บทความวิจัย (Research Article)

# อิทธิพลของวิธีการสกัดต่อผลได้การสกัด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชสมุนไพรไทย

# Influences of Extraction Methods on Extraction Yield and Antioxidant Activity of Thai Herbal Extracts

ชนัญ ผลประไพ*, ศรัณยู อุ่นทวี,
จุฑามาส สุขเอม และภานุวัฒน์ ทองสอง
*สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*
*ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120*

Chanan Phonprapai*, Saranyou Oontawee,
Justhamas Sukaim, and Panuwat Thongsong
*Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,*
*Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120*

**Received: September 23, 2018; Accepted: March 30, 2019**

## บทคัดย่อ

การสะสมของอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตก่อนวัยอันควรของมนุษย์ ดังนั้นการบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการดูแลสุขภาพ งานวิจัยนี้จึงศึกษาอิทธิพลของวิธีการสกัดต่อผลได้การสกัดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชสมุนไพรไทย ได้แก่ รากชะเอมเทศ ดอกกานพลูตูม และดอกเก๊กฮวย และการศึกษากระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดต่อคุณลักษณะสารสกัดดอกเก๊กฮวย เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดกับการแช่ การเขย่า และการสกัดแบบซอกห์เลต จากการศึกษาพบว่าการแช่ทำให้สารสกัดดอกเก๊กฮวยมีผลได้การสกัดร้อยละ 9.70 และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำ ($IC_{50}$ = 78.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดดอกกานพลูตูมพบว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง ($IC_{50}$ = 11.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีผลได้การสกัดร้อยละ 8.05 จึงเลือกดอกเก๊กฮวยมาสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น ทั้งนี้เมื่อเพิ่มความดันในการสกัดดอกเก๊กฮวยด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดทำให้ผลได้การสกัดและประสิทธิภาพการทำลายอนุมูลอิสระของสารสกัดเพิ่มขึ้น เนื่องจากความหนาแน่นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นทำให้สารประกอบต่าง ๆ สามารถละลายได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม การสกัดดอกเก๊กฮวยด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลตมีผลได้การสกัดสูงที่สุด (ร้อยละ 23.09)

**คำสำคัญ :** วิธีการสกัด; ผลได้การสกัด; ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ; พืชสมุนไพร; ดอกเก๊กฮวย

**Corresponding author: chanan@tu.ac.th*
DOI: 10.14456/tjst.2019.55

## Abstract

Free radical accumulation has been known as a cause of untimely death, therefore the consumption of antioxidants from herbal plants could be the promising choices for health promotion. This research focused on studying influences of extracting methods on extraction yield and antioxidant activity of the extracts obtained from licorice roots, cloves and chrysanthemum flowers. Additionally, the effect of supercritical $CO_2$ extraction process on the characteristic of chrysanthemum flower extract was compared to other processes including maceration, shaking extraction and Soxhlet extraction. The results revealed that the maceration method used in extracting chrysanthemum flower gave the highest extraction yield [9.70 % (w/w)], with low $IC_{50}$ value (78.28 μg/mL), while the clove flower was found to obtain high $IC_{50}$ value (11.55 μg/mL). However, the extracting yield of the clove flower with maceration method gave the moderate yield [8.05 % (w/w)]. As a result, chrysanthemum flower was then selected to study on a variety of extraction methods. The increasing on the extraction pressure of supercritical $CO_2$ extraction process was found to increase the extraction yield and antioxidant activity of chrysanthemum extract. This extracting condition also caused many substances in chrysanthemum flower to be dissolved. However, the results also showed that the Soxhlet method used in extracting chrysanthemum flower gave the highest yield of 23.09 % (w/w). The increment of chrysanthemum flower extraction yield, supercritical $CO_2$ flow rate, time length of the extraction process and the amount of dry chrysanthemum flower powder should be increased.


**Keywords:** extraction method; extraction yield; antioxidant activity; herbal plant; chrysanthemum flower

## 1. คำนำ

สถิติการเสียชีวิตของประชากรไทยในทศวรรษที่ผ่านมาพบว่าร้อยละ 75 เสียชีวิตเนื่องจากโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (non-communicable disease, NCD) หรือประมาณ 320,000 คนต่อปี และจำนวนร้อยละ 55 ของผู้เสียชีวิตเหล่านี้มีอายุต่ำกว่า 70 ปี ซึ่งจัดได้ว่าเป็นการเสียชีวิตก่อนวันอันควร โดยสาเหตุการเสียชีวิตก่อนวัยอันควร คือ โรคหลอดเลือดสมอง โรคหัวใจขาดเลือด โรคเบาหวาน และโรคทางเดินหายใจอุดกั้นเรื้อรัง (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) (กลุ่มยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2561) โดยที่โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดนั้นมีความเกี่ยวข้องกับภาวะความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระ (oxidative imbalance) ซึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (free radical) และอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species) หรือเกิดขึ้นจากความบกพร่องของการป้องกันอันตรายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เนื่องมาจากปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านปฏิกิริยาดังกล่าวลดลงหรือทำงานผิดปกติ (โกสินทร์ และคณะ, 2557) อนุมูลอิสระดังที่กล่าวข้างต้นเป็นโมเลกุลหรืออิเล็กตรอนโดดเดี่ยว ซึ่งมีความไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา หากอนุมูลอิสระดึงอิเล็กตรอนจากสารชีวโมเลกุลภายในร่างดาย ได้แก่ ไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอ จะทำให้โมเลกุลเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงและทำให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ในที่สุด ดังนั้น

การบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เข้าไปในร่างกายจะช่วยลดปริมาณอนุมูลอิสระได้ อย่างไรก็ตาม สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย เช่น บีเอชที (butylated hydroxytoluene, BHT) และ บีเอชเอ (butylated hydroxyanisole, BHA) ที่ล่าสุดมีการรายงานว่าเป็นอันตรายต่อสุขภาพ *(Lobo et al*., 2010) จึงมีหลายงานวิจัยในทศวรรษนี้มุ่งเน้นการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพร เนื่องจากมีการใช้เป็นส่วนประกอบทั้งในอาหารและยาพื้นบ้านมาแต่โบราณกาล ทั้งนี้การใช้สมุนไพรและเครื่องเทศเป็นส่วนประกอบในอาหารของมนุษย์นั้นนอกจากจะเป็นการปรุงแต่งรสชาติอาหารแล้ว ยังเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพอีกด้วย (Przygodzka *et al*., 2014) สารออกฤทธิ์ที่พืชผลิตขึ้นมานี้เป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ผลิตขึ้นมาเพื่อใช้ในการอยู่รอดและการแข่งขัน ดังนั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชหลาย ๆ ชนิดจึงสามารถใช้รักษาอาการป่วยหรือโรคบางชนิดได้ (Hyun *et al*., 2014)

กานพลู (*Syzygium aromaticum*) เป็นไม้ยืนต้นสูงประมาณ 5-10 เมตร มีการเพาะปลูกในอินเดีย อินโดนีเซีย ปากีสถาน ศรีลังกา เป็นต้น ซึ่งนำทั้งผล เปลือก ดอก และใบมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย แต่ที่นิยมมากที่สุด คือ ดอกตูม กานพลูเป็นหนึ่งในแหล่งสำคัญของสารประกอบฟีนอล เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดไฮดรอกซีซีนามิก ไฮดรอกซีเพนนิลโพรเพน (Cortés-Rojas *et al*., 2014) จากการศึกษาสมบัติทางเภสัชวิทยาพบว่าดอกกานพลูตูม (clove) มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านเจริญการเติบโตของแบคทีเรียและรา ต้านการอักเสบ รักษาโรคเบาหวาน และลดแก๊สในกระเพาะอาหาร รักษาอาการท้องอืด นอกจากนี้ในประเทศอินเดียพบว่ามีการใช้ดอกกานพลูรักษาอาการปวดฟันอีกด้วย

ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra*) มีความยาวลำต้นประมาณ 1-2 เมตร มีรากอวบ ยาว และแตกแขนงเป็นจำนวนมาก มีการใช้ส่วนของรากชะเอมเทศ (licorice) ในการปรุงแต่งรสชาติอาหาร เนื่องจากมีรสหวาน และมีการใช้ในตำรับสมุนไพรการแพทย์ จากการศึกษาพบ glycyrrhizin ซึ่งมีรสหวานกว่าน้ำตาลจากอ้อยถึง 60 เท่า glycyrrhizin และ glycyrrhizic acid ยังมีความสามารถในการยับยังการเพิ่มจำนวนของอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอไวรัส เช่น ไวรัสตับอักเสบเอและซี ไวรัสวาริเซลลา ไวรัสซอสเตอร์ที่เป็นสาเหตุของโรคงูสวัด รวมถึงไวรัสเอชไอวี (HIV, human immunodeficiency virus) (Nesar, 2016) นอกจากนี้พบว่าไดเมทิลไฮดราซีน (dimethylhydrazine) ในรากชะเอมเทศมีความสามารถในการป้องกันการเกิดเนื้องอกบริเวณลำไส้ใหญ่และปอดของหนู เมื่อใช้ในปริมาณ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Chin *et al*., 2007)

เก๊กฮวย (*Chrysanthemum indicum* L.) เป็นพืชล้มลุก จัดอยู่ในวงศ์ Compositae ดอกมีฤทธิ์ทางยา เป็นพืชที่ใช้เป็นยาพื้นบ้านทั้งในเอเชียและยุโรป (Yoshikawa *et al*., 2000) เป็นพืชดั้งเดิมของประเทศจีนและญี่ปุ่น แต่ภายหลังได้แพร่กระจายไปทั่วในประเทศกัมพูชา ประเทศลาว รวมถึงประเทศไทยด้วย ซึ่งเพาะปลูกได้ดีในพื้นที่สูงของประเทศ มีกลิ่นหอม จึงนิยมนำไปชงชา อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดดอกเก๊กฮวยโดยเฉพาะในการต้านอนุมูลอิสระ กลุ่มฟลาโวนอยด์จำพวกไกลโคซิลเลตฟลาโวนอยด์ และสารประกอบแอลิแฟติก เช่น caffeoylquinic acid (Lin and Harnly, 2010) นอกจากนั้นเก๊กฮวยยังมีสมบัติในการใช้เป็นยาระงับประสาทส่วนกลาง ช่วยลดความดันโลหิต รวมทั้งต้านการอักเสบ (Burt, 2004) น้ำมันที่สกัดได้จากดอกเก๊กฮวยจะมีสารเทอพีน (terpene) และสารอนุพันธ์กลุ่มเอสเทอร์ อัลดี

ไฮด์ และฟีนอล ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ และต้านการอักเสบ (Lanciotti *et al*., 2004)

การนำสมุนไพรต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์มีมาแต่โบราณกาล โดยยุคแรกเริ่มนั้นมีการนำสมุนไพรสดมากินหรือทา ยุคถัดมามีการนำมาสกัดด้วยวิธีการต้ม บด หรือคั้น จากการวิจัยโดยใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ นักวิจัยสามารถวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenol) ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น เอทานอล เมทานอล เฮกเซน อย่างไรก็ตาม ตัวทำละลายดังกล่าวส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ที่สกัด ผ่านการสัมผัสหรือสูดดมตัวทำละลายเหล่านี้ และยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมหากมีการปล่อยสู่ธรรมชาติ เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์มีสมบัติในการละลายสารอื่นได้ดี มีความไวไฟและสามารถระเหยง่าย จึงทำให้ง่ายต่อการแทรกซึมเข้ากระแสเลือดและสูบฉีดไปยังอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย ทำให้เกิดการระคายเคืองหรือมึนศีรษะ ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีสีเขียว (green technology) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ ลดปัญหาการสร้างมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม หนึ่งในเทคนิคการสกัดที่จัดเป็นเทคโนโลยีสีเขียวที่ช่วยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอันตราย คือ วิธีการสกัดด้วยของไหลวิกฤติยิ่งยวด (supercritical fluid extraction) ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าสสารชนิดนั้น ๆ อยู่ในสภาวะแก๊สหรือของเหลว โดยแก๊สสามารถเปลี่ยนเป็นของเหลวได้โดยเพิ่มความดันหรือลดอุณหภูมิ เพื่อลดพลังงานจลน์หรือทำให้ระยะห่างระหว่างโมเลกุลแก๊สลดลง ทั้งนี้มีความนิยมในการใช้ของไหลวิกฤติยิงยวดของคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากมีความดันและอุณหภูมิวิกฤติต่ำ ไม่เป็นพิษ ไม่ติดไฟ ราคาถูก และกำจัดออกจากสารสกัดง่าย การสกัดด้วยของไหลวิกฤติยิ่งยวดนั้นสารสกัดที่ได้ไม่มีส่วนประกอบของตัวทำละลาย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ผลิตกาแฟไร้คาเฟอีน เนยปราศจากคอเลสเตอรอล และเนื้อไขมันต่ำได้ด้วย (Sapkale *et al*., 2010)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเน้นการศึกษาอิทธิพลของชนิดพืชสมุนไพรต่อผลได้การสกัดและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัด และศึกษาอิทธิพลของกระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดต่อคุณลักษณะสารสกัดดอกเก๊กฮวย จากนั้นศึกษาอิทธิพลของวิธีการสกัดต่อผลได้การสกัดของการสกัดดอกเก๊กฮวย เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพในการนำสารสกัดสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

2.1.1 การศึกษาอิทธิผลของชนิดพืชสมุนไพรต่อผลได้การสกัดและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และมีการทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ ปัจจัยที่ศึกษาในการทดลองนี้ คือ ชนิดพืชสมุนไพร โดยแบ่งเป็น 3 ระดับ ได้แก่ รากชะเอมเทศ (licorice root, LR) ดอกกานพลูตูม (clove flower bud, CL) และดอกเก๊กฮวย (chrysanthemum flower, CF) รวม 3 ทรีทเมนต์ (9 หน่วยทดลอง) โดยมีผลตอบสนอง (response) ที่สนใจจากการทดลองนี้ ได้แก่ ผลได้การสกัด (extraction yield, EY) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant activity, $IC_{50}$)

2.1.2 การศึกษาอิทธิพลของกระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดต่อคุณลักษณะสารสกัดดอกเก๊กฮวย

ออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล (factorial) และมีการทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ โดย

ปัจจัยที่ศึกษามี 2 ปัจจัย ได้แก่ (1) ปริมาณผงดอกเก๊กฮวย มี 2 ระดับ คือ 1.5 และ 3.0 กรัม และ (2) ความดันในการสกัด มี 3 ระดับ คือ 100, 200 และ 300 บาร์ รวม 6 ทรีทเมนต์ (18 หน่วยทดลอง) ดังแสดงในตารางที่ 1 ทั้งนี้ผลตอบสนองที่สนใจในการทดลองนี้ ได้แก่ ผลได้การสกัด การทำลายอนุมูลอิสระ (radical scavenging) และปริมาณองค์ประกอบหลักของสารสกัด

2.1.3 การศึกษาอิทธิพลวิธีการสกัดต่อผลได้การสกัดของการสกัดดอกเก๊กฮวย

ออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์และมีการทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ โดยที่ปัจจัยที่ศึกษาในการทดลองนี้ คือ วิธีการสกัดดอกเก๊กฮวย แบ่งเป็น 4 ระดับ คือ การสกัดด้วยวิธีแช่ การสกัดด้วยวิธีเขย่า การสกัดแบบซอกห์เลต และการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวด รวม 4 ทรีทเมนต์ (12 หน่วยทดลอง) และผลตอบสนองที่สนใจในการทดลองนี้ คือ ผลได้การสกัด

2.1.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาต่อผลตอบสนองในการทดลองแบบแฟกทอเรียลและการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์นั้น ได้วิเคราะห์ความแปรปรวนตัวแปรเดียว (univariate analysis of variance, univariate ANOVA) โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลทางสถิติวิธี Tukey's honesty significant difference (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ ส่วนข้อมูลที่แสดงในงานวิจัยนี้ได้คำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วจัดข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**2.2 การเตรียมผงพืชสมุนไพร**

งานวิจัยนี้ใช้พืชสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ รากชะเอมเทศ (LR) ดอกกานพลูตูม (CB) และดอกเก๊กฮวย (CF) โดยรากชะเอมเทศแห้งและดอกกานพลูตูมแห้งซื้อจากร้านจำหน่ายสมุนไพรย่านเยาวราช เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร ส่วนดอกเก๊กฮวยซื้อจากร้านค้าในอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี นำมาเตรียมเป็นผงพืชสมุนไพรโดยการปั่นด้วยเครื่องปั่นผลไม้เป็นเวลาประมาณ 5 นาที หรือจนกว่าจะได้ผงที่ละเอียด แล้วนำผงพืชสมุนไพรที่ได้มาร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 600 ไมโครเมตร และเก็บรักษาผงพืชสมุนไพรละเอียดที่ร่อนได้ให้พ้นแสงที่อุณหภูมิห้องในภาชนะที่จำกัดอากาศ เพื่อใช้สำหรับการสกัดต่อไป

**2.3 กระบวนการสกัดพืชสมุนไพร**

2.3.1 การสกัดพืชสมุนไพรด้วยวิธีแช่

การสกัดพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธีแช่ (macerating extraction, MTE) นั้นสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอลความเข้มข้น 99.98 เปอร์เซ็นต์ และใช้อัตราส่วนผงพืชสมุนไพรต่อตัวทำละลายเป็น 1 (3 กรัม) ต่อ 10 (30 มิลลิลิตร) และนำไปวางไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมากรองด้วยตัวกรองเซลลูโลสอะซิเตทขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปประเหยเพื่อวิเคราะห์ผลได้การสกัดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2.3.2 การสกัดพืชสมุนไพรด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลต

การสกัดพืชสมุนไพรด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลต (Soxhlet extraction, SLE) นั้นใช้ผงดอกเก๊กฮวยปริมาณ 30 กรัม และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.98 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ประมาณ 30 รอบ) หรือจนกว่าตัวทำละลายที่อยู่ในโถสกัดจะใส จากนั้นจึงกรองสารสกัดหยาบเหลวที่ได้ด้วยเซลลูโลสอะซิเตทขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร และนำไปประเหยตัวทำละลายออก เป็นเวลา 2 วัน หรืออบจนกระทั่งมีน้ำหนักคงที่ แล้วนำไปวิเคราะห์ผลได้การสกัดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ต่อไป

2.3.3 การสกัดพืชสมุนไพรด้วยวิธีคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด

การสกัดพืชสมุนไพรด้วยวิธีคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดนั้นใช้สกัดผงดอกเก๊กฮวยเพียงอย่างเดียว โดยมีการแปรผันความดันในการสกัดเป็น 100, 200 และ 300 บาร์ และแปรผันปริมาณผงดอกเก๊กฮวยที่ใช้ในการสกัดเป็น 1.5 และ 3.0 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดในระดับห้องปฏิบัติการและการสกัดในระดับต้นแบบ โดยใช้เครื่องสกัดของไหลวิกฤติยิ่งยวด (SFX 220D, Teledyne ISCO Inc., USA) และใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลายวิกฤติยิ่งยวด และไม่ใช้ตัวทำละลายร่วมในการสกัด สำหรับปัจจัยคงที่ให้การสกัดด้วยวิธีนี้ได้แก่ อุณหภูมิการสกัด (60 องศาเซลเซียส) อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดผ่านตัวอย่างผงพืชสมุนไพร (10 มิลลิลิตรต่อนาที) และเวลาในการสกัด (60 นาที) ทั้งนี้หลังการสกัดแต่ละครั้งจะล้างระบบเครื่องสกัดด้วยสภาวะการสกัดเดียวกันเป็นเวลา 15 นาที สำหรับการเก็บสารสกัดที่ปล่อยออกมาจากเครื่องสกัดนั้นใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.98 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นตัวรับ เมื่อสกัดเป็นเวลาตามที่กำหนดแล้ว จะปรับปริมาตรสารสกัดให้เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บหลอดแก้วทึบแสงที่อุณหภูมิประมาณ 4-8 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปวิเคราะห์ผลได้การสกัด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และองค์ประกอบของสารสกัด

**2.4 การวิเคราะห์ผลได้การสกัด**

การวิเคราะห์ผลได้การสกัด (extraction yield, EY) ของสารสกัดพืชสมุนไพรนั้นได้นำถ้วยระเหยที่มีสารสกัดหยาบแห้งมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ซึ่งได้ชั่งน้ำหนักถ้วยระเหยที่ไม่มีสารสกัดไว้ก่อนแล้ว จากนั้นนำน้ำหนักแห้งของสารสกัดได้ ($W_E$) ที่ได้จากการคำนวณผลต่างของน้ำหนักถ้วยระเหยก่อนการบรรจุสารสกัดและภายหลังการบรรจุสารสกัด และน้ำหนักผงพืชสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด ($W_P$) มาคำนวณผลได้การสกัดด้วยสมการ EY (% w/w) = (WE / WP) x 100 จากนั้นขูดสารสกัดที่ได้ออกจากถ้วยระเหย แล้วบรรจุในหลอดแก้วทึบแสงที่อุณหภูมิประมาณ 4-8 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

**ตารางที่ 1** ผลได้จากการสกัด (EY) การทำลายอนุมูลอิสระ (RS) และพื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรมของสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัด (PA) ของสารสกัดดอกเก๊กฮวย (CF) ที่ได้จากการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดภายใต้สภาวะการสกัดต่าง ๆ

| Extract code | CF weight (g) | Pressure (bar) | EY (% w/w) | RS (%) | PA (mAU) |
|---|---|---|---|---|---|
| SCE-1.5-1 | 1.5 | 100 | 0.02±0.01 $^{a}$ | 53.94±19.05 $^{\alpha}$ | 153.98±38.50 $^{A}$ |
| SCE-1.5-2 | 1.5 | 200 | 0.05±0.04 $^{a}$ | 78.88±5.46 $^{\beta}$ | 227.01±19.40 $^{A}$ |
| SCE-1.5-3 | 1.5 | 300 | 0.20±0.07 $^{b}$ | 90.64±6.74 $^{\beta}$ | 340.09±50.47 $^{A}$ |
| SCE-3.0-1 | 3.0 | 100 | 0.01±0.00 $^{a}$ | 64.74±4.08 $^{\alpha}$ | 147.76±96.93 $^{B}$ |
| SCE-3.0-2 | 3.0 | 200 | 0.05±0.01 $^{a}$ | 73.87±6.67 $^{\beta}$ | 400.23±3.33 $^{B}$ |
| SCE-3.0-3 | 3.0 | 300 | 0.12±0.06 $^{b}$ | 95.38±7.07 $^{\beta}$ | 430.02±125.58 $^{B}$ |

*SCE means supercritical carbon dioxide extraction; The data are expressed as mean ± standard deviation; $^{a, b, \alpha, \beta}$ และ $^{A, B}$ mean that different superscripts of EY, RS and PA are significantly different ($p \leq 0.05$), respectively.

ส่วนการวิเคราะห์ผลได้การสกัดของสารสกัดดอกเก๊กฮวยซึ่งได้จากการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดนั้น ได้นำสารละลายสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งในหลอดหมุนเหวี่ยงปริมาตร 2 มิลลิลิตร

**2.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay**

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดพืชสมุนไพรนั้นเริ่มต้นด้วยการละลายสารสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.98 ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านตัวกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นเจือจาง ด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.98 ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ที่ดัดแปลงจาก Gamez และคณะ (1998) โดยเจือจางสารละลายสารสกัดสมุนไพรที่เตรียมได้แบบอนุกรม 2 เท่าด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.98 เป็น 7 ความเข้มข้น (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ใส่ในไมโครเพลทพอลิสไตรีนแบบก้นแบนชนิด 96 หลุม (96-well polystyrene microplate with flatted-bottom) สารสกัดละ 4 แถว จากนั้นเติมอนุมูล 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 0.12 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.98 (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ลงในหลุมที่เจือจางสารสกัดไว้แล้วจำนวน 3 แถว (extract sample) ในส่วนของตัวควบคุมสี (color control) จะเติมตัวทำละลายของ DPPH (เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.98) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปแทนการเติมสารละลาย DPPH สำหรับตัวควบคุม DPPH (DPPH control) จะเติมตัวทำละลายของสารสกัด (เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.98) ลงไปแทนสารสกัด และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.98 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จะใช้เป็นตัวควบคุมตัวทำละลาย (blank control) จากนั้นนำถาดไมโครเพลทมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader, Sunrise™, Tecan, USA) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด ($OD_E$) ตัวควบคุมสี ($OD_C$) และ DPPH ($OD_{DPPH}$) ที่ได้มาคำนวณค่าการทำลายอนุมูลอิสระ (radical scavenging, RS) ด้วยสมการ RS (%) = $\{[OD_{DPPH} - (OD_E - OD_C)] \div OD_{DPPH}\} \times 100$ แล้วค่า RS ที่คำนวณได้จะใช้คำนวณค่าความเข้มข้นในการยับยั้ง 50 เปอร์เซ็นต์ ($IC_{50}$) โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสกัดและการตอบสนอง (dose-response analysis) โดยวิเคราะห์การถดถอยแบบโลจิสติก 4 ตัวแปร (four-parameter logistic regression) (Ritz *et al.*, 2015) ในฟังก์ชัน ED{drm[RS ~ Conc, fct=LL.4(names=c<"Slope", "Lower", "Upper", "ED50">), data=object], 50, type = "absolute"} ที่อยู่ในคลัง drc ของโปรแกรม RStudio Version 1.1.423 (R Core Team, 2017) ในการวิจัยครั้งนี้ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานในการเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับสารสกัด โดยที่ค่า $IC_{50}$ ที่น้อยกว่าสื่อได้ถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่า

สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดอกเก๊กฮวยที่ได้จากการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดนั้น ใช้สารละลายสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธีเดียวกัน แล้วคำนวณค่าการทำลายอนุมูลอิสระ โดยการศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดอกเก๊กฮวยจากการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดนั้นใช้เพียงค่า RS ในการเปรียบเทียบเท่านั้น (ค่า RS มาก หมายถึง สารสกัดมีสารต้าน

อนุมูลอิสระมาก) ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดบางชนิดมีค่าการทำลายอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่าร้อยละ 50 จึงไม่สามารถนำมาคำนวณค่า $IC_{50}$

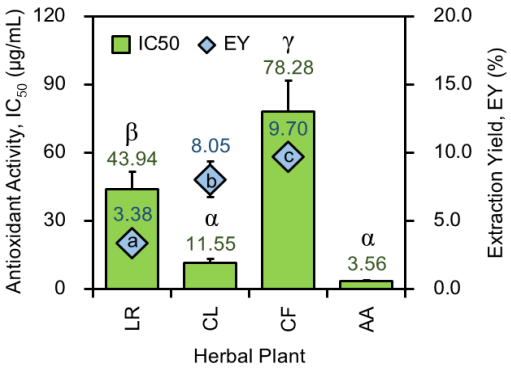
**2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัด**

2.6.1 เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี

การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี (spectrophotometry) เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และต้นทุนต่ำ งานวิจัยนี้จึงใช้วิธีนี้มาเปรียบเทียบรูปแบบของสเปคตรัมช่วงแสงยูวีและแสงขาว (UV-Vis spectrum) ของสกัดดอกเก๊กฮวยที่สกัดด้วยวิธีคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดภายใต้สภาวะการสกัดที่แตกต่างกัน ใช้สารสกัดตัวอย่างปริมาตร 800 ไมโครลิตร ที่บรรจุลงในคิวเวทท์ควอทซ์ (quartz cuvette) และใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.98 ปริมาตรเท่ากันเป็นสารละลายอ้างอิง (reference) บรรจุลงในคิวเวทท์ควอทซ์อีกชิ้น วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นแสง 200-700 นาโนเมตร โดยวัดด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (Biochrom Libra S21, Biochrom Ltd., Cambridge, UK) ทุก 1 นาโนเมตร อัตราเร็ว 1,800 นาโนเมตรต่อนาที และวัด 3 ซ้ำ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาเฉลี่ยและสร้างกราฟเส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (wavelength) และค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบของสเปคตรัมของสารสกัดแต่ละชนิด

2.6.2 เทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบหลักที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดดอกเก๊กฮวยที่สกัดด้วยวิธีคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดภายใต้สภาวะการสกัดที่แตกต่างกัน โดยใช้ระบบวัฏภาคแบบผันบ (reversed-phase) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ He และคณะ (2016) มีการใช้วัฏภาคคงที่ (stationary phase) เป็นคอลัมน์ Kromasil® C18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 4.6 มิลลิเมตร ยาว 150 มิลลิเมตร มีรูพรุนขนาด 5 ไมโครเมตร และมีการปกป้องคอลัมน์ด้วยชุดปกป้องคอลัมน์ Supelguard™ C18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 4.0 มิลลิเมตร ยาว 2 เซนติเมตร ซึ่งมีรูพรุนขนาด 5 ไมโครเมตร โดยฉีดสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าไปในเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (Agilent 1200 HPLC, Agilent Technologies Inc., California, USA) ซึ่งนำพาด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่านชุดป้องกันคอลัมน์สู่ภายในคอลัมน์ไปสู่คอลัมน์ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส แล้ววัดปริมาณสารประกอบที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสง (diode-array detector, DAD) ที่ความยาวคลื่น 326 นาโนเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งใช้ในการทดลองนี้มี 2 ชนิด คือ (A) สารละลายกรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (0.1 % formic acid) และ (B) อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) สารทั้ง 2 ชนิด นี้ใช้ในการวิเคราะห์แบบปรับเปลี่ยนความเข้มข้น (gradient program) ดังนี้ (B) ความเข้มข้นร้อยละ 12-19 ภายในเวลา 0-7 นาที (B) ความเข้มข้นร้อยละ 19-20 ภายในเวลา 17-30 นาที (B) ความเข้มข้นร้อยละ 20-21 ภายในเวลา 30-40 นาที (B) ความเข้มข้นร้อยละ 21-23 ภายในเวลา 40-50 นาที (B) ความเข้มข้นร้อยละ 23-25 ภายในเวลา 50-57 นาที และ (B) ความเข้มข้นร้อยละ 25-26 ภายในเวลา 57-70 นาที ทั้งนี้พื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรม (peak area) ที่ได้จากการวิเคราะห์ได้เปรียบเทียบทางสถิติเพื่อหาสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัด (PA)




**รูปที่ 1** ผลได้การสกัด (EY) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ($IC_{50}$) ของรากชะเอมเทศ (LR) กานพลู (CL) และเก๊กฮวย (CF) ที่สกัดด้วยวิธีแช่ (AA คือ กรดแอสคอร์บิก) (สัญลักษณ์ $^{a, b, c}$ และ $^{\alpha, \beta, \gamma}$ ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

## 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

### 3.1 อิทธิผลของชนิดพืชสมุนไพรต่อผลได้การสกัดและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

การสกัดรากชะเอมเทศ (LR) ดอกกานพลูตูม (CL) และดอกเก๊กฮวย (CF) ด้วยวิธีแช่ (macerating extraction, MTE) โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.98 เป็นตัวทำละลาย พบว่าผลได้จากการสกัด (EY) มีค่าร้อยละ 3.38±0.03, 8.05±1.33 และ 9.70±0.54 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยเห็นได้ว่าการสกัดดอกเก๊กฮวยด้วยวิธีแช่ให้ผลได้การสกัดสูงที่สุด ซึ่งมากกว่าสารสกัดรากชะเอมเทศถึง 2.86 เท่า ($p = 0.000$) แม้ว่าสารสกัดดอกกานพลูนั้นมีผลได้การสกัดใกล้เคียงกับสารสกัดดอกเก๊กฮวยมากที่สุด แต่ก็ยังมีผลได้การสกัดที่น้อยกว่าสารสกัดดอกเก๊กฮวยอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.000$) ทั้งนี้ผลได้การสกัดที่สูงบ่งบอกถึงสารสกัดสมุนไพรนั้นมีศักยภาพในการนำใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเวชสำอาง เนื่องจากการสกัดพืชสมุนไพรด้วยแอลกอฮอล์นั้นเป็นที่ทราบกันดีว่าทำให้ได้สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ได้แก่ กรดฟีนอลิก (phenolic acid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และแซนโทน (xanthone) เป็นต้น ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงและยังมีศักยภาพในการรักษาโรคร้ายแรงหลายชนิดด้วย ( Kim *et al*., 2004; Ngawhirunpat *et al*., 2010; Hansakul *et al*., 2011; Chunthorng-Orn *et al*., 2012; Mitani *et al*., 2012; Worawattananutai *et al*., 2014; Panchinda *et al*., 2016) สารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้เป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่พืชผลิตขึ้นมาเพื่อความอยู่รอด โดยการตอบสนองต่อความเครียดทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ (Cheynier *et al*., 2013; Guerriero et al., 2018)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดแต่ละชนิดมีค่า $IC_{50}$ ที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยพบว่าสารสกัดดอกกานพลูตูมมีฤทธิ์การต้านอุมูลอิสระสูงที่สุด (11.55±1.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid, AA) ที่ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (3.56±0.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมา คือ สารสกัดรากชะเอมเทศ (43.94±7.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดดอกเก๊กฮวย (78.28±13.66 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ดังที่แสดงในรูปที่ 1 แม้ว่าสารสกัดดอกเก๊กฮวยจะมีผลได้การสกัดสูงที่สุดแต่สารสกัดเก๊กฮวยนั้นมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำที่สุด โดยที่มีค่า $IC_{50}$ สูงกว่าค่าของสารสกัดดอกกานพลูตูมถึง 6.77 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดดอกเก๊กฮวยมีสารที่ไม่มีฤทธิ์เจือปนอยู่มากหรือกระบวนการสกัดยังไม่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม จากการวิจัยของ Lee และคณะ (2008) ที่ใช้ดอกเก๊กฮวยผ่านการทำแห้งด้วยเทคนิคการระเหิดน้ำ แล้วนำมาสกัดด้วยเมทอานอล

ที่มีกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 5 (methanol containing 5% acetic acid) เป็นจำนวน 3 รอบ ผลปรากฏว่าได้สารสกัดดอกเก๊กฮวยมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) มากกว่าสารสกัดรากชะเอมเทศ โดยมีค่า 38.46 และ 9.19 มิลลิโมลเทียบเท่าโทรล็อกซ์ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนการเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดดอกกานพลูตูมกับสารสกัดรากชะเอมเทศหรือสารสกัดดอกเก๊กฮวยนั้น ยังไม่พบว่ามีการศึกษามาก่อน จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น จึงได้มีการพัฒนากระบวนการสกัดดอกเก๊กฮวย เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากยิ่งขึ้น ซึ่งดำเนินการในการทดลองถัดไป

**3.2 อิทธิพลของกระบวนการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดต่อคุณลักษณะของสารสกัดดอกเก๊กฮวย**

การสกัดพืชสมุนไพรด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดเป็นเทคโนโลยีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (eco-friendly extraction technology) มีจุดวิกฤติต่ำ (31 องศาเซลเซียส และ 74 บาร์) นิยมใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ในกลุ่มที่ไม่มีขั้วหรือสารประกอบฟีนอลิก งานวิจัยนี้จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดดอกเก๊กฮวย โดยได้ศึกษาอิทธิพลของความดันการสกัด (100, 200 และ 300 บาร์) ในการสกัดดอกเก๊กฮวยปริมาณ 1.5 และ 3.0 กรัม ต่อคุณลักษณะของสารสกัดดอกเก๊กฮวย ได้แก่ ผลได้การสกัด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณองค์ประกอบหลักในสารสกัดดอกเก๊กฮวย

3.2.1 ผลได้การสกัด

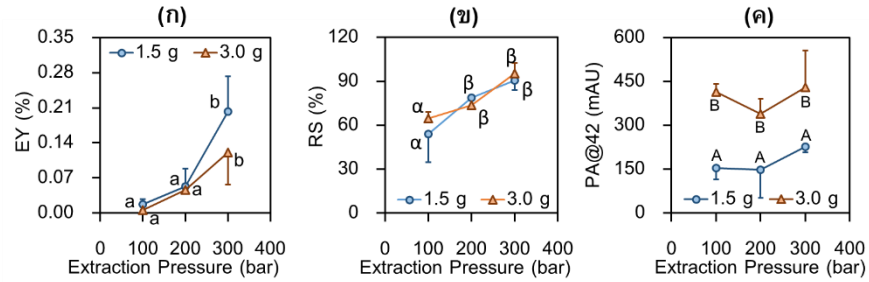
การสกัดผงดอกเก๊กฮวยด้วยการใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวด มีผลได้การสกัด (EY) ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งเห็นได้ว่าการเพิ่มความดันในการสกัดส่งผลให้มีผลได้การสกัดที่สูงขึ้น โดย SCE-1.5-3 มีผลได้การสกัดสูงที่สุดเป็นร้อยละ 0.20±0.07 และ SCE-3.0-3 มีผลได้การสกัดสูงในอันดับถัดมาเป็นร้อยละ 0.12±0.06 ดังแสดงในรูปที่ 2ก อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณผงดอกเก๊กฮวยจาก 1.5 เป็น 3.0 กรัม ภายใต้สภาวะการสกัดเดียวกัน (ความดัน 300 บาร์ และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) ที่ซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดในปริมาณเท่ากันเป็นตัวละลายและนำพาสารออกฤทธิ์ออกจากเครื่องด้วยอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ทำให้ได้สารสกัดที่มีน้ำหนักประมาณ 0.30 และ 0.36 กรัม ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าการใช้ผงดอกเก๊กฮวยในปริมาณที่มากขึ้นทำให้ได้ปริมาณสารสกัดเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อนำปริมาณสารสกัดที่ได้มาคำนวณเป็นค่าผลได้การสกัดที่มีการนำน้ำหนักผงพืชเริ่มต้นมาใช้ในการคำนวณ ค่าผลได้การสกัดที่ได้จากการใช้ผงดอกเก๊กฮวย 1.5 กรัม มีค่ามากกว่าการใช้ผงดอก 3.0 กรัม โดยหากต้องการให้เห็นความแตกต่างของค่าผลได้การสกัดอย่างชัดเจนยิ่งขึ้น อาจเพิ่มเวลาในการสกัดให้นานขึ้น

การวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงให้เห็นว่าความดันที่ใช้ในการสกัดดอกเก๊กฮวยมีอิทธิพลต่อผลได้การสกัด ($p = 0.0001$) แต่ปริมาณผงดอกเก๊กฮวยที่ใช้สกัดไม่มีอิทธิพลต่อผลได้การสกัด ($p = 0.1159$) เนื่องจากการเพิ่มความดันทำให้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดมีความหนาแน่นมากยิ่งขึ้นทำให้สกัดสารได้มากขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 100, 200 และ 300 บาร์ คาร์บอนไดออกไซด์มีความหนาแน่นเป็น 0.29, 0.72 และ 0.83 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ($CO_2$ Tables Calculator, $CO_2$TablesWeb v7.0, MegaWatSoft Inc., Canada) และการที่ความหนาแน่นเพิ่มสูงขึ้นนี้ทำให้สามารถสกัดสารที่มีโมเลกุลใหญ่ได้มากยิ่งขึ้น โดยการสกัดสารประกอบที่ไม่สามารถระเหยได้ (non-volatile compound) ซึ่งมีโมเลกุลใหญ่นั้น จะ

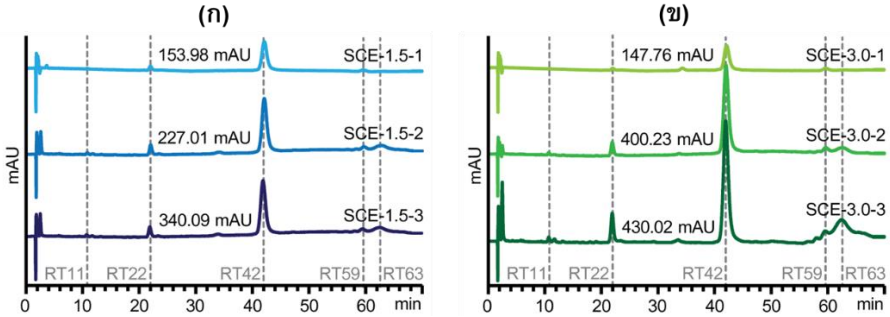
สกัดที่ความดันสูงประมาณ 120-200 บาร์ ส่วนการสกัดสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile compound) ซึ่งมีโมเลกุลเล็ก จะสกัดที่ความดันปานกลาง ซึ่งมีค่าประมาณ 90 บาร์ (Reverchon, 1997; Barroso *et al*., 2011)

3.2.2 ประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระ

ประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระ (radical scavenging, RS) ของสารสกัดดอกเก๊กฮวยที่สกัดได้นั้น พบว่าความดันที่ใช้ในการสกัดดอกเก๊กฮวยมีอิทธิพลต่อค่าการทำลายอนุมูลอิสระ ($p = 0.0022$) แต่ปริมาณผงดอกเก๊กฮวยที่ใช้สกัดไม่มีอิทธิพลต่อผลได้การสกัด ($p = 0.1060$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับผลได้การสกัด โดยสารสกัดดอกเก๊กฮวยจะมีค่าการทำลายอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความดันในการสกัด ดังแสดงในรูปที่ 2ข และทำให้ SCE-3.0-3 มีค่าการทำลายอนุมูลอิสระสูงที่สุดเป็นร้อยละ 95.38±7.07 รองลงมา คือ SCE-1.5-3 ซึ่งมีค่าการทำลายอนุมูลอิสระเป็นร้อยละ 90.64±6.74 ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งเห็นได้ว่าเมื่อกระบวนการสกัดทำให้มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ผลได้การสกัดก็จะมีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน



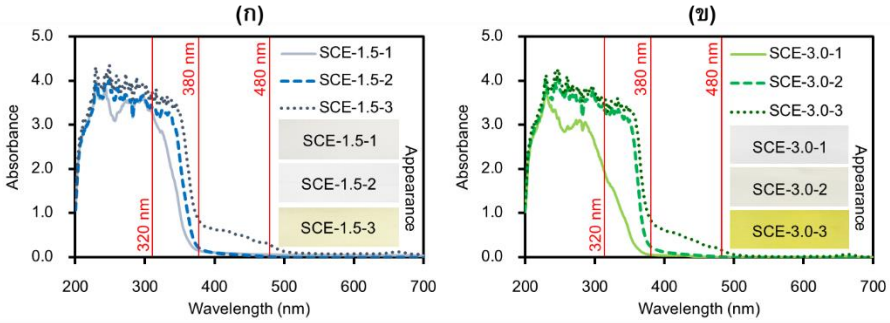

**รูปที่ 2** (ก) ผลได้จากการสกัด (ข) การทำลายอนุมูลอิสระ และ (ค) พื้นที่ใต้กราฟของสารประกอบหลักในสารสกัดที่เวลา 42 นาที ของสารสกัดดอกเก๊กฮวยที่ได้จากการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวด (SCE) ภายใต้สภาวะการสกัดต่างกัน (สัญลักษณ์ $^{a, b, c, \alpha, \beta, \gamma}$ และ $^{A, B, C}$ ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95)




**รูปที่ 3** โครมาโทแกรมของสารสกัดดอกเก๊กฮวยที่ได้จาก (ก) การสกัดผงดอกเก๊กฮวย 1.5 กรัม และ (ข) การสกัดผงดอกเก๊กฮวย 3.0 กรัม ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวด (SCE) ภายใต้ความดันที่แตกต่างกัน

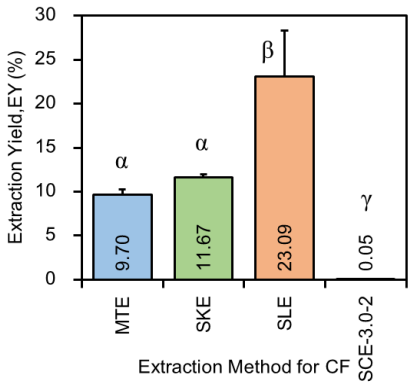
3.2.3 ปริมาณองค์ประกอบหลักในสารสกัดดอกเก๊กฮวย

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบหลักในสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาทอกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าสารประกอบหลักในสารสกัดดอกเก๊กฮวยที่สกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวด คือ สารประกอบที่มีเวลาคงอยู่ในคอลัมน์ (retention time) ประมาณ 42 นาที ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยที่พื้นที่ใต้กราฟของสารประกอบที่เวลา 42 นาที (PA@42) ของสารสกัดที่ได้จากการสกัดภายใต้ความดันที่แตกต่างกันมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณผงดอกเก๊กฮวยที่ใช้ในการสกัดมีอิทธิพลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า PA@42 ($p = 0.0000$) ซึ่งการสกัดผงดอกเก๊กฮวยภายใต้ความ 300 บาร์ โดยใช้ผงดอกเก๊กฮวยเพิ่มขึ้นจาก 1.5 เป็น 3.0 กรัม ทำให้ค่า PA@42 ของสารสกัดเพิ่มขึ้นจาก 340.09±50.47 เป็น 430.02±125.58 mAU ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 2ค เนื่องจากสารที่สกัดได้เพิ่มขึ้นภายใต้ความดันที่สูงขึ้นนี้เป็นสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ PA@42 และยังมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระด้วย ยืนยันได้จากโครมาโทแกรม (chromatogram) ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งเห็นได้ว่าการเพิ่มความดันในการสกัดทำให้จำนวนชนิดของสารประกอบในสารสกัดเพิ่มขึ้น โดยการสกัดผงดอกเก๊กฮวยภายใต้ความดัน 100 บาร์ ทำให้ได้สารประกอบที่มีเวลาคงอยู่ในคอลัมน์เป็น 22, 42 และ 59 นาที หรือมีสารประกอบที่ตรวจพบ 3 ชนิด ส่วนการสกัดผงดอกเก๊กฮวยภายใต้ความดัน 300 บาร์ ทำให้ได้สารประกอบที่มีเวลาคงอยู่ในคอลัมน์เป็น 11, 22, 42, 59 และ 63 นาที หรือมีสารประกอบที่ตรวจพบเพิ่มขึ้นเป็น 5 ชนิด




**รูปที่ 4** สเปกโทรแกรมและลักษณะปรากฏของสารสกัดดอกเก๊กฮวยที่ได้จาก (ก) การสกัดผงดอกเก๊กฮวย 1.5 กรัม และ (ข) การสกัดผงดอกเก๊กฮวย 3.0 กรัม ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวด (SCE) ภายใต้ความดันที่แตกต่างกัน

ลักษณะปรากฏ (appearance) ของสารสกัดที่มีสีเหลืองมากยิ่งขึ้น เมื่อเพิ่มความดันในการสกัด และการสกัดผงดอกเก๊กฮวย 3.0 กรัม ทำให้ได้สารสกัดที่มีสีเหลืองมากที่สุด (รูปที่ 4) ยืนยันการเพิ่มขึ้นของสารสีเหลืองนี้ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี (spectrophotometry) เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดดอกเก๊กฮวยที่ความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร พบว่าสเปกโทรแกรม (spectrogram) ของสารสกัดมีการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันในความยาวคลื่น 320-380 นาโนเมตร ($OD_{320-380}$) และความยาวคลื่น 380-




**รูปที่ 5** ผลได้การสกัด (EY) ของการสกัดดอกเก๊กฮวยด้วยการแช่ (MTE) การเขย่า (SKE) การสกัดแบบซอกห์เลต (SLE) และการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดที่ใช่ผงดอกเก๊กฮวย 3.0 กรัม ในการสกัดภายใต้ความดัน 200 บาร์ (SCE-3.0-2) (สัญลักษณ์ $^{\alpha, \beta, \gamma}$ ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

480 นาโนเมตร ($OD_{380-480}$) ดังแสดงในรูปที่ 4ก โดยการสกัดผงดอกเก๊กฮวย 1.5 และ 3.0 กรัม เมื่อเพิ่มความดันการสกัดจาก 100 เป็น 200 บาร์ ค่าเฉลี่ย $OD_{320-380}$ มีการเพิ่มขึ้น 0.698±0.428 และ 1.646±0.779 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความดันการสกัดจาก 200 เป็น 300 บาร์ ค่าเฉลี่ย $OD_{320-380}$ มีการเพิ่มขึ้น 0.654±0.346 และ 0.466±0.316 ตามลำดับ ทั้งนี้จากกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert Law) ที่ว่า “เมื่อคงที่ระยะการเดินทางแสงของสารดูดซับค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารดูดซับที่เพิ่มขึ้น” (Swinehart, 1962) ดังนั้นการเพิ่มความดันการสกัดดอกเก๊กฮวยส่งผลให้ปริมาณสารประกอบที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 320-380 นาโนเมตร ($CP_{320-380}$) เพิ่มขึ้นเนื่องจากมีค่า $OD_{320-380}$ เพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มความดันการสกัดผงดอกเก๊กฮวย 3.0 กรัม จาก 100 เป็น 200 บาร์ ทำให้มีสาร $CP_{320-380}$ เพิ่มในสารสกัดมากที่สุด นอกจากนี้การเพิ่มความดันการสกัดดอกเก๊กฮวยจาก 200 เป็น 300 บาร์ ทำให้มีสารประกอบที่ดูดกลืนแสงในความยาวคลื่น 380-480 นาโนเมตร ($CP_{380-480}$) ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ที่เพิ่มในสารสกัด ดังแสดงในรูปที่ 4ก โดยสาร $CP_{380-480}$ ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดที่ใช้ผงดอกเก๊กฮวยปริมาณ 1.5 และ 3.0 กรัม ทำให้มีค่าเฉลี่ย $OD_{380-480}$ เพิ่มขึ้น 0.441±0.094 และ 0.374±0.124 ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มความดันการสกัดผงดอกเก๊กฮวย 1.5 กรัม จาก 200 เป็น 300 บาร์ ทำให้มีสาร $CP_{320-380}$ เพิ่มเข้ามาในสารสกัดมากที่สุด

**3.3 อิทธิพลวิธีการสกัดต่อผลได้การสกัดของการสกัดดอกเก๊กฮวย**

การศึกษาอิทธิพลของวิธีการสกัดดอกเก๊กฮวยต่อผลได้การสกัดเปรียบเทียบวิธีสกัดแบบแช่ (MTE) วิธีสกัดแบบเขย่า (SKE) วิธีสกัดแบบซอกห์เลต (SLE) และวิธีสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดที่ใช่ผงดอกเก๊กฮวย 3.0 กรัม ภายใต้ความดัน 200 บาร์ (SCE-3.0-2) ซึ่งมีผลได้การสกัดดังแสดงในรูปที่ 5 ซึ่งเห็นได้ว่า SLE ทำให้สารสกัดมีผลได้การสกัดสูงสุดร้อยละ 23.09 และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลได้การสกัดจากวิธีสกัด SLE กับวิธีการสกัดอื่น ๆ ได้แก่ MTE, SKE และ SCE-3.0-2 ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวโดยใช้วิธี Tukey’s HSD พบว่ามีค่า p เป็น 0.0011, 0.0032 และ 0.0000 ตามลำดับ เนื่องจากการสกัดด้วยวิธี SLE มีการสกัดซ้ำแบบต่อเนื่องประมาณ 30 รอบ (8 ชั่วโมง) หรือจนกว่าตัวทำละลายมีลักษณะใส ส่วนอันดับถัดมาเป็น SKE และ MTE ที่ทำให้สารสกัดมีผลได้การสกัดไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อย่างไรก็ตาม SKE (1 วัน) ใช้เวลาในการสกัดเร็วกว่า MTE (3 วัน) เนื่องจากมีการใช้เครื่องเขย่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลจนกระทั่งตัวทำละลาย

มีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับความเข้มข้นของสารสกัดภายในโครงสร้างผงดอกเก๊กฮวย ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องมีการสกัดซ้ำเพื่อเพิ่มผลได้การสกัดให้สูงขึ้น ส่วน SCE-3.0-2 มีผลได้การสกัดน้อยที่สุด ร้อยละ 0.05 เนื่องจากใช้อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดผ่านผงดอกเก๊กฮวยเพียง 10 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้เวลาการสกัดเพียง 1 ชั่วโมงเท่านั้น หากเพิ่มอัตราการไหลร่วมกับการเพิ่มเวลาในการสกัด อาจทำให้มีผลได้การสกัดที่มากขึ้น หรืออาจมีการเพิ่มปริมาณผงดอกเก๊กฮวยที่ใช้สกัดให้มากขึ้น เพื่อเพิ่มปริมาณสารที่สามารถสกัดออกมาได้โดยใช้เวลาสกัดที่สั้น

## 4. สรุป

การสกัดพืชสมุนไพรด้วยวิธีแช่ทำให้การสกัดดอกเก๊กฮวยมีผลได้การสกัดสูง แต่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำ ส่วนสารสกัดดอกกานพลูตูมนั้นมีฤทธิ์การต้านอุมูลอิสระสูงและมีผลได้การสกัดอยู่ในระดับปานกลาง ดังนั้นจึงสกัดดอกเก๊กฮวยด้วยวิธีต่าง ๆ รวมถึงวิธีสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวด ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อให้ได้สารสกัดดอกเก๊กฮวยที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น ทั้งนี้การเพิ่มความดันในการสกัดดอกเก๊กฮวยด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดมีอิทธิพลทำให้ผลได้การสกัดและประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระของสารสกัดเพิ่มขึ้น เนื่องจากความดันที่เพิ่มขึ้นทำให้ความหนาแน่นของคาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้น ส่งผลให้สารประกอบต่าง ๆ ละลายได้ดีขึ้น และยังละลายสารประกอบออกมาจากดอกเก๊กฮวยได้หลากหลายชนิดมากขึ้น รวมทั้งทำให้สารสกัดดอกเก๊กฮวยมีลักษณะเป็นสีเหลืองมากขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม การสกัดดอกเก๊กฮวยด้วยวิธีสกัดแบบซอกห์เลตมีผลได้การสกัดสูงที่สุดภายในระยะเวลาสั้น เนื่องจากมีการสกัดซ้ำแบบต่อเนื่องจนกว่าตัวทำละลายมีลักษณะใส ส่วนการสกัดด้วยวิธีเขย่าช่วยลดระยะเวลาในการสกัดลง เนื่องจากมีการแรงเชิงกลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเทมวล แต่ควรมีการสกัดซ้ำเพื่อเพิ่มผลได้การสกัดให้สูงขึ้น โดยการเพิ่มผลได้การสกัดดอกเก๊กฮวยให้สูงขึ้น ควรเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดผ่านผงดอกเก๊กฮวย เพิ่มเวลาในการสกัดให้มากขึ้น และเพิ่มปริมาณผงดอกเก๊กฮวยที่ใช้สกัดให้มากขึ้น

## 5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่จัดสรรทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2560 เพื่อดำเนินงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณ งานบริการตรวจวิเคราะห์ หน่วยภูมิปัญญาทางเภสัชศาสตร์ “ประโชติ เปล่งวิทยา” คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ สำหรับความเอื้อเฟื้อในการให้บริการเครื่องมือวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้

## 6. รายการอ้างอิง

กลุ่มยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, แผนยุทธศาสตร์การป้องกันและควบคุมโรคไม่ติดต่อระดับชาติ 5 ปี (พ.ศ. 2560-2564), แหล่งที่มา : http://www.searo.who.int/thailand/areas/national-ncd-prevention-and-control-plan-2017-2021-tha.pdf, 16 กันยายน 2561.

โกสินทร์ วิระษร, กุลธิดา กล้ารอด, ประณิธิ หงส์ประภาส, พัชรี บุญศิริ, 2557, ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลและสารต้านออกซิเดชั่นกับโรคมะเร็ง, ศรีนครินทร์เวชสาร 29(2): 207-219.

Barroso, M.S.T., Villanueva, G., Lucas, A.M., Perez, G.P., Vargas, R.M.F., Brun, G.W. and Cassel, E., 2011, Supercritical fluid

extraction of volatile and non-volatile compounds from *Schinus molle* L., Braz. J. Chem. Eng. 28: 305-312.

Burt, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review, Int. J. Food Microbiol. 94: 223-253.

Cheynier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V. and Martens, S., 2013, Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology, Plant Physiol. Bioch. 72: 1-20.

Chin, Y.W., Jung, H.A., Liu, Y., Su, B.N., Castoro, J.A., Keller, W.J., Pereira, M.A. and Kinghorn, A.D., 2007, Anti-oxidant constituents of the roots and stolons of licorice (*Glycyrrhiza glabra*), J. Agric. Food. Chem. 55: 4691-4697.

Chunthorng-Orn, J., Panthong, S. and Itharat, A., 2012, Antimicrobial, antioxidant activities and total phenolic content of Thai medicinal plants used to treat HIV patients, J. Med. Assoc. Thai. 95(1): 154-158.

Cortés-Rojas, D.F., de Souza, C.R.F. and Oliveira, W.P., 2014, Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 4(2): 90-96.

Gamez, E.J.C., Luyengi, L., Lee, S.K., Zhu, L.F., Zhou, B.N. and Fong, H.H.S., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 1998, Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*, J. Nat. Prod. 61: 706-708.

Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J., Apone, F., Abdel-Salam, E., Qahtan, A., Alatar, A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J.F., Siddiqui, K., Hernández-Sotomayor, S. and Faisal, M., 2018, Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists, Genes 9: 309.

Hansakul, P., Srisawat, U., Itharat, A. and Lerdvuthisopon, N., 2011, Phenolic and flavonoid contents of Thai rice extracts and their correlation with antioxidant activities using chemical and cell assays, J. Med. Assoc. Thai. 94(7): 122-130.

He, J., Wu, X., Kuang, Y., Wang, T., Bi, K. and Li, Q., 2016, Quality assessment of *Chrysanthemum indicum* flower by simultaneous quantification of six major ingredients using a single reference standard combined with HPLC fingerprint analysis, Asian J. Pharm. Sci. 11: 265-272.

Hyun, T.K., Kim, H.C. and Kim, J.S., 2014, Antioxidant and antidiabetic activity of *Thymus quinquecostatus* Celak, Ind. Crops Prod. 52: 611-616.

Kim, K.J., Yu, H.H., Jeong, S.I., Cha, J.D., Kim, S.M. and You, Y.O., 2004, Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococ cus aureus*, J. Ethnopharmacol. 91: 81-87.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M.E. and Gardini, F., 2004, Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits, Trends Food Sci. Technol. 15: 201-208.

Lee, Y.C., Chuah, A.M., Yamaguchi, T., Takamura, H. and Matoba, T., 2008,

Antioxidant activity of traditional Chinese medicinal herbs, Food Sci. Technol. Res. 14: 205-210.

Lin, L.Z. and Harnly, J.M., 2010, Identification of the phenolic components of chrysanthe mum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat), Food Chem. 120: 319-326.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N., 2010, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, Pharmacogn. Rev. 4: 118-126.

Mitani, K., Takano, F., Kawabata, T., Allam, A.E., Ota, M., Takahashi, T., Yahagi, N., Sakurada, C., Fushiya, S. and Ohta, T., 2012, Suppression of melanin synthesis by the phenolic constituents of sappanwood (*Caesalpinia sappan*), Planta Med. 79: 37-44

Nesar, A., Noorul, H., Khalid, M., Juber, A., Mujahid, M., Badruddin, Anuradha M. and Nazma K., 2016, *Glycyrrhiza glabra*: For traditional uses and pharmacological actions, Adv. J. Pharm. Life Sci. Res. 4(2): 23-32.

Ngawhirunpat, T., Opanasopi, P., Sukma, M., Sittisombut, C., Kat, A. and Adachi, I., 2010, Antioxidant, free radical-scavenging activity and cytotoxicity of different solvent extracts and their phenolic constituents from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana*), Pharm. Biol. 48: 55-62.

Panchinda, C., Ruangnoo, S. and Itharat, A., 2016, Cytotoxic activity against cancer cell lines from the ethanolic extracts and its VLC fractions of *Bauhinia strychnifolia* leaves, J. Med. Assoc. Thai. 99(7): 110-115.

Przygodzka, M., Zielińska, D., Ciesarová, Z., Kukurová, K. and Zieliński, H., 2014, Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices. LWT-Food Sci. Technol. 58: 321-326.

R Core Team, 2017, R: A language and environment for statistical computing.

Reverchon, E., 1997, Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, J. Supercrit. Fluids 10: 1-37.

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C. and Gerhard, D., 2015, Dose-response analysis using R, PLOS ONE 10(12): e0146021.

Sapkale, G.N., Patil, S.M., Surwase, U.S. and Bhatbhage, P.K., 2010, Supercritical fluid extraction, Swinehart, D.F., 1962, The Beer-Lambert law, J. Chem. Educ. 39: 333.

Worawattananutai, P., Itharat, A. and Ruangnoo, S., 2014, *In vitro* antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic activities against prostate cancer of extracts from *Hibiscus sabdariffa* leaves. J. Med. Assoc. Thai. 97(Suppl. 8): S81-S87.

Yoshikawa, M., Morikawa, T., Toguchida, I., Harima, S. and Matsuda, H., 2000, Inhibitors of nitric oxide production and absolute stereostructures of five new germacrane-type sesquiterpenes, mikkanols D, D monoacetate, E, F, and F monoacetate from the flowers of *Chrysanthemum indicum*, Chem. Pharm. Bull. 48: 651-656.