บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สบู่ดำ

สบู่ดำ เป็นภาษาโปรตุเกส หมายถึง ต้นไม้ชนิดหนึ่งใช้น้ำมันจากเมล็ดมาเป็นส่วนผสมในการทำสิ่งที่ใช้สำหรับชำระล้างร่างกายและซักผ้าให้สะอาด เพราะในสมัยก่อนนั้นยังไม่มีสารเคมีที่ทำให้เกิดฟอง **ต้นสบู่ดำ** (physic nut) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกากลาง ซึ่งพ่อค้านักเดินเรือทะเลชาวโปรตุเกสไปพบ แล้วนำเข้ามาในประเทศไทยราวตอนปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา ประมาณ 300 ปีที่ผ่านมา โดยรับซื้อเมล็ดไปทำสบู่ เนื่องจากน้ำมันของเมล็ดสบู่นั้นมีฟองเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว ลักษณะต้นสบู่ดำเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางสูง 2-7 เมตร มีอายุยืนกว่า 20 ปี อยู่ในวงศ์ยางพารา สกุล Jatropha มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha Curcus* Linn. ชื่อสามัญคือ physic nut ทั้งนี้คำว่า jatropha มีรากศัพท์มาจากศัพท์ทางการแพทย์ของชาวกรีก คือ “iatros” แปลว่า หมอ และคำว่า “trophe” แปลว่า อาหาร ส่วนคำว่า “curcas” เป็นชื่อเรียกของสบู่ดำ พบปลูกบริเวณเมืองมาลาบา (Malabar) ในประเทศอินเดีย แต่สามารถพบต้นสบู่ดำได้เกือบทั่วโลก ทำให้มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไป

ในประเทศไทยมีการปลูกต้นสบู่ดำประมาณ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สบู่ดำพันธุ์ที่มีผลทรงกลม ผลมีขนาดปานกลาง มีเปลือกหนาปานกลาง ปลูกกันทั่วไปในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ส่วนสบู่ดำพันธุ์ที่มีผลทรงกลม หรือรูปทรงของผลยาวกว่าพวกแรกเล็กน้อย ส่วนผลนั้นมีขนาดเท่ากัน แต่มีเปลือกหนากว่า ปลูกมากในภาคเหนือ และสบู่ดำพันธุ์ที่มีผลกลม มีขนาดเล็กกว่าสองพวกแรกปลูกในภาคเหนือและภาคใต้ สาเหตุที่เรียกว่า ต้นสบู่ดำ หรือต้นสบู่ เนื่องจากน้ำยางมีสีขาวคล้ายสบู่ บริเวณลำต้นและกิ่ง มีเมล็ดคล้ายเมล็ดละหุ่ง แต่มีขนาดเล็กกว่า และมีสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งชาวบ้านเรียกชื่อแตกต่างกันคือ ภาคกลางเรียก “สบู่ดำ” เพราะเมล็ดมีสีดำ ภาคเหนือเรียก “มะทุ่งฮั้ว” เพราะนำมาปลูกเป็นรั้วธรรมชาติป้องกันสัตว์เลี้ยงต่างๆมาทำลายกัดกินพืชที่ปลูก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียก “มะเยา” ชาวโคราชเรียก “สีหลอด” เพราะรับประทานแล้วท้องเดินเหมือนสลอด ภาคใต้เรียก “พงเทศ” หมายถึง ละหุ่งต่างประเทศ

สบู่ดำมีฤทธิ์เป็นยาถ่าย และเป็นพิษ ถ้าจะใช้เป็นยาถ่ายต้องนำไปคั่วก่อน เนื่องจากมีสารพิษเป็นสารพวกโปรตีน (toxalbumin) คือ จาร์โทฟีน (jatrophin) หรือเคอร์ซีน (curcin) ซึ่งมีอยู่ในน้ำยางและเมล็ด แต่เมื่อได้รับความร้อนจะสลายตัว [1] จากการศึกษาความเป็นพิษในคน พบว่าอาการพิษในเด็กจะเกิดขึ้นเมื่อรับประทานเพียง 1-5 เมล็ด ส่วนในผู้ใหญ่มีรายงานว่าอาการเป็นพิษอาจเกิดขึ้นเมื่อรับประทาน 1-20 เมล็ด อาการเป็นพิษอาจเกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน โดยจะเกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน ปวดท้อง อ่อนเพลีย จุกเสียด กระหายน้ำ ปวดศีรษะ อาจถ่ายเป็นเลือด ความดันโลหิตต่ำ การ

เต้นของหัวใจผิดปกติ ม่านตาขยาย ตัวสั่น ผิวหนังแดง เลือดออกในจอรับภาพในลูกตา (retina) อาการจะเกิดภายใน 1 ชั่วโมง นอกจากนั้นยางสบู่ดำอาจทำให้ตาอักเสบ ระคายเคืองต่อผิวหนัง และทำให้เกิดอาการแพ้ [1,4]

2.1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์

ต้นสบู่ดำเป็นพืชที่มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n = 22) เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง และอาจมีความสูงกว่า 5 เมตร อายุยืนกว่า 20 ปี ลำต้นและยอดเกลี้ยงเกลาไม่มีขน เนื้อไม้ไม่มีแก่น ระบบรากเป็นแบบรากแก้ว ส่วนต่างๆของต้นสบู่ดำแสดงดังรูปที่ 2.1

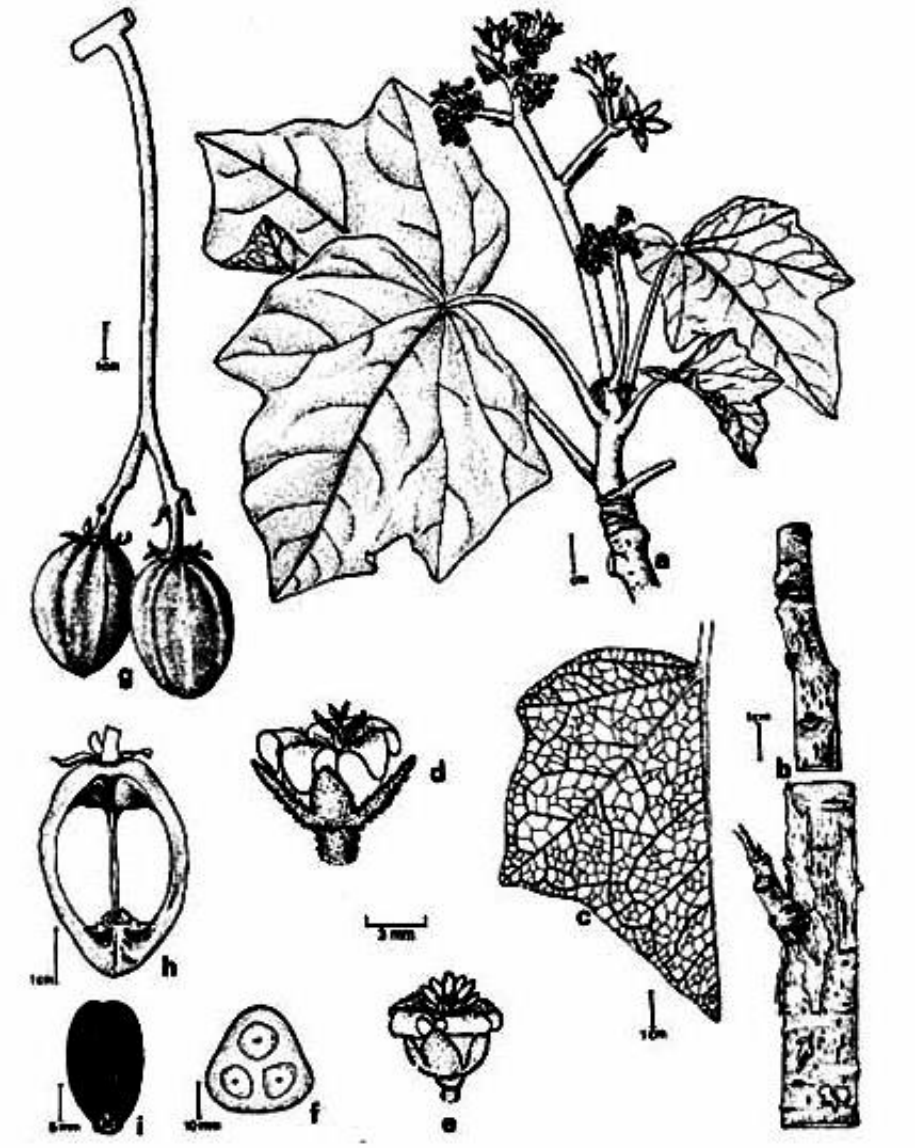
ใบ เป็นแบบใบเดี่ยว แผ่นใบคล้ายๆใบพุดตาลหรือใบฝ้าย แต่หนากว่าเพราะมีพวกไขเคลือบอยู่ที่ผิวใบ ขอบใบมีรอยหยักตื้นๆ ตั้งแต่ 3 - 7 หยัก กว้างและยาวประมาณ 6 - 15 เซนติเมตร ขนาดของแผ่นใบเฉลี่ยมีความยาวประมาณ 19.78 เซนติเมตร และมีความกว้างประมาณ 16.67 เซนติเมตร ใบสบู่ดำมีส่วนของก้านใบเชื่อมติดกับส่วนของลำต้น ก้านใบสีเขียว ความยาวก้านใบประมาณ 2.5 - 7.5 เซนติเมตร ตำแหน่งของการเกิดใบจะเกิดสลับกัน สบู่ดำมักจะทิ้งใบในฤดูแล้ง และเมื่อแล้งจัดก็จะทิ้งใบหมดทั้งต้น

ดอก ออกบริเวณปลายกิ่ง เป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่แยกกัน แต่อยู่ภายในช่อดอกเดียวกัน โดยดอกออกเป็นช่อบริเวณซอกใบส่วนปลายของยอด ลักษณะดอกเป็นรูปถ้วย กลีบเลี้ยงมีสีเขียวอ่อนอมเหลือง กลีบดอกมีสีเหลืองอมขาว มีต่อมน้ำหวานติดอยู่ที่โคนด้านในของกลีบดอกสบู่ดำจัดเป็นพืชผสมข้าม ดอกตัวผู้ในช่อดียวกันบานก่อนที่ดอกตัวเมียพร้อมที่จะรับการผสม (receptive) จึงต้องมีแมลงช่วยในการผสมพันธุ์

ผล มีรูปร่างค่อนข้างกลมและป้อม หรืออาจเป็นเหลี่ยม มี 3 พู ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองสด และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนในที่สุด เมื่อปล่อยให้ผลแห้งคาต้น เปลือกนอกของผลจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ผลแห้งจะไม่แตกออก ผลสด 1 ผล มีน้ำหนักประมาณ 15.06 กรัม ผลแห้งน้ำหนักจะลดลงเหลือเพียง 2.60 กรัม อายุของผลสบู่ดำตั้งแต่ออกดอกถึงผลแก่ประมาณ 60 – 90 วัน

เมล็ด รูปร่างเมล็ดของสบู่ดำเป็นแบบรี มีเปลือกหุ้มสีดำ โดยมีเนื้อเยื่ออยู่ภายในเป็นที่สะสมพวกน้ำมันและสารพวกเคอร์ซีน เมล็ดประกอบด้วยเนื้อเมล็ดสีขาวประมาณ 32 เปอร์เซ็นต์ น้ำมัน 30 - 38 เปอร์เซ็นต์ และเปลือก 30 - 38 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเมล็ด เมล็ดสบู่ดำ 100 เมล็ดจะหนักประมาณ 69.8 กรัม ส่วนของเนื้อเมล็ดและเปลือกมีน้ำหนักประมาณ 51.99 - 62 เปอร์เซ็นต์ และ 0.98 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเมล็ดตามลำดับ เมล็ดแต่ละเมล็ดมีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 0.64 กรัม

น้ำยาง มีลักษณะใส ไม่มีสี พบมากในส่วนของลำต้นอ่อนและก้านใบ ส่วนลำต้นแก่พบเฉพาะที่เปลือกเท่านั้น [5]



a = ปลายยอดและดอก b = เปลือก c = แผ่นใบและการเรียงตัวของเส้นใบ
d = เกสรตัวเมีย e = เกสรตัวผู้ f = ภาพตัดขวางของผลอ่อน g = ลักษณะผลสุกแก่
h = ภาพตัดตามยาวของผล และ i = เมล็ด

รูปที่ 2.1 ส่วนต่างๆของต้นสบู่ดำ [5]

2.1.2 ประโยชน์จากต้นสบู่ดำ

เปลือกไม้ สามารถนำมาสกัดแทนนิน (tannin) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนังได้

ลำต้น ตัดเป็นท่อนต้มน้ำให้เด็กกินแก้ซางตานขโมย หรือตัดแป็นท่อนแช่น้ำอาบแก้โรคพุพอง ใช้เป็นวัสดุก่อสร้าง และทำรั้วป้องกันสัตว์เลี้ยงเข้าทำลายผลผลิต ใช้เป็นฟืนและถ่าน นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำในเนื้อเยื่อของต้นสบู่ดำสามารถนำมาใช้ห้ามเลือดได้

ดอก ใช้เลี้ยงผึ้งเพื่อผลิตน้ำผึ้ง

เมล็ด ใช้เป็นยาถ่าย เมล็ดสบู่ดำประกอบด้วยน้ำมันประมาณ 30 - 38 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันเป็นผลผลิตที่สำคัญของสบู่ดำสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น น้ำมันของสบู่ดำมีฤทธิ์เป็นยาระบาย และโดยทั่วไปนิยมนำมาใช้ในการรักษาโรคผิวหนัง รวมทั้งใช้ทาแก้ปวดในคนที่เป็นโรครูมาติสซั่ม (Rheumatic) ส่วนสารสกัดนำมาใช้เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช นำมาทำ สบู่ และกลีเซอรีน

กากเมล็ด ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือจากการหีบเอาน้ำมันไปใช้แล้ว จะนำมาอัดเป็นก้อน ส่วนนี้จะมีเคอร์ซีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นพิษเหมือนกับไรซิน (ricin) ในเมล็ดละหุ่งจึงไม่เหมาะที่จะนำมาเลี้ยงสัตว์ แต่สามารถนำไปทำปุ๋ย หรือนำไปทำเป็นเชื้อเพลิงเพื่อใช้กับกังหันไอน้ำ (steam turbine) สำหรับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า

น้ำยาง จากก้านและใบ รักษาโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือด แก้ปวดฟัน แก้ลิ้นเป็นฝ้าขาว โดยผสมกับน้ำนมมารดา ป้ายลิ้น หรือใช้ประโยชน์อย่างอื่น เช่น ใช้เบื่อปลา หรือเป็นของเล่น โดยเป่าน้ำยางสีขาวให้กลายเป็นฟองคล้ายฟองสบู่

ราก ใช้เป็นยาขับถ่ายพยาธิ

ใบ ใบนำมาต้มน้ำดื่มแก้ไอ และใช้ฆ่าเชื้อโรคภายหลังการคลอด ใบอ่อนสามารถนำมานึ่ง หรือต้มรับประทานได้อย่างปลอดภัย อีกทั้งยังพบว่าในใบของสบู่ดำมีสารประกอบฟีโนลิคซึ่งมีฤทธิ์ทางยาสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อยู่เป็นจำนวนมาก

2.2 สารประกอบฟีโนลิค

สารประกอบฟีโนลิค คือสารประกอบที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชันของฟีนอลชนิดต่างๆ สารประกอบฟีโนลิคที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในใบสบู่ดำ ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน ซึ่งจะพบอยู่ในกลุ่มของแทนนิน สารประกอบแทนนินพบเป็นองค์ประกอบของพืชชั้นสูง โดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงคู่ แต่อาจพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้บ้างโดยเฉพาะพืชตระกูลปาล์ม สารประกอบแทนนินเป็นสารประกอบพวกฟีนอลที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี (water-soluble phenolics) และมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นจำนวนมาก มีโครงสร้างที่ซับซ้อน น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500 ถึง 3,000 นอกจากนี้ยังสามารถแสดงคุณสมบัติของการเกิดปฏิกริยาที่เฉพาะเจาะจงของฟีนอลได้ เช่น สามารถตกตะกอนกับโปรตีนต่าง ๆ อัลคาลอยด์ รวมทั้งมาโครโมเลกุล (macromolecules) เช่น เซลลูโลส (cellulose) และเพกติน (pectin) [6]

2.2.1 ประโยชน์ของแทนนิน

แทนนินมีคุณสมบัติในการฟอกหนัง โดยแทนนินจะทำปฏิกริยากับโปรตีน ทำให้หนังที่ฟอกแล้วสามารถนำไปย้อมสีได้ และไม่เน่าเสียหลังการฟอก

ใช้ย้อมแห อวน เชือก และเรือใบ ทำให้ทนทานต่อการใช้งานที่สัมผัสกับน้ำเค็ม ซึ่งอาศัยคุณสมบัติการตกตะกอนกับมาโครโมเลกุล

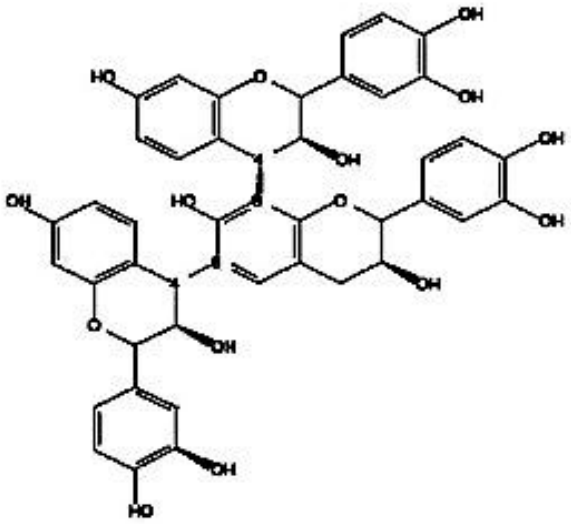
ลดการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย โดยแทนนินบางชนิดมีคุณสมบัติในการทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและยับยั้งการเกิดซุปเปอร์ออกไซด์ไอออน (superoxide ion) และอาจช่วยลดการเกิดมะเร็งต่างๆได้

นอกจากนี้แทนนินยังมีคุณสมบัติอื่นๆอีกมากมาย เช่น ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์บางชนิด และจากการที่แทนนินบางกลุ่มมีโครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อยู่ก็อาจมีคุณสมบัติทำให้หลอดเลือดมีความยืดหยุ่นที่ดีขึ้น และไม่เปราะแตกง่าย [6]

2.2.2 ประเภทของสารประกอบแทนนิน

สารประกอบแทนนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนฟีโนลิค (complex phenolic compound) เป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน และไม่สามารถตกผลึกได้ การแบ่งกลุ่มของสารประกอบแทนนินนั้นขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของโครงสร้างโมเลกุลไฮโดรไลซิส (hydrolysis) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

2.2.2.1 **คอนเดนเซด แทนนิน** (condensed tannins) หรือเรียกอีกอย่างว่า โปรแอนโทรไซยานิน (proanthrocyanin) เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่เป็นโพลีเมอร์ (polymeric polyphenols) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีไฮดริคฟีนอล (polyhydric phenols) ที่ถูกเชื่อมด้วยพันธะคาร์บอน (C-C linkage) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 เป็นสารที่ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ได้ด้วยกรดหรือด่าง แต่เมื่อนำไปต้มกับกรดหรือเอนไซม์ จะให้ตะกอนสีแดงที่ไม่ละลายน้ำ เรียกสารดังกล่าวว่า โฟลบาฟีน (phlobaphenes) พบมากในส่วนเปลือกต้น และแก่นไม้เป็นส่วนใหญ่ [6]

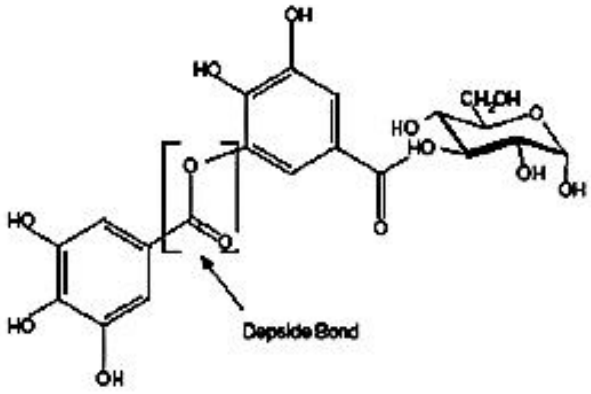


รูปที่ 2.2 โครงสร้างของคอนเดนเซดแทนนิน [7]

2.2.2.2 **ไฮโดรไลซ์เอเบิลแทนนิน** (hydrolysable tannins) หรือเรียกอีกอย่างว่า ไพโรแกลลอลแทนนิน (pyrogalloltannin) สารในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นอะมอร์ฟัส (amorphous) สีเหลือง-น้ำตาล ละลายในน้ำร้อนได้เป็นสารละลายคอลลอยด์ (colloidal dispersions) มีรสฝาด มีโครงสร้างประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส หรือสารประกอบโพลีออล (polyols) และส่วนที่เป็นกรดฟีโนลิค (phenolic acid) เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) หรือกรดเฮกซะไฮดรอกซิลไดฟีนิก (hexahydroxydiphenic acid, HHDP) หรืออนุพันธ์ของ HHDP ที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์ โดยส่วนที่เป็นกรดฟีโนลิคจะมากกว่าส่วนของน้ำตาลหรือโพลีออลที่เชื่อมกับพันธะเอสเตอร์ (ester linkage) ซึ่งพันธะเอสเตอร์จะถูกไฮโดไลซ์ (hydrolyzed) ในสภาวะที่มีน้ำ และถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยกรด ด่าง หรือเอนไซม์แทนเนส (tannase) ให้กรดฟีโนลิค และน้ำตาลหรือโพลีออล เมื่อนำไปกลั่นแบบแห้ง (dry distillation) สารประกอบกรดฟีโนลิคจะเปลี่ยนเป็นไพโรแกลลอลแทนนิน (pyrogallol tannin) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ (free hydroxy group) 3 หมู่ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟอร์ริก คลอไรด์ (ferric chloride) จะให้สีน้ำเงิน [6]

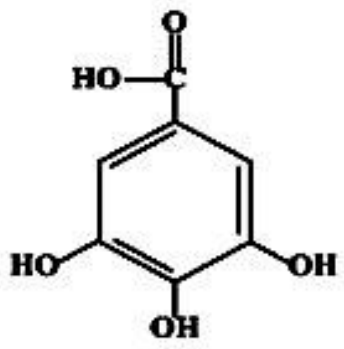
สารประกอบกลุ่มไฮโดรไลซ์เอเบิลแทนนิน (hydrolysable tannins) เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟีโนลิคซึ่งมีคุณสมบัติทางการแพทย์ คือ แก้อักเสบ แก้ไข้มาลาเรีย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

แกลโลแทนนิน (gallotannins) เป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยกรดแกลลิกเชื่อมต่อกับน้ำตาลกลูโคสด้วยพันธะเอสเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.3 เมื่อสลายตัวจะได้กรดแกลลิก และน้ำตาลกลูโคส ตัวอย่างของแกลโลแทนนิน ได้แก่ กรดแทนนิค (tannic acid)



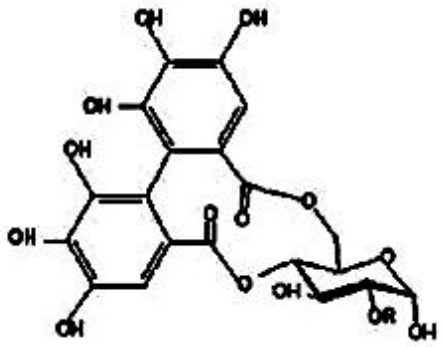
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของแกลโลแทนนิน [7]

กรดแกลลิก (3, 4, 5-hydroxybenzoic acid, $C_7H_6O_5$) เป็นสารตั้งต้นของสารประกอบแทนนิน พวกแกลโลแทนนิน และแอลลาจิกแทนนิน ซึ่งประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ คือ หมู่ไฮดรอกซิล และกรดคาร์บอกซิลิก ดังแสดงในรูปที่ 2.4 โดยกรดแกลลิกจะเกิดพันธะเอสเตอร์กับคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส [2] โดยคุณสมบัติของกรดแกลลิกแสดงดังตารางที่ 2.1



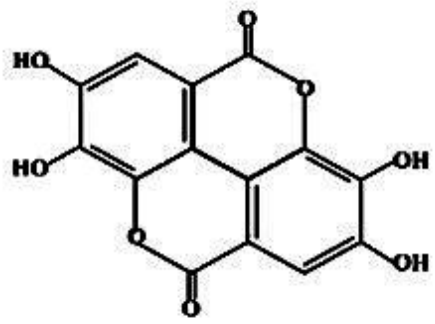
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของกรดแกลลิก [2]

แอลลาจิกแทนนิน (ellagitannin) เป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยกรดแอลลาจิกเชื่อมต่อกับน้ำตาลด้วยพันธะเอสเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.5 เมื่อสลายตัวจะได้กรดเฮกซะไฮดรอกซิไดฟีนิก (hexahydroxy diphenic acid) เช่น กรดดีไฮโดรเฮกซะไฮดรอกซิไดฟีนิก (dehydrohexahydroxydiphenic acid) และกรดเชอบิวลิก (chebulic acid) เมื่อส่วนของกรดเฮกซะไฮดรอกซิไดฟีนิกแยกออกและเกิดปฏิกริยาแลกโตไนเซชัน (lactonization) จะให้กรดแอลลาจิก และเมื่อเกิดการคู่ควบ (coupling) ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่สามกับตำแหน่งที่หกจะได้คลอริลาจิน [6] โดยคุณสมบัติของกรดแอลลาจิกและคลอริลาจินแสดงดังตารางที่ 2.1



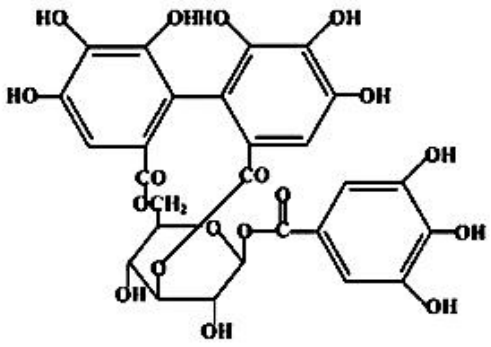
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของแอลลาจิกแทนนิน [7]

กรดแอลลาจิก (4, 4'5, 5'6, 6'-hexa hydroxyl diphenic acid 2,6,2',6'-dilactone, $C_{14}H_6O_8$) เป็นสารประกอบอินทรีย์ และสารประกอบโพลีฟีโนลิค ไดเมอร์ (dimer) ของกรดแกลลิก และเป็นองค์ประกอบของสารประกอบแอลลาจิกแทนนิน ดังแสดงในรูปที่ 2.6 ซึ่งมีมากในผลสตรอเบอร์รี่ องุ่น สบู่ดำ และพืชอาหารชนิดอื่น [2]



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของกรดแอลลาจิก [2]

คลอริลาจิน (1-0-galloyl-3, 6-(R)-hexahydroxyldiphenoyl-beta-D-glucopyranose, $C_{27}H_{22}O_{18}$) คือ สารประกอบที่มีกรดเฮกซะไฮดรอกซีไดฟีนิก และหมู่แกลโลออล เป็นองค์ประกอบที่เกาะอยู่กับกลูโคส ดังแสดงในรูปที่ 2.7 [2]



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของคลอริลาจิน [2]

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน [2]

ชื่อทางการค้า	คุณสมบัติ		
	กรดแกลลิก (gallic acid)	กรดแอลลาจิก (ellagic acid)	คลอริลาจิน (corilagin)
ชื่อทางวิทยาศาสตร์	3,4,5-hydroxybenzoic acid	4,4'5,5'6,6'-hexahydroxy diphenic acid 2,6,2',6'-dilactone	1-0-Galloyl-3,6-(R)-hexahydroxyl diphenoyl-beta-D-glucopyranose
สูตรโมเลกุล	$C_7H_6O_5$	$C_{14}H_6O_8$	$C_{27}H_{22}O_{18}$
น้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล)	170.2	302.2	634.46
ความหนาแน่น (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	1.694	1.677	-

ซึ่งนอกเหนือจากคุณสมบัติทางการแพทย์แล้วยังพบว่าสารประกอบฟีโนลิคกลุ่มนี้ยังมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย

2.3 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือโมเลกุลหรืออิออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นประมาณ $10^{-3} – 10^{-10}$ วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร แต่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โมเลกุลหรืออิออนชนิดนี้เป็นตัวที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ตัวอย่างอนุมูลอิสระได้แก่ O_2^- (superoxide ion) OH^- (hydroxyl radical) H_2O_2 (hydrogen peroxide) โดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นในร่างกายได้อยู่แล้ว แต่ร่างกายจะมีระบบที่ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมากำจัดสารพิษเองได้ แต่ถ้าร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกายมากเกินไป ทำให้สารเหล่านี้มีมากกว่าความสามารถที่ร่างกายจะผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ หรือในภาวะที่สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายไม่เพียงพอก็จะก่อให้เกิดโรค หรือเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด ได้แก่ มะเร็ง หลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคความจำเสื่อม และความแก่ เป็นต้น [8]

2.3.1 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ

จากที่กล่าวมาแล้วว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากกระบวนการภายในร่างกายเอง และในภาวะที่ร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายถูกแวดล้อมด้วยมลพิษ ภาวะที่ผิดปกติเหล่านี้ จะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น

กลไกการเกิดอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก ดังสมการที่ 2.1 และ 2.2 ดังนี้ [3]

ปฏิกิริยาการแยกอย่างสมมาตร (symmetric separation)

$$X - X \text{ ------> } X^{\bullet} + X^{\bullet} \qquad (2.1)$$

การเกิดจากอนุมูลอิสระอื่น

$$X^{\bullet} + HR \text{ ------> } HX + R^{\bullet} \qquad (2.2)$$

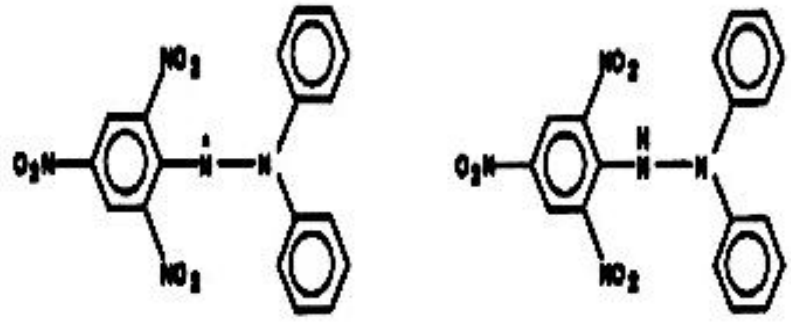
2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

ร่างกายจะเป็นอันตรายและอาจก่อให้เกิดโรคได้หากมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินสมดุล สารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่ยับยั้งไม่ให้ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้ โดยการให้หรือรับอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ 2 วิธีคือ

2.3.2.1 เอนไซม์ในร่างกาย เอนไซม์นับเป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล โดยเอมไซม์เหล่านี้จะไปจับกับอนุมูลอิสระในร่างกาย แล้วหยุดวงจรการสร้างสารอนุมูลอิสระในร่างกาย

2.3.2.2 การได้รับยาหรืออาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระอย่างเพียงพอและเหมาะสม สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ วิตามินต่างๆ เบต้า-แคโรทีน (beta-carotene) และสารประกอบซิลิเนียม (selenium) โดยสารเหล่านี้พบได้ทั่วไปในผักและผลไม้

DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazy) คืออนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็ดตรอนได้ เพื่อเปลี่ยนอนุมูลอิสระให้เป็นอนุมูลที่ไม่อิสระ และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังแสดงในรูปที่ 2.8



Free radical Non radical

รูปที่ 2.8 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสาร DPPH [8]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรขณะที่อยู่ในสารละลาย ทำการทดสอบโดยให้สารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วงเข้มทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนด จะเกิดการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH ทำให้สารละลายสีอ่อนลงกลายเป็นสีเหลืองและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515

นาโนเมตร [3, 8, 9] โดยกระบวนการสกัดอาหารและยาที่กำลังได้รับความนิยมในขณะนี้คือการสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤต เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากวิธีนี้จะมีความบริสุทธิ์สูง

2.4 การสกัด

การสกัด (extraction) เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยสมบัติการละลายของสารในตัวทำละลาย หรือการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ต้องการออกจากสารละลายหรือของผสม โดยใช้หลักการ “like dissolves like”

การสกัดแบ่งออกเป็นสองประเภท ดังนี้

การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid -liquid extraction) เป็นวิธีการสกัดสารผสมที่เป็นของเหลวหรือของผสมที่ละลายในตัวทำละลายชนิดหนึ่งด้วยตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ตัวทำละลายที่ใช้ต้องสามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดีกว่า และไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลายเดิม และควรมีจุดเดือดต่ำ ระเหยได้ง่าย และไม่เป็นพิษ

การสกัดของแข็งด้วยของเหลว (solid-liquid extraction) เป็นกระบวนการแยกสารออกจากของแข็งที่ไม่ละลายในของเหลวใดๆ ด้วยของเหลวชนิดหนึ่ง เช่น เปลือกไม้ ใบไม้ รากไม้ ผลไม้ และอื่นๆโดยแช่ตัวอย่างในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง หรือต้มให้ความร้อน

2.4.1 ขั้นตอนของกระบวนการสกัด

2.4.1.1 การเตรียมตัวอย่างที่จะทำการสกัดให้สามารถนำไปสกัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งรวมถึงการบดและการลดขนาด

2.4.1.2 การเลือกใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสม เพื่อให้มีการสัมผัสระหว่างตัวทำละลายกับของแข็งในลักษณะการแช่หรือการไหลผ่านกัน ซึ่งจะทำให้เกิดการถ่ายเทตัวถูกละลายที่มีในเนื้อของตัวอย่างไปยังตัวทำละลาย หลังจากการสัมผัสกันแล้วจะแยกสารออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกประกอบด้วยตัวทำละลายที่อยู่กับตัวถูกละลายซึ่งแยกออกจากของแข็ง อีกส่วนหนึ่งประกอบด้วยของแข็งและตัวถูกละลายที่สกัดไม่หมดและมีตัวทำละลายปนอยู่บ้าง

2.4.1.3 การแยกตัวถูกละลายออกจากตัวทำละลาย พร้อมทั้งนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งปกติจะใช้กระบวนการระเหยหรือการกลั่น

2.4.2 กลไกของกระบวนการสกัด

การสกัดในระบบของเหลว – ของแข็ง ประกอบไปด้วยกระบวนการสำคัญ 5 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 สารละลายขนถ่ายจากรอบๆอนุภาคของแข็งไปสู่พื้นผิวของอนุภาคของแข็ง (solvent convection)

ขั้นตอนที่ 2 สารละลายแพร่เข้าไปในอนุภาคของแข็ง (diffusion)

ขั้นตอนที่ 3 ตัวทำละลายละลายตัวถูกละลาย (dissolution)

ขั้นตอนที่ 4 ตัวถูกละลายแพร่ออกมาจากอนุภาคของแข็งมาที่ผิวของอนุภาคของแข็ง (back diffusion)

ขั้นตอนที่ 5 ตัวถูกละลายที่พื้นผิวของอนุภาคของแข็งถูกถ่ายโอนมายังสารละลายรอบๆอนุภาคของแข็ง (solute convection)

2.4.3 การพิจารณาอัตราของขั้นตอนต่างๆในกระบวนการการสกัด

2.4.3.1 ขั้นตอน **convection**

ในขั้นตอนนี้จะพิจารณาว่าไม่มีความต้านทานที่รอยต่อระหว่างพื้นผิวอนุภาคของแข็งกับตัวทำละลาย ดังนั้น อัตราการถ่ายโอนตัวถูกละลายไปสู่ตัวทำละลายสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2.3

$$N_A = K_L A(C_{AS} - C_A) \tag{2.3}$$

โดย N_A คือ อัตราการถ่ายโอนตัวถูกละลายในสารละลาย (กิโลโมลต่อวินาที)

A คือ พื้นผิวของอนุภาคของแข็ง (ตารางเมตร)

K_L คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล (เมตรต่อวินาที)

C_{AS} คือ ค่าความเข้มข้นอิ่มตัวของตัวถูกละลายในสารละลาย (กิโลโมลต่อลูกบาศก์เมตร)

C_A คือ ค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลาย ณ เวลาใดๆ (กิโลโมลต่อลูกบาศก์เมตร)

2.4.3.2 ขั้นตอน **diffusion**

ในขั้นตอนนี้พิจารณาว่าความต้านทานภายในส่งผลต่ออัตราการถ่ายเทมวลจากภายในอนุภาคของแข็งไปสู่ตัวทำละลาย ดังนั้นอัตราการการแพร่ของตัวทำละลายเข้าสู่ภายในของแข็ง และอัตราการแพร่ของสารละลายออกไปสู่ตัวทำละลายสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2.4

$$J_A = -D_A(dC_A/d_r) \tag{2.4}$$

โดย J_A คือ ปริมาณการถ่ายโอนตัวถูกละลายในสารละลาย (กิโลโมลต่อตารางเมตร - วินาที)

D_A คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (ตารางเมตรต่อวินาที)

dC_A/dr คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่ระยะทาง (r) ใดๆ (กิโลโมลต่อเมตร^4)

2.4.3.3 ขั้นตอน **dissolution**

ในขั้นนี้คือ การเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนเฟสของตัวถูกละลายจากของแข็งที่ไม่ละลายให้มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายได้ เนื่องจากสมบัติของตัวถูกละลายขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุล เมื่อน้ำหนักโมเลกุลต่ำลง จึงมีความสามารถในการละลายและการแพร่ในอนุภาคของแข็งเพิ่มขึ้น ปฏิกิริยาการละลายมีอัตราสูงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปปฏิกิริยาการละลายประกอบด้วยปฏิกิริยาแตกตัวด้วยน้ำ เพราะน้ำเป็นส่วนประกอบหลักในสารละลายซึ่งสามารถอธิบายได้ในรูปของสมการปฏิกิริยาเสมือนอันดับหนึ่ง (pseudo – first - order) และตัวถูกละลายอธิบายได้ในรูปสมการปฏิกิริยาอันดับสอง (second order) ซึ่งปฏิกิริยาที่ทำให้ขนาดโมเลกุลของตัวถูกละลายเล็กลง คือ ปฏิกิริยาเสมือนอันดับหนึ่ง ดังนั้นเพื่อเพิ่มผลลัพธ์ของปฏิกิริยาเสมือนอันดับหนึ่งจึงต้องลดผลกระทบจากปฏิกิริยาอันดับสอง กล่าวคือ การเพิ่มปริมาณสัดส่วนตัวทำละลายต่ออนุภาคของแข็ง โดยในขั้นตอนนี้จะพิจารณาว่าเมื่ออัตราการละลายเร็วมาก สมการแสดงปฏิกิริยาการละลายแบบ first – order แสดงดังได้สมการที่ 2.5

$$\ln\left(\frac{Y_{max}-Y_A}{Y_{max}}\right) = -K_r T \tag{2.5}$$

โดย Y_{max} คือ ความเข้มข้นสูงสุดของตัวถูกละลายในสารละลาย (กิโลโมลต่อลูกบาศก์เมตร)

Y_A คือ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลาย (กิโลโมลต่อลูกบาศก์เมตร)

K_r คือ ค่าคงที่ของปฏิกิริยา (วินาที$^{-1}$)

T คือ เวลาที่ใช้ในการสกัด (วินาที)

2.4.4 อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด

2.4.4.1 **ขนาดอนุภาค** อนุภาคที่มีขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวในการถ่ายเทมวลสารมากขึ้น และมีระยะทางสั้นลง ทำให้ตัวถูกละลายที่อยู่ในของแข็งแพร่กระจายออกมาสู่ตัวทำละลายได้เร็วขึ้น

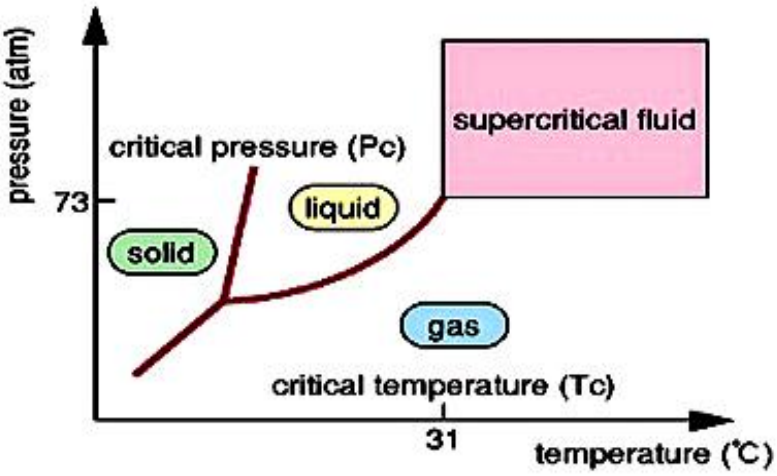
2.4.4.2 **ตัวทำละลาย** ตัวทำละลายที่ดีควรมีค่าความมีขั้วใกล้เคียงกับตัวถูกละลาย และควรมีค่าความหนืด (viscosity) ที่ต่ำ เพื่อให้มีการแพร่ที่ดี อีกทั้งยังเป็นการลดความหนาของชั้นตัวทำละลายที่อยู่โดยรอบอนุภาคของแข็ง

2.4.4.3 **อุณหภูมิของตัวทำละลาย** เมื่ออุณหภูมิของตัวทำละลายสูงขึ้น มีผลทำให้อัตราการสกัดเพิ่มสูงขึ้นด้วย เริ่มจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความหนืดของตัวทำละลายจะมีค่าลดลง ทำให้ความหนาของชั้นตัวทำละลายที่อยู่โดยรอบอนุภาคของแข็งลดลง และยังส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่มีค่าเพิ่มขึ้นทำให้ตัวถูกละลายแพร่เข้าสู่ตัวทำละลายได้มากขึ้น

2.4.4.4 **เวลาในการสกัด** การเลือกเวลาในการสกัดให้เหมาะสม จะสามารถสกัดสารออกมาได้ปริมาณมากที่สุด เนื่องจากถ้าเวลาในการสกัดน้อย สารที่ต้องการสกัดก็จะออกมาน้อย แต่กลับกันเมื่อใช้เวลาในการสกัดมากขึ้น กลับพบว่าอัตราในการสกัดมีค่าลดลง เนื่องจากในช่วงแรกอัตราการสกัดจะมีค่าสูง เพราะตัวทำละลายในตอนเริ่มต้นจะไม่มีตัวถูกละลายละลายอยู่ ดังนั้นความแตกต่างของความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายจะมีค่าสูง และเมื่อเวลาผ่านไปอัตราการสกัดจะลดลง จนกระทั่งความแตกต่างของความเข้มข้นเป็นศูนย์จึงไม่สามารถสกัดสารออกมาได้อีก

2.4.5 การสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤต

ของไหลเหนือวิกฤต คือของไหลบริสุทธิ์ใดๆที่อยู่ภายใต้ความดัน และอุณหภูมิค่าใดค่าหนึ่งแล้วสามารถเป็นได้ทั้งของเหลวอิ่มตัว และไออิ่มตัว เรียกสภาวะนี้ว่า “**จุดวิกฤต**” (critical point) ซึ่งสภาวะนี้สามารถแสดงเป็นจุดในกราฟระหว่างอุณหภูมิและความดัน ดังแสดงในรูปที่ 2.9 ซึ่งเป็นเฟสไดอะแกรมที่แสดงให้เห็นถึงสภาวะที่สารบริสุทธิ์ใดๆจะเป็นเฟสของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซ โดยมีเส้นการระเหิด (sublimation line) อยู่ระหว่างเฟสของแข็งกับก๊าซ เส้นการหลอม (fusion line) อยู่ระหว่างของแข็งกับของเหลว และเส้นการเดือด (boiling line) อยู่ระหว่างของเหลวกับก๊าซ และจุดที่อยู่ระหว่างทั้งสามสถานะเรียกว่า “**จุดสามร่วม**” (triple point) [10]



รูปที่ 2.9 เฟสไดอะแกรมของคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต [10]

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ หรือความดันให้สูงกว่าจุดวิกฤตนี้ จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของของไหล และเรียกของไหลที่อยู่ในสภาวะนี้ว่า **ของไหลเหนือวิกฤต** (supercritical fluid) สภาวะของไหลเหนือวิกฤตนี้เป็นสภาวะของไหลกึ่งของเหลวและก๊าซ ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (physicochemical properties) อยู่ระหว่างของเหลวกับก๊าซดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยจะพบว่าความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าใกล้เคียงของเหลว กล่าวคือความหนาแน่นของไหลเหนือวิกฤตมีค่าประมาณ 0.2 – 0.5 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในขณะที่ในสภาวะของเหลวจะมีค่าประมาณ 0.6 - 1.6 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนในสภาวะก๊าซจะมีค่าประมาณ (0.6 - 2) x 10^{-3} กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และในขณะเดียวกันค่าความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตก็มีค่าใกล้เคียงกับก๊าซ (ค่าความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตจะมีค่าอยู่ในช่วง (1 - 3) x 10^{-4} กรัมต่อเซนติเมตรต่อวินาที) ในขณะที่ค่าความหนืดในสภาวะของเหลวมีค่าประมาณ (0.2 - 3) x 10^{-2} กรัมต่อเซนติเมตรต่อวินาที ทำให้ของไหลเหนือวิกฤตมีคุณสมบัติต่างๆ คล้ายตัวทำละลายอินทรีย์ เพราะมีความหนาแน่นใกล้เคียงกับของเหลว ส่งผลให้สามารถแทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างต่างๆของผลิตภัณฑ์เพื่อทำละลายสารที่ต้องการได้ดี โดยโมเลกุลของสารที่ต้องการละลายจะถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของของไหลเหนือวิกฤตและเกิดอันตรกิริยา (interaction) กัน ทำให้ค่าเอนทาลปีลดลงและเกิดการละลายได้ดี แต่ของไหลเหนือวิกฤตมีความสามารถในการแพร่และคุณสมบัติการส่งถ่ายคล้ายก๊าซ เพราะมีค่าความหนืด และแรงตึงผิวน้อยกว่าของเหลว จึงสามารถพาสารที่ต้องการสกัดออกจากตัวอย่างที่เป็นเมทริกซ์ (matrix) ได้ดี [11] ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงได้มีการนำเอาของไหลเหนือวิกฤตมาใช้เป็นตัวทำละลาย ซึ่งมีข้อดีเหนือตัวทำละลายที่เป็นของเหลว คือ มีอัตราการถ่ายเทมวลเร็วกว่าและสามารถสกัดสารได้ปริมาณมากกว่าในเวลาที่เท่ากัน

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของของไหลเหนือวิกฤต [11]

ของไหล	ความหนาแน่น (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	ความสามารถในการแพร่ (ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อวินาที)	ความหนืด (กรัมต่อเซนติเมตรต่อวินาที)
ก๊าซ P = 1 บรรยากาศ T = 15-30 องศาเซลเซียส	$(0.6 - 2) \times 10^{-3}$	0.1 - 0.4	$(1 - 3) \times 10^{-4}$
ของเหลว P = 1 บรรยากาศ T = 15-30 องศาเซลเซียส	0.6 - 1.6	$(0.2 - 2) \times 10^{-5}$	$(0.2 - 3) \times 10^{-2}$
ของไหลเหนือวิกฤต $P = P_c$ $T = T_c$	0.2 - 0.5	0.7×10^{-3}	$(1 - 3) \times 10^{-4}$

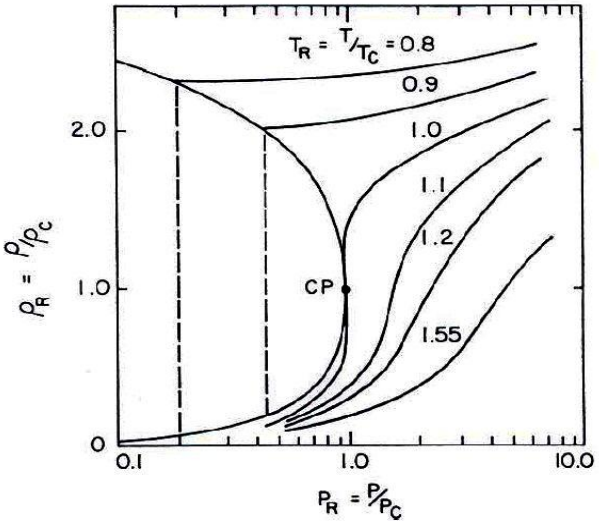
2.4.6 คุณสมบัติของของไหลเหนือวิกฤต

จากการศึกษากลไกในการสกัดสารผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ พบว่าตัวทำละลายจะแพร่ผ่านชั้นขอบเขต (boundary layer) ก่อนจะถึงอนุภาคของวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัด และเมื่อตัวทำละลายแพร่ถึงส่วนที่ต้องการสกัด ตัวทำละลายจะต้องมีความสามารถในการละลายสารที่ต้องการ ซึ่งความสามารถในการละลายจะแปรผันตามความหนาแน่น จากนั้นตัวทำละลายและสารละลายก็จะแพร่ผ่าน boundary layer อีกครั้งหนึ่ง ดังนั้นคุณสมบัติหลักที่จำเป็นต่อการสกัดสารผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ คือ ค่าความหนาแน่นและค่าความสามารถในการแพร่กระจาย ซึ่งความหนาแน่นจะมีค่าสูงเมื่อตัวทำละลายอยู่ในสถานะของเหลว ส่วนความสามารถในการแพร่กระจายจะมีค่ามากเมื่อตัวทำละลายอยู่ในสถานะก๊าซ โดยของไหลเหนือวิกฤตนั้นจะมีสถานะอยู่ระหว่างของเหลวและก๊าซ ทำให้ของไหลเหนือวิกฤตมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการสกัดสารผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ โดยเมื่อของไหลเหนือวิกฤตได้รับอิทธิพลของความดันและอุณหภูมิจะส่งผลต่อคุณสมบัติของของไหลเหนือวิกฤต เช่น ความหนาแน่น (density) การแพร่ (diffusivity) และค่าความหนืด (viscosity)

2.4.6.1 **ความหนาแน่น**

จากการศึกษาค่าความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤต พบว่าอุณหภูมิและความดันมีผลต่อความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤต จากรูปที่ 2.10 แสดงการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของตัวทำละลายบริสุทธิ์ในบริเวณจุดวิกฤต สำหรับอุณหภูมิรีดิวส์ ($T_r = T/T_c$) ในช่วง 0.9 – 1.2 และความดัน

รีดิวส์ ($P_r = P/P_c$) ที่มีค่ามากกว่า 1.0 พบว่าค่าความหนาแน่นรีดิวส์ ($\rho_r = \rho/\rho_c$) จะมีค่าเพิ่มจาก 0.1 (ใกล้เคียงก๊าซ) ไปจนถึง 2.5 (ใกล้เคียงของเหลว) โดยความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อมีการเพิ่มความดันเพียงเล็กน้อย



รูปที่ 2.10 การเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นรีดิวส์ของสารบริสุทธิ์ [12]

จากกฎของก๊าซอุดมคติสามารถหาความสัมพันธ์ของความดันและความหนาแน่นที่อุณภูมิต่างๆได้ดังสมการที่ (2.6 – 2.8)

$$PV = ZRT \tag{2.6}$$

$$\rho = \frac{M}{V} \tag{2.7}$$

$$\rho = \frac{MP}{ZRT} \tag{2.8}$$

โดย V คือ ปริมาตรเชิงโมล (cm^3/mol)

R คือ ค่าคงที่ของก๊าซ (cm^3 bar $mol^{-1} K^{-1}$)

ρ คือ ความหนาแน่น (g/cm^3)

M คือ มวลโมเลกุล (g/mol)

Z คือ แฟกเตอร์สภาพอัด (compressibility factor)

โดย Z หาได้จากสมการที่ (2.9)

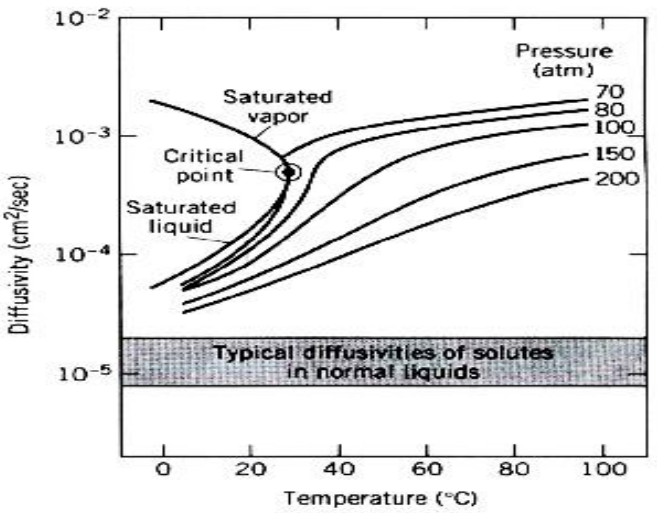
$$Z = Z^0 + \omega Z^1 \tag{2.9}$$

เมื่อ ω คือ แฟกเตอร์อะเซนทริก (acentric factor) คำนวณจาก $\omega = -logP_r - 1$

Z^0 และ Z^1 หาได้จากตารางของ Pitzer ที่เป็นฟังก์ชั่นของ P_r และ T_r [13]

2.4.6.2 **การแพร่**

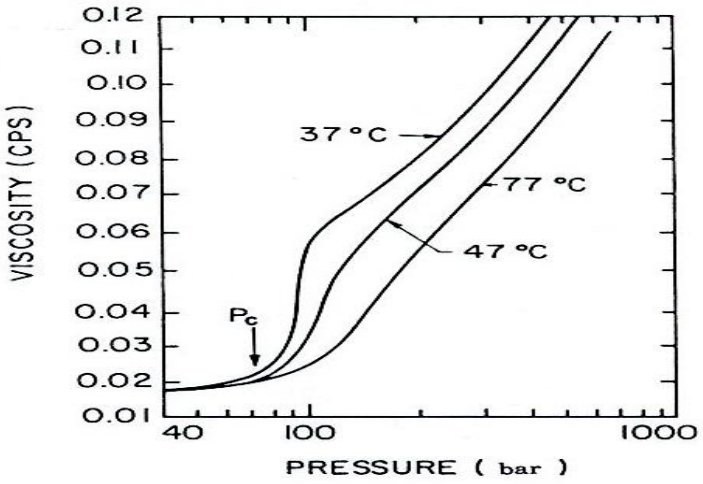
จากการศึกษาการแพร่ของของไหลเหนือวิกฤต (รูปที่ 2.11) พบว่าที่อุณภูมิคงที่เมื่อเพิ่มความดันให้สูงขึ้นความสามารถในการแพร่ของของไหลเหนือวิกฤตจะมีค่าลดลง แต่ความสามารถในการแพร่จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิมีค่าเพิ่มขึ้นโดยความสามารถในการแพร่จะมีการเปลี่ยนแปลงมากขึ้นเมื่ออยู่ใกล้จุดวิกฤต



รูปที่ 2.11 ความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และความสามารถในการแพร่ [12]

2.4.6.3 **ความหนืด**

ความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความดัน จากรูปที่ 2.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของคาร์บอนไดออกไซด์กับความดันที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าความหนืดของคาร์บอนไดออกไซด์จะเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในบริเวณใกล้เคียงจุดวิกฤต ที่ความดันสูงประมาณ 300 – 400 บาร์ คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตก็ยังมีค่าความหนืดเพียง 0.09 cP ซึ่งมีค่าต่ำกว่าความหนืดของตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วๆไป โดยสามารถสรุปว่าความหนืดของของไหลเหนือวิกฤตจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความดันเพิ่มขึ้น และจะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น



รูปที่ 2.12 ความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิ และค่าความหนืด [12]

2.4.7 ลักษณะเฉพาะของของไหลเหนือวิกฤต

2.4.7.1 **ความสามารถในการเลือกสกัด** (selectivity property) เป็นคุณสมบัติของของไหลเหนือวิกฤตในการเลือกสกัดเฉพาะสารที่ต้องการ โดยให้มีสารอื่นที่ไม่ต้องการเจือปนออกมาน้อยที่สุด ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันหนึ่งๆ และที่สำคัญคือ ค่าความสามารถในการเลือกของของไหลเหนือวิกฤตนั้นสามารถที่จะปรับเปลี่ยนให้มีความเหมาะสมเฉพาะกับสารที่ต้องการสกัดได้ง่าย โดยการเลือกความดันและอุณหภูมิที่ทำให้ของไหลเหนือวิกฤตมีความสามารถในการละลายที่เหมาะสมกับสารที่ต้องการสกัด

2.4.7.2 **ความสามารถในการละลาย** (solvent power) ของไหลเหนือวิกฤตมีความสามารถในการทำละลายที่เหนือกว่าตัวทำละลายของเหลวทั่วไป เนื่องจากสามารถปรับอุณหภูมิและความหนาแน่นให้มีค่ามากหรือน้อยได้ง่าย ซึ่งความหนาแน่นที่เปลี่ยนไปมีผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของความดัน ส่วนการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้การละลายของตัวถูกละลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิทำให้ความดันไอของสารที่ต้องการสกัดลดลง ในขณะเดียวกันการเพิ่มอุณหภูมิทำให้ความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตลดต่ำลง จึงทำให้การละลายของตัวถูกละลายลดลง ซึ่งสามารถแก้ปัญหานี้ได้โดยการเพิ่มความดัน เพื่อให้ค่าความหนาแน่นคงเดิม

2.4.7.3 **คุณสมบัติการถ่ายเท** (transportation property) ของไหลเหนือวิกฤตมีความหนืดต่ำ และมีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่สูง ทำให้สามารถกระจายตัวได้ดี และสามารถแทรกซึม (penetrate) เข้าไปในโครงข่ายของอนุภาคได้ดี และสามารถกระจายตัวออกจากพื้นที่ส่วนสกัด (extraction zone) ไปยังบริเวณอื่นได้ง่าย ทำให้มีอัตราการถ่ายเทมวลสูง ส่งผลให้ของไหลเหนือวิกฤตเป็นตัวทำละลายที่ดี

ความหนืดและสัมประสิทธิ์การแพร่ของของไหลเหนือวิกฤตนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ความดัน และชนิดของของไหลเหนือวิกฤต จึงต้องมีการปรับสภาวะให้เหมาะสม เพื่อให้สกัดสารที่ต้องการได้สูงที่สุด อัตราเร็วของการถ่ายเทมวลนอกจากจะขึ้นอยู่กับปัจจัยข้างต้นแล้วยังขึ้นอยู่กับระยะทางในการแพร่ (diffusion distance) และตัวขวางกั้นการแพร่ (diffusion barriers) อีกด้วย จากการศึกษาพบว่าเมื่อขนาดความหนาของสารที่ใช้ในการสกัดลดลงจะสามารถสกัดสารได้มากขึ้น เนื่องจากการลดขนาดของสารที่ใช้ในการสกัดจะเป็นการลดระยะทางในการแพร่ และลดตัวขวางกั้นการแพร่ ทำให้การสกัดเกิดได้ดีขึ้น [12]

2.4.8 ประโยชน์ของของไหลเหนือวิกฤต

2.4.8.1 ใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัด (supercritical fluid extraction) โดยงานที่ได้รับความสนใจค่อนข้างมากคือ งานสกัดสารที่มีปริมาณน้อยๆ โดยมีจุดประสงค์เพื่อนำสารสกัดไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2.4.8.2 ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในงานวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (supercritical fluid chromatography)

2.4.8.3 ใช้ในการศึกษาทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopic studies) ของสารผสมเชิงซ้อน

2.4.8.4 ใช้สังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) เช่นนาโนเทคโนโลยี

2.4.9 คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต

คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) เป็นสารที่ไม่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม หาได้ง่าย ราคาถูก ไม่ติดไฟ มีค่าความดันวิกฤต (P_c) และอุณหภูมิวิกฤต (T_c) ต่ำ คือ P_c = 7.4 เมกกะปาสคาล และ T_c = 31 องศาเซลเซียส จึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะนำไปใช้ในการสกัดสารด้วยวิธีของไหลเหนือวิกฤต เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์มีอุณหภูมิวิกฤตต่ำ จึงทำให้สามารถใช้งานกับสารที่ไม่ทนต่อความร้อนได้ เนื่องจากสารสกัดส่วนใหญ่จะสลายตัวเมื่อมีอุณหภูมิสูง อีกทั้งยังสามารถแยกคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากสารที่สกัดได้ง่าย เพราะคาร์บอนไดออกไซด์จะกลายเป็นก๊าซเมื่ออยู่ในสภาวะบรรยากาศ ทำให้ไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์หลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์สารสกัด ตารางที่ 2.3 แสดงคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตเปรียบเทียบกับตัวทำละลายของเหลวชนิดอื่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส [14]

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตและตัวทำละลายของเหลวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส [14]

	คาร์บอนไดออกไซด์	เฮกเซน	เมธิลีนคลอไรด์	เมทานอล
ความหนาแน่น (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	0.764	0.66	1.236	0.791
ความสามารถในการแพร่ (ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อวินาที)	1	4.45	3.09	6.91
ความหนืด (กรัมต่อเซนติเมตรต่อวินาที)	6	4	2.9	1.8

การเพิ่มประสิทธิภาพการละลายของสารสกัดในคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตทำได้โดยการปรับความดัน และอุณหภูมิ เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตให้สูงขึ้น ทำให้อันตรกิริยาระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตกับสารสกัดมีมากขึ้น ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความดัน และความหนาแน่นของคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตแสดงได้ดังตารางที่ 2.4 [14]

ตารางที่ 2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความดัน และความหนาแน่นของคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต [14]

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) / ความหนาแน่น (กรัมต่อเซนติเมตรต่อวินาที)	40	50	60	70	80	90	100	110	120
1.00	526	618							
0.95	383	463	544	544	644	680			
0.90	281	350	420	420	489	518			
0.85	211	269	329	329	401	44			
0.80	164	213	264	314	365	416	467		
0.75	134	175	218	261	305	349	392	436	510
0.70	115	150	187	223	260	297	334	372	425
0.65	104	133	165	196	227	259	290	322	354
0.60	97	122	149	176	203	229	256	284	311
0.55	93	115	138	161	183	206	230	252	276
0.50	91	109	129	148	168	188	207	227	246
0.45	89	104	122	138	155	172	188	205	221
0.40	87	100	115	129	143	157	171	185	197
0.35	84	96	108	120	132	144	155	167	178
0.30	81	90	101	111	121	130	140	149	158
0.25	77	84	93	100	108	116	123	130	137
0.20	70	75	82	88	94	99	105	110	116

นอกจากนั้นการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตยังมีสิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือเรื่องของค่าความมีขั้วของของไหลเหนือวิกฤต และสารที่ต้องการสกัด เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารที่ไม่มีขั้วแต่สารประกอบฟีโนลิค (กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน) ที่ต้องการสกัดในงานวิจัยนี้เป็นสารกลุ่มที่มีขั้วดังนั้นการเติมตัวทำละลายร่วมที่มีขั้วจะช่วยเพิ่มค่าความมีขั้วและเพิ่มความสามารถในการละลายให้กับคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดดีขึ้น

2.5 ตัวทำละลายร่วม

ตัวทำละลายร่วม (co-solvent) คือตัวทำละลายหรือสารละลายที่นำมาผสมกับของไหลเหนือวิกฤต เพื่อเพิ่มความสามารถของตัวทำละลาย (solvent power) ของของไหลเหนือวิกฤต ทำให้การละลายของสารที่ต้องการสกัดดีขึ้น เนื่องจากเกิดแรงดึงดูดที่แข็งแรงระหว่างโมเลกุลของตัวทำละลายร่วมกับโมเลกุลของสาร และไปทำลายหรือลดพันธะระหว่างเมตริกซ์กับสารสกัด ซึ่งตัวทำละลายร่วมที่นิยมใช้กันทั่วไปในการสกัดได้แก่ เมทานอล ซึ่งเป็นสารระเหย มีลักษณะใส ไม่มีสี เป็นสารที่มีขั้วไม่กัดกร่อน สามารถละลายได้ในน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ และเกลืออนินทรีย์ คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของเมทานอลสามารถแสดงได้ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของเมทานอล [15]

คุณสมบัติของเมทานอล	
น้ำหนักโมเลกุล	32.042 กรัมต่อโมล
ความหนาแน่นของของเหลว	0.7864 กรัมต่อลบ.ซม
จุดเดือด (ที่ 1 บรรยากาศ)	64.70 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิวิกฤต	239.4 องศาเซลเซียส
ความดันวิกฤต	79.9 บรรยากาศ
ความหนาแน่นวิกฤต	0.272 กรัมต่อลบ.ซม

2.5.1 หน้าที่ของตัวทำละลายร่วม

การสกัดสารที่มีขั้วสูงโดยใช้วิธีคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตนั้น ส่วนใหญ่นิยมเติมตัวทำละลายร่วม เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นการเติมทำละลายร่วมจะช่วยให้สกัดสารที่มีขั้วได้ดีกว่า ตัวทำละลายร่วมจะช่วยให้การสกัดดีขึ้นดังนี้ [16]

2.5.1.1 ช่วยในการถ่ายเทมวลสารภายในโครงข่ายของแข็ง (matrix) ให้เป็นไปง่ายขึ้น

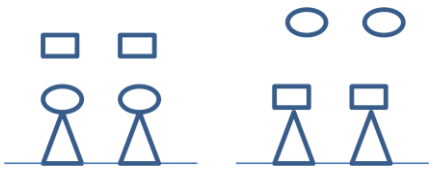
2.5.1.2 ช่วยสลายพันธะของสารสกัดและโครงข่ายของแข็ง (analyte-matrix interaction)

2.5.1.3 เพิ่มความสามารถในการทำละลาย (solvating power) ของคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต

2.5.2 พันธะในโครงข่ายของแข็งกับตัวทำละลายร่วม

การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด ทำได้โดยการเติมตัวทำละลายร่วม เพื่อช่วยทำลายหรือลดพันธะระหว่างเมตริกซ์ (matrix interaction) กับสารสกัดเป็นไปได้ดังนี้ [17]

2.5.2.1 **อิออนเอกซ์เชนจ์** (ion – exchange) คือการที่อนุภาคของตัวทำละลายร่วมเข้าไปแทนที่อนุภาคของสารสกัดโดยไปจับกับเมตริกซ์ โดยตัวทำละลายร่วมจะเป็นสารประเภทกรด เบส และสารไอออนิก ซึ่งสามารถจับกับเมตริกซ์ได้ดีกว่าสารสกัด ทำให้อนุภาคสารสกัดหลุดออกไป ดังแสดงในรูปที่ 2.13

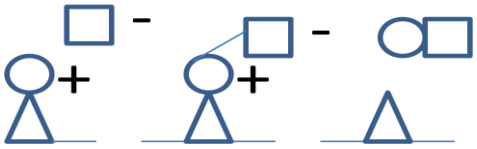


รูปที่ 2.13 หน้าที่ของตัวทำละลายร่วมแบบอิออนเอกซ์เชนจ์ [17]

2.5.2.2 **อิออนซัพเพรสชั่น** (ion – suppression) คือการทำให้สารสกัดมีประจุเป็นกลางด้วยการเติมกรดหรือเบสที่เหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 2.14

รูปที่ 2.14 หน้าที่ของตัวทำละลายร่วมแบบอิออนซัพเพรสชั่น [17]

2.5.2.3 **อิออนแพริ่ง** (ion – pairing) เป็นการทำให้เกิดแรงไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างขั้วไฟฟ้าที่ต่างกัน ระหว่างสารสกัด และตัวทำละลายร่วมดังแสดงในรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 หน้าที่ของตัวทำละลายร่วมแบบอิออนแพริ่ง [17]

ดังนั้นการเติมตัวทำละลายร่วมที่มีความเหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้สูงขึ้น โดยวิธีการเลือกตัวทำละลายร่วมที่เหมาะสมสามารถพิจารณาได้จากค่าพารามิเตอร์การละลายของสารที่ใกล้เคียงกัน

2.6 พารามิเตอร์การละลาย

พารามิเตอร์การละลาย (solubility parameter, δ) คือค่าที่แสดงถึงความแข็งแรงของแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล หรืออนุภาคของสาร ค่าพารามิเตอร์การละลายสามารถนำมาพิจารณาค่าการละลายของสารได้ ซึ่งสารที่มีค่าพารามิเตอร์การละลายใกล้เคียงกันจะสามารถละลายกันได้ดี

การคำนวณค่าพารามิเตอร์การละลายแบบแฮนเซน (Hansen Solubility Parameter, HSP) โดยวิธีพิจารณากลุ่มองค์ประกอบ (group contribution) เป็นการคำนวนค่าองค์ประกอบของพารามิเตอร์การละลาย (solubility parameter component) จากโครงสร้างทางเคมี โดยศึกษาอิทธิพลของอันตรกิริยาของกลุ่มที่มีขั้ว กลุ่มที่ไม่มีขั้วและพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเป็นวิธีที่ Hoftyzer และ Van – Krevelen ได้ทำการศึกษา และนำเสนอการคำนวนเป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้หาค่าพารามิเตอร์การละลายแบบแฮนเซน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับพอลิเมอร์โดยใช้มวลเชิงโมล (molar mass) ของหน่วยซ้ำ (repeating unit) โดยไม่จำเป็นต้องทราบความยาวของสายโซ่

องค์ประกอบของค่าพารามิเตอร์การละลายและค่าพารามิเตอร์การละลาย (δ) สามารถคำนวณได้จากสมการ (2.10) – (2.13) เพื่อคำนวณค่าองค์ประกอบพารามิเตอร์การละลายของอันตรกิริยาของส่วนที่มีขั้ว (δ_p) อันตรกิริยาของส่วนที่ไม่มีขั้ว (δ_d) และอันตรกิริยาในส่วนของพันธะไฮโดรเจน (δ_h) ตามลำดับ [18]

$$\delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_{pi}^2}}{V} \tag{2.10}$$

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{V} \tag{2.11}$$

$$\delta_h = \sqrt{\frac{\sum E_{hi}}{V}} \tag{2.12}$$

$$\delta = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} \tag{2.13}$$

โดยที่ δ คือ ค่าพารามิเตอร์การละลาย ($MPa^{1/2}$)

δ_p คือ ค่าพารามิเตอร์การละลายของส่วนที่มีขั้ว ($MPa^{1/2}$)

δ_d คือ ค่าพารามิเตอร์การละลายของส่วนที่ไม่มีขั้ว ($MPa^{1/2}$)

δ_h คือ ค่าพารามิเตอร์การละลายของพันธะไฮโดรเจน ($MPa^{1/2}$)

F_{di} คือ อันตรกิริยาของส่วนที่ไม่มีขั้วของหมู่องค์ประกอบ i ($J^{1/2}cm^{3/2}/mol$)

F_{pi} คือ อันตรกิริยาของส่วนที่มีขั้วของหมู่องค์ประกอบ i ($(J^{1/2}cm^{3/2}/mol)^2$)

E_{hi} คือ อันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนของหมู่องค์ประกอบ i (J/mol)

V คือ ปริมาตรเชิงโมล (cm^3/mol)

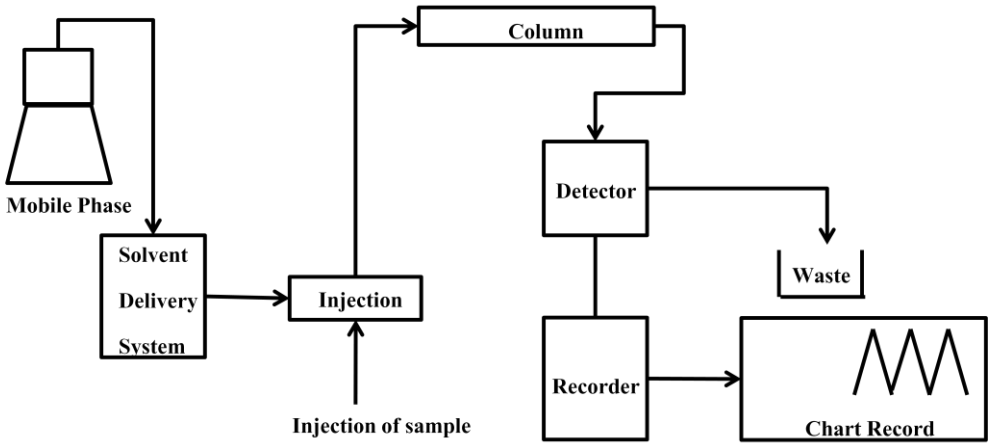
โดยหลังจากกระบวนการสกัดแล้วจะนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

2.7 โครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

โครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการแยกสาร เมื่อโมเลกุลของตัวถูกละลายในสารตัวอย่างผสมผ่านเข้าไปในคอลัมน์จะถูกพาออกจากคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ ในขณะที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่ จะเกิดการกระจายตัว (distribute) ระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กับเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ไปพร้อมๆกัน

HPLC คือวิธีการของคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์ จึงใช้ขนาดอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ขนาดเล็กมากๆ เมื่อเฟสอยู่กับที่มีขนาดเล็ก การไหลของของเฟสเคลื่อนที่จึงต้องใช้แรงดันช่วย เพื่อทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลาย

และตัวทำละลาย ทำให้การแยกเกิดเร็วขึ้น แต่เนื่องจากของแข็งที่บรรจุในเฟสอยู่กับที่มีขนาดเล็ก จึงสามารถใช้ได้กับสารตัวอย่างที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อย จากนั้นส่วนที่แยกออกมาจะถูกส่งเข้าไปตรวจวัดปริมาณและตรวจสอบว่าเป็นสารชนิดใดในเครื่องดีเทคเตอร์ [19] ดังแสดงในรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC [20]

ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC มีดังนี้

2.7.1 เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ต้องนำมากรองให้ปราศจากอนุภาคแขวนลอยต่างๆ และต้องไล่ก๊าซออกซิเจน (O_2) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่มีอยู่ออกก่อน เพราะอาจจะทำให้คอลัมน์มีฟองอากาศแทรกอยู่ สารที่จะนำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ต้องมีความหนืดต่ำ มีจุดเดือดสูงกว่าอุณหภูมิของคอลัมน์ มีความเสถียร ไม่รวมกับเฟสที่อยู่นิ่ง ใช้ได้กับเครื่องดีเทคเตอร์ ไม่เป็นพิษ ไม่ติดไฟ และมีราคาถูก

2.7.2 ปั๊ม (pump) ปั๊มที่ใช้ต้องเป็นปั๊มความดันสูง ส่วนมากเป็นปั๊มลูกสูบ ทำหน้าที่สูบดันเฟสเคลื่อนที่เข้าคอลัมน์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ

2.7.2.1 **ไอโซเครติกปั๊ม** (isocratic pump) อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่กับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์จะมีค่าคงที่ตลอด

2.7.2.2 **แกรเดียนปั๊ม** (gradient pump) เป็นปั๊มที่สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่กับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ได้ตามเวลาที่กำหนด

2.7.3 หน่วยฉีดสารตัวอย่าง (injection unit) การฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์จะต้องมีความใกล้เคียงในการวัดผล (reproducibility) สูง และการฉีดสารตัวอย่างต้องทำให้ได้แบนด์ (band) ที่แคบ การฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์มี 2 ชนิดได้แก่

2.7.3.1 **ไซริ้งค์อินเจคชั่น** (syringe injection) เป็นวิธีฉีดสารโดยใช้กระบอกฉีด (syringe) ฉีดสารตัวอย่างเข้าเซพทัม (septum)

2.7.3.2 **วาลว์บรรจุสารตัวอย่าง** (sampling valve) เป็นลักษณะของลูพ (loop) ที่กำหนดขนาดตัวอย่างได้แน่นอน

2.7.4 คอลัมน์ (column) ใน HPLC ประกอบด้วย 4 ส่วน คือ

2.7.4.1 **พรีพาเรทีฟคอลัมน์** (preparative column) เป็นคอลัมน์ที่ใช้ในการเตรียมและแยกสารปริมาณมากๆ

2.7.4.2 **คอลัมน์วิเคราะห์** (analytical column) เป็นคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารเพื่อการวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพ

2.7.4.3 **การ์ดคอลัมน์** (guard column) ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับคอลัมน์ และเพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ให้ยาวนานขึ้น

2.7.4.4 **พรีคอลัมน์ฟิวเตอร์** (pre-column filter) ทำหน้าที่กรองอนุภาค

2.7.5 เครื่องดีเทคเตอร์ (detector) ใช้วัดความเข้มข้นของสาร การเลือกใช้ชนิดของดีเทคเตอร์ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสาร เช่น สารที่ดูดกลืนแสงในช่วงอุลตร้าไวโอเลต หรือวิซิเบิลไลท์ จะใช้ยูวีวิซิเบิลดีเทคเตอร์ (UV-visible detector) ถ้าเป็นสารเรืองแสงจะใช้ฟลูออเรสเซนต์ดีเทคเตอร์ (fluorescence detector) ส่วนสารที่ไม่ดูดกลืนแสงจะวัดความเข้มข้นโดยเปรียบเทียบการหักเหของแสง

2.7.6 ถังใส่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ทำด้วยแก้วหรือสแตนเลส มีขนาดบรรจุ 1-2 ลิตร ปกติจะต่อเข้ากับระบบการขจัดก๊าซ (degassing system) เพื่อดูดก๊าซออกซิเจนหรือไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายออก เพื่อป้องกันการเกิดฟองก๊าซในคอลัมน์ ซึ่งจะรบกวนการทำงานของเครื่องวัด การวิเคราะห์โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวเรียกว่าสภาวะไอโซเครติก (isocratic condition) แต่ถ้ามีการเปลี่ยนโพลาริตี้ (polarity) ของตัวทำละลายอย่างต่อเนื่องเรียกว่าสภาวะแกรเดียน (gradient condition)

2.7.7 ส่วนควบคุมอุณหภูมิ ทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปทุมพร แม้นพงษ์ [2] ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีโนลิค (phenolic compounds) ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid) กรดแอลลาจิก (ellagic acid) และคลอริลาจิน (corilagin) จากใบสบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตร่วมกับตัวทำละลายร่วมเมทานอล ออกแบบการทดลองด้วยวิธีบ๊อกเบนเคน (Box-Bhenken) แบบ 3 ระดับ 3 ตัวแปร เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของตัวแปรต่างๆที่มีต่อผลได้ (yield) การสกัด ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ ความดันในช่วง 10 ถึง 30 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิในช่วง 40 ถึง 80 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของตัวทำละลายร่วมเมทานอลที่ 30 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร รวมทั้งผลของปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างตัวแปรที่มีผลต่อการสกัด หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยสมการที่ไม่เป็นเชิงเส้น (non-linear equation) และพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology) แบบสามมิติของสารสกัดแต่ละตัว จากผลการทดลองพบว่า ผลได้การสกัดกรดแกลลิกสูงสุดเท่ากับ 1567.68 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ โดยสภาวะที่ใช้สกัดคือ ความดัน 10 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และใช้ความเข้มข้นของตัวทำละลายร่วมเมทานอลที่ 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผลได้การสกัดกรดแอลลาจิกสูงสุดเท่ากับ 1089.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ โดยสภาวะที่ใช้สกัดคือ ความดัน 10 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และใช้ความเข้มข้นของตัวทำละลายร่วมเมทานอลที่ 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และผลได้การสกัดคลอริลาจินสูงสุดเท่ากับ 4693.60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของใบสบู่ดำ โดยสภาวะที่ใช้สกัดคือ ความดัน 30 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และใช้ความเข้มข้นของตัวทำละลายร่วมเมทานอลที่ 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นอกจากนี้ค่าทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัดเป็นตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อการสกัดกรดแกลลิกและสาร คลอริลาจิน ในขณะที่อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด และปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับความดันที่ใช้ในการสกัด เป็นตัวแปรที่มีผลต่อการสกัดกรดแอลลาจิก

ญาติกา โยธา [3] ได้ศึกษาสมบัติความเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ของเบตาไซยานิน สารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากเปลือกแก้วมังกร (*Hylocereus undatus*) โดยใช้คลื่นอัลตร้าซาวด์เสริม (ultrasound-assisted extraction) และใช้ตัวทำละลายร่วมระหว่างเอทานอลกับน้ำ จากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่สามารถสกัดสารแอนติออกซิแดนท์ที่มีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สูงสุดเท่ากับ 9.91 มิลลิกรัมเทียบเท่าวิตามินซีต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเปลือกแก้วมังกร คือการสกัดโดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 เมื่อวิเคราะห์ความเสถียรของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรพบว่า สารสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 และใช้เอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เบตาไซยานินที่สกัดได้จะมีความเสถียรมากที่สุด และสภาวะที่สารสกัดมี

คุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเสถียรที่สุดในระหว่างการเก็บรักษาคือ สารที่สกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 และใช้เอทานอลความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

Saeedeh และคณะ [9] ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และสมบัติการเป็นแอนติออกซิแดนท์ของสารสกัดจากใบหม่อน โดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ เมทานอล และอะซิโตน และวิเคราะห์สมบัติของแอนติออกซิแดนท์ ได้แก่ ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (reducing power) ความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity) และทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH (2,2-dipheyl-1-picrylhydrazyl) และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด ได้แก่ อุณหภูมิในการสกัด ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่มีผลต่อความคงตัวของสารแอนติออกซิแดนท์ในสารสกัด จากผลการทดลองพบว่าสารที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดแสดงคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดจากเมทานอลมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุด และมีคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยการสกัดสารที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และสภาวะที่เป็นกลาง พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยังสามารถคงตัวอยู่ได้ และสารสกัดที่เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จะมีความคงตัวนานถึง 30 วัน และหลังจากนั้นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะมีค่าลดลง

Murga และคณะ [21] ศึกษาเปรียบเทียบการสกัดสารประกอบฟีนอลจากเมล็ดองุ่นด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับตัวทำละลายร่วม 2 ชนิด คือ เมทานอลและเอทานอล โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิ 313 เคลวิน อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความดัน 20 และ 30 เมกกะปาสคาล สัดส่วนตัวทำละลายร่วมเท่ากับ 2 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากผลการทดลองพบว่าตัวทำละลายทั้งสองชนิดให้ผลได้การสกัดที่ใกล้เคียงกัน และยังพบว่าการเพิ่มความดันและสัดส่วนของตัวทำละลายร่วมส่งผลให้สกัดสารได้ปริมาณมากขึ้นด้วย

Rangkadilok และคณะ [22] ศึกษาการสกัดสารประกอบโพลีฟีโนลิค (polyphenolic compounds) ชนิดไฮโดรไลเซเบอแทนนิน หรือแอลลาจิกแทนนิน ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดของลำไยโดยแบ่งลำไยออกเป็นสองกลุ่ม คือ ลำไยสด และลำไยแห้ง ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยใช้เครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเมล็ดลำไยมีสารประกอบโพลีฟีโนลิคทั้ง 3 ชนิดนี้มากกว่าส่วนของเปลือกและเนื้อลำไย โดยพบกรดแกลลิกในเมล็ดแห้งและเมล็ดสดเท่ากับ 2,300 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของเมล็ดลำไยตามลำดับ พบกรดแอลลาจิกในเมล็ดแห้งและ

เมล็ดสดเท่ากับ 2,500 และ 4,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของเมล็ดลำไยตามลำดับ และพบคลอริลาจินในเมล็ดแห้งและเมล็ดสดเท่ากับ 7,800 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งของเมล็ดลำไยตามลำดับ

Markom และคณะ [23] ศึกษาผลของชนิดของตัวทำละลายและวิธีการสกัดสารไฮโดรไลเซเบอแทนนิน ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจินจากลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri* Linn.) โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องเขย่า การสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤต และการสกัดด้วยน้ำที่ความดันสูง จากผลการทดลองพบว่าความมีขั้วของตัวทำละลายที่มีค่าต่างกันจะมีผลต่อผลได้การสกัดของสารทั้งสามชนิด ซึ่งค่าการละลายของสารไฮโดรไลเซเบอแทนนินในน้ำเท่ากับ 26.2 เปอร์เซ็นต์ และในสารละลายเอทานอลเท่ากับ 20.8 - 27.1 เปอร์เซ็นต์ โดยผลได้การสกัดของกรดแกลลิก และกรดแอลลาจิกจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้น้ำเป็นทำละลาย ส่วนคลอริลาจินจะได้ค่าผลได้การสกัดสูงสุดเมื่อใช้สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลาย นอกจากนั้นยังพบว่าการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตที่ความดัน 200 บาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้เอทานอลความเข้มข้น30 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลายร่วมจะได้ปริมาณสารที่ต้องการสกัดมากที่สุด ส่วนวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องเขย่า และการสกัดด้วยน้ำที่ความดันสูงแม้จะได้ปริมาณสารสกัดสูงแต่ต้องใช้ตัวทำละลายปริมาณมากกว่า

Hollender และคณะ [24] ศึกษาการสกัดโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตกับตัวทำละลายร่วมและตัวทำละลายร่วมผสม ถ้าสารที่ต้องการสกัดนั้นมีอันตรกิริยากับโครงข่าย (matrix) สูง ซึ่งเป็นการยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะทางเคมี การสกัดสารด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตเพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถทำให้การสกัดได้ผลดี ดังนั้นการเติมตัวทำละลายร่วมจะช่วยทำลายอันตรกิริยาระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับโครงข่าย จากผลการทดลองใช้ตัวทำละลายร่วมชนิดมีขั้วและชนิดที่ไม่มีขั้ว พบว่าการใช้ตัวทำละลายร่วมแบบมีขั้วเช่น เมทานอล ให้ผลการสกัดที่ดีกว่าการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตเพียงอย่างเดียว แต่การใช้ตัวทำละลายร่วมที่ไม่มีขั้วเช่น โทลูอีน จะทำให้ผลการสกัดที่ได้ต่ำกว่าการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตเพียงอย่างเดียว นอกจากนั้นยังศึกษาผลของการเติมกรดอะซิตริกปริมาณเล็กน้อยในเมทานอลพบว่าการใช้ตัวทำละลายร่วมผสมสามารถช่วยให้การสกัดดีขึ้น

Vargas และคณะ [25] ศึกษาวิธีการสกัด สภาวะและชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) เพื่อหาค่าสัดส่วนของสารประกอบฟีโนลิค (phenolic fraction) และค่าของสารสกัดทั้งหมด (total extract) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตและตัวทำละลายร่วมได้แก่ เอทานอล และเอทธิลอะซีเตท (ethyl acetate) ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ ความดันในช่วง 10 ถึง

30 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิในช่วง 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส และชนิดของตัวทำละลายและตัวทำละลายร่วมได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์ คาร์บอนไดออกไซด์กับเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์กับเอทธิลอะซีเตท และการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเอทธิลอะซีเตทโดยใช้เครื่องเขย่า จากผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตและใช้เอทานอลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเป็นตัวทำละลายร่วม พบว่าสภาวะที่ให้ผลการสกัดดีที่สุดเท่ากับ 1.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของสัดส่วนของสารประกอบฟีโนลิค และ 19.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของสารสกัดทั้งหมด คือการสกัดที่ความดัน 30 เมกกะปาสคาล และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Yadollah และคณะ [26] ศึกษาการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต ในการสกัดยาสเตียรอยด์ (steroid) ชนิดเมอดอกซ์ซีโปรเจสสเตอโรนอะซีเตด (medroxyprogesterone acetate, med) และไซโพเทอโรนอะซีเตด (cyproterone acetate, cyp) โดยศึกษาผลของความดัน อุณหภูมิ สัดส่วนของตัวทำละลายร่วม เวลาที่ใช้ในการสกัดในขณะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตอยู่นิ่งในเซลล์สกัด (static extraction time) และเวลาที่ใช้ในการสกัดในขณะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตไหลผ่านเซลล์สกัด (dynamic extraction time) จากผลการทดลองพบว่า การเพิ่มเวลาที่ใช้ในการสกัดในขณะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตอยู่นิ่งในเซลล์สกัดเป็น 10 นาทีนั้น สามารถเพิ่มผลได้การสกัดให้สูงขึ้นได้ แต่การเพิ่มเวลาที่ใช้ในการสกัดในขณะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตไหลผ่านเซลล์สกัดนาน 15 นาทีนั้น ไม่ทำให้ผลได้การสกัดเพิ่มขึ้น สำหรับการเพิ่มความดันในช่วง 100 - 300 บาร์ และเพิ่มอุณหภูมิในช่วง 308 - 348 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถสกัด med ได้ดีขึ้น แต่กลับสกัด cyp ได้น้อยลง ในส่วนของผลการเติมเมทานอลเป็นตัวทำละลายร่วมที่ความเข้มข้น 0 1 5 10 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรนั้น พบว่าสามารถสกัด cyp ได้ดีขึ้น แต่จะสกัด med ได้น้อยลงเมื่อความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

Akgun และคณะ [27] ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแอลคานิน (alkannins) จากรากของพืชจำพวกแอลคะนาทิสโทรเลีย (*Alkanna tinctoria*) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตกับตัวทำละลายร่วมเมทานอล โดยออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบ็นเกน (Box-Behnken Design, BBD) โดยมีตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ ความดันในช่วง 50 – 350 บาร์ อุณหภูมิในช่วง 30 – 80 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 – 20 กรัมต่อนาที โดยใช้อัตราส่วนของรากของแอลคะนา (alkannaroot) ต่อคาร์บอนไดออกไซด์เป็น 1:3 จากการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองพบว่ามีค่าระดับความเชื่อมั่น (R^2) เท่ากับ 0.9665 และพบว่าความดันที่ใช้ในการสกัดเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้มากที่สุด แต่การสกัดที่ความดันสูงกว่า 300 บาร์ และอุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส กลับทำให้ปริมาณของสารสกัดลดลง นอกจากนั้นยังพบว่าและความดันที่ใช้

ในการสกัดมีอิทธิพลต่อผลได้การสกัดน้อยลง การสกัดที่ความดัน 175 บาร์ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 5 กรัมต่อนาที เป็นสภาวะที่สกัดได้ปริมาณสารแอลคานินสูงที่สุดเท่ากับ 1.47 เปอร์เซ็นต์ของแอลคานินรวมเทียบกับน้ำหนักแห้งของแอลคะนาทิสโทรเลีย ในขณะที่การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายนั้นสกัดได้เพียง 1.24 เปอร์เซ็นต์ของแอลคานินรวมเทียบกับน้ำหนักแห้งของแอลคะนาทิสโทรเลีย

Tonthubthimthong [28] ศึกษาการสกัดสารนิมบิมจากเมล็ดสะเดาโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตกับตัวทำละลายร่วมเมทานอล โดยทำการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารนิมบิมที่สกัดได้ ได้แก่ อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณนิมบิมที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อเพิ่มความดันที่ใช้ในการสกัดปริมาณของนิมบิมที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความดันจนกระทั่งสูงเกิน 23 เมกกะปาสคาล กลับพบว่าปริมาณนิมบิมที่สกัดได้จะลดลง สำหรับผลของอุณหภูมิพบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณนิมบิมที่สกัดได้ลดลง และยังพบว่าเมื่อลดขนาดของอนุภาคจะสกัดนิมบิมได้เพิ่มขึ้น และการใช้ตัวทำละลายร่วมเมทานอลไม่มีผลต่อผลได้การสกัดของนิมบิม

Patel และคณะ [29] ทำการศึกษาการสกัดน้ำมันจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต โดยทำการศึกษาอิทธิพลที่มีผลต่อการสกัดได้แก่ ความดัน อุณหภูมิ และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยพบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 1 กิโลกรัมต่อชั่วโมง พบว่าการเพิ่มความดันในช่วง 200 – 300 บาร์ ทำให้ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้เพิ่มขึ้น และการเพิ่มอุณหภูมิกับอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ปริมาณของน้ำมันที่สกัดได้เพิ่มขึ้นด้วย

Yi และคณะ [30] ทำการศึกษาอิทธิพลของตัวแปรได้แก่ อุณหภูมิ (40 – 100 องศาเซลเซียส) ความดัน (20 – 40 เมกะปาสคาล) และอัตราการไหลของของไหลเหนือวิกฤต (1 – 2 มิลลิลิตรต่อนาที) ที่มีผลต่อการสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต โดยวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกมะเขือเทศ ทำการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีบ๊อกซ์-เบ็นเกน (Box-Behnken Design, BBD) จากผลการทดลอง พบว่าผลได้การสกัดที่ได้จากการทดลองมีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากการคำนวณ โดยมีระดับความเชื่อมั่น (R^2) เท่ากับ 0.9834 และปริมาณไลโคปีนสูงสุดที่สกัดได้เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อกรัมของเปลือกมะเขือเทศ ซึ่งได้จากการสกัดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความดัน 40 เมกกะปาสคาล และอัตราการไหลของของไหลเหนือวิกฤตเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที และพบว่าความสามารถของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส

Zuo และคณะ [31] ทำการสกัดสารไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต โดยศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้น สัดส่วนตัวทำละลายร่วมของเมทานอล ขนาดอนุภาค และสภาวะที่ใช้ในการสกัดได้แก่ อุณหภูมิ ความดัน และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ จากผลการทดลองพบว่า สามารถสกัดได้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมา (% recovery) ของไอโซฟลาโวนสูงสุดเท่ากับ 87.3 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดโดยใช้สารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 50 เมกกะปาสคาล อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 9.80 กิโลกรัมต่อชั่วโมง และใช้สัดส่วนของตัวทำละลายร่วม 7.8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และพบว่าปริมาณไอโซฟลาโวนที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมเพิ่มถึง 10.2 เปอร์เซ็นต์ แต่การเพิ่มอุณหภูมิในช่วง 40 - 70 องศาเซลเซียส ทำให้ปริมาณไอโซฟลาโวนที่สกัดได้ลดลง ส่วนอิทธิพลของความดันพบว่าการเพิ่มความดันที่ใช้ในการสกัดทำให้ปริมาณไอโซฟลาโวนที่สกัดได้เพิ่มขึ้น

Lee และคณะ [32] ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโนบิเลติน (nobiletin) และแทนเจอเลติน (tangeretin) จากเปลือกส้มโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต โดยศึกษาผลของชนิดของตัวทำละลายร่วม ความเข้มข้นของตัวทำละลายร่วม และสภาวะที่ใช้ในการสกัดได้แก่ อุณหภูมิ ความดัน และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ จากผลการสกัดโดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลายร่วม ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และความดัน 30 เมกกะปาสคาล พบว่าปริมาณของโนบิเลตินและแทนเจอเลตินที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้สัดส่วนของตัวทำละลายร่วมเพิ่มขึ้นเป็น 9.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นอกจากนั้นยังพบว่าการเพิ่มอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ และการใช้เปลือกส้มซึ่งมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 0.375 มิลลิเมตร ในการสกัดจะทำให้สามารถสกัดโนบิเลติน และแทนเจอเลตินได้ปริมาณเพิ่มขึ้น

Sauceau และคณะ [33] ทำการศึกษาค่าการละลายของเอฟลูซีมายด์ (eflucimibe) ในยาโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต ร่วมกับใช้ตัวทำละลายร่วมและไม่ใช้ตัวทำละลายร่วมที่อุณหภูมิ 308.15 และ 318.15 เคลวิน และที่ความดันในช่วง 8-30 เมกกะปาสคาล ตัวทำละลายร่วมที่ใช้ศึกษาได้แก่ เอทานอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) จากผลการทดลองพบว่าค่าการละลายของสารขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความดัน โดยพบว่าที่อุณหภูมิที่ 318.15 เคลวิน และใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมของเอทานอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์เท่ากับ 5 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรตามลำดับ พบว่าการเพิ่มความดันทำให้ค่าการละลายของสารมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนที่อุณหภูมิ 318.15 เคลวิน และความดัน 20 เมกกะปาสคาล พบว่าการเพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายร่วมของเอทานอลและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ให้สูงขึ้นจะทำให้ค่าการละลายของเอฟลูซีมายด์มีค่าเพิ่มขึ้น