

# การสกัดสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรกวาวเครือขาว

## Extraction of active ingredients in *Pueraria mirifica*

นที ชินวิภาส, ปรัชญา ชัยลินฟ้า

ผศ.ดร. มานพ เจริญไชยตระกูล

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี, คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โทร. 02-9428555 ต่อ 1216 โทรสาร 02-5614621 E-mail: fengmnc@ku.ac.th

### บทคัดย่อ

โครงการนี้ได้ศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์ในกวาวเครือขาว ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง (Phytoestrogen) สารออกฤทธิ์ที่พบในกวาวเครือขาว ได้แก่ ไมโรเอสโตรลและดีออกซีไมโรเอสโตรล ซึ่งออกฤทธิ์แรงแต่มีปริมาณน้อยและสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ซึ่งออกฤทธิ์อ่อนกว่าแต่มีปริมาณมากกว่า ได้แก่ พิวราริน ไดด์ซิน ไดด์ไซน์ เจนิสทิน และเจนิสโทน สารออกฤทธิ์เหล่านี้มีประโยชน์มากมาย เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ บำรุงร่างกาย บำรุงผิวพรรณ บำรุงโลหิต เป็นต้น การสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากกวาวเครือขาว โดยใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ในโครงการนี้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด ได้แก่ อุณหภูมิของตัวทำละลาย เวลาที่ใช้ในการสกัด และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ โดยปริมาณสารที่สกัดได้ทั้งหมดจะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตัวทำละลายที่ใช้ในโครงการนี้ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และเฮกเซน เวลาในการสกัด 2 4 และ 6 ชั่วโมง และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเป็นอุณหภูมิที่สูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลายแต่ละชนิด 5 10 และ 15°C ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ในสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้ ประกอบด้วยพิวราริน ไดด์ไซน์ และไดด์ซินเป็นส่วนใหญ่ และพบเจนิสโทนเล็กน้อยในบางสภาวะ แต่ไม่พบเจนิสทิน นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพิ่มเวลาและอุณหภูมิในการสกัด จะได้ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น แต่ถ้าหากอุณหภูมิสูงเกินไป ประสิทธิภาพในการสกัดจะลดลง การใช้เฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ไม่สามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้ และการใช้ตัวทำละลายมีขั้วซึ่งได้แก่ เมทานอล และเอทานอล สามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้ โดยที่เมทานอลสามารถสกัดสารได้มากกว่าเอทานอล เพราะเมทานอลมีความเป็นขั้วสูงกว่า สภาวะที่สามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้มากที่สุดในงานวิจัยนี้ คือ การสกัดด้วยเมทานอล อุณหภูมิ 75°C เวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง โดยพบปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ 0.474 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : การสกัด, กวาวเครือขาว, ไฟโตเอสโตรเจน, ไอโซฟลาโวนอยด์

### Abstract

The aim of this project is to extract the active ingredients in *Pueraria mirifica* which have properties like the female hormone (Phytoestrogen). The active ingredients found in the *Pueraria mirifica* are Miroestrol and Deoxymiroestrol, which exhibit high bioactivity, but the amount of these compounds are relatively small. The other active ingredients are in the isoflavonoid group which exhibit lower bioactivity but can be found in the higher amounts. The active compounds in isoflavonoid group include Puerarin, Daidzin, Daidzein, Genistin, Genistein. These compounds have many benefits, such as they can be used as food supplement for healthy body and skin and for hormone replacement. In this project, the extractions of active ingredients in *Pueraria mirifica* were carried out using Soxhlet extraction. The effects of extraction temperature, extraction time and type of solvents on the extraction yield were investigated. Methanol, ethanol and hexane were selected as solvents, whereas the extraction time was varied from 2 to 6 hours. The extraction temperatures used in this work were 5, 10 and 15°C higher than the boiling points of the extraction solvents. The active ingredients extracted were analyzed using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). It was found that the majority components of the extracted isoflavonoid were Puerarin, Daidzin, and Daidzein. Genistein was found only in some extraction conditions, but no Genistin was observed. In addition, it was found that an increase in extraction time and temperature resulted in a higher amount of the extracted isoflavonoid. However, the extraction efficiency could be lower when the temperature was too high. With the use of hexane (non polar solvent), the extraction of isoflavonoid could not be achieved due to the polarity of the isoflavonoid. In fact, Isoflavonoid could only be extracted with the use of polar solvents (methanol and ethanol). In this study, methanol was found to be more effective solvent compared to ethanol due to its higher polarity. It was also found that when using methanol at 75°C with the extraction time of 6 hour, the highest extracted isoflavonoid (0.474 mg/ml) was achieved.

Keywords : Extraction, Pueraria mirifica, Phytoestrogen, Isoflavonoid

## 1. บทนำ

พืชสมุนไพรเป็นพืชที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย นอกจากจะนำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคแล้ว ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ได้อีก เช่น นำมาบริโภคเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เครื่องดื่ม สีย้อม ตลอดจนนำมาใช้ทำเป็นเครื่องสำอางได้อีกด้วย ในการนำมาใช้ อาจมีการดัดแปลงให้นำมาใช้ได้ง่ายและสะดวกขึ้น เช่น นำมาบดเป็นผง หรือนำมาหั่นให้มีขนาดเล็กลง ในปัจจุบันจึงมีการนำสมุนไพรมาทำให้อยู่ในการยาคัดหรือแคปซูล เพื่อสะดวกต่อการบริโภคมากขึ้น

กวาวเครือขาว เป็นพืชสมุนไพรที่นำสนใจอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งถูกใช้เป็นยามาตั้งแต่สมัยโบราณ สารออกฤทธิ์สำคัญในกวาวเครือขาว เป็นสารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในพืชหญิง (Phytoestrogens) ได้แก่ ไมโรเอสโตรล (Miroestrol) และ ไดออกซิไมโรเอสโตรล (Deoxymiroestrol) ซึ่งมีฤทธิ์แรงแต่มีปริมาณน้อย และมีสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids) ซึ่งมีปริมาณมากกว่าแต่ออกฤทธิ์น้อยกว่า โดยสารในกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์นี้ประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญอยู่หลายชนิดเช่น พิวราริน (Puerarin) ไดด์ซิน (Daidzin) ไดด์ไซน์ (Daidzein) เจนิสทิน (Genistin) เจนิสไทน์ (Genistein) เป็นต้น ซึ่งมีความแตกต่างมากมาย เช่น บำรุงร่างกาย บำรุงผิวพรรณ บำรุงสมอง ช่วยให้เจริญอาหาร ช่วยบำรุงโลหิต เป็นต้น ด้วยประโยชน์ที่มากมายของกวาวเครือขาว จึงมีนักวิจัยหลายท่านพยายามสกัดเอาสารออกฤทธิ์สำคัญจากกวาวเครือขาว ซึ่งการสกัดทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Conventional soxhlet extraction) เช่น เมทานอล เอทานอล เป็นต้น หรือสกัดโดยใช้ของไหลเหนือจุดวิกฤต (Supercritical fluid extraction) ซึ่งของไหลที่ใช้ในการสกัดนั้นจะต้องเป็นสารที่หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษและสามารถทำละลายสารออกฤทธิ์สำคัญในวัตถุดิบตั้งต้นได้ ซึ่งของไหลที่ใช้กันอยู่อย่างแพร่หลายในขณะนี้ก็คือคาร์บอนไดออกไซด์ แต่วิธีนี้จะสกัดเอาสารออกฤทธิ์สำคัญออกมาได้น้อยกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ อีกทั้งในการสกัดต้องสกัดที่ความดันสูง ซึ่งอาจทำให้เกิดอันตรายได้ วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จึงเป็นวิธีที่นำสนใจอีกวิธีหนึ่ง

การสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากกวาวเครือขาวในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิด เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากกวาวเครือขาว ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน โดยที่เฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่นักวิจัยหลายท่านนำไปใช้สกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากพืชชนิดอื่น แต่ยังไม่พบว่ามีการนำตัวทำละลายที่กล่าวมานี้มาใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์จากกวาวเครือขาว ทางคณะวิจัยจึงได้สนใจตัวทำละลายเฮกเซนว่าจะให้ผลการสกัดเป็นอย่างไร เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วย เมทานอลและเอทานอลที่มีนักวิจัย

หลายท่านได้ทำมาแล้ว โดยในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากกวาวเครือขาว ซึ่งสารออกฤทธิ์สำคัญดังกล่าว จะศึกษาเพียงแค่สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์เท่านั้น เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีปริมาณมากกว่า โดยทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด ได้แก่ เวลาในการสกัด อุณหภูมิของตัวทำละลาย และชนิดของตัวทำละลาย เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์จากกวาวเครือขาว โดยที่ใช้เวลาในการสกัด 2, 4 และ 6 ชั่วโมง อุณหภูมิของตัวทำละลายที่ใช้จะสูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลายนั้น 5, 10 และ 15°C สกัดด้วยเครื่องมือ Soxhlet แล้วนำสารละลายที่ได้หลังการสกัดไปวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

## 2. วัตถุประสงค์และสารเคมี

1. ผงรากกวาวเครือขาวอบแห้ง ผ่านการฆ่าเชื้อโดยฉายรังสี (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. วิชัย เจริญชีวศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

2. เมทานอล (บริษัท CARLO ERBA, ความบริสุทธิ์ 99.9%)

3. เอทานอล (บริษัท CARLO ERBA, ความบริสุทธิ์ 99.9%)

4. เฮกเซน (บริษัท CARLO ERBA, ความบริสุทธิ์ 99.9%)

สารเคมีสำหรับเครื่องมือวิเคราะห์ HPLC

1. 0.1% (v/v) acetic acid : acetonitrile (Maxima Ultrapure Water Systems (ELGA))

2. น้ำบริสุทธิ์ (16 MΩ/cm)

3. เมทานอล (HPLC grade) (Merck, Germany)

4. สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์มาตรฐาน (Sigma, USA)

## 3. วิธีการดำเนินโครงการ

### 3.1 การเตรียมอุปกรณ์ Water bath และ Cooler

ใช้ระดับน้ำที่อยู่ภายในอุปกรณ์ Cooler และ Water bath ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม โดยใช้น้ำเป็นสารหล่อเย็นไอของตัวทำละลายให้ควบแน่นหยดลงมาสกัดสาร และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวให้ความร้อนแก่สารละลายที่ Water bath เพื่อป้องกันการเกิดตะกอนขึ้นบริเวณพื้นที่การให้ความร้อน จากนั้นทำการตั้งค่าอุณหภูมิ Cooler (5°C) และ Water bath จากนั้นรอนจนกว่าอุปกรณ์ทั้งสองมีอุณหภูมิตามที่ตั้งไว้

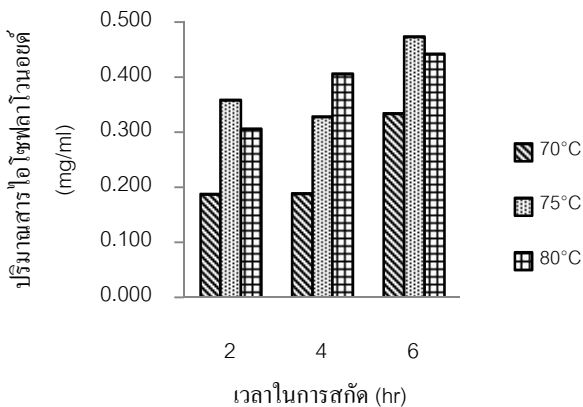
### 3.2 ขั้นตอนการสกัด

เทตัวทำละลาย (เมทานอล, เอทานอล หรือเฮกเซน) ลงในกระบอกตวงให้ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นเทตัวทำละลายที่ตวงแล้วลงใน Distillation flask และใส่ลูกแก้วเพื่อกระจายความร้อน จากนั้นปิดปากขวดด้วย Parafilm ต่อมาตักผงกวาวเครือขาว 10 กรัมบรรจุลงใน Thimble ที่มีผ้าขาวบางซ้อนอยู่ด้านใน ใส่ Thimble ลงใน Main chamber และทำการประกอบชุดเครื่องแก้ว Soxhlet รออุณหภูมิของ Cooler และ Water

bath ถึงอุณหภูมิที่เราตั้งไว้ เมื่อได้อุณหภูมิที่ต้องการแล้ว ใช้ Holder ยึดชุดอุปกรณ์ Soxhlet ตั้งไว้บน Water bath จากนั้นใช้แผ่นฟิล์มพลาสติกปิดช่องทางที่ไอน้ำจาก Water bath จะระเหยออกให้มันติด จากนั้นต่อสาย Cooling water จากเครื่อง Cooler เข้ากับตัว Condenser ของ Soxhlet และทำการเปิดปั๊มจ่ายน้ำเย็นให้ไหลเข้าไปใน Condenser สังเกตการควบแน่นเป็นหยดของตัวทำละลายที่ Condenser และเริ่มจับเวลาทันทีที่เริ่มหยดแรก และปล่อยให้ตัวทำละลายไหลหมุนเวียนอยู่ในระบบเพื่อทำการสกัดสาร จนถึงเวลาที่เรารอการเดือดจึงทำการปิด หลังจากนั้นนำสารละลายที่อยู่ใน Main chamber และ Distillation flask เทลงในกระบอกตวงเพื่อหาปริมาตรสุดท้ายหลังการสกัด และเก็บสารละลายที่ได้หลังการสกัดทั้งหมดลงในขวดสีชาและเก็บไว้ในที่มืดชื้น เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

#### 4. ผลการดำเนินโครงการและวิจารณ์ผล

นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมาวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดซ้ำ 3 ครั้งต่อการทดลอง หาค่าเฉลี่ยของปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ และนำมาสร้างกราฟแสดงผลของเวลาและอุณหภูมิต่อปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้ ดังรูปที่ 4.1 และ 4.2

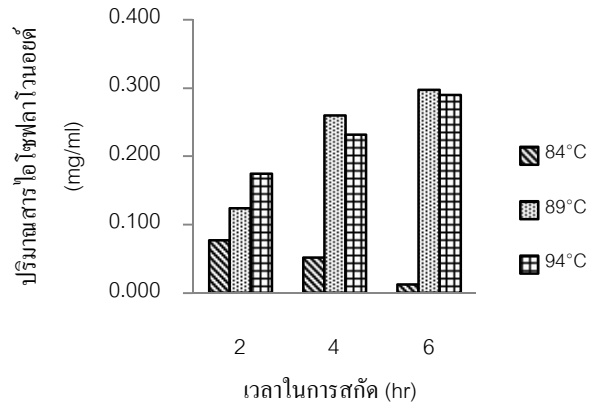


รูปที่ 4.1 ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอลที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ

##### 4.1 ผลของเวลาที่มีต่อปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์

จากรูปที่ 4.1 และ 4.2 พบว่า ปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลานานในการสกัดเพิ่มขึ้น โดยที่อุณหภูมิเท่ากัน เวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง จะทำให้ได้ปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์สูงสุด เนื่องจากการเพิ่มเวลาในการสกัด เป็นการเพิ่มเวลาให้ตัวทำละลายสัมผัสกับกาวเครือขาวได้นานขึ้น ทำให้สกัดสารไอโซฟลาโวนอยด์ออกมาได้มากขึ้น ซึ่งผลของเวลาต่อปริมาณสารที่สกัดได้สอดคล้องกับงานวิจัย [1] และ [2] แต่ในการสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 84°C นั้น ปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้มีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้เวลานานในการสกัดเพิ่มขึ้นซึ่ง

ขัดแย้งกับทฤษฎีดังกล่าว ซึ่งอาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนในการทดลอง ทำให้ผลการทดลองออกมาไม่สอดคล้องกับทฤษฎี



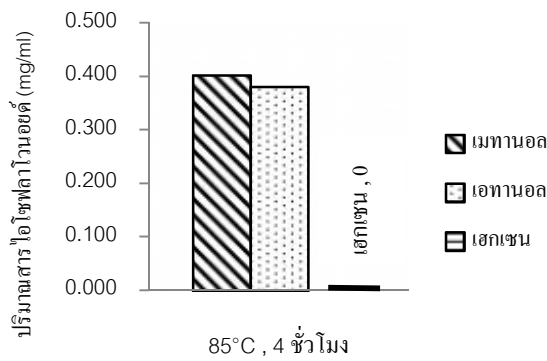
รูปที่ 4.2 ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ

##### 4.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์

จากรูปที่ 4.1 และ 4.2 พบว่าที่เวลาในการสกัดเท่ากัน ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองนี้จะสูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลาย 5, 10 และ 15°C จากผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิในการสกัดที่สูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลาย 10°C และใช้เวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง สามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ออกมาได้มากที่สุด เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิมีสองด้าน คือ เป็นการเพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ทำให้ทั้งเมทานอลและเอทานอลสามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้มากขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิในการสกัดสูงเกินไป ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้อาจจะลดลง อาจเนื่องมาจากสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์เกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิสูง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัย [3], [4] และ [5] อย่างไรก็ดีเมื่อพิจารณาที่การสกัดด้วยเมทานอลที่เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมงและการสกัดด้วยเอทานอลที่เวลาในการสกัด 2 ชั่วโมง พบว่าอุณหภูมิที่ให้ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์สูงสุดคือ 80 และ 94°C ตามลำดับ หรือสูงกว่าจุดเดือดประมาณ 15°C ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิมิผลต่ออัตราการถ่ายเทมวลของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์มากกว่าการสลายตัวของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ จึงสามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้มากกว่า

##### 4.3 ผลของตัวทำละลายที่มีต่อปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์

ต่อมาทำการศึกษาผลของตัวทำละลายที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้ โดยทำการสกัดกาวเครือขาวที่สภาวะเดียวกันคือ อุณหภูมิ 85°C เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ผลของตัวทำละลายต่อปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้ แสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด

จากรูปที่ 4.3 เป็นการสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่อุณหภูมิและเวลาเท่ากัน เพื่อเปรียบเทียบผลของตัวทำละลายที่มีต่อปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ พบว่า เมทานอลสามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ออกมาได้มากที่สุดคือ 0.403 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเอทานอลสกัดได้ 0.381 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายในการสกัด จะเห็นได้ว่า ไม่พบปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ เพราะว่าสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มสารที่มีขี้ การใช้เฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขี้ ทำให้ไม่สามารถสกัดสารกลุ่มดังกล่าวออกมาได้ ต้องใช้ตัวทำละลายที่มีขี้เท่านั้น ซึ่งทั้งเมทานอลและเอทานอลต่างเป็นตัวทำละลายที่มีขี้ จึงสามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ออกมาได้ และเมทานอลนั้นมีความเป็นขี้สูงกว่าเอทานอล แต่เนื่องจากสารออกฤทธิ์ในกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์จากถั่วเขียวสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารเสริมที่ต้องบริโภคโดยการรับประทาน แม้ว่าจะมีกระบวนการแยกตัวทำละลายออกจากสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ก่อนนำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ แต่ก็อาจจะมีเมทานอลตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ เมื่อรับประทานเข้าไปในร่างกายอาจเกิดอันตรายได้ ดังนั้นการสกัดด้วยเอทานอลจึงเป็นทางเลือกที่ดีกว่า ถึงแม้ว่าเอทานอลจะสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ออกมาได้น้อยกว่า แต่เอทานอลไม่เป็นพิษต่อร่างกาย จึงเหมาะกับการสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์เพื่อนำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

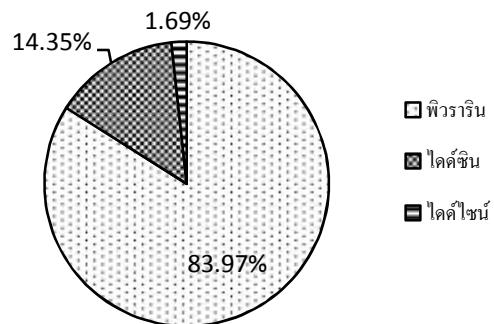
#### 4.4 การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต

ในเรื่องต้นโครงการนี้ยังได้ทดลองสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากถั่วเขียวโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตเป็นตัวทำละลาย โดยทำการสกัดที่ความดัน 170 บาร์ อุณหภูมิ 40°C ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 200 มิลลิลิตร และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 1 มิลลิลิตรต่ออนาที และนำสารที่สกัดได้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้มีเพียง 0.003 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีฟิราริน 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และโคดีซิน 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แม้ว่าวิธีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตนั้น มีข้อดีคือ ไม่มีตัวทำ

ละลายตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ แต่ได้ปริมาณสารที่ได้นั้นน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งสามารถสกัดได้ปริมาณมากกว่า

#### 4.5 องค์ประกอบของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์

จากการทดลองพบว่า สภาวะที่ทำให้การสกัดถั่วเขียวแล้วได้ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ การสกัดด้วยเมทานอลที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยพบปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 0.474 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งประกอบไปด้วยฟิราริน โคดีซิน และโคดีไซน์ 0.398 0.068 และ 0.008 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 84, 14 และ 2 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 องค์ประกอบของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

เจนิสทินและเจนิสทินนั้น พบในบางสภาวะเท่านั้น โดยที่เจนิสทินนั้นพบในการสกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลที่อุณหภูมิ 85°C เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณ 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือประมาณร้อยละ 0.25 ซึ่งถือว่าน้อยมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในถั่วเขียวที่ใช้ในการทดลองมีองค์ประกอบของเจนิสทินน้อยมาก หรืออาจเกิดจากการสลายตัวเนื่องจากความร้อน ส่วนเจนิสทินพบในการสกัดด้วยเมทานอลที่อุณหภูมิ 70 และ 75°C โดยมีปริมาณเพียง 0.004 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือประมาณร้อยละ 2 ของปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้ทั้งหมด ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากถั่วเขียวที่ใช้มีองค์ประกอบของเจนิสทินอยู่น้อย หรืออาจเกิดจากการสลายตัวเนื่องจากความร้อน เพราะจากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิสภาวะที่สามารถสกัดเอเจนิสทินออกมาได้มากที่สุดคือการสกัดด้วยเมทานอล ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และปริมาณเจนิสทินมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่ออุณหภูมิหรือเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ดังนั้นเหตุผลที่ว่าเจนิสทินเกิดสลายตัวเมื่อได้รับความร้อนจึงน่าจะเป็นความเป็นไปได้มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัย [6] ที่ได้ทำการสกัดถั่วเขียวจาก 28 จังหวัดทั่วประเทศด้วยวิธี Sonication เพื่อศึกษาปริมาณสารในกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ พบว่าปริมาณและองค์ประกอบของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้จากถั่วเขียวในแต่ละจังหวัดมีความแตกต่างกัน ซึ่งเฉลี่ยแล้วสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากถั่วเขียวส่วนใหญ่จะเป็น

เจนิสทินและพิวราริน โดยมีปริมาณเฉลี่ยประมาณ 44 และ 29% ของปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และมีเจนิสทินน้อยที่สุด โดยมีเพียง 1.5% ของปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ทั้งหมด [7] ดังนั้น หากต้องการสกัดเจนิสทินและเจนิสทิน จึงควรทำการสกัดด้วยวิธี Sonication เพื่อนำเจนิสทินและเจนิสทินออกมาก่อน จากนั้นจึงนำกาวเครือขาวมาทำการสกัดอีกครั้งด้วยวิธี Soxhlet เพื่อทำการสกัด พิวราริน ไดคัสซิน ไดคัสซินต่อไป

## 5. สรุปผลการดำเนินโครงการงาน

จากการศึกษาในโครงการงานนี้พบว่า ปัจจัยที่ผลต่อการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากกาวเครือขาว ได้แก่ เวลาในการสกัด อุณหภูมิและชนิดของตัวทำละลาย โดยพบว่าปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์มีค่ามากขึ้น หากเพิ่มเวลาในการสกัด ทั้งนี้เพราะการเพิ่มเวลาในการสกัดเป็นการเพิ่มเวลาให้ตัวทำละลายสัมผัสกับวัตถุดิบที่ต้องการสกัดมากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดเพิ่มขึ้น ส่วนผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสกัดพบว่าถ้าอุณหภูมิของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น จะเป็นการเพิ่มอัตราการถ่ายโอนมวล ทำให้ตัวทำละลายสามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้มากขึ้น ทั้งนี้การเพิ่มอุณหภูมิจะต้องเพิ่มไม่ให้อุณหภูมิสูงเกินไป เนื่องจากจะทำให้สารที่เราต้องการนั้นเกิดการสลายตัวได้ ชนิดของตัวทำละลายก็มีผลต่อการสกัดเช่นกัน โดยพบว่าเฮกเซนไม่สามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้ เนื่องจากเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว แต่สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มที่มีขั้ว ดังนั้น เมทานอลและเอทานอลจึงสามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ออกมาได้ โดยที่เมทานอลสามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ออกมาได้มากที่สุด 0.403 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพราะเมทานอลมีความเป็นขั้วสูงกว่าเอทานอลซึ่งสามารถสกัดสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้ 0.381 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่หากต้องการสกัดสารไอโซฟลาโวนอยด์เพื่อนำไปทำเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ ควรเลือกใช้เอทานอลในการสกัด เนื่องจากเอทานอลไม่มีความพิษต่อร่างกาย สภาวะการสกัดที่พบปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์มากที่สุดนี้คือ ที่อุณหภูมิ 75°C เวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยมีปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ 0.474 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับ การสกัดกาวเครือขาวโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤตเป็นตัวทำละลาย ที่ความดัน 170 บาร์ อุณหภูมิ 40°C ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ทั้งหมด 200 มิลลิลิตร และอัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่ามีปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์เพียง 0.003 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จึงเป็นวิธีการสกัดที่น่าสนใจอีกวิธีหนึ่งในการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากกาวเครือขาว

## 6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยนี้

## 7. เอกสารอ้างอิง

- [1] Lapornik, B., Prosek, M. and Wondra, A.G., Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 2005, 71: 2114-222.
- [2] Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D.M., Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 2007, 81: 200-208.
- [3] Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey J.B., Webby, R.F. Mitchell, K.A., Foo, L.Y. and Perry, N.B., Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry*, 2007, 101: 1417-1424.
- [4] Spigno, G. and De Faveri, D.M., Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78, 793-801.
- [5] Thoo, Y.Y., Ho, S.K., Liang, J.Y., Ho, C.W. and Tan, C.P., Effect of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 2010, 120: 290-295.
- [6] Cherdshewasart, W., Subtang, S. and Dahlan, W., Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43: 428-434.
- [7] วิชัย เจริญศาสตร์. นวัตกรรมสมุนไพรกาวเครือขาว. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัททวิ พรินท์ (1991) จำกัด. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 2552.