.039	0.040	0.041	0.043	0.047
	0.497	0.040	0.497	0.401	0.324	0.194	0.099	0.094	0.040	0.039	0.040	0.042	0.043	0.049
Test 2	0.497	0.039	0.497	0.387	0.303	0.180	0.096	0.094	0.039	0.039	0.040	0.042	0.045	0.049
	0.496	0.044	0.496	0.393	0.308	0.181	0.095	0.096	0.044	0.042	0.042	0.043	0.044	0.047
	0.503	0.038	0.503	0.426	0.350	0.231	0.112	0.087	0.038	0.038	0.039	0.041	0.042	0.046
Test 3	0.502	0.039	0.502	0.417	0.335	0.212	0.106	0.100	0.039	0.039	0.039	0.041	0.042	0.048
	0.501	0.038	0.501	0.420	0.339	0.209	0.105	0.101	0.038	0.039	0.040	0.040	0.042	0.046
	0.501	0.039	0.501	0.407	0.327	0.202	0.101	0.096	0.039	0.039	0.040	0.041	0.043	0.048
A-B	0.46156													

		scavenging	0	0.625	1.25	2.5	5	10
			-0.962927299	21.7862	40.4189	65.9846	87.8671	89.817
			0.120365912	24.8195	42.1521	68.8012	89.3837	90.2504
			-1.612903226	14.2032	31.5359	59.9182	86.5672	88.7338
			0.987000481	21.5696	38.4689	67.0679	87.8671	90.2504
			0.770341839	24.6028	43.0188	70.1011	88.9504	90.2504
			2.070293693	23.9528	42.3688	70.1011	88.9504	89.3837
			-0.746268657	15.9364	32.6192	58.8349	84.8339	91.117
			-0.312951372	18.103	35.869	62.9514	86.1338	88.7338
			-0.312951372	17.4531	35.2191	63.3847	86.3505	88.0838
		Average	1.87381E-14	20.2696	37.9634	65.2383	87.4338	89.6245
		STDEV.s	1.126370291	3.95662	4.33859	4.21109	1.54725	0.96556
		n	9	9	9	9	9	9
		SEM	0.375456764	1.31887	1.4462	1.4037	0.51575	0.32185

ตารางที่ A4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 75 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

	A	B	C					D					
	Et+DPPH	Et+Mt	0+DPPH	0.625+DPPH	1.25+DPPH	2.5+DPPH	5+DPPH	10+DPPH	0+Mt	0.625+Mt	1.25+Mt	2.5+Mt	5+Mt	10+Mt
	0.529	0.039	0.529	0.440	0.377	0.269	0.133	0.099	0.039	0.038	0.039	0.040	0.042	0.046
Test 1	0.532	0.037	0.532	0.438	0.372	0.263	0.128	0.098	0.037	0.039	0.039	0.040	0.042	0.047
	0.543	0.037	0.543	0.439	0.377	0.258	0.131	0.097	0.037	0.039	0.039	0.041	0.043	0.047
	0.555	0.038	0.555	0.439	0.368	0.239	0.118	0.115	0.038	0.038	0.039	0.041	0.044	0.050
Test 2	0.543	0.037	0.543	0.428	0.357	0.230	0.107	0.107	0.037	0.039	0.040	0.043	0.045	0.051
	0.543	0.037	0.543	0.431	0.351	0.231	0.109	0.104	0.037	0.038	0.039	0.041	0.045	0.051
	0.551	0.038	0.551	0.447	0.382	0.259	0.126	0.103	0.038	0.038	0.040	0.040	0.042	0.047
Test 3	0.546	0.037	0.546	0.447	0.379	0.260	0.125	0.100	0.037	0.041	0.044	0.046	0.043	0.048
	0.552	0.037	0.552	0.451	0.377	0.252	0.126	0.101	0.037	0.039	0.039	0.040	0.044	0.048
	0.544	0.037	0.544	0.440	0.371	0.251	0.123	0.103	0.037	0.039	0.040	0.041	0.043	0.048
A-B	0.50633													

	scavenging	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		3.22581	20.6057	33.2456	54.7729	82.0276	89.5326
		2.23831	21.1982	34.233	55.9579	83.0151	89.9276
		0.06583	21.0007	33.2456	57.1429	82.6201	90.1251
		-2.10665	20.8032	35.023	60.8953	85.3851	87.1626
		0.06583	23.1731	37.393	63.0678	87.7551	88.9401
		0.06583	22.3831	38.3805	62.4753	87.3601	89.5326
		-1.31666	19.2232	32.4556	56.7479	83.4101	88.9401
		-0.52666	19.8157	33.8381	57.7354	83.8051	89.7301
		-1.71165	18.6307	33.2456	58.1303	83.8051	89.5326
	Average	1.2E-14	20.7593	34.5622	58.5473	84.3537	89.2693
	STDEV.s	1.76095	1.43706	2.03337	2.92345	2.04241	0.88324
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.58698	0.47902	0.67779	0.97448	0.6808	0.29441

ตารางที่ A5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 82 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

	A	B	C						D					
	Et+DPPH	Et+Mt	0+DPPH	0.625+DPPH	1.25+DPPH	2.5+DPPH	5+DPPH	10+DPPH	0+Mt	0.625+Mt	1.25+Mt	2.5+Mt	5+Mt	10+Mt
	0.540	0.038	0.54	0.380	0.280	0.131	0.106	0.115	0.038	0.039	0.041	0.045	0.050	0.062
Test 1	0.540	0.038	0.54	0.388	0.281	0.136	0.104	0.116	0.038	0.040	0.042	0.045	0.051	0.065
	0.539	0.039	0.539	0.385	0.275	0.130	0.105	0.116	0.039	0.041	0.043	0.046	0.052	0.064
	0.554	0.038	0.554	0.425	0.320	0.173	0.118	0.125	0.038	0.039	0.042	0.045	0.051	0.061
Test 2	0.546	0.039	0.546	0.407	0.308	0.162	0.104	0.113	0.039	0.041	0.043	0.046	0.051	0.061
	0.543	0.038	0.543	0.409	0.304	0.156	0.104	0.114	0.038	0.040	0.041	0.045	0.050	0.060
	0.548	0.038	0.548	0.409	0.299	0.169	0.110	0.115	0.038	0.039	0.041	0.044	0.050	0.062
Test 3	0.548	0.041	0.548	0.409	0.300	0.152	0.105	0.114	0.041	0.044	0.045	0.048	0.054	0.062
	0.560	0.040	0.560	0.411	0.301	0.150	0.107	0.117	0.040	0.043	0.044	0.046	0.051	0.061
	0.546	0.039	0.546	0.403	0.296	0.151	0.107	0.116	0.039	0.041	0.042	0.046	0.051	0.062
A-B	0.50767													

	scavenging	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		1.11622	32.8299	52.9219	83.0598	88.9691	89.5601
		1.11622	31.4511	52.9219	82.0749	89.5601	89.954
		1.51018	32.239	54.3007	83.4537	89.5601	89.7571
		-1.6415	23.9659	45.2397	74.7866	86.8024	87.3933
		0.13132	27.9054	47.8004	77.1504	89.5601	89.7571
		0.52528	27.3145	48.1944	78.1353	89.3631	89.3631
		-0.45962	27.1175	49.1793	75.3775	88.1812	89.5601
		0.13132	28.1024	49.7702	79.5141	89.954	89.7571
		-2.42942	27.5115	49.3762	79.5141	88.9691	88.9691
	Average	7.3E-15	28.7153	49.9672	79.2296	88.991	89.3412
	STDEV.s	1.3177	2.88063	2.90336	3.17942	0.96723	0.78449
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.43923	0.96021	0.96779	1.05981	0.32241	0.2615

ตารางที่ A6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 45 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

	A	B	C						D					
Blank	Et+DPPH	Et+Mt	0+DPPH	0.625+DPPH	1.25+DPPH	2.5+DPPH	5+DPPH	10+DPPH	0+Mt	0.625+Mt	1.25+Mt	2.5+Mt	5+Mt	10+Mt
	0.420	0.038	0.42	0.371	0.343	0.283	0.199	0.101	0.038	0.038	0.039	0.040	0.042	0.045
Test 1	0.426	0.038	0.426	0.391	0.337	0.281	0.185	0.097	0.038	0.038	0.039	0.041	0.042	0.047
	0.412	0.038	0.412	0.381	0.339	0.286	0.181	0.094	0.038	0.039	0.039	0.041	0.041	0.045
	0.426	0.040	0.426	0.384	0.354	0.295	0.189	0.102	0.04	0.038	0.039	0.043	0.045	0.050
Test 2	0.428	0.040	0.428	0.384	0.357	0.285	0.183	0.098	0.04	0.039	0.041	0.040	0.046	0.050
	0.429	0.038	0.429	0.389	0.349	0.287	0.185	0.098	0.038	0.040	0.039	0.042	0.042	0.049
	0.437	0.038	0.437	0.398	0.356	0.290	0.207	0.116	0.038	0.038	0.039	0.040	0.042	0.044
Test 3	0.413	0.038	0.413	0.394	0.354	0.288	0.192	0.101	0.038	0.038	0.039	0.040	0.041	0.045
	0.438	0.038	0.438	0.395	0.354	0.291	0.195	0.101	0.038	0.038	0.039	0.039	0.042	0.046
	0.425	0.038	0.425	0.387	0.349	0.287	0.191	0.101	0.038	0.038	0.039	0.041	0.043	0.047
A-B	0.387													

	Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		1.291989664	13.9535	21.447	37.2093	59.4315	85.5297
		-0.258397933	8.78553	22.9974	37.9845	63.0491	87.0801
		3.359173127	11.6279	22.4806	36.6925	63.8243	87.3385
		0.258397933	10.5943	18.6047	34.8837	62.7907	86.5633
		-0.258397933	10.8527	18.3463	36.6925	64.5995	87.5969
		-1.033591731	9.81912	19.8966	36.6925	63.0491	87.3385
		-3.100775194	6.97674	18.0879	35.4005	57.3643	81.3953
		3.100775194	8.01034	18.6047	35.9173	60.9819	85.5297
		-3.359173127	7.75194	18.6047	34.8837	60.4651	85.7881
	Average	-1.44082E-14	9.81912	19.8966	36.2618	61.7284	86.0178
	STDEV.s	2.364729356	2.20018	1.91633	1.0654	2.33791	1.91391
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.788243119	0.73339	0.63878	0.35513	0.7793	0.63797

ตารางที่ A7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 55 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

	A	B	C						D					
	Et+DPPH	Et+Mt	0.625+DPPH	0.625+DPPH	1.25+DPPH	2.5+DPPH	5+DPPH	10+DPPH	0+Mt	0.625+Mt	1.25+Mt	2.5+Mt	5+Mt	10+Mt
	0.427	0.038	0.427	0.370	0.319	0.227	0.162	0.092	0.038	0.038	0.039	0.041	0.045	0.049
Test 1	0.432	0.039	0.432	0.359	0.324	0.241	0.152	0.093	0.039	0.040	0.040	0.041	0.045	0.050
	0.422	0.037	0.422	0.360	0.328	0.254	0.148	0.093	0.037	0.039	0.041	0.041	0.045	0.051
	0.463	0.037	0.463	0.372	0.315	0.244	0.142	0.100	0.037	0.038	0.039	0.040	0.043	0.050
Test 2	0.420	0.038	0.42	0.363	0.309	0.236	0.110	0.092	0.038	0.039	0.040	0.041	0.045	0.050
	0.401	0.038	0.401	0.360	0.308	0.233	0.129	0.092	0.038	0.038	0.039	0.042	0.044	0.050
	0.424	0.037	0.424	0.362	0.320	0.248	0.139	0.092	0.037	0.038	0.039	0.041	0.043	0.051
Test 3	0.427	0.037	0.427	0.361	0.311	0.252	0.139	0.092	0.037	0.038	0.040	0.041	0.045	0.050
	0.460	0.037	0.460	0.363	0.320	0.251	0.134	0.091	0.037	0.038	0.039	0.040	0.044	0.050
	0.431	0.038	0.431	0.363	0.317	0.243	0.139	0.093	0.038	0.038	0.040	0.041	0.044	0.050
A-B	0.39311													

	Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		1.04579	15.5455	28.77332	52.68513	70.23742	89.06162
		0.02826	18.8525	27.75579	49.1238	72.78123	89.06162
		2.06331	18.3437	26.99265	45.81685	73.79876	89.316
		-8.36631	15.0367	29.79084	48.10627	74.81628	87.28095
		2.82646	17.5806	31.57151	50.3957	83.46523	89.316
		7.65969	18.0893	31.57151	51.41323	78.37761	89.316
		1.55455	17.5806	28.51894	47.34313	75.57942	89.57038
		0.79141	17.8349	31.06275	46.32561	76.08819	89.316
		-7.60317	17.3262	28.51894	46.32561	77.10571	89.57038
	Average	0	17.3544	29.39514	48.61504	75.80554	89.08988
	STDEV.s	5.03559	1.26197	1.687905	2.449862	3.746067	0.701792
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	1.67853	0.42066	0.562635	0.816621	1.248689	0.233931

ตารางที่ A8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

	A	B	C						D					
	Et+DPPH	Et+Mt	0+DPPH	0.625+DPPH	1.25+DPPH	2.5+DPPH	5+DPPH	10+DPPH	0+Mt	0.625+Mt	1.25+Mt	2.5+Mt	5+Mt	10+Mt
	0.419	0.037	0.419	0.321	0.242	0.128	0.085	0.090	0.037	0.038	0.040	0.042	0.045	0.053
Test 1	0.427	0.036	0.427	0.315	0.240	0.130	0.084	0.089	0.036	0.039	0.041	0.044	0.048	0.055
	0.427	0.037	0.427	0.316	0.237	0.133	0.086	0.087	0.037	0.038	0.040	0.047	0.046	0.054
	0.422	0.037	0.422	0.324	0.249	0.134	0.091	0.092	0.037	0.039	0.039	0.042	0.047	0.055
Test 2	0.420	0.038	0.420	0.325	0.247	0.143	0.087	0.092	0.038	0.039	0.042	0.043	0.047	0.056
	0.419	0.039	0.419	0.325	0.246	0.135	0.087	0.093	0.039	0.042	0.041	0.046	0.046	0.053
	0.439	0.039	0.439	0.329	0.253	0.145	0.089	0.094	0.039	0.039	0.041	0.042	0.046	0.057
Test 3	0.431	0.040	0.431	0.334	0.247	0.143	0.088	0.092	0.04	0.041	0.041	0.043	0.048	0.056
	0.437	0.038	0.437	0.326	0.251	0.144	0.088	0.092	0.038	0.039	0.041	0.043	0.046	0.054
	0.427	0.038	0.427	0.324	0.246	0.137	0.087	0.091	0.038	0.039	0.041	0.044	0.047	0.055
A-B	0.38889													

		scavenging	0	0.625	1.25	2.5	5	10
			1.771428571	27.2286	48.0571	77.8857	89.7143	90.4857
			-0.542857143	29.0286	48.8286	77.8857	90.7429	91.2571
			-0.285714286	28.5143	49.3429	77.8857	89.7143	91.5143
			1	26.7143	46	76.3429	88.6857	90.4857
			1.771428571	26.4571	47.2857	74.2857	89.7143	90.7429
			2.285714286	27.2286	47.2857	77.1143	89.4571	89.7143
			-2.857142857	25.4286	45.4857	73.5143	88.9429	90.4857
			-0.542857143	24.6571	47.0286	74.2857	89.7143	90.7429
			-2.6	26.2	46	74.0286	89.2	90.2286
		Average	-1.58392E-14	26.8286	47.2571	75.9143	89.5429	90.6286
		STDEV.s	1.873989524	1.37944	1.31398	1.86761	0.58919	0.53184
		n	9	9	9	9	9	9
		SEM	0.624663175	0.45981	0.43799	0.62254	0.1964	0.17728

ตารางที่ A9 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 75 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

	A	B	C						D					
	Et+DPPH	Et+Mt	0+DPPH	0.625+DPPH	1.25+DPPH	2.5+DPPH	5+DPPH	10+DPPH	0+Mt	0.625+Mt	1.25+Mt	2.5+Mt	5+Mt	10+Mt
	0.427	0.038	0.427	0.310	0.227	0.116	0.091	0.097	0.038	0.039	0.040	0.043	0.047	0.058
Test 1	0.426	0.039	0.426	0.302	0.219	0.108	0.091	0.101	0.039	0.039	0.044	0.044	0.049	0.057
	0.432	0.038	0.432	0.306	0.214	0.113	0.090	0.097	0.038	0.039	0.040	0.044	0.047	0.055
	0.443	0.037	0.443	0.318	0.234	0.123	0.092	0.097	0.037	0.039	0.040	0.043	0.047	0.056
Test 2	0.445	0.037	0.445	0.320	0.211	0.117	0.091	0.096	0.037	0.038	0.040	0.043	0.047	0.055
	0.437	0.037	0.437	0.311	0.222	0.112	0.092	0.100	0.037	0.040	0.040	0.042	0.048	0.056
	0.427	0.039	0.427	0.322	0.241	0.135	0.094	0.098	0.039	0.038	0.039	0.042	0.046	0.053
Test 3	0.444	0.037	0.444	0.315	0.225	0.127	0.091	0.102	0.037	0.039	0.040	0.043	0.046	0.054
	0.445	0.037	0.445	0.318	0.236	0.127	0.094	0.102	0.037	0.039	0.040	0.042	0.045	0.054
	0.436	0.038	0.436	0.314	0.225	0.120	0.092	0.099	0.038	0.039	0.040	0.043	0.047	0.055
A-B	0.39856													

	scavenging	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		2.39755	32.0045	53.0806	81.6839	88.9601	90.2147
		2.89936	34.0117	56.0914	83.942	89.4619	88.9601
		1.14302	33.0081	56.3423	82.6875	89.211	89.4619
		-1.86786	29.9972	51.3242	79.9275	88.7092	89.7129
		-2.36967	29.2445	57.0951	81.433	88.9601	89.7129
		-0.36242	32.0045	54.3351	82.4366	88.9601	88.9601
		2.64845	28.7427	49.317	76.6657	87.9565	88.7092
		-2.11876	30.7499	53.5824	78.9239	88.7092	87.9565
		-2.36967	29.9972	50.8224	78.673	87.7056	87.9565
	Average	-2E-14	31.0845	53.5545	80.7081	88.7371	89.0716
	STDEV.s	2.28625	1.7786	2.69197	2.32154	0.56724	0.78457
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.76208	0.59287	0.89732	0.77385	0.18908	0.26152

ตารางที่ A10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 82 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

	A	B	C						D					
	Et+DPPH	Et+Mt	0+DPPH	0.625+DPPH	1.25+DPPH	2.5+DPPH	5+DPPH	10+DPPH	0+Mt	0.625+Mt	1.25+Mt	2.5+Mt	5+Mt	10+Mt
	0.525	0.038	0.525	0.386	0.296	0.150	0.098	0.097	0.038	0.039	0.040	0.042	0.043	0.050
Test 1	0.519	0.038	0.519	0.389	0.285	0.142	0.094	0.098	0.038	0.039	0.039	0.041	0.045	0.050
	0.463	0.038	0.523	0.385	0.286	0.144	0.093	0.099	0.038	0.038	0.039	0.040	0.044	0.050
	0.473	0.037	0.473	0.346	0.293	0.154	0.096	0.100	0.037	0.040	0.040	0.041	0.045	0.050
Test 2	0.487	0.038	0.487	0.346	0.289	0.153	0.097	0.096	0.038	0.040	0.040	0.042	0.045	0.053
	0.479	0.038	0.479	0.348	0.296	0.161	0.098	0.098	0.038	0.039	0.040	0.041	0.044	0.051
	0.464	0.038	0.464	0.344	0.254	0.120	0.093	0.094	0.038	0.040	0.039	0.041	0.045	0.050
Test 3	0.490	0.037	0.490	0.342	0.255	0.121	0.092	0.096	0.037	0.041	0.042	0.042	0.045	0.051
	0.482	0.039	0.482	0.347	0.246	0.127	0.093	0.095	0.039	0.039	0.040	0.042	0.045	0.050
	0.487	0.038	0.494	0.359	0.278	0.141	0.095	0.097	0.038	0.039	0.040	0.041	0.045	0.051
A-B	0.449													

		scavenging	0	0.625	1.25	2.5	5	10
			-8.46325167	22.7171	42.9844	75.9465	87.7506	89.5323
			-7.126948775	22.049	45.2116	77.5056	89.0869	89.3096
			-8.017817372	22.7171	44.9889	76.8374	89.0869	89.0869
			2.89532294	31.8486	43.6526	74.833	88.6414	88.8641
			1.23633E-14	31.8486	44.5434	75.2784	88.4187	90.4232
			1.781737194	31.1804	42.9844	73.2739	87.9733	89.5323
			5.122494432	32.294	52.1158	82.4053	89.3096	90.2004
			-0.890868597	32.9621	52.5612	82.4053	89.5323	89.9777
			1.336302895	31.4031	54.1203	81.069	89.3096	89.9777
		Average	-1.484780995	28.78	47.0181	77.7283	88.7899	89.656
		STDEV.s	5.089708188	4.74521	4.53497	3.41237	0.62994	0.52364
		n	9	9	9	9	9	9
		SEM	1.696569396	1.58174	1.51166	1.13746	0.20998	0.17455

ตารางที่ A11 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 45 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ

	A	B						A-B					
	Blalk (DMSO)	0	0.625	1.25	2.5	5	10	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.046	0.046	0.068	0.087	0.125	0.202	0.336	0.000	0.022	0.041	0.079	0.156	0.290
Test 1	0.046	0.046	0.068	0.087	0.125	0.200	0.338	0.000	0.022	0.041	0.079	0.154	0.292
	0.046	0.046	0.067	0.087	0.125	0.201	0.338	-0.001	0.021	0.041	0.079	0.155	0.292
	0.046												
	0.047	0.047	0.066	0.086	0.128	0.202	0.349	0.000	0.019	0.039	0.081	0.155	0.302
Test 2	0.047	0.047	0.067	0.088	0.127	0.203	0.349	0.000	0.020	0.041	0.080	0.156	0.302
	0.047	0.047	0.067	0.088	0.127	0.204	0.357	0.000	0.020	0.041	0.080	0.157	0.310
	0.047												
	0.047	0.047	0.067	0.094	0.128	0.210	0.364	0.000	0.020	0.047	0.081	0.163	0.317
Test 3	0.047	0.047	0.067	0.091	0.129	0.210	0.365	0.000	0.020	0.044	0.082	0.163	0.318
	0.047	0.047	0.068	0.092	0.129	0.210	0.364	0.000	0.021	0.045	0.082	0.163	0.317
	0.047												

	Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		0	7.05535	13.1486	25.3351	50.0289	93.0024
		0	7.05535	13.1486	25.3351	49.3875	93.6438
		-0.320697838	6.73465	13.1486	25.3351	49.7082	93.6438
		0	6.09326	12.5072	25.9765	49.7082	96.8507
		0	6.31775	13.1486	25.6558	50.0289	96.8507
		0	6.31775	13.1486	25.6558	50.3496	99.4163
		0.000	6.414	15.073	25.977	52.274	101.661
		0.000	6.414	14.111	26.297	52.274	101.982
		0.000	6.735	14.431	26.297	52.274	101.661
	Average	-0.035633093	6.57074	13.5406	25.7627	50.6703	97.6347
	STDEV.s	0.106899279	0.3407	0.81412	0.39277	1.23166	3.6919
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.035633093	0.11357	0.27137	0.13092	0.41055	1.23063

ตารางที่ A12 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 55 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ

	A	B						A-B					
	Blalk (DMSO)	0	0.625	1.25	2.5	5	10	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.047	0.047	0.073	0.102	0.151	0.249	0.464	0.000	0.026	0.055	0.104	0.202	0.417
Test 1	0.047	0.047	0.074	0.102	0.150	0.237	0.456	0.000	0.027	0.055	0.103	0.190	0.409
	0.047	0.047	0.074	0.102	0.155	0.260	0.455	0.000	0.027	0.055	0.108	0.213	0.408
	0.047												
	0.046	0.046	0.081	0.114	0.175	0.302	0.533	-0.001	0.034	0.067	0.128	0.255	0.486
Test 2	0.047	0.047	0.081	0.114	0.172	0.303	0.537	0.000	0.034	0.067	0.125	0.256	0.490
	0.047	0.047	0.081	0.112	0.174	0.306	0.542	0.000	0.034	0.065	0.127	0.259	0.495
	0.047												
	0.047	0.047	0.080	0.113	0.178	0.305	0.533	0.000	0.033	0.066	0.131	0.258	0.486
Test 3	0.047	0.047	0.080	0.114	0.179	0.303	0.531	0.000	0.033	0.067	0.132	0.256	0.484
	0.047	0.047	0.081	0.106	0.179	0.304	0.528	0.000	0.034	0.059	0.132	0.257	0.481
	0.047												

	Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		0	8.33814	17.6384	33.3526	64.781	133.731
		0	8.65884	17.6384	33.0319	60.9326	131.165
		0	8.65884	17.6384	34.6354	68.3086	130.845
		-0.213798559	11.0106	21.5937	41.1562	81.8848	155.966
		0.106899279	11.0106	21.5937	40.1941	82.2055	157.249
		0.106899279	11.0106	20.9523	40.8355	83.1676	158.852
		0.000	10.583	21.166	42.011	82.740	155.859
		0.000	10.583	21.487	42.332	82.099	155.218
		0.000	10.904	18.921	42.332	82.419	154.256
	Average	-2.46716E-16	10.0842	19.8476	38.8757	76.5043	148.127
	STDEV.s	0.092577492	1.16491	1.84537	3.98657	9.06992	12.2522
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.030859164	0.3883	0.61512	1.32886	3.02331	4.08407

ตารางที่ A13 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ

	A	B						A-B					
	Blalk (DMSO)	0	0.625	1.25	2.5	5	10	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.049	0.049	0.085	0.112	0.184	0.307	0.549	0.002	0.038	0.065	0.137	0.260	0.502
Test 1	0.046	0.046	0.081	0.110	0.180	0.306	0.540	-0.001	0.034	0.063	0.133	0.259	0.493
	0.047	0.047	0.081	0.109	0.183	0.303	0.549	0.001	0.034	0.062	0.136	0.256	0.502
	0.047												
	0.046	0.046	0.082	0.117	0.180	0.312	0.536	-0.001	0.035	0.070	0.133	0.265	0.489
Test 2	0.046	0.046	0.080	0.116	0.177	0.313	0.536	-0.001	0.033	0.069	0.130	0.266	0.489
	0.048	0.048	0.080	0.116	0.179	0.315	0.540	0.001	0.033	0.069	0.132	0.268	0.493
	0.047												
	0.048	0.048	0.083	0.120	0.190	0.303	0.554	0.001	0.036	0.073	0.143	0.256	0.507
Test 3	0.046	0.046	0.081	0.118	0.185	0.325	0.553	-0.001	0.034	0.071	0.138	0.278	0.506
	0.047	0.047	0.082	0.120	0.189	0.326	0.537	0.000	0.035	0.073	0.142	0.279	0.490
	0.047												

Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.534496397	12.0796	20.7385	43.8287	83.2745	160.883
	-0.427597118	10.7968	20.0971	42.5459	82.9538	157.997
	0.320697838	10.7968	19.7764	43.508	81.9917	160.883
	-0.213798559	11.3313	22.5557	42.7597	85.0918	156.928
	-0.213798559	10.6899	22.2351	41.7976	85.4125	156.928
	0.427597118	10.6899	22.2351	42.439	86.0539	158.211
	0.321	11.545	23.411	45.860	82.099	162.594
	-0.321	10.904	22.770	44.256	89.154	162.273
	0.000	11.224	23.411	45.539	89.475	157.142
Average	0.047510791	11.1175	21.9144	43.6149	85.0562	159.316
STDEV.s	0.358993466	0.47205	1.37315	1.40401	2.81005	2.33165
n	9	9	9	9	9	9
SEM	0.119664489	0.15735	0.45772	0.468	0.93668	0.77722

ตารางที่ A14 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 75 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ

	A	B						A-B					
	Blalk (DMSO)	0	0.625	1.25	2.5	5	10	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.048	0.048	0.073	0.100	0.157	0.261	0.462	0.001	0.026	0.053	0.110	0.214	0.415
Test 1	0.047	0.047	0.072	0.099	0.153	0.261	0.430	0.000	0.025	0.052	0.106	0.214	0.383
	0.047	0.047	0.069	0.097	0.149	0.262	0.450	0.000	0.022	0.050	0.102	0.215	0.403
	0.047												
	0.049	0.049	0.074	0.100	0.153	0.258	0.470	0.001	0.026	0.052	0.105	0.210	0.422
Test 2	0.046	0.046	0.071	0.098	0.150	0.256	0.423	-0.002	0.023	0.050	0.102	0.208	0.375
	0.048	0.048	0.073	0.100	0.154	0.259	0.461	0.000	0.025	0.052	0.106	0.211	0.413
	0.048												
	0.048	0.048	0.073	0.097	0.144	0.239	0.415	0.001	0.026	0.050	0.097	0.192	0.368
Test 3	0.047	0.047	0.074	0.096	0.142	0.239	0.414	0.000	0.027	0.049	0.095	0.192	0.367
	0.047	0.047	0.073	0.096	0.143	0.238	0.418	0.000	0.026	0.049	0.096	0.191	0.371
	0.047												

	Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		0.213798559	8.23124	16.8901	35.1699	68.5224	132.983
		-0.106899279	7.91055	16.5694	33.8871	68.5224	122.72
		-0.106899279	6.94845	15.928	32.6043	68.8431	129.134
		0.427597118	8.44504	16.7832	33.7802	67.4534	135.441
		-0.534496397	7.48295	16.1418	32.8181	66.812	120.369
		0.106899279	8.12435	16.7832	34.1009	67.7741	132.555
		0.214	8.231	15.928	31.001	61.467	117.910
		-0.107	8.552	15.607	30.359	61.467	117.589
		-0.107	8.231	15.607	30.680	61.146	118.872
	Average	-1.24283E-15	8.01745	16.2487	32.7112	65.7787	125.286
	STDEV.s	0.277732475	0.50707	0.51545	1.6995	3.37157	7.20738
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.092577492	0.16902	0.17182	0.5665	1.12386	2.40246

ตารางที่ A15 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 82 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 1 รอบ

	A	B						A-B					
	Blalk (DMSO)	0	0.625	1.25	2.5	5	10	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.047	0.047	0.087	0.126	0.202	0.352	0.628	0.000	0.040	0.079	0.155	0.305	0.581
Test 1	0.047	0.047	0.087	0.126	0.198	0.353	0.635	0.000	0.040	0.079	0.151	0.306	0.588
	0.046	0.046	0.084	0.127	0.201	0.358	0.628	-0.001	0.037	0.080	0.154	0.311	0.581
	0.047												
	0.047	0.047	0.090	0.132	0.212	0.371	0.670	0.000	0.043	0.085	0.165	0.324	0.623
Test 2	0.047	0.047	0.089	0.132	0.214	0.368	0.659	0.000	0.042	0.085	0.167	0.321	0.612
	0.047	0.047	0.088	0.128	0.208	0.370	0.665	0.000	0.041	0.081	0.161	0.323	0.618
	0.047												
	0.046	0.046	0.088	0.129	0.209	0.369	0.634	-0.001	0.041	0.082	0.162	0.322	0.587
Test 3	0.048	0.048	0.089	0.130	0.211	0.344	0.643	0.001	0.042	0.083	0.164	0.297	0.596
	0.046	0.046	0.088	0.127	0.212	0.369	0.651	-0.001	0.041	0.080	0.165	0.322	0.604
	0.047												

	Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		0.1069	12.9348	25.442	49.8151	97.9197	186.432
		0.1069	12.9348	25.442	48.5323	98.2404	188.677
		-0.2138	11.9727	25.7627	49.4944	99.8439	186.432
		0	13.79	27.2593	52.9151	103.906	199.795
		0	13.4693	27.2593	53.5565	102.944	196.267
		0	13.1486	25.9765	51.6324	103.585	198.191
		-0.214	13.256	26.404	52.060	103.372	188.357
		0.428	13.576	26.725	52.701	95.354	191.243
		-0.214	13.256	25.763	53.022	103.372	193.808
	Average	-4.9E-16	13.1486	26.226	51.5255	100.949	192.134
	STDEV.s	0.20701	0.5237	0.71909	1.80229	3.17115	5.09036
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.069	0.17457	0.2397	0.60076	1.05705	1.69679

ตารางที่ A16 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 45 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ

	A	B						A-B					
	Blalk (DMSO)	0	0.625	1.25	2.5	5	10	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.055	0.055	0.069	0.081	0.106	0.154	0.243	0.000	0.014	0.026	0.051	0.099	0.188
Test 1	0.054	0.054	0.067	0.079	0.104	0.150	0.239	-0.001	0.012	0.024	0.049	0.095	0.184
	0.055	0.055	0.067	0.080	0.106	0.157	0.242	0.000	0.012	0.025	0.051	0.102	0.187
	0.055												
	0.055	0.055	0.067	0.078	0.101	0.147	0.229	0.001	0.013	0.024	0.047	0.093	0.175
Test 2	0.054	0.054	0.065	0.077	0.099	0.143	0.224	0.000	0.011	0.023	0.045	0.089	0.170
	0.054	0.054	0.066	0.077	0.100	0.145	0.229	0.000	0.012	0.023	0.046	0.091	0.175
	0.054												
	0.046	0.046	0.062	0.074	0.099	0.156	0.233	0.001	0.017	0.029	0.054	0.111	0.188
Test 3	0.044	0.044	0.060	0.072	0.097	0.156	0.231	-0.001	0.015	0.027	0.052	0.111	0.186
	0.044	0.044	0.061	0.073	0.099	0.151	0.232	-0.001	0.016	0.028	0.054	0.106	0.187
	0.045												

Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.106899279	4.59667	8.44504	16.4625	31.856	60.3981
	-0.213798559	3.95527	7.80365	15.8211	30.5732	59.1153
	0.106899279	3.95527	8.12435	16.4625	32.8181	60.0774
	0.213798559	4.06217	7.58985	14.9659	29.718	56.0152
	-0.106899279	3.42078	7.26915	14.3245	28.4352	54.4117
	-0.106899279	3.74147	7.26915	14.6452	29.0766	56.0152
	0.428	5.559	9.407	17.425	35.704	60.398
	-0.214	4.917	8.766	16.783	35.704	59.757
	-0.214	5.238	9.086	17.425	34.101	60.077
Average	-9.86865E-16	4.38287	8.19561	16.0349	31.9985	58.4739
STDEV.s	0.226767616	0.72896	0.7819	1.16368	2.76237	2.32368
n	9	9	9	9	9	9
SEM	0.075589205	0.24299	0.26063	0.38789	0.92079	0.77456

ตารางที่ A17 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 55 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ

	A	B						A-B					
	Blalk (DMSO)	0	0.625	1.25	2.5	5	10	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.054	0.054	0.070	0.085	0.115	0.178	0.307	0.000	0.016	0.031	0.061	0.124	0.253
Test 1	0.054	0.054	0.070	0.086	0.116	0.180	0.305	0.000	0.016	0.032	0.062	0.126	0.251
	0.054	0.054	0.069	0.085	0.116	0.180	0.307	0.000	0.015	0.031	0.062	0.126	0.253
	0.054												
	0.053	0.053	0.065	0.075	0.100	0.155	0.248	-0.001	0.011	0.021	0.046	0.101	0.194
Test 2	0.054	0.054	0.065	0.079	0.101	0.155	0.246	0.000	0.011	0.025	0.047	0.101	0.192
	0.054	0.054	0.065	0.079	0.101	0.156	0.251	0.000	0.011	0.025	0.047	0.102	0.197
	0.054												
	0.044	0.044	0.063	0.078	0.110	0.171	0.281	0.000	0.019	0.034	0.066	0.127	0.237
Test 3	0.044	0.044	0.063	0.078	0.111	0.170	0.280	0.000	0.019	0.034	0.067	0.126	0.236
	0.044	0.044	0.064	0.078	0.110	0.172	0.283	0.000	0.020	0.034	0.066	0.128	0.239
	0.044												

	Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		0	5.13117	9.94163	19.5626	39.7665	81.1366
		0	5.13117	10.2623	19.8833	40.4079	80.4952
		0	4.81047	9.94163	19.8833	40.4079	81.1366
		-0.213798559	3.63458	6.84155	14.859	32.4974	62.3223
		0.106899279	3.63458	8.12435	15.1797	32.4974	61.6809
		0.106899279	3.63458	8.12435	15.1797	32.8181	63.2844
		0.000	6.093	10.904	21.166	40.729	76.005
		0.000	6.093	10.904	21.487	40.408	75.685
		0.000	6.414	10.904	21.166	41.049	76.647
	Average	-2.46716E-16	4.953	9.54967	18.7074	37.8423	73.1547
	STDEV.s	0.092577492	1.11989	1.48797	2.80649	3.94406	8.32494
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.030859164	0.3733	0.49599	0.9355	1.31469	2.77498

ตารางที่ A18 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 65 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ

	A	B						A-B					
	Blalk (DMSO)	0	0.625	1.25	2.5	5	10	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.056	0.056	0.089	0.122	0.183	0.305	0.492	0.001	0.034	0.067	0.128	0.250	0.437
Test 1	0.054	0.054	0.088	0.121	0.180	0.305	0.492	-0.001	0.033	0.066	0.125	0.250	0.437
	0.054	0.054	0.088	0.121	0.183	0.305	0.493	-0.001	0.033	0.066	0.128	0.250	0.438
	0.055												
	0.053	0.053	0.082	0.111	0.166	0.269	0.473	-0.001	0.028	0.057	0.112	0.215	0.419
Test 2	0.054	0.054	0.082	0.111	0.167	0.267	0.473	0.000	0.028	0.057	0.113	0.213	0.419
	0.054	0.054	0.082	0.111	0.169	0.271	0.468	0.000	0.028	0.057	0.115	0.217	0.414
	0.054												
	0.045	0.045	0.082	0.107	0.175	0.284	0.509	0.000	0.037	0.062	0.130	0.239	0.464
Test 3	0.045	0.045	0.081	0.095	0.175	0.287	0.515	0.000	0.036	0.050	0.130	0.242	0.470
	0.045	0.045	0.082	0.092	0.178	0.288	0.512	0.000	0.037	0.047	0.133	0.243	0.467
	0.045												

	Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		0.427597118	11.0106	21.5937	41.1562	80.2814	140.252
		-0.213798559	10.6899	21.273	40.1941	80.2814	140.252
		-0.213798559	10.6899	21.273	41.1562	80.2814	140.573
		-0.213798559	9.08644	18.3867	36.0251	69.0569	134.479
		0.106899279	9.08644	18.3867	36.3458	68.4155	134.479
		0.106899279	9.08644	18.3867	36.9872	69.6983	132.876
		0.000	11.866	19.883	41.691	76.647	148.804
		0.000	11.545	16.035	41.691	77.609	150.728
		0.000	11.866	15.073	42.653	77.930	149.766
	Average	-4.93432E-16	10.5474	18.9212	39.7665	75.5778	141.356
	STDEV.s	0.207009565	1.17953	2.32183	2.57891	5.06899	6.92436
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.069003188	0.39318	0.77394	0.85964	1.68966	2.30812

ตารางที่ A19 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 75 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ

	A	B						A-B					
	Blalk (DMSO)	0	0.625	1.25	2.5	5	10	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.054	0.054	0.090	0.126	0.195	0.323	0.545	0.000	0.036	0.072	0.141	0.269	0.491
Test 1	0.054	0.054	0.090	0.127	0.190	0.322	0.551	0.000	0.036	0.073	0.136	0.268	0.497
	0.054	0.054	0.090	0.126	0.194	0.321	0.547	0.000	0.036	0.072	0.140	0.267	0.493
	0.054												
	0.055	0.055	0.092	0.130	0.190	0.334	0.575	0.001	0.038	0.076	0.136	0.280	0.521
Test 2	0.053	0.053	0.090	0.128	0.187	0.330	0.583	-0.001	0.036	0.074	0.133	0.276	0.529
	0.054	0.054	0.091	0.129	0.185	0.339	0.588	0.000	0.037	0.075	0.131	0.285	0.534
	0.054												
	0.049	0.049	0.086	0.121	0.192	0.317	0.534	0.003	0.040	0.075	0.146	0.271	0.488
Test 3	0.044	0.044	0.080	0.119	0.186	0.315	0.539	-0.002	0.034	0.073	0.140	0.269	0.493
	0.046	0.046	0.084	0.120	0.188	0.319	0.539	0.000	0.038	0.074	0.142	0.273	0.493
	0.046												

	Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		0	11.5451	23.0902	45.2184	86.2677	157.463
		0	11.5451	23.4109	43.6149	85.947	159.387
		0	11.5451	23.0902	44.8977	85.6263	158.104
		0.320697838	12.1865	24.373	43.6149	89.7954	167.084
		-0.320697838	11.5451	23.7316	42.6528	88.5126	169.649
		0	11.8658	24.0523	42.0114	91.3989	171.253
		0.855	12.721	23.945	46.715	86.802	156.394
		-0.748	10.797	23.304	44.791	86.161	157.997
		-0.107	12.080	23.625	45.432	87.444	157.997
	Average	-5.13478E-16	11.7589	23.6247	44.3276	87.5505	161.703
	STDEV.s	0.434226926	0.53981	0.44399	1.47641	1.97475	5.8656
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.144742309	0.17994	0.148	0.49214	0.65825	1.9552

ตารางที่ A20 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟคั่วโรบัสต้าด้วยเทคนิคการสกัดด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวดที่อุณหภูมิในการสกัด 82 องศาเซลเซียส จำนวนการสกัด 3 รอบ

	A	B						A-B					
	Blalk (DMSO)	0	0.625	1.25	2.5	5	10	0	0.625	1.25	2.5	5	10
	0.048	0.048	0.086	0.124	0.195	0.334	0.593	0.001	0.039	0.077	0.148	0.287	0.546
Test 1	0.047	0.047	0.084	0.122	0.192	0.333	0.592	0.000	0.037	0.075	0.145	0.286	0.545
	0.047	0.047	0.084	0.122	0.193	0.336	0.601	0.000	0.037	0.075	0.146	0.289	0.554
	0.047												
	0.049	0.049	0.089	0.113	0.199	0.359	0.620	0.001	0.041	0.065	0.151	0.311	0.572
Test 2	0.047	0.047	0.084	0.122	0.185	0.324	0.628	-0.001	0.036	0.074	0.137	0.276	0.580
	0.047	0.047	0.084	0.121	0.199	0.340	0.613	-0.001	0.036	0.073	0.151	0.292	0.565
	0.048												
	0.048	0.048	0.089	0.124	0.203	0.361	0.630	0.001	0.042	0.077	0.156	0.314	0.583
Test 3	0.047	0.047	0.086	0.122	0.202	0.359	0.626	0.000	0.039	0.075	0.155	0.312	0.579
	0.047	0.047	0.087	0.126	0.206	0.357	0.628	0.000	0.040	0.079	0.159	0.310	0.581
	0.047												

	Concentration	0	0.625	1.25	2.5	5	10
		0.2138	12.4003	24.5868	47.3564	91.9334	174.994
		-0.1069	11.7589	23.9454	46.3943	91.6127	174.673
		-0.1069	11.7589	23.9454	46.715	92.5748	177.56
		0.4276	13.2555	20.9523	48.5323	99.8439	183.546
		-0.2138	11.652	23.8385	44.0425	88.6195	186.112
		-0.2138	11.652	23.5178	48.5323	93.7507	181.301
		0.214	13.362	24.587	49.922	100.592	186.860
		-0.107	12.400	23.945	49.601	99.951	185.577
		-0.107	12.721	25.228	50.884	99.309	186.219
	Average	-1.2E-15	12.3291	23.8385	47.9978	95.3542	181.871
	STDEV.s	0.22677	0.67609	1.19994	2.10499	4.55139	4.95383
	n	9	9	9	9	9	9
	SEM	0.07559	0.22536	0.39998	0.70166	1.51713	1.65128