

การสกัดสารแคนนาบินอยด์จากพืชสมุนไพรกัญชา สายพันธุ์บลูเบอร์รี่ ด้วยระบบสนามไฟฟ้าพัลส์

Cannabinoids Extraction from Cannabis Cultivar Blueberry by Pulsed Electric Field

ณัฐณกรณ พันธ์มรรธการกุล¹, รสกรพัฒน์ หิรัญญะสิริ¹, รวีโรจน์ จินตวิวัฒน์¹,
วรารัตน์ ตี๋วงศ์¹, ธนะชัย พันธเกษมสุข¹, เจริญ หล่อวิมจล², จริญญา เทพพรบัญชากิจ³,
อาทิตยา กาวี้อย¹, ศุภเกียรติ์ สุภสินธุ์^{1,*}

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และพืชสมุนไพรเพื่อการพัฒนาท้องถิ่น บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยพายัพ เชียงใหม่ 50000

²วิทยาลัยนานาชาติ มหาวิทยาลัยพายัพ เชียงใหม่ 50000

³สาขาวิชาการบริหารการศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยพายัพ เชียงใหม่ 50000

Natnakorn Punamontarakul¹, Rossakornpat Hirunyasiri¹, Raweeroj Jintawiwat¹,
Wararat Tawong¹, Tanachai Pankasemsuk¹, Rien Loveemongkol²,
Jarunya Thepphornbanchakit³, Arthitaya Kawee-ai¹, Supakiat Supasin^{1,*}

¹Division of Cannabis and Medicinal Plants for Local Development, Graduate School, Payap University,
Chiang Mai 50000

²International College, Payap University, Chiang Mai 50000

³Educational Administration Department, Graduate School, Payap University, Chiang Mai 50000

Received 28 November 2024; Received in revised 3 January 2024; Accepted 1 February 2024

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแคนนาบินอยด์ delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) และสารแคนนาบินอยด์รวม (total cannabinoids) ของพืชสมุนไพรกัญชาสายพันธุ์บลูเบอร์รี่ ด้วยเทคนิคสนามไฟฟ้าพัลส์ และประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองออกแบบการทดลองแบบ Box Behnken เพื่อหาผลของตัวแปรอิสระ 3 ปัจจัย คือ จำนวนพัลส์ (pulse numbers) ที่ระดับ 100-300 ค่าความเข้มกระแสไฟฟ้า (pulse intensity) ที่ระดับ 5-10 kV/cm และอัตราส่วนวัตถุดิบต่อสารละลาย (ratio) ที่ระดับ 1: 20-1:40 และเปรียบเทียบปริมาณสารแคนนาบินอยด์ระหว่างการสกัดด้วยเทคนิคสนามไฟฟ้าพัลส์ กับการสกัดสารในระบบดั้งเดิม ผลการศึกษา พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสาร THC และสารแคนนาบินอยด์รวม คือ 300 จำนวนพัลส์ ความเข้มสนามไฟฟ้า 7.5 kV/cm และอัตราส่วนสมุนไพรต่อสารละลาย 1:20 สามารถสกัดสาร THC ได้สูงสุด

*ผู้รับผิดชอบบทความ: supakiat_31@hotmail.com

doi: 10.14456/tstj.2024.17

254.77±11.01 mg/g และสารแคนนาบินอยด์รวม 270.98±11.96 mg/g เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดสารสมุนไพร กัญชาแบบดั้งเดิมโดยวิธีการแช่ พบว่าการสกัดสารแคนนาบินอยด์ด้วยระบบสนามไฟฟ้าพัลส์ให้ปริมาณสาร แคนนาบินอยด์ THC และสารแคนนาบินอยด์รวม สูงกว่าคิดเป็น 20.13% และ 22.69% ตามลำดับ รวมทั้งใช้ระยะเวลาในการสกัดน้อยกว่าถึง 88.9% ดังนั้นการสกัดสารแคนนาบินอยด์ด้วยเทคนิคสนามไฟฟ้าพัลส์สามารถใช้เป็น แนวทางการสกัดสารสำคัญจากพืชกัญชา มีประสิทธิภาพและมีคุณภาพสูงในการสกัดสารแคนนาบินอยด์ต่อไป

คำสำคัญ: สมุนไพรกัญชา; สารแคนนาบินอยด์; การสกัด; ระบบสนามไฟฟ้าพัลส์

Abstract

The aims of this study were to define the optimum conditions for pulsed electric field extraction of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and total cannabinoids of the *Cannabis sativa* L. (Blueberry variety) and to apply the response surface method to design a Box Behnken experiment to investigate the effects of three independent variables: pulse numbers at levels 100-300, pulse intensity at 5-10 kV/cm, and the solution ratio at 1:20-1:40. The best yield result was then compared with the traditional maceration extraction method. The experiments found that the optimum conditions for extracting THC and total cannabinoids were 300 pulses, a pulse intensity of 7.5 kV/cm, and a solution ratio of 1:20. The maximum THC content was 254.77±11.01 mg/g, and the total cannabinoids content was 270.98±11.96 mg/g, which were higher than those obtained by maceration by 20.13% and 22.69%, respectively. Moreover, the extraction time was significantly shorter, by 88.9%. Therefore, the extraction of cannabinoids using the pulsed electric field technique can be an effective method for extracting high-value phytochemicals from cannabis, offering both efficiency and higher quality.

Keywords: Cannabis; Cannabinoids; Extraction; Pulsed electric field

1. บทนำ

กัญชามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis* spp. ในวงศ์ Cannabaceae เป็นพืชที่มนุษย์รู้จักใช้ประโยชน์มาอย่างยาวนาน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียแล้วแพร่ไปทั่วโลก [1] สารประกอบเคมีในกัญชาที่สำคัญคือสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) เช่น Cannabidiol (CBD), delta-8-Tetrahydrocannabinol (delta 8-THC), delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabichromene (CBC), Cannabigerol (CBG), Cannabinol (CBN), Cannabicyclol (CBL), Tetrahydrocannabivarin (THCV) และสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ [2] เป็นต้น ในทางการแพทย์แผนไทย กัญชามีส่วนที่ใช้เป็นตัวยาในตำรับยาเกือบทุกส่วน ไม่ว่าจะเป็นราก ก้านใบ ใบ และเรื้อนยอดช่อดอกเพศเมีย ตำราสรรพคุณยาไทย ระบุว่า กัญชา มีรสเมาเบื่อ มีสรรพคุณแตกต่างกันตามส่วนที่ใช้ เช่น ใบมีสรรพคุณแก้หอบหืด เจริญอาหาร ชูกำลัง เป็นต้น แต่ทำให้จิตใจขลาดกลัว ตาตาย ประสาทหลอน ดอกมีสรรพคุณแก้โรคประสาท ทำให้นอนหลับ เจริญอาหาร กัดเสมหะในคอ เป็นต้น [3] โดยขั้นตอนสำคัญในกระบวนการนำกัญชามาใช้ในทางการแพทย์นั้น คือการแยกสารแคนนาบินอยด์ออกจากส่วนของพืชกัญชาหรือที่เรียกกันว่าการสกัดสาร (Extraction) [4]

เทคนิคการสกัดสารแบบดั้งเดิม เช่น การแช่ การดอง การต้ม การบด เครื่องกวนด้วยแม่เหล็ก การซึมผ่านของน้ำ การกลั่น จะมีข้อบกพร่องและข้อจำกัด คือใช้ระยะเวลานาน ปริมาณสารสำคัญที่ได้จากการสกัดน้อย ใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก และรวมถึงความเสี่ยงของการสลายตัวของสารสำคัญจากพืชที่ทนความร้อนต่ำ และเพื่อเอาชนะข้อบกพร่องของเทคนิคการสกัดแบบดั้งเดิมที่กล่าวถึงข้างต้น จึงมีการวิจัยเทคนิคใหม่ ๆ มากมาย เช่น การสกัดโดยใช้อัลตราซาวด์ (UAE) การสกัดด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ (PEF) การสกัดด้วยเอนไซม์ช่วย (EAE) การสกัดโดยใช้ไมโครเวฟช่วย (MAE) การสกัดด้วยของเหลว (PLE), การสกัดของเหลวเหนือวิกฤต

(SFE), การสกัดด้วยตัวทำละลายแรง (ASE) [5] การสกัดด้วยระบบสนามไฟฟ้าพัลส์ (PEF) เป็นการใช้พัลส์แบบช่วงสั้น ๆ ระดับนาโนวินาที ถึง มิลลิวินาที โดยจะให้ความเข้มสนามไฟฟ้าจาก 100-300 V/cm ถึง 10-50 kV/cm สนามไฟฟ้าพัลส์เป็นวิธีการสกัดแบบใหม่ รวดเร็ว มีประสิทธิภาพและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนช่วยและทำให้ชิ้นส่วนพืชสมุนไพรกัญชาสามารถถูกซึมผ่านเพื่อปล่อยน้ำมันออกมาได้ง่าย [6, 7]

ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารแคนนาบินอยด์ในพืชกัญชาสายพันธุ์บลูเบอร์รี่ ด้วยเทคนิคสนามไฟฟ้าพัลส์ โดยทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยการออกแบบการทดลองแบบ Box Behnken ซึ่งการวิจัยนี้อาจเป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตสารสกัดในกลุ่มแคนนาบินอยด์ของพืชกัญชาได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชสมุนไพรกัญชาและการเตรียม

ช่อดอกแห้งพืชสมุนไพรกัญชาสายพันธุ์บลูเบอร์รี่ที่ใช้ในการวิจัยนำมาจากร้าน Canna N' Rossa อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

2.1.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการสกัดโดยวิธี การแช่ (maceration)

นำช่อดอกกัญชาแห้งมาทำให้มีขนาดเล็กด้วยวิธีการฉีก แล้วนำเข้าเตาอบลมร้อน (Memmert, Germany) เพื่อทำการ decarboxylation ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที [8] จากนั้นปั่นด้วยเครื่องปั่น (Dade รุ่น DFT-200, Thailand) ให้มีขนาด 30-200 mesh แล้วนำไปแช่ในสารละลายเอทานอล แอลกอฮอล์ 95% ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลายที่ 1:20

2.1.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการสกัดโดยระบบสนามไฟฟ้าพัลส์ (Pulsed Electric Field)

นำช่อดอกกัญชาแห้งมาทำให้มีขนาดเล็กด้วยวิธีการฉีก แล้วนำเข้าเตาอบลมร้อน (Memmert, Germany) เพื่อทำการ decarboxylation ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที [8] จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง

ปิ่น (Dade รุ่น DFT-200, Thailand) ให้มีขนาด 30-200 mesh แล้วนำไปผสมกับสารละลายเอทานอลแอลกอฮอล์ 95% ในอัตราส่วนตามค่าปัจจัยสำหรับการทดลอง และเทใส่ห้องบำบัด (chamber) เครื่อง PEF-US

2.2 เครื่องสกัดสารสมุนไพรพลังงานร่วมสนามไฟฟ้าพัลส์และอัลตราโซนิก (PEF-US)

ต้นแบบเครื่อง PEF-US ได้รับการออกแบบและสร้างขึ้นที่ ศูนย์วิจัยการผลิตรายการจากกัญชาและพืชสมุนไพรโดยปฏิกิริยาชีวภาพ (RPAH) มหาวิทยาลัยพายัพ เชียงใหม่ ประเทศไทย (Figure 1) โครงสร้างอุปกรณ์ PEF-US ประกอบด้วยเครื่องกำเนิดไฟฟ้าแรงสูง เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้าพัลส์ ก้านอัลตราโซนิก ห้องบำบัด และปั๊มลม อุปกรณ์เครื่องนี้สามารถใช้งานได้สี่โหมดคือ PEF, US, US+PEF และ PEF+US

เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้าพัลส์สามารถให้แรงดันไฟฟ้าสูงสุด 20 kV เครื่องกำเนิดไฟฟ้านี้มีพัลส์รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าแบบชั่วคราว มีหน้าจอสัมผัสแบบดิจิทัลเพื่อควบคุมความเข้มกระแสไฟฟ้า ความถี่ และระยะเวลา

ของพัลส์ ห้องบำบัดประกอบด้วยตัวเรือนโพลีโพรพิลีนและอิเล็กโทรดสแตนเลสสตีลสองตัว อิเล็กโทรดถูกวางขนานกันภายในห้องบำบัด โดยคั่นด้วยช่องว่าง 100 มม. ปริมาตรห้องบำบัดคือ 5 ลิตร [9]

2.3 การศึกษาปัจจัยที่ใช้ในการสกัดของพืชสมุนไพรกัญชาของระบบสนามไฟฟ้าพัลส์

ปัจจัยที่ศึกษา 3 ปัจจัย คือ 1) จำนวนพัลส์ (Pulse numbers) ที่ระดับช่วง 100 ถึง 300 พัลส์ 2) ค่าความเข้มกระแสไฟฟ้า (Pulse Intensity) ที่ระดับช่วง 5 ถึง 10 kV/cm และ 3) อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อสารละลาย (Ratio) ที่ช่วง 1:20 ถึง 1:40 ดังแสดงใน Table 1 ประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองออกแบบการทดลองแบบ Box Behnken ได้ 14 การทดลอง ดังแสดงใน Table 2

เมื่อสิ้นสุดการปล่อยกระแสไฟฟ้าพัลส์จึงนำตัวอย่างที่ได้มารองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 และนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์สาร 1) delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) 2) Total Cannabinoids ด้วยเครื่อง UHPLC MS/MS ต่อไป



Figure 1 The prototype of pulsed electric field (PEF) apparatus.

Table 1 Levels of the factors studied

	Pulse Numbers	Pulse Intensity (kV/cm)	Ratio
-1	100	5	20
0	200	7.5	30
+1	300	10	40

Table 2 Data of THC and total cannabinoids extract with pulsed electric field identified by UHPLC MS/MS

No	Pulse Numbers (X ₁ , A)	Intensity (X ₂ , B)	Ratio (X ₃ , C)	THC (mg/g)	Total Cannabinoids (mg/g)
1	100	5	30	163.52±10.43	173.93±11.12
2	300	5	30	110.61±3.11	118.77±3.29
3	100	10	30	116.13±2.15	123.80±2.66
4	300	10	30	121.28±2.20	129.85±4.25
5	100	7.5	20	210.55±15.77	224.33±17.13
6	300	7.5	20	254.77±11.01	270.98±11.96
7	100	7.5	40	131.94±0.81	140.29±1.28
8	300	7.5	40	149.73±2.04	160.56±2.29
9	200	5	20	230.46±4.88	248.69±6.07
10	200	10	20	180.42±18.64	192.26±19.74
11	200	5	40	142.75±2.53	152.05±2.95
12	200	10	40	109.81±4.19	116.73±4.55
13	200	7.5	30	95.69±4.32	101.96±4.85
14	200	7.5	30	107.87±14.08	114.54±14.93

2.4 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC MS/MS

นำสารสกัดมากรองตัวอย่างด้วย nylon filter ที่มีรูขนาด 0.45 μm และเจือจางตัวอย่าง 100 เท่าด้วย เอทานอล 95% นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณ สาร THC และปริมาณแคนนาบินอยด์รวม ด้วยเครื่อง Ultra-High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) การแยกส่วนจะผ่านคอลัมน์ Quasar SPP C18 (100 $\times$ 2.1 mm, 2.6 μm –PerkinElmer, Buckinghamshire, UK) ที่อุณหภูมิ 30°C ด้วย สารละลาย mobile phase 2 ชนิด คือ

Mobile phase A คือ 0.1% Formic Acid + Water (LC–MS grade)

Mobile phase B คือ 0.1% Formic Acid + Methanol (LC–MS grade)

ตั้งการแยกแบบ Gradient program ที่ 0-1 นาที, 25% B; 1-3 นาที, 30% B; และ 3-4 นาที, 25% B รวมเป็นเวลา 1.22 นาที บันทึกผลและรายงานผลการ วิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณเปรียบเทียบกับ สารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ของสารกลุ่ม Cannabinoids ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ประกอบไปด้วยสาร THC และ CBD เตรียม ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน โดยแบ่งเป็น 2 ช่วง ดังนี้

- 1) Calibration curve 1,2.5, 5,10, 25 และ 50 ppm
- 2) Calibration curve 50, 100, 250 และ 500 ppm

2.5 การแปรผลด้วยโปรแกรมทางสถิติ

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (standard deviation) เมื่อทำการทดลองสกัด สาร THC และแคนนาบินอยด์รวมจากกัญชาสายพันธุ์ บลูเบอร์รี่ โดยใช้เทคนิคสกัดด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ทั้ง 14 การทดลองแล้วนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความ ถูกต้องของแบบจำลองการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของ การตัดสินใจ (R-Square) และการวิเคราะห์ความ แปรปรวน (ANOVA) เพื่อนำมาสร้างสมการทำนาย ปริมาณสาร THC และแคนนาบินอยด์รวมที่สกัดได้โดย นำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของ สมการถดถอยของปริมาณสาร THC และแคนนาบินอยด์ รวมมาเขียนให้อยู่ในรูปของสมการดังสมการที่ 1

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (1)$$

เมื่อ Y คือผลการตอบสนองได้แก่ปริมาณสาร THC และแคนนาบินอยด์รวม, X_1 , X_2 , X_3 คือตัวแปร อิสระหรือปัจจัยที่ศึกษา, β_0 คือค่าคงที่สมการ, β_1 , β_2 , β_3 คือสัมประสิทธิ์สมการเส้นตรง, β_{12} , β_{13} , β_{23} คือ สัมประสิทธิ์สมการปฏิสัมพันธ์และ β_{11} , β_{22} , β_{33} คือ สัมประสิทธิ์สมการกำลังสองเมื่อได้สมการทำนายปริมาณ สาร THC และแคนนาบินอยด์รวมที่สกัดได้จากกัญชา สายพันธุ์ Blueberry โดยใช้เทคนิคสกัดด้วยสนามไฟฟ้า พัลส์แล้วจึงนำมาสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองของ

ปริมาณสาร THC และแคนนาบินอยด์รวมที่สกัดได้เทียบ กับปัจจัยที่ใช้ในการทดลองทั้ง 3 ปัจจัยโดยใช้โปรแกรม สำเร็จรูปทางสถิติ SPSS (version 18, IBM, USA) เพื่อ หาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดปริมาณสาร THC และ แคนนาบินอยด์รวมมากที่สุดและอยู่ภายใต้ระดับของค่า ปัจจัยในการทดลอง

การเปรียบเทียบระหว่างวิธีสกัด 2 วิธีการ ทดสอบด้วยสถิติ t-test ประเมินด้วยการทดสอบแบบ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ปริมาณสารแคนนาบินอยด์

ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ที่สกัดได้ด้วยระบบสนามไฟฟ้าพัลส์ ได้ผลการวิเคราะห์ดัง Table 2 ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ THC และ Total Cannabinoids ด้วยเครื่อง UHPLC-MS/MS พบว่า เมื่อใช้ค่าปัจจัย ความถี่ (pulse numbers) ที่ 300, ความเข้มสนามไฟฟ้า (intensity) ที่ 7.5 และอัตราส่วนสมุนไพรต่อสารละลาย (ratio) ที่ 1:20 สามารถสกัดสาร THC ได้สูงสุด 254.77 ± 11.01 mg/g และได้ปริมาณสารแคนนาบินอยด์รวม (total cannabinoids) 270.98 ± 11.96 mg/g ในขณะที่การสกัดด้วยค่าปัจจัย ความถี่ (pulse numbers) ที่ 200, ความเข้มสนามไฟฟ้า (intensity) ที่ 7.5 และอัตราส่วนสมุนไพรต่อสารละลาย (ratio) ที่ 1:30 ให้ผลปริมาณสาร THC น้อยสุดที่ 95.69 ± 4.32 mg/g สารแคนนาบินอยด์รวมน้อยสุดที่ 101.96 ± 4.85 mg/g

ความสามารถในการสกัดสารของระบบสนามไฟฟ้าพัลส์สามารถอธิบายได้ด้วยทฤษฎี electroporation คือ การใช้แรงไฟฟ้าภายนอก ซึ่งช่วยเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ อาหารหรือชิ้นส่วนที่ต้องการสกัดอื่น ๆ จะอยู่ระหว่างอิเล็กโทรดและสนามไฟฟ้าแรงสูง เยื่อหุ้มเซลล์ถูกเจาะโดยการสร้างรูโหว่สำหรับน้ำซึ่งเปิดช่องโปรตีน ตัวอย่างประสพกับแรงต่อหน่วยประจุที่เรียกว่าสนามไฟฟ้าเมื่อพัลส์ไฟฟ้าแรงสูงผ่านอิเล็กโทรด เยื่อหุ้มจะสูญเสียรูปแบบของโครงสร้างและสารสำคัญจากพืชจะถูกสกัดออกมา [10, 11]

แทนค่าลงตามสมการที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pulse numbers (A), intensity (B) และ ratio (C) ต่อสารประกอบ THC และ Total Cannabinoids ของพืชกัญชาสายพันธุ์บลูเบอร์รี่ ด้วยระบบสนามไฟฟ้าพัลส์ แสดงใน Table 3

เมื่อนำสมการที่ได้นี้ไปสร้างแผนภาพสามมิติ (3D surface plot) จะได้แผนภาพสามมิติดัง Figure 2 & 3

Table 3 Equation of the relationship among pulse numbers (A), intensity (B) และ ratio (C)

Cannabinoids	Equation	p-values	Adj. R ²
THC	+1022.360251.13531- Pulsed number-29.94008 Intensity-40.63956 Ratio+0.051689 Pulsed number * Intensity-0.006607 Pulsed number * Ratio+0.170970 Intensity * Ratio+0.002429 Pulsed number ² 0.544680+ Intensity ² 0.606735+ Ratio ²	0.0306	0.8208
Total Cannabinoids	+1108.964881.22121- Pulsed number-34.58440 Intensity-43.80929 Ratio+0.054895 Pulsed number * Intensity-0.006539 Pulsed number * Ratio+0.208310 Intensity * Ratio+0.002589 Pulsed number ² 0.697620+ Intensity ² 0.649559+ Ratio ²	0.0290	0.8328

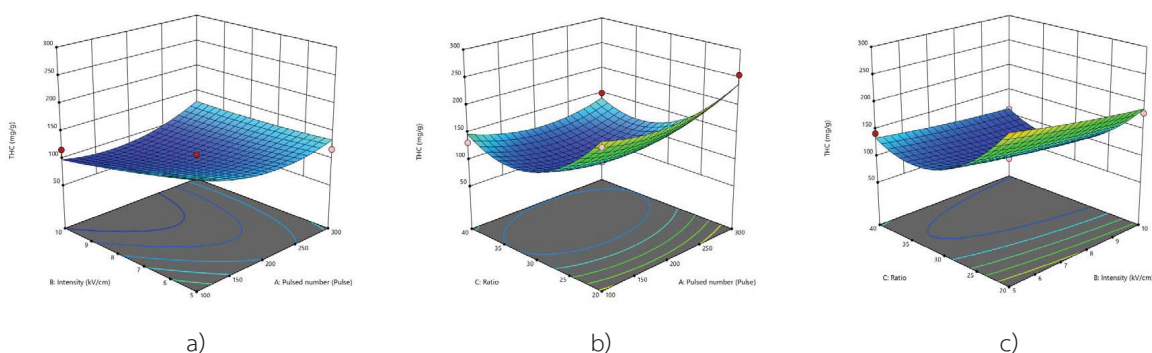


Figure 2 3D surface plot showing the relationship between pulse numbers (A), intensity (B) and ratio (C) to cannabinoid THC of cannabis Blueberry cultivar extracted by pulsed electric field (A). (a) the relationship between (A) and (B), (b) the relationship between (A) and (C), and (c) the relationship between (B) and (C)

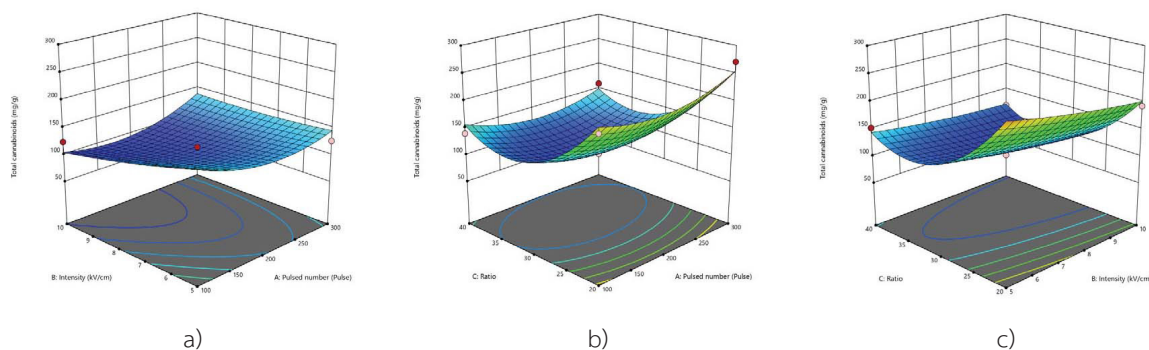


Figure 3 3D surface plot showing the relationship between pulse numbers (A), intensity (B) and ratio (C) to cannabinoid Total Cannabinoids of cannabis Blueberry cultivar extracted by pulsed electric field (A). (a) the relationship between (A) and (B), (b) the relationship between (A) and (C), and (c) the relationship between (B) and (C).

Figure 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย pulse numbers (A), intensity (B) และ ratio (C) ต่อสาร THC การเพิ่มปริมาณของ pulse numbers (A) กับ intensity (B) จะทำให้ปริมาณสาร THC เพิ่มขึ้น ดัง Figure 2 (a) ส่วนการเพิ่ม pulse numbers (A) กับ ratio (C) จะทำให้ปริมาณสาร THC ลดลงดัง Figure 2 (b) การเพิ่มปริมาณของ intensity (B) กับ ratio (C) จะทำให้ปริมาณสาร THC เพิ่มขึ้น ดัง Figure 2 (c)

Figure 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย pulse numbers (A), intensity (B) และ ratio (C) ต่อสาร Total Cannabinoids การเพิ่มปริมาณของ pulse numbers (A) กับ intensity (B) จะทำให้ปริมาณสาร Total Cannabinoids เพิ่มขึ้นดัง Figure 3 (a) ส่วนการเพิ่ม pulse numbers (A) กับ ratio (C) จะทำให้ปริมาณสาร Total Cannabinoids ลดลงดัง Figure 3 (b) การเพิ่มปริมาณของ intensity (B) กับ ratio (C)

จะทำให้ปริมาณสาร Total Cannabinoids เพิ่มขึ้น ดัง Figure 3 (c)

3.2 การเปรียบเทียบการสกัดสารแคนนาบินอยด์ด้วยวิธีการแช่และสนามไฟฟ้าพัลส์

วิธีการสกัดสารสมุนไพรกัญชาแบบดั้งเดิมโดยวิธีการแช่ (maceration) ในสารละลาย เอทานอล 95% อัตราส่วน 1:20 แช่ทิ้งไว้ในบีกเกอร์ที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 45 นาที [12] ได้ปริมาณสาร THC ที่ 203.48 ± 6.29 mg/g และได้ปริมาณสารแคนนาบินอยด์รวม (total cannabinoids) 216.46 ± 7.17 mg/g และได้ทำการเปรียบเทียบดังแสดงผลใน Table 4

การใช้ระบบสนามไฟฟ้าพัลส์ทำให้ได้ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ THC และ Total cannabinoids สูงกว่าการสกัดสารสมุนไพรกัญชาแบบดั้งเดิมโดยวิธีการแช่ 20.13% และ 22.69% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังใช้เวลาการสกัดน้อยกว่าถึง 88.9% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้ระบบสนามไฟฟ้าพัลส์สามารถช่วยลดระยะเวลาในการสกัด และเพิ่มปริมาณสารแคนนาบินอยด์จากช่อดอกกัญชาสายพันธุ์ลูเบอร์รี่ได้

4. สรุปผลการทดลอง

การวิจัยนี้ประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง ออกแบบการทดลองแบบ Box Behnken โดยมีตัวแปรอิสระ 3 ปัจจัย คือ จำนวนพัลส์ (pulse numbers)

ที่ระดับ 100-300 ค่าความเข้มกระแสไฟฟ้า (pulse intensity) ที่ระดับ 5-10 kV/cm และอัตราส่วนวัตถุดิบต่อสารละลาย (ratio) ที่ระดับ 1:20-1:40 วิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ด้วยเครื่อง UHPLC และเปรียบเทียบปริมาณสารแคนนาบินอยด์ที่ได้ระหว่างการสกัดด้วยเทคนิคสนามไฟฟ้าพัลส์ กับการสกัดในระบบดั้งเดิม

การศึกษพบว่าการใช้ค่าปัจจัยความถี่ (pulse numbers) ที่ 300, ความเข้มสนามไฟฟ้า (intensity) ที่ 7.5 และอัตราส่วนสมุนไพรต่อสารละลาย (ratio) ที่ 1:20 สามารถสกัดสาร THC ได้สูงสุด 254.77 ± 11.01 mg/g และได้ปริมาณสารแคนนาบินอยด์รวม (total cannabinoids) 270.98 ± 11.96 mg/g ในการสกัดด้วยวิธีการแช่แบบดั้งเดิม (maceration) ในสารละลาย ethanol 95% อัตราส่วน 1:20 เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) ได้ปริมาณสาร THC ที่ 203.48 ± 6.29 mg/g และได้ปริมาณสารแคนนาบินอยด์รวม (total cannabinoids) 216.46 ± 7.17 mg/g เมื่อเปรียบเทียบผลการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์กับผลการสกัดที่ได้จากการแช่ พบว่าการสกัดด้วยระบบสนามไฟฟ้าพัลส์ให้ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ THC และ Total cannabinoids สูงกว่าคิดเป็น 20.13% และ 22.69% ตามลำดับ ในขณะที่การสกัดด้วยวิธีการแช่แบบดั้งเดิมนั้นใช้เวลาในการสกัดนาน 45 นาที การสกัดด้วย

Table 4 Comparison of cannabinoids between the maceration method in 95% ethanol and pulsed electric field (PEF)

Method	Extraction time (min)	THC (mg/g)	Total cannabinoids (mg/g)
Maceration	45	203.48 ± 6.29^b	216.46 ± 7.17^b
PEF	5	254.77 ± 11.01^a	270.98 ± 11.96^a

Note: a and b in each column represent the level of significant ($p < 0.05$) in independent t-test

ระบบสนามไฟฟ้าพัลส์ใช้เวลาสั้นเพียง 5 นาที โดยคิดเป็นเวลาน้อยกว่าถึง 88.9% จึงสรุปได้ว่าการสกัดโดยใช้ระบบสนามไฟฟ้าพัลส์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยพายัพ มพย/2566/04-24 ทั้งนี้ขอขอบคุณศูนย์วิจัยการผลิตสารออกฤทธิ์จากัญชาและพืชสมุนไพรโดยปฏิกิริณชีวะภาพ (RPAH) มหาวิทยาลัยพายัพ เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทดลอง

6. References

- [1] D.T. Brown, Cannabis The Genus Cannabis, harwood academic publishers, 1998.
- [2] D. Jin, K. Dai, Z. Xie, J. Chen, Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes, Sci Rep. 10 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60172-6>.
- [3] M. Woodbridge, Medicinal Cannabis Book, Bedrocan International. (2019) 53.
- [4] J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, J Food Eng. 117 (2013) 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.
- [5] L.G. Yan, L. He, J. Xi, High intensity pulsed electric field as an innovative technique for extraction of bioactive compounds—A review, Crit Rev Food Sci Nutr. 57 (2017) 2877-2888. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077193>.
- [6] A. Haji-Moradkhani, R. Rezaei, M. Moghimi, Optimization of pulsed electric field-assisted oil extraction from cannabis seeds, J Food Process Eng. 42 (2019). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13028>.
- [7] R. Bobinaite, G. Pataro, N. Lamanauskas, S. Šatkauskas, P. Viškelis, G. Ferrari, Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products, J Food Sci Technol. 52 (2015) 5898-5905. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1668-0>.
- [8] L.S. Zaharia, I. Trofin, D.-I. Vaireanu, G. Dabija, Influence of Temperature and Heating Time on the Decarboxylation of Δ 9-THCA and CBDA in the Cannabis Inflorescences, Bull., Series B. 82 (2020) 2020.
- [9] R. Jintawiwat, N. Punamornarakul, R. Hirunyasiri, P. Jarupoom, T. Pankasemsuk, S. Supasin, A. Kawee-ai, Article Testing of a Prototype Combining Ultrasound and Pulsed 3 Electric Field on Extracted Valuable Compounds of Mitragyna 4 speciosa Leaves, 5 (2023). <https://doi.org/10.3390/xxxxx>.
- [10] J.C. Weaver, Electroporation Theory Concepts and Mechanisms, 1995. <https://doi.org/10.1385/0-89603-328-7:3>

- [11] M.M.A.N. Ranjha, R. Kanwal, B. Shafique, R.N. Arshad, S. Irfan, M. Kieliszek, P.Ł. Kowalczewski, M. Irfan, M.Z. Khalid, U. Roobab, R.M. Aadil, A critical review on pulsed electric field: A novel technology for the extraction of phytoconstituents, *Molecules*. 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26164893>.
- [12] C.L. Ramirez, M.A. Fanovich, M.S. Churio, Cannabinoids: Extraction Methods, Analysis, and Physicochemical Characterization, in: *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier B.V., 2018: pp. 143-173. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64183-0.00004-X>.