

# การสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบับวกโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต ที่มีตัวทำละลายร่วม

## Extraction of Active Ingredients from *Centella Asiatica* Using Supercritical Carbon Dioxide with Co-solvent

วารภรณ์ กิตติพันธ์วรกุล และ มานพ เจริญไชยตระกูล

สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทร 0-2797-0999 ต่อ 1216 โทรสาร 0-2561-4621 E-mail: fengmnc@ku.ac.th

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากิจกรรมการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบับวก โดยสารออกฤทธิ์สำคัญที่สนใจอยู่ในกลุ่มของไตรเทอร์พีน คือ กรดอะเซียติก และอะเซียติโคไซด์ โดยทำการศึกษาดังต่อไปนี้ซึ่งมีผลต่อการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบับวกแห้ง ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตซึ่งมีเอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วม โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิในช่วง 35 – 45 องศาเซลเซียส ความดันในช่วง 120 – 180 บาร์ เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลายร่วมในช่วง 2 – 3 %mol และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญ เพื่อให้ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญมากที่สุด ซึ่งสารสกัดที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะเซียติก และอะเซียติโคไซด์ ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography จากผลการทดลอง พบว่าในช่วงขอบเขตของปัจจัยที่ทำการศึกษา สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดกรดอะเซียติกจากบับวก คือ ความดัน 180 บาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายร่วม 3.0 %โมล ได้ปริมาณกรดอะเซียติกมากที่สุด คือ 23.195 ไมโครกรัมต่อกรัม และสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดอะเซียติโคไซด์จากบับวก คือ ความดัน 180 บาร์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายร่วม 2.5 % โมล ได้ปริมาณอะเซียติโคไซด์มากที่สุด คือ 69.457 ไมโครกรัมต่อกรัม

คำสำคัญ : การสกัด, บับวก, กรดอะเซียติก, อะเซียติโคไซด์, คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต

### Abstract

The objective of this study was to extract active ingredients from dried powder of *Centella asiatica* leaves using supercritical carbon dioxide with ethanol as a co-solvent. Two main compounds in a group of triterpene, namely asiatic acid and asiaticoside are considered as the active ingredients in this extraction process. In this study, the effects of temperature (35 – 45 °C), pressure (120 – 180

bar) and ethanol concentration (2 – 3 % mol) on the extraction yield of asiatic acid and asiaticoside were investigated in order to find the optimal extraction condition. The extracts were analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to identify and determine the amount of asiatic acid and asiaticoside. Within the range of conditions studied, it was found that the optimal extraction condition of asiatic acid was obtained at 40 °C, 180 bar and ethanol concentration of 3.0 % mol. At the optimal extraction condition, the amount of asiatic acid was found to be 23.195 µg/g of dried *Centella asiatica* leaves powder and the optimal extraction condition of asiaticoside was obtained at 35°C, 180 bar and ethanol concentration of 2.5 % mol. At the optimal extraction condition the amount of asiaticoside was 69.457 µg/g of dried *Centella asiatica* leaves powder.

Keywords: Extraction, *Centella asiatica*, Asiatic acid, Asiaticoside, Supercritical carbon dioxide

### 1. บทนำ

บับวกเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์มากมาย ในตำรายาไทยระบุสรรพคุณของบับวกโดยใช้ทั้งต้นตั้งนี้ แก้วใน บำรุงกำลัง บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย เมื่อยล้า ขับปัสสาวะ เป็นต้น นอกจากนี้บับวกยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ลดการอักเสบ ฤทธิ์สมานแผล เป็นต้น ซึ่งม้งงานวิจัยออกมามากมาย เนื่องจากในบับวกประกอบด้วยสารประกอบไตรเทอร์พีน (Triterpene) ซึ่งช่วยสมานแผลและเร่งการสร้างเนื้อเยื่อ ระงับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง และลดการอักเสบ [1]

สารออกฤทธิ์ที่สำคัญของบับวกมีหลายอย่างด้วยกันได้แก่ กลุ่มสารประกอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids Compound) ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบ 2 กลุ่มด้วยกัน คือ สารประกอบโมโนและเซสควิเทอร์พีน

(Mono and Sesquiterpene Compounds) และสารประกอบไตรเทอร์ปีน (Triterpene Compound) ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบมากที่สุดในบัวบก โดยประกอบด้วย 4 ชนิด ได้แก่ กรดอะเซียติก (Asiatic acid) กรดมาเดคาสสิก (Madecassic acid) อะเซียติโคไซด์ (Asiaticoside) มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) นอกจากนี้ยังพบสารประกอบไตรเทอร์ปีนชนิดอื่น ๆ อีก ได้แก่ 6-เบต้า-ไฮดรอกซีอะเซียติก กรดเทอร์มิโนลิก กรดบรามิก บราโมไซด์ เซ็นเทโลไซด์ [1] อีกด้วย

ในปัจจุบันบัวบกได้รับความนิยมน้อยกว่าหลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ มีการนำสารสกัดที่ได้จากบัวบกมาทำการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายอย่างอาทิเช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ยารักษาโรค เป็นต้น ทำให้มีการศึกษาการสกัดสารสำคัญจากบัวบกด้วยวิธีการสกัดต่างๆ เช่น การแช่ การปล่อยให้ไหลซึมผ่าน การสกัดด้วยซอกซ์เลต เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณมากที่สุด และมีคุณภาพดี กล่าวคือ มีความบริสุทธิ์ปราศจากตัวทำละลายเจือปนอยู่ แต่ในวิธีการสกัดดังกล่าวข้างต้นมีข้อเสีย เช่น ประสิทธิภาพการสกัดต่ำ ใช้เวลาในการสกัดนาน สิ้นเปลืองตัวทำละลาย และสารสกัดที่ได้อาจมีตัวทำละลายตกค้างอยู่ในสารสกัด

เทคนิคการสกัดสารด้วยของไหลที่เหนือสภาวะวิกฤต (Supercritical fluid extraction) ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายเมื่อสารอยู่ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิและความดันสูงกว่าวิกฤต จะมีคุณสมบัติในการซึมผ่านของแข็งได้ดีเหมือนก๊าซและมีความหนาแน่นใกล้เคียงกับของเหลว ทำให้เป็นตัวทำละลายที่ดี ซึ่งของไหลที่นิยมใช้ในการสกัดคือ สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เนื่องจากสามารถเข้าถึงจุดวิกฤตของสารได้ง่าย โดยของไหลที่นิยมนำมาใช้มากที่สุด คือ คาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากมีจุดวิกฤตต่ำ คือ ความดันวิกฤต 73.8 บาร์ และอุณหภูมิวิกฤต 31.1 องศาเซลเซียส ซึ่งในสภาวะที่เหนือจุดวิกฤตนี้ คาร์บอนไดออกไซด์ยังมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ดี และสามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่ายหลังจากสิ้นสุดการสกัดที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศ ทำให้ไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์ในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ยังไม่ติดไฟ ไม่เป็นพิษ ไม่กัดกร่อน สามารถหาได้ง่ายและราคาถูกอีกด้วย แต่ของไหลที่มีอุณหภูมิวิกฤตต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส จะเป็นสารที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นสารเหล่านี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับการสกัดตัวถูกละลายที่มีขั้ว ซึ่งความสามารถในการทำละลายของสารเหล่านี้สามารถเพิ่มสูงขึ้นได้ โดยการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณเล็กน้อย (1-5 เปอร์เซ็นต์โดยโมล) โดยเรียกสารที่เติมนี้ว่า ตัวทำละลายร่วม (Co-solvent) หรือสารปรับแต่ง (Modifier) ซึ่งตัวทำละลายร่วมที่นิยมใช้ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และอะซิโตน นอกจากนี้การเติมตัวทำละลายร่วมยังส่งผลให้การสกัดสารที่มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น และความดันที่ใช้ในกระบวนการสกัดลดลง [2] ดังนั้นสารสกัดที่ได้จากวิธีการนี้ จะมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคมากกว่าวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่อาจจะมีตัวทำละลายตกค้างอยู่ และยังเป็นวิธีที่ไม่สิ้นเปลืองตัวทำละลาย [3]

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจทำการศึกษารายละเอียดต่างๆที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการสกัดและอะเซียติโคไซด์ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญจากบัวบกด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วม ในช่วงอุณหภูมิ 35 - 45 องศาเซลเซียส ความดัน 120 - 180 บาร์ เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลายร่วม 2-3 %mol และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญ

## 2. วิธีการทดลอง

### 2.1 สารเคมีที่ใช้

เมทานอล (Methanol;  $\text{CH}_3\text{OH}$ ; บริษัท Carlo Erba, ความบริสุทธิ์ 99.9% ) เอทานอล (Ethanol;  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ; บริษัท Emsure, ความบริสุทธิ์ 99.9% อะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile;  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; HPLC Grade, บริษัท Burdick and Jackson, ความบริสุทธิ์ 99.9%) น้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดประจุออกแล้วหรือน้ำ DI (De-ionization, 18  $\text{M}\Omega/\text{cm}$ ) คาร์บอนไดออกไซด์ (High Purity Grade, บริษัท TIG) สารมาตรฐานของอะเซียติโคไซด์ (บริษัท Fluka; ความบริสุทธิ์ 99%) สารมาตรฐานของกรดอะเซียติก (บริษัท Aldrich; ความบริสุทธิ์ 99.9%)

### 2.2 การเตรียมวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัด

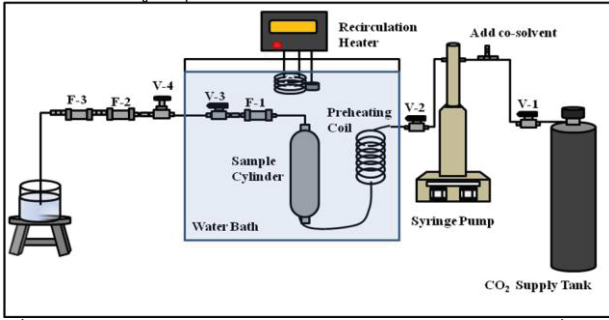
นำบัวบกสดมาแยกเอาเฉพาะส่วนใบของบัวบก แล้วนำมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ตากลมให้ใบบัวบกสะเด็ดน้ำ จากนั้นนำมาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ใบบัวบกแห้ง นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหารแห้ง และจัดเก็บผงบัวบกไว้ในถุงซิปล็อค (Zip Lock) นำมาเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง

### 2.3 การสกัดผงบัวบกด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต

#### 2.3.1 การเตรียมอุปกรณ์สำหรับการสกัด

ใส่ผงบัวบก 40 กรัม ในเครื่องปฏิกรณ์ โดยทำการบรรจุผงบัวบกสลับกับชั้นของใยแก้ว (Glass wool) อัดให้แน่นเพื่อป้องกันการเกิดแชนแนลลิง (Channeling) ซึ่งจะทำให้ปริมาณสารที่สกัดได้ลดลง จากนั้นนำไปประกอบกับชุดอุปกรณ์การทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่มีเครื่องให้ความร้อน แล้วทำการชั่งน้ำหนักวาล์ว 4 (V-4) ตัวกรอง 2 (F-2) และตัวกรอง 3 (F-3) จัดบันทึกน้ำหนัก ก่อนนำไปประกอบกับชุดอุปกรณ์ทดลอง แสดงดังรูปที่ 1 แล้วทำการเติมตัวทำละลายร่วมเข้าสู่ปั๊มความดันสูงตามด้วยเติมคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ปั๊ม เมื่อเติมคาร์บอนไดออกไซด์เต็มปั๊มแล้ว ทำการหล่อด้วยน้ำเย็นสลับกับน้ำร้อนที่บริเวณ Jacket ของปั๊ม โดยใช้น้ำเย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หล่อสลับกันรอบละ 10 นาที จำนวน 3 รอบ หลังจากนั้นทำการหล่อด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการปรับความดันให้ได้ตามที่ต้องการโดยใช้ปั๊มไฮดรอลิกอัตราการไหลคงที่ที่ 10 มิลลิลิตร

ต่อมาที่ แล้วทั้งระบบไว้ที่สภาวะที่ต้องการสกัดเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที เพื่อรอให้ระบบเข้าสู่สมดุลพร้อมสำหรับการทดลอง



รูปที่ 1 อุปกรณ์สำหรับการสกัดผงบัวบกด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตที่มีตัวทำละลายร่วม

### 2.3.2 ขั้นตอนการสกัด

ในการทดลองจะเริ่มต้นจากการเปลี่ยนโหมดของปั๊มความดันสูงให้ทำงานแบบความดันคงที่ที่ต้องการ จากนั้นทำการเปิดวาล์ว 2 (V-2) และวาล์ว 3 (V-3) ให้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตที่มีตัวทำละลายร่วมไหลผ่านผงบัวบกที่บรรจุอยู่ในเครื่องปฏิกรณ์ ทำให้เกิดการสกัดสาร จากนั้นคาร์บอนไดออกไซด์จะไหลออกไปทางวาล์ว 4 (V-4) และขยายตัวเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความดันบรรยากาศ ซึ่งในระหว่างการทดลองจะควบคุมอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ให้อยู่ในช่วง 0.2 – 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตรต่อการสกัด 1 รอบ ซึ่งในการทดลองแต่ละครั้งผงบัวบกที่บรรจุในเครื่องปฏิกรณ์ (40 กรัม) จะถูกสกัดด้วยกัน 3 รอบ ดังนั้นจะใช้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ทั้งหมดที่ใช้ในการสกัด 300 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เวลาในการสกัดประมาณ 4-5 ชั่วโมงต่อการสกัด 1 รอบ เมื่อทำการสกัดจนครบปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตรแล้ว ทำการปิดวาล์ว 4 (V-4) วาล์ว 3 (V-3) และวาล์ว 2 (V-2) ตามลำดับ และหยุดการทำงานของปั๊ม หลังจากนั้นทำการถอดวาล์ว 4 (V-4) ตัวกรอง 2 (F-2) และตัวกรอง 3 (F-3) ไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึกน้ำหนักหลังการสกัด ซึ่งจะทำให้สามารถหาปริมาณสารสกัดที่ได้จาก น้ำหนักของวาล์ว 4 (V-4) ตัวกรอง 2 (F-2) และตัวกรอง 3 (F-3) หลังการสกัดลบด้วยน้ำหนักก่อนสกัด

### 2.3.3 การเก็บสารสกัดที่ได้

สารสกัดที่ได้จะติดอยู่ที่วาล์ว 4 (V-4) ตัวกรอง 2 (F-2) และตัวกรอง 3 (F-3) โดยมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวๆ ซึ่งจะทำการเก็บสารสกัดที่ได้ด้วยการกลั่นสารสกัดด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ด้วยปริมาตร 10 -15 มิลลิลิตร แล้วทำการเก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชาและปิดฝาให้สนิท เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญด้วยเทคนิค HPLC ต่อไป

### 2.3.4 สภาวะในการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบก ได้แก่ กรดอะซิติก และอะซิetyl โคโคไซด์ ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตและศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญ ปัจจัยที่

ทำการศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิ (35 40 และ 45 องศาเซลเซียส) ความดัน (120 150 และ 180 บาร์) ตัวทำละลายร่วม (2.0 2.5 และ 3 %โมล) งานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบการทดลองโดยใช้โปรแกรม MINITAB 15 เลือกการออกแบบที่เรียกว่า บ็อกซ์-เบนเคน (Box-Behnken) กำหนดให้ระดับของแต่ละปัจจัยอยู่ในรูปแบบของรหัสเรียกว่า ตัวแปรที่ให้อรรถ (Coded variable) ซึ่งผู้วิจัยได้ใช้ตัวเลขแทนระดับของแต่ละปัจจัย แสดงดังตารางที่ 1 โดยสภาวะการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบนเคน แสดงตามตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ตัวเลขแทนระดับของปัจจัย

ปัจจัย	สัญลักษณ์	ระดับ		
		-1	0	1
ความดัน (บาร์)	P	120	150	180
อุณหภูมิ (เซลเซียส)	T	35	40	45
ตัวทำละลายร่วม (%โมล)	C	2.0	2.5	3.0

ตารางที่ 2 สภาวะการทดลองที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากบัวบกด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วม

การทดลองที่	ความดัน (Bar)	อุณหภูมิ (°C)	ตัวทำละลายร่วม (% mol)
1	120	35	2.5
2	120	40	2.0
3	120	40	3.0
4	120	45	2.5
5	150	35	2.0
6	150	35	3.0
7	150	40	2.5
8	150	40	2.5
9	150	40	2.5
10	150	45	2.0
11	150	45	3.0
12	180	35	2.5
13	180	40	2.0
14	180	40	3.0
15	180	45	2.5

### 2.3.5 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญด้วยเทคนิค HPLC

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกและอะซิetyl โคโคไซด์จากสารสกัดบัวบกด้วยเทคนิค HPLC จะใช้คอลัมน์ Reverse Phase Kinetex C-18 (100×2.1 mm, I.D. 2.6 μm) โดยใช้อะซิโตน ไตรคลอโรเอทิลีน และน้ำ DI เป็นเฟสเคลื่อนที่ด้วยอัตราการไหลคงที่ 0.5 ml/min อุณหภูมิ 25 °C ความยาวคลื่น 206 นาโนเมตร โดยใช้ตัวอย่างปริมาณ 10 ไมโครลิตร

### 2.3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ

#### Box - Behnken

ในงานวิจัยได้ทำการออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบนเคน ผู้วิจัยจะทำการวิเคราะห์ผลด้วยพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) ซึ่งสามารถหาระดับปัจจัยที่เหมาะสมได้ โดยวิธีพื้นที่การตอบสนองเป็นวิธีที่สามารถสร้างสมการของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ระดับของปัจจัย: Level of factor) ได้แก่ อุณหภูมิ (35 40 และ 45 องศาเซลเซียส) ความดัน (120 150 และ 180 บาร์) ตัวทำละลายรวม (2.0 2.5 และ 3 %โมล) กับตัวแปรตอบสนอง ได้แก่ ปริมาณของกรดอะซิติกและอะซีติโคไซด์ ซึ่งใช้วิธีการวิเคราะห์การถดถอย (Regression) เพื่อหาค่าที่เหมาะสม (Optimal setting) ของระดับในแต่ละปัจจัยที่ศึกษาในการออกแบบการทดลอง โดยเลือกการวิเคราะห์การถดถอยแบบ Linear + Interaction เนื่องจากมีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานน้อยที่สุด และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วมากที่สุด จึงมีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นตัวแทนแบบจำลอง เพื่อใช้ในการอธิบายผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีต่อปริมาณของกรดอะซิติกและอะซีติโคไซด์

### 3. ผลการทดลอง

#### 3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญด้วยเทคนิคHPLC

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญในสารสกัดที่ได้ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าทุกสภาวะการทดลองสามารถสกัดกรดอะซิติกและอะซีติโคไซด์ โดยปริมาณของกรดอะซิติกและอะซีติโคไซด์ที่สกัดได้ทั้งหมดต่อน้ำหนักผงบัวบก 1 กรัม แสดงดังตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการทดลองกับปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากแบบจำลอง Linear+Interaction

การทดลองที่	ความดัน (Bar)	อุณหภูมิ (°C)	ตัวทำละลายรวม (%mol)	กรดอะซิติก (µg/g)		% ความแตกต่าง
				จากการทดลอง	จากแบบจำลอง	
1	120	35	2.5	10.500	9.094	13.39
2	120	40	2.0	4.330	5.837	34.80
3	120	40	3.0	4.774	9.726	103.72
4	120	45	2.5	6.566	6.468	1.49
5	150	35	2.0	8.420	8.466	0.55
6	150	35	3.0	22.926	19.527	14.82
7	150	40	2.5	13.193	11.530	12.61
8	150	40	2.5	6.922	11.530	66.57
9	150	40	2.5	15.063	11.530	23.46
10	150	45	2.0	4.458	3.196	28.31
11	150	45	3.0	19.637	14.930	23.97
12	180	35	2.5	16.891	18.900	11.89
13	180	40	2.0	7.733	5.825	24.67
14	180	40	3.0	23.195	24.732	6.63
15	180	45	2.5	8.341	11.658	39.77

จากการตารางที่ 3 พบว่าที่สภาวะการทดลองที่ความดัน 180 บาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายรวม 3.0 %โมล มีปริมาณกรดอะซิติกมากที่สุด คือ 23.195 ไมโครกรัมต่อกรัม

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณอะซีติโคไซด์ที่ได้จากการทดลองกับปริมาณอะซีติโคไซด์ที่ได้จากแบบจำลอง Linear+Interaction

การทดลองที่	ความดัน (Bar)	อุณหภูมิ (°C)	ตัวทำละลายรวม (%mol)	อะซีติโคไซด์ (µg/g)		% ความแตกต่าง
				จากการทดลอง	จากแบบจำลอง	
1	120	35	2.5	35.715	24.791	30.587
2	120	40	2.0	40.072	39.405	1.665
3	120	40	3.0	19.089	15.621	18.168
4	120	45	2.5	25.108	30.235	20.420
5	150	35	2.0	26.216	40.115	53.017
6	150	35	3.0	18.688	35.389	89.368
7	150	40	2.5	33.851	29.188	13.775
8	150	40	2.5	20.058	29.188	46.821
9	150	40	2.5	43.058	29.188	32.212
10	150	45	2.0	27.415	25.261	7.857
11	150	45	3.0	15.338	15.987	4.231
12	180	35	2.5	69.457	50.713	26.986
13	180	40	2.0	18.817	25.971	38.019
14	180	40	3.0	31.403	35.755	13.859
15	180	45	2.5	13.706	11.013	19.648

จากการตารางที่ 4 พบว่าที่สภาวะการทดลองที่ความดัน 180 บาร์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายรวม 2.5 %โมล สารสกัดที่ได้มีปริมาณอะซีติโคไซด์มากที่สุด คือ 69.457 ไมโครกรัมต่อกรัม

### 3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

#### 3.3.1 การวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแบบจำลอง

จากแบบจำลอง Linear + Interaction โดยใช้ตัวแปรที่ให้รหัส ทำการดำเนินการหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร โดยใช้วิธี Response Surface Regression จากโปรแกรม MINITAB ได้ผลลัพธ์แสดงตามตารางที่ 5 และ 6 สำหรับกรดอะซิติกและอะซีติโคไซด์ ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของกรดอะซีติก โดยใช้ตัวแปรที่เข้ารหัส (Coded variable)

Term	Coef	P
Constant	11.5299	0.000
Pressure	3.7488	0.026
Temperature	-2.4669	0.111
Co-solvent	5.6989	0.003
Pressure*Temperature	-1.1540	0.570
Pressure*Co - solvent	3.7545	0.090
Temperature*Co - solvent	0.1683	0.933

หมายเหตุ

S = 3.89860 R-Sq = 79.88% R-Sq (adj) = 64.79%

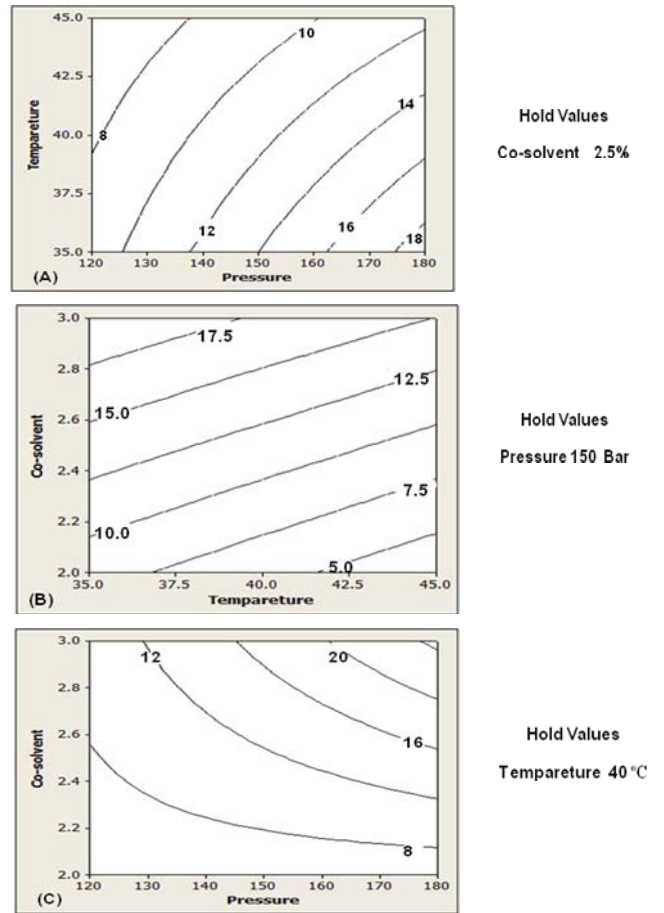
โดยที่ Coef คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการความสัมพันธ์  
 P คือ ค่าความน่าจะเป็น  
 S คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน  
 R-Sq คือ สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ )  
 R-sq (adj) คือ สัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ทำการปรับค่า ( $R^2$  adj)

จากตารางที่ 5 สามารถเขียนสมการแบบจำลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของกรดอะซีติกกับตัวแปรอิสระ (ความดัน อุณหภูมิ ตัวทำละลายรวม) ได้ตามสมการที่ 1

$$\text{ปริมาณของกรดอะซีติก} = 3.7488P - 2.4669T + 5.6989C - 1.1540PT + 3.7545PC + 0.1683TC + 11.5299 \quad (1)$$

แบบจำลองแบบ Linear + Interaction ตามตารางที่ 5 สามารถนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของกรดอะซีติกกับตัวแปรอิสระ (ความดัน อุณหภูมิ ตัวทำละลายรวม) แสดงดังรูปที่ 2

จากรูปที่ 2(A) พบว่าปริมาณของกรดอะซีติกจะมีปริมาณลดลงเมื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของอุณหภูมิมีค่าเป็นลบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการสกัดที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้กรดอะซีติกเสื่อมสภาพทางความร้อน จึงทำให้มีปริมาณลดลง จากรูปที่ 2(B) พบว่าปริมาณของกรดอะซีติกจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อตัวทำละลายรวมเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะกรดอะซีติกเป็นสารที่มีขี้ การเพิ่มตัวทำละลายรวมช่วยให้สกัดได้ดีขึ้น นอกจากนี้พบว่าปริมาณของกรดอะซีติกจะมีปริมาณมากที่สุดเมื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิในช่วง 37.5 - 40 องศาเซลเซียส จากรูปที่ 2(C) พบว่าการเพิ่มความดันและตัวทำละลายรวม ทำให้ได้ปริมาณของกรดอะซีติกเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของทั้งความดันและตัวทำละลายรวมมีค่าเป็นบวก



รูปที่ 2 Contour plots แสดงถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อปริมาณของกรดอะซีติก

อีกทั้งการเพิ่มความดัน ยังเป็นการเพิ่มความหนาแน่นของของไหล จึงทำให้สกัดสารได้มากขึ้น เมื่อทำการพิจารณาถึงค่า P ของทั้งความดันและตัวทำละลายรวม พบว่ามีค่า P ต่ำกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าความดันและตัวทำละลายรวมเป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อปริมาณของกรดอะซีติก นอกจากนี้พบว่าปริมาณของกรดอะซีติกจะมีปริมาณมากที่สุด เมื่อทำการสกัดที่ความดันในช่วง 160 - 170 บาร์ ตัวทำละลายรวม 2.8 - 3.0 %โมล เมื่อนำสมการแบบจำลองของปริมาณกรดอะซีติก (สมการที่ 1) มาคำนวณหาค่ากรดอะซีติกที่สภาวะต่างๆและนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง แสดงตามตารางที่ 5 พบว่าที่บางสภาวะการทดลองมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างค่อนข้างสูง ซึ่งสอดคล้องกับสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R-Sq) เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R-Sq) เท่ากับ 79.88 % และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับค่า ( $R^2$ -adj) เท่ากับ 64.79 % ถือได้ว่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ไม่สูงมากนัก

ตารางที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่พิจารณาจากปริมาณของอะเซียดิโคไซด์ โดยใช้ตัวแปรที่ให้รหัส (Coded variable)

Term	Coef	P
Constant	29.188	0.000
Pressure	1.675	0.726
Temperature	-8.564	0.101
Co-solvent	-3.500	0.470
Pressure*Temperature	-11.286	0.122
Pressure*Co - solvent	8.392	0.235
Temperature*Co - solvent	-1.137	0.866

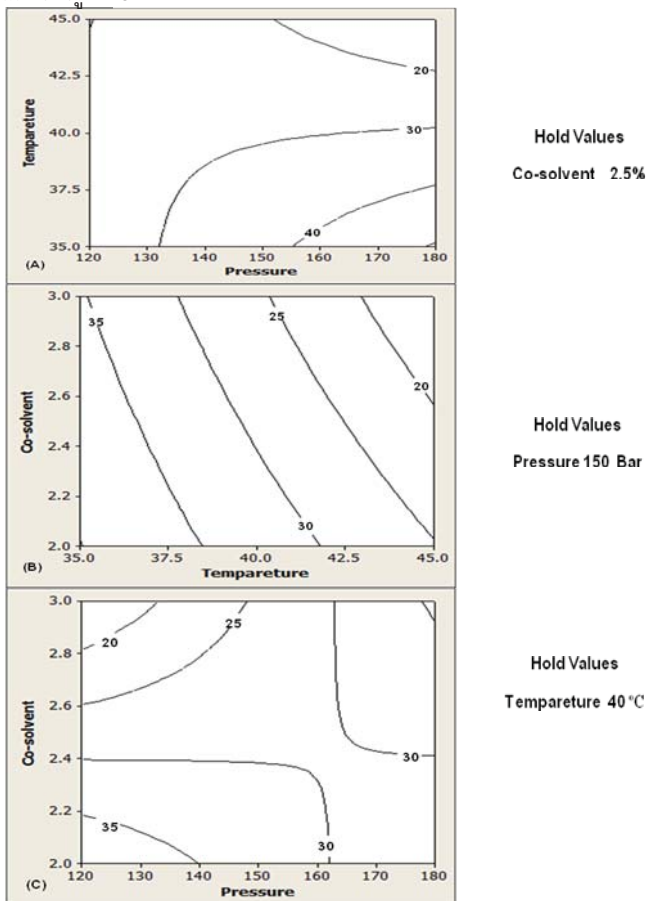
พหุ  
ยเหตุ  
S =  
13.0  
610  
R-Sq  
=

52.42 R-Sq (adj) = 16.73%

จากตารางที่ 6 สามารถเขียนแบบจำลองแบบ Linear + Interaction แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของอะเซียดิโคไซด์กับตัวแปรอิสระ (ความดัน อุณหภูมิ ตัวทำละลายร่วม) ได้ตามสมการที่ 2

$$\text{ปริมาณของอะเซียดิโคไซด์} = 1.675P - 8.564T - 3.500C - 11.286PT + 8.392PC - 1.137TC + 29.188 \quad (2)$$

แบบจำลองแบบ Linear + Interaction ที่ได้สามารถนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของอะเซียดิโคไซด์กับตัวแปรอิสระ แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 Contour plots แสดงถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อปริมาณของอะเซียดิโคไซด์

จากรูปที่ 3(A) พบว่าปริมาณของอะเซียดิโคไซด์จะมีปริมาณลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของอุณหภูมิมีค่าเป็นลบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการสกัดที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้อะเซียดิโคไซด์เสื่อมสภาพทางความร้อน จึงทำให้มีปริมาณลดลง เมื่อทำการพิจารณาถึงค่า P ของอุณหภูมิ พบว่ามีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับค่า P ของปัจจัยอื่น แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อปริมาณของอะเซียดิโคไซด์มากที่สุด จากรูปที่ 3(B) พบว่าการเพิ่มตัวทำละลายร่วมและอุณหภูมิ ทำให้ได้ปริมาณของอะเซียดิโคไซด์ลดลง เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวทำละลายร่วมและอุณหภูมิมีค่าเป็นลบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเพิ่มอุณหภูมิส่งผลให้ความหนาแน่นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตลดลง ทำให้ได้ปริมาณของอะเซียดิโคไซด์ลดลง นอกจากนี้พบว่าปริมาณของอะเซียดิโคไซด์จะมีปริมาณมากที่สุดเมื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิในช่วง 35 – 37.5 °C จากรูปที่ 3(C) พบว่าปริมาณของอะเซียดิโคไซด์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อความดันเพิ่มขึ้น เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของความดันมีค่าเป็นบวก อีกทั้งการเพิ่มความดัน ยังเป็นการเพิ่มความหนาแน่นของไหล จึงทำให้สกัดสารได้มากขึ้น นอกจากนี้พบว่าปริมาณของอะเซียดิโคไซด์จะมีปริมาณมากที่สุด เมื่อทำการสกัดที่ความดันในช่วง 120 – 140 บาร์ ตัวทำละลายร่วม 2.0 – 2.2 %โมล เมื่อนำสมการแบบจำลองของปริมาณของอะเซียดิโคไซด์ (สมการที่ 2) มาคำนวณค่าอะเซียดิโคไซด์ที่สภาวะต่างๆ และนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง แสดงตามตารางที่ 4 พบว่าที่บางสภาวะการทดลองมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างค่อนข้างสูง ซึ่งสอดคล้องกับสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R-Sq) เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R-Sq) เท่ากับ 52.42 และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับค่า (R<sup>2</sup>-adj) เท่ากับ 16.73%

จากตารางที่ 5 และ 6 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R-Sq) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับค่า (R<sup>2</sup>-adj) มีค่าค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในการทดลองนี้เป็นการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากพืชสมุนไพรซึ่งในพืชสมุนไพรนั้นมีปริมาณของสารออกฤทธิ์สำคัญที่ไม่แน่นอน ดังเช่นการทดลองที่ 7 – 9 จะเห็นได้ชัดเจนว่าที่สภาวะการทดลองเดียวกัน ปริมาณสารสกัดที่ได้มีค่าแตกต่างกันค่อนข้างสูง นอกจากนี้ระยะเวลาในการปลูกและเก็บเกี่ยว ยังส่งผลให้ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญในบวบ มีปริมาณที่ไม่แน่นอน ส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองอีกด้วย [4]

จากการทดลองข้างต้นพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตได้ปริมาณสารอะเซียดิโคไซด์สูงสุดคือ 69.457 µg/g และกรดอะเซียดิโคไซด์สูงสุดคือ 23.195 µg/g และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารสกัดที่ได้กับการสกัดแบบแห้งด้วยเอทานอล ได้ปริมาณสารอะเซียดิโคไซด์ 8335 ± 885 µg/g และกรดอะเซียดิโคไซด์ 2700 ± 370 µg/g จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตยังคงให้ปริมาณสารสกัดน้อยกว่าการสกัดแบบแห้งด้วยเอทานอลค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตาม จุดเด่นของการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตคือ มีปริมาณสารอินทรีย์ตกค้างน้อย ทำให้สามารถ

ช่วยลดกระบวนการแยกตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากสารสกัด และยังใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่น้อยกว่าการสกัดแบบแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์อีกด้วย ทั้งนี้ในอนาคตควรทำการศึกษาถึงความคุ้มทุนทางด้านเศรษฐศาสตร์ต่อการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญด้วยเทคนิคนี้ เปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบซอกซ์เลตและวิธีอื่นๆ ต่อไป

#### 4. บทสรุป

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อการสกัดสารออกฤทธิ์ที่สำคัญจากบัวบกด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตที่มีตัวทำละลายร่วม โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken พบว่าการทดลองที่สภาวะความดัน 180 บาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายร่วม 3.0 %โมล ได้ปริมาณกรดอะซีติกมากที่สุดคือ 23.195 ไมโครกรัมต่อกรัม และที่สภาวะการทดลองความดัน 180 บาร์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายร่วม 2.5 %โมล ได้ปริมาณอะซีติกดีไฮด์มากที่สุดคือ 69.457 ไมโครกรัมต่อกรัม นอกจากนี้ทั้งตัวทำละลายร่วมและความดัน เป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อปริมาณของกรดอะซีติก โดยตัวทำละลายร่วมเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลมากที่สุด ปัจจัยรองลงมาคือ ความดัน ส่วนปริมาณของอะซีติกดีไฮด์นั้น ไม่พบปัจจัยที่มีนัยสำคัญ แต่ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของอะซีติกดีไฮด์มากที่สุดคือ อุณหภูมิ

#### 5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัยและศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมีและวัสดุขั้นสูง

#### เอกสารอ้างอิง

- [1] นฤมล นอยหอย. 2551. ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบก (*Centella asiatica*(Linn.) Urban). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- [2] มานพ เจริญไชยตระกูล. 2553. เทคโนโลยีของไหลที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตกับอุตสาหกรรมยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.
- [3] อรัญญา มโนสร้อย, ชลดา คำโน, เพ็ญพรรณ ชันรินทร์, กาญจนา เรือนโต และจิรเดช มโนสร้อย. 2551. การเตรียมสารสกัดและน้ำมันจากสมุนไพรไทยโดยใช้ Supercritical carbon dioxide fluid และการกลั่น. ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และคณะ เกษศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- [4] จูไรรัตน์ ดวงเดือน. 2542. โครงการการประมวลองค์ความรู้เกี่ยวกับพืชพื้นเมืองที่มีศักยภาพเศรษฐกิจของประเทศไทย. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลร่วมกับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.