

การสกัดสารโพรแอนโธไซยานินสีจากเมล็ดองุ่น ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด*

สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม¹⁾

¹⁾ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

Email: skajorn3@yahoo.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษา การสกัดสารโพรแอนโธไซยานินสีจากเมล็ดองุ่น ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด โดยเน้นศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ เช่น ความดัน อุณหภูมิ และ ขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่น ที่มีผลต่อปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินสีที่สกัดได้โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดเป็นตัวสกัดภายใต้สภาวะความดันในช่วง 30-40 MPa อุณหภูมิในช่วง 35 ° C - 45 ° C และ ขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่น 3 ขนาด คือ 20-40 mesh 40-60 mesh และ 60-80 mesh นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังศึกษาและเปรียบเทียบการสกัดสารโพรแอนโธไซยานินสีจากเมล็ดองุ่นโดยใช้เอทานอลเป็นตัวสกัดร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด สารที่สกัดได้ในแต่ละสภาวะการสกัดจะนำมาผ่านกระบวนการ ไฮโดรไลซิส และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินสีด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการสกัดสารจากเมล็ดองุ่นด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด เป็นตัวสกัดอย่างเดียวจะได้ปริมาณของสารโพรแอนโธไซยานินสีมากที่สุด 50.13 มิลลิกรัม/100กรัมเมล็ดองุ่น ภายใต้สภาวะความดันที่ 40 MPa อุณหภูมิ 40 ° C และ ขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่น 60-80 mesh และปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินสีที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้น 4.03 % เมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวสกัดร่วมภายใต้สภาวะการสกัดเดียวกัน

คำสำคัญ : คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด การสกัด เมล็ดองุ่น โพรแอนโธไซยานินสี

* รับต้นฉบับเมื่อวันที่ 13 กรกฎาคม 2549 และได้รับบทความฉบับแก้ไขเมื่อวันที่ 11 สิงหาคม 2549

The Extraction of Proanthocyanidines from Grape Seed by Supercritical Carbon Dioxide^{*}

Somjai Kajorncheappunngam¹⁾

¹⁾ Assistant Professor Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University 40002

Email: skajorn3@yahoo.com

Abstract

This research work is a study of supercritical carbon dioxide extraction of proanthocyanidins from grape seeds. The effect of various parameters such as pressure, temperature and particle size of the grape seed on the amount of proanthocyanidins that was extracted by supercritical carbon dioxide are emphasized. The extraction was carried out under the pressure range of 30-40 MPa, temperature range of 35 °C - 45 °C and with three different particle sizes of grape seeds namely 20-40 mesh 40-60 mesh and 60-80 mesh. In addition, the extraction of proanthocyanidines from grape seed by utilizing ethanol as a co-solvent with supercritical carbon dioxide was also studied and compared. To determine the amount of proanthocyanidines, the extract at each extracting condition was hydrolyzed and subsequently analyzed by UV/Visible spectrophotometer.

The results show that the maximum amount of proanthocyanidins of 50.13 mg/100g of grape seed was obtained when only supercritical carbon dioxide was used as an extracting fluid under the pressure of 40 MPa, temperature of 40 °C and particle size of grape seed 60-80 mesh. The increasement of 4.03 % of proanthocyanidins was obtained when ethanol was used as a co-solvent with supercritical carbon dioxide under the same condition of extraction.

Keywords : Supercritical carbon dioxide, Extraction, Grape seed, Proanthocyanidins

^{*} Original manuscript submitted: July 13, 2006 and Final manuscript received: August 11, 2006

บทนำ

โดยทั่วไปการสกัดสารต่างๆ จะใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ เฮกเซน เอทานอล เมทานอล อะซีโตน เตตระไฮโดรฟิวแรน และปีโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น ซึ่งปัญหาที่พบในการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ ต้องใช้สารในปริมาณมาก สารที่นำมาใช้มีราคาสูง ไวไฟ สิ้นเปลืองเวลา เนื่องจากต้องทำหลายขั้นตอน และที่สำคัญสารที่นำมาใช้เป็นอันตรายต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันพบว่าการสกัดโดยใช้ของไหลวิกฤตยิ่งยวด เป็นการสกัดที่อาศัยคุณสมบัติของตัวทำละลายที่สภาวะวิกฤต ของไหลวิกฤตยิ่งยวดมีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์อยู่ระหว่างก๊าซกับของเหลว คือ มีความหนาแน่นค่อนข้างสูงคล้ายของเหลว แต่จะมีความหนืดต่ำและมีความสามารถในการแพร่เข้าไปในโครงสร้างของของแข็งได้ดี ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงนิยมนำของไหลวิกฤตยิ่งยวดมาใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เนื่องจากมีข้อดีกว่าตัวทำละลายที่อยู่ในสถานะของเหลว คือ มีอัตราการถ่ายเทมวล (mass transfer) เร็วกว่า และมีความสามารถในการทำละลาย และ จำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการสกัดดีกว่า [Mukhopadhyay, 2000] นักวิจัยจึงเริ่มหันมาสนใจสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่อย่างมากมาย โดยใช้เทคโนโลยีการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid extraction) และใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) วิกฤตยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide) มาเป็นตัวทำละลาย เนื่องจากว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีข้อดีคือ เป็นก๊าซเฉื่อย ไม่ไวไฟ มีราคาถูก ง่ายต่อการจัดหา เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไม่มีกลิ่น รส และความเป็นพิษ นอกจากนี้ไม่มีตัวทำละลายเหลือตกค้างอยู่ในส่วนที่สกัดได้ เพราะคาร์บอนไดออกไซด์จะกลับสถานะเป็นก๊าซที่สภาวะบรรยากาศภายหลังการสกัด ยิ่งไปกว่านั้นอุณหภูมิวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์ (31.1 °C) มีค่าไม่สูงจนเกินไป จึงไม่มีปัญหาของการสลายตัวของสารที่สกัดได้อันเนื่องมาจากความร้อน [สมใจ และ อาทิตย์, 2546 ; นิตยา, 2548] และให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและความบริสุทธิ์สูง [Bright and McNally, 1992] วิธีนี้จึงเป็นวิธีการสกัดที่สามารถใช้ได้กับการสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีต้นทุนในการสกัดสูง เนื่องจากอุปกรณ์ต่างๆ ที่นำมาใช้มีราคาแพง ดังนั้นเทคนิคการสกัดโดยใช้ของไหลวิกฤตยิ่งยวดจึงยังไม่เป็นที่นิยมในประเทศไทย

ปัจจุบัน ประเทศไทยได้มีการปลูกองุ่นมากขึ้นกว่าแต่ก่อนเป็นจำนวนมาก ไร่องุ่นเหล่านี้ นอกจากจำหน่ายผลองุ่นแล้ว ยังจำหน่ายผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปมาจากองุ่นอีกด้วย เช่น ไวน์องุ่น น้ำองุ่น พาย คุกกี้ ไอศกรีม ฯลฯ ในขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะใช้ประโยชน์จากเนื้อองุ่น และทิ้งเมล็ดองุ่นไป นับเป็นสิ่งที่น่าเสียดายเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากในเมล็ดองุ่นประกอบด้วยวิตามินหลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี และกรดไขมันอิสระ เช่น กรดไลโนเลอิก กรดโอเลอิก กรดพาล์มิติก และกรดสเตียริก เป็นต้น นอกจากนี้ในเมล็ดองุ่นยังประกอบด้วยสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ชื่อ โพรแอนโธไซยานินดีนส์ (Proanthocyanidins) เป็นจำนวนมาก สารนี้เมื่อรวมตัวกันจะอยู่ในรูปโอลิโกเมอร์ริก โพรแอนโธไซยานินดีนส์ (Oligomeric Proanthocyanidins) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า สาร “OPCs” สารนี้มีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีฤทธิ์แรงกว่าวิตามินอีถึง 1,000 เท่า โดยเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกายให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นและเป็นการลดอัตราเสี่ยงต่อ

การเกิดโรคมะเร็ง [Gabetta et al., 2000] จากคุณสมบัตินี้เอง สารโพรแอนโทไซยานิดินส์ (Proanthocyanidins) จึงช่วยบำรุงผิวพรรณให้เต่งตึง ไม่เหี่ยวยุบ ช่วยรักษาฝ้า กระ รักษาความผิดปกติของหลอดเลือดและเส้นเลือดฝอย [Gabetta et al., 2000 and Makris et al., 2006]

ได้มีการนำคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดมาประยุกต์ใช้ในการสกัดสารมีประโยชน์จากเมล็ดองุ่นตัวอย่างเช่น Gomez และ คณะ (1996) ได้ใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดในการสกัดน้ำมันจากเมล็ดองุ่นและนำผลการทดลองเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและพบว่าคุณภาพของน้ำมันที่ได้จากการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดจะดีกว่าและยังช่วยลดขั้นตอนการกลั่นเพื่อกำจัดเฮกเซนออกจากน้ำมันอีกด้วย Cao และ Ito (2003) ใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดสกัดน้ำมันและกรดไขมันอิสระจากเมล็ดองุ่นโดยเน้นศึกษาตัวแปร เช่น ความดัน อุณหภูมิ ขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่น ที่มีผลต่อปริมาณและส่วนประกอบของน้ำมันที่สกัดได้ Bravi และ คณะ (2005) ได้ทำการวิจัยเพื่อศึกษาหา สภาวะการสกัด (ความดัน อุณหภูมิ ขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่น) ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้น้ำมันจากเมล็ดองุ่นที่อุดมด้วยสาร แอลฟาโทโคเฟอโรล (α -tocopherol) ในปริมาณที่มากที่สุดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดเป็นตัวสกัด นอกจากการนำคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดมาประยุกต์ใช้กับการสกัดน้ำมันและกรดไขมันอิสระที่มีประโยชน์จากเมล็ดองุ่นแล้วยังมีการนำมาใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลจากเมล็ดองุ่น โดยในการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดสามารถปรับอุณหภูมิและความดันให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม (ความดัน 10-50 MPa และ อุณหภูมิ 40°C - 60°C) เพื่อให้เลือกสกัดสารประกอบฟีนอลบางตัวที่ต้องการ ผลจากการทดลองถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายพฤติกรรมมวลภาคของระบบของแข็ง - คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด [Murga et al., 2002]

ด้วยคุณประโยชน์อันมากมายของสารต่าง ๆ ในเมล็ดองุ่นและเพื่อให้ได้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีการปนเปื้อนน้อยลงกว่าการสกัดแบบดั้งเดิม (การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์) ประกอบกับการค้นคว้าข้อมูลพบว่าการวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ส่วนใหญ่จะเน้นการใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดในการสกัดน้ำมัน กรดไขมันอิสระ และ สารประกอบฟีนอลจากเมล็ดองุ่น ส่วนงานวิจัยและข้อมูลการใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดในการสกัดสารโพรแอนโทไซยานิดินส์ จากเมล็ดองุ่นยังมีน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะสกัดสารโพรแอนโทไซยานิดินส์ จากเมล็ดองุ่นด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด และเปรียบเทียบผลการสกัดกับการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดร่วมกับเอทานอล (มีเอทานอลเป็นตัวสกัดร่วม) โดยงานวิจัยนี้จะเน้นศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่น ความดัน และ อุณหภูมิ ที่มีอิทธิพลต่อปริมาณของสารโพรแอนโทไซยานิดินส์ที่สกัดได้ และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรแอนโทไซยานิดินส์ ที่สกัดได้โดยใช้เครื่อง ยูวี/วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV/Visible Spectrophotometer) ผลจากการศึกษาจะให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนากระบวนการสกัดสารโพรแอนโทไซยานิดินส์จากเมล็ดองุ่นด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดในระดับสเกลที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

ขั้นตอนการทดลอง

1 การสกัดสารโพรแอนโธไซยานิดินส์ (Proanthocyanidins) จากเมล็ดองุ่น ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (Supercritical carbon dioxide)

1.1 นำเมล็ดองุ่นแห้งไปอบไล่ความชื้นในตู้อบสูญญากาศ (vacuum oven) ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมงแล้วนำไปบดด้วยเครื่องบดสมุนไพรมือ แล้วทำการแยกขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นที่บดแล้ว ด้วย ตะแกรงร่อน (sieve shaker) เพื่อคัดขนาดของเมล็ดองุ่นที่บดแล้วออกเป็น 3 กลุ่มคือ ขนาด 20-40 mesh ขนาด 40-60 mesh และขนาด 60-80 mesh

1.2 นำเมล็ดองุ่นที่บดแล้ว ขนาด 20-40 mesh จำนวน 1 กรัม มาทำการสกัดด้วยเครื่อง Supercritical Fluid Extractor (SFX 220, ISCO, U.S.A.) ที่ความดัน 30 MPa และอุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดเป็นตัวสกัด สารที่สกัดได้จะถูกเก็บในหลอดแก้วที่บรรจุเมทานอล (Analytical grade, Labscan Asia, Thailand) ปริมาตร 15 มิลลิลิตรแล้วปิดฝาหลอดแก้วให้สนิท

1.3 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1 และ 1.2 แต่ใช้เมล็ดองุ่นที่บดแล้วขนาด 40 – 60 mesh และขนาด 60-80 mesh ตามลำดับ

1.4 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1 , 1.2 และ 1.3 แต่ทำการสกัดสารจากเมล็ดองุ่นที่ความดัน 35 MPa และ 40 MPa และที่อุณหภูมิ 40 °C และ 45 °C ตามลำดับ

2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรแอนโธไซยานิดินส์ ในเมล็ดองุ่น

2.1 เตรียมสารละลายโพรแอนโธไซยานิดินส์ มาตรฐานเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารที่สกัดได้ โดยเตรียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

2.2 ทำการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และการทำให้เกิดสี (colour formation) สารละลายมาตรฐาน โดยนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ จำนวน 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ เติมตัวทำละลายคือ น้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร และแบ่งมา 2 มิลลิลิตร

2.3 เติมสารละลาย Fe-Sulphate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมได้จากการละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 7.7 มิลลิกรัม ในตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Analytical grade, Intereducation supplies, Thailand) : นอร์มอลบิวทานอล (Analytical grade, Labscan Asia, Thailand) ในอัตราส่วน 2:3 โดยปริมาตร ลงในสารละลายจากข้อ 2.2 ที่มีปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.4 ปั่นให้สารละลายเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 95 °C โดยนำไปเข้าตู้อบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.5 สารละลายจะถูกทำให้เย็น และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรแอนโธไซยานิดินส์ มาตรฐาน โดยเครื่อง UV/Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm ซึ่งจะได้ค่าการดูดกลืน

คลีนแสง (absorbance) ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ ทำการพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนคลีนแสง จะได้กราฟมาตรฐานของสารโพรแอนโธไซยานินดินส์

2.6 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2, 2.3, 2.4 และ 2.5 โดยเปลี่ยนจากสารละลายมาตรฐานเป็นสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่สกัดได้จากข้อ 1 ซึ่งจะได้ค่าการดูดกลืนคลีนแสง (absorbance) มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ จะทำให้สามารถวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ ที่สกัดจากเมล็ดองุ่นได้

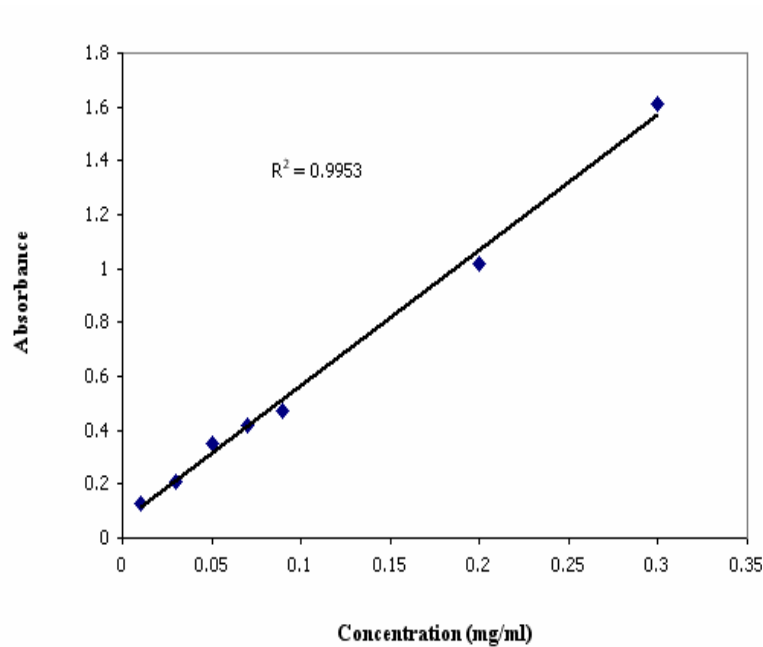
3 การสกัดสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ จากเมล็ดองุ่นด้วย คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่มีเอทานอลเป็นตัวสกัดร่วม

3.1 ทำการสกัดสารจากเมล็ดองุ่นปริมาณ 1 กรัมโดยเครื่อง Supercritical Fluid Extractor (SFX 220, ISCO, U.S.A.) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงโดยใช้สภาวะการสกัดคือ ขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่น ความดัน และ อุณหภูมิ ที่วิเคราะห์พบปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ที่สกัดได้มากที่สุดในข้อ 2.6 โดยสารที่ใช้เป็นตัวสกัดประกอบด้วย คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด 90 % และเอทานอล 10%โดยปริมาตร

3.2 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร โพรแอนโธไซยานินดินส์ ในเมล็ดองุ่นที่สกัดได้ตามวิธี การในข้อ 2

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาการสกัดสารโพรแอนโธไซยานินดินส์จากเมล็ดองุ่นโดยวิธีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดเป็นตัวสกัดอย่างเดียว และ แบบที่สกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดร่วมกับเอทานอล โดยจะศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ คือ ขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่น ความดัน และ อุณหภูมิ ที่มีผลต่อการสกัดและเปรียบเทียบปริมาณสารที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธี ผลจากการทดลองจะได้กราฟมาตรฐาน (standard curve หรือ calibration curve) ของสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ที่มีค่า $R^2 = 0.9953$ ดังแสดงในรูปที่ 1 และ ปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ที่สกัดได้จากการทดลองที่สภาวะการสกัดต่างๆแสดงในตารางที่ 1 - 3 ปริมาณสารที่สกัดได้ที่ปรากฏในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัด 3 ครั้งในแต่ละสภาวะ



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับ การดูดกลืนคลื่นแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของสารมาตรฐานโพรแอนโทไซยานินสีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมีเมทานอลเป็นตัวทำละลาย

ความดัน (MPa)	อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม / 100 กรัมเมล็ดองุ่น)
30	35	23.64
	40	24.66
	45	26.54*
	50	24.55
35	35	27.01
	40	27.30*
	45	25.18
40	35	27.32
	40	28.16*
	45	28.03

* ปริมาณสารที่สกัดได้สูงสุดในแต่ละชุดสภาวะที่ความดันคงที่

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารโพรแอนโทไซยานินสี ที่สกัดได้จากเมล็ดองุ่นที่มีขนาดอนุภาค 20 – 40 mesh ที่สภาวะต่าง ๆ

ความดัน (MPa)	อุณหภูมิ (° C)	ปริมาณสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม / 100 กรัมเมล็ดองุ่น)
30	35	29.34
	40	29.95*
	45	29.89
35	35	30.08
	40	30.99
	45	31.37*
40	35	31.88
	40	35.00*
	45	33.00

* ปริมาณสารที่สกัดได้สูงสุดในแต่ละชุดสภาวะที่ความดันคงที่

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณสารโพรแอนโทไซยานินดิสที่สกัดได้จากเมล็ดองุ่น
ที่มีขนาดอนุภาค 40 – 60 mesh ที่สภาวะต่าง ๆ

ความดัน (MPa)	อุณหภูมิ (° C)	ปริมาณสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม / 100 กรัมเมล็ดองุ่น)
30	35	37.88
	40	41.71*
	45	38.33
35	35	46.02
	40	45.26*
	45	42.55
40	35	47.90
	40	50.13*
	45	48.92

* ปริมาณสารที่สกัดได้สูงสุดในแต่ละชุดสภาวะที่ความดันคงที่

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสารโพรแอนโทไซยานินดิสที่สกัดได้จากเมล็ดองุ่น
ที่มีขนาดอนุภาค 60 – 80 mesh ที่สภาวะต่าง ๆ

อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัด

การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัดสารโพรแอนโทไซยานินดิสโดยพิจารณาที่สภาวะที่ปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ ขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นและความดันคงที่ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1 – 3 เมื่อพิจารณาตารางที่ 1 ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 20-40 mesh จะเห็นได้ว่าเมื่อให้ความดันในการสกัดคงที่ที่ 30 MPa หรือ 35 MPa หรือ 40 MPa แต่ให้อุณหภูมิในการสกัดเพิ่มขึ้นเป็น 35 °C 40 °C และ 45 °C ตามลำดับ พบว่าปริมาณของสารโพรแอนโทไซยานินดิสที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิจนถึงอุณหภูมิค่าหนึ่งหลังจากนั้นการเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลทำให้ปริมาณของสารที่สกัดได้ลดลง ตัวอย่างเช่น ที่สภาวะการสกัดที่ความดันคงที่ 30 MPa และอุณหภูมิ 45 °C จะให้ปริมาณสารที่สกัดได้สูงสุด 26.54 มิลลิกรัม/100 กรัมเมล็ดองุ่น และเมื่อให้อุณหภูมิการสกัดเพิ่มขึ้นเป็น 50 °C จะมีผลทำให้ปริมาณสารที่สกัดได้ลดลงเหลือ 24.55 มิลลิกรัม/100 กรัมเมล็ดองุ่น ในขณะที่การสกัดที่ความดันคงที่ที่ 35 MPa และ 40 MPa จะพบว่าอุณหภูมิในการสกัดที่ 40 °C จะให้ปริมาณสารที่สกัด

ได้มากที่สุด คือ 27.30 มิลลิกรัม/100 กรัมเมล็ดองุ่น (สำหรับการสกัดที่ความดันคงที่ที่ 35 MPa) และ 28.16 มิลลิกรัม/ 100 กรัม เมล็ดองุ่น (สำหรับการสกัดที่ความดันคงที่ที่ 40 MPa) และเมื่ออุณหภูมิในการสกัดเพิ่มขึ้นเป็น 45°C จะมีผลทำให้ปริมาณสารสกัดที่ได้ลดลงในทั้งสองสภาวะความดัน (35 MPa และ 40 MPa) ที่ผลเป็นเช่นนี้สันนิษฐานว่า ณ สภาวะความดันที่คงที่ที่ค่าหนึ่งจะมีอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้นที่เหมาะสมกับสภาวะการสกัดที่ทำให้ได้ผลผลิตของสารสกัดที่ต้องการมากที่สุด หากอุณหภูมิสูงกว่าค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมก็จะมีผลทำให้การสกัดได้สารประกอบตัวอื่นละลายออกมาแทนที่จะได้สารสกัดที่ต้องการซึ่งในที่นี้คือสารแอนโธไซยานินส์ นอกจากนี้ที่สภาวะการสกัดที่อุณหภูมิสูงเกินไปจะมีผลทำให้สารแอนโธไซยานินส์สลายตัวได้ ส่งผลให้ปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้ลดลง อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้ เมื่อทำการสกัดที่ขนาดอนุภาคอื่นได้แก่ ขนาดอนุภาคเมล็ดองุ่น 40-60 mesh และ 60-80 mesh ภายใต้ความดันในการสกัดคงที่แต่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นก็ให้ผลในทำนองเดียวกันกับการสกัดที่ขนาดอนุภาค 20 – 40 mesh (ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ)

อิทธิพลของความดันที่มีผลต่อการสกัด

ตารางที่ 1-3 แสดงผลของอิทธิพลของความดันที่มีต่อการสกัดสารโพรแอนโธไซยานินส์จากเมล็ดองุ่น ที่สภาวะอุณหภูมิคงที่ที่ 35 °C 40 °C และ 45°C และภายใต้ขนาดอนุภาค 3 ขนาด คือ 20-40 mesh 40-60 mesh และ 60-80 mesh ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการสกัดโดยใช้ขนาดอนุภาคเมล็ดองุ่นขนาดเดียวกันคือ 20-40 mesh หรือ 40-60 mesh หรือ 60-80 mesh และภายใต้อุณหภูมิที่คงที่ 35°C พบว่าการเพิ่มความดันในการสกัดจาก 30 MPa เป็น 40 MPa จะมีผลทำให้ปริมาณของสารโพรแอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้เพิ่มขึ้น ผลการทดลองในทำนองเดียวกันก็เกิดขึ้นกับการสกัดขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นทั้ง 3 ขนาดภายใต้สภาวะอุณหภูมิคงที่ที่ 40 °C และ 45°C เมื่อให้ค่าความดันในการสกัดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าการสกัดภายใต้สภาวะอุณหภูมิและขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นที่คงที่ การสกัดที่สภาวะความดันที่ 40 MPa จะได้ปริมาณสารสกัดโพรแอนโธไซยานินส์มากที่สุด เนื่องจากที่ความดันสูงตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดในที่นี้ได้แก่คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดจะมีความหนาแน่นมากขึ้นทำให้ตัวทำละลายมีอันตรกิริยา (interaction) กับอนุภาคเมล็ดองุ่นได้ดีขึ้นทำให้สามารถละลายสารที่ต้องการสกัดออกมาได้มากขึ้น

อิทธิพลของขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นที่มีต่อการสกัด

ในการศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคเมล็ดองุ่นที่มีต่อการสกัดนี้ได้ทำการสกัดเมล็ดองุ่น 3 ขนาด คือ 20-40 mesh (ขนาดใหญ่) 40-60 mesh (ขนาดกลาง) และ 60-80 mesh (ขนาดเล็ก) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่ทำการสกัดคงที่ 3 ระดับ คือ 35°C 40°C และ 45°C และภายใต้ความดันที่สกัดที่คงที่ 3 ระดับ คือ 35 MPa 40 MPa และ 45 MPa ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1-3 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการสกัดโดยใช้เมล็ดองุ่นทั้ง 3 ขนาดให้ผลในแนวโน้มเดียวกัน คือ ภายใต้อุณหภูมิ และความดันในการสกัดที่คงที่ ปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดอนุภาคเมล็ดองุ่นเล็ก

ลง ดังนั้นการสกัดอุ้งที่มีขนาดอนุภาคเล็ก (60-80 mesh) จะให้ปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินดินส์มากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากขนาดอนุภาคที่เล็กจะเยียดจะมีพื้นที่ผิวมากกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ หรือหยาบกว่า ทำให้ตัวทำละลายคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ใช้สกัดสามารถแพร่เข้าไปละลายสารที่ต้องการสกัดออกมาได้มากขึ้นเพราะอัตราการแพร่ของตัวทำละลายจะแปรผันโดยตรงกับพื้นที่ผิว ดังนั้นการสกัดโดยใช้ขนาดอนุภาคที่เล็กจะเยียดจึงทำให้ได้ปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ที่ต้องการสกัดมากขึ้น

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของอุณหภูมิ ความดัน และขนาดอนุภาคของเมล็ดอุ้งที่มีต่อปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ที่สกัดได้รวมกันแล้ว พบว่าขนาดของอนุภาคเมล็ดอุ้งมีผลต่อปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ที่สกัดได้มากที่สุดรองลงมา ได้แก่ อิทธิพลของความดัน ส่วนอุณหภูมิมีผลต่อปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ที่สกัดได้น้อยที่สุด (ดูตารางที่ 1-3) และเมื่อพิจารณาผลการทดลองในทุกสภาวะที่ทำการสกัดพบว่าสภาวะที่ได้สารโพรแอนโธไซยานินดินส์มากที่สุด (50.13 มิลลิกรัม/100 กรัมเมล็ดอุ้ง) ได้แก่สภาวะที่อุณหภูมิ 40 °C ความดัน 40 MPa และขนาดอนุภาคเมล็ดอุ้ง 60-80 mesh

อิทธิพลของการมีเอทานอลเป็น ตัวสกัดร่วม

การศึกษาการสกัดโดยมีเอทานอลเป็นตัวสกัดร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด เพื่อต้องการเปรียบเทียบผลกับการสกัดที่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดอย่างเดียว โดยทำการสกัดที่สภาวะเดียวกันกับสภาวะการสกัดที่ให้ปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินดินส์มากที่สุด เมื่อใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดเป็นตัวสกัดอย่างเดียว (ได้แก่สภาวะที่อุณหภูมิ 40 °C ความดัน 40 MPa และ ขนาดอนุภาคเมล็ดอุ้ง 60-80 mesh) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4

ตัวทำละลาย	ปริมาณสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม / 100 กรัมเมล็ดอุ้ง)
คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด+เอทานอล	52.15
คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด	50.13

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ที่สกัดได้จากเมล็ดอุ้งเมื่อมีและไม่มีเอทานอลเป็นตัวสกัดร่วมในสภาวะที่ใช้เมล็ดอุ้งขนาดอนุภาค 60-80 mesh ความดัน 40 MPa และ อุณหภูมิ 40 °C

จากตารางที่ 4 พบว่า การใช้เอทานอลเป็นตัวสกัดร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด ในการสกัด จะทำให้ได้ปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ มากขึ้นจากเดิม 2.02 มิลลิกรัม / 100 กรัมเมล็ดอุ้ง หรือคิดเป็นร้อยละ 4.03 ทั้งนี้เนื่องจากทั้งเอทานอลและสารโพรแอนโธไซยานินดินส์เป็นสารที่มีขั้ว ดังนั้นสารนี้จึงละลายได้ในเอทานอล การใช้เอทานอลเป็นตัวสกัดร่วมจึงเท่ากับเป็นการเพิ่มความมีขั้วให้แก่ตัวทำละลายคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ใช้สกัด มีผลช่วยทำให้ปริมาณสารที่ต้องการสกัดละลายออกมาได้มากขึ้น [Mukhopadhyay, 2000] แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสารโพรแอนโธไซยานินดินส์ที่ได้เพิ่มขึ้นมิได้เพิ่มขึ้นในปริมาณที่มากนัก ดังนั้นในการสกัดโดยมีเอทานอลเป็นตัวสกัดร่วม จึงต้องพิจารณาถึงความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ด้วยโดยต้องคำนึงถึงราคาของเอทานอลและต้นทุนที่ต้อง

เพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากต้องเพิ่มขึ้นตอนการกำจัดเอทานอลออกจากสารที่สกัดได้ภายหลังเสร็จสิ้นการสกัดแล้ว

สรุปผลการทดลอง

ขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่น ความดัน และ อุณหภูมิ ล้วนมีผลต่อปริมาณสารโพรแอนโทไซยานินสีที่สกัดได้จากเมล็ดองุ่นด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด โดยขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นมีอิทธิพลต่อปริมาณของสารโพรแอนโทไซยานินสีที่สกัดได้มากที่สุดรองลงมาได้แก่ ความดัน และ อุณหภูมิ ตามลำดับ โดยขนาดอนุภาคที่เล็กละเอียดและความดันสูงจะให้ปริมาณสารโพรแอนโทไซยานินสีมากที่สุด สำหรับสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดคือ ที่ความดัน 40 MPa อุณหภูมิ 40 °C และขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่น 60 - 80 mesh จะได้ปริมาณสารโพรแอนโทไซยานินสีมากที่สุด 50.13 มิลลิกรัม / 100 กรัมเมล็ดองุ่น และ เมื่อมีการใช้เอทานอลเป็นตัวสกัดร่วมภายใต้สภาวะการสกัดเดียวกันจะได้ปริมาณสารโพรแอนโทไซยานินสี 52.15 มิลลิกรัม / 100 กรัมเมล็ดองุ่น หรือ เพิ่มขึ้นร้อยละ 4.03

เอกสารอ้างอิง

- Bravi M., Spinoglio F., Verdone N., Adami M., Aliboni A., Santis A. De and Ferri D. 2005. **Improving the extraction of α - tocopherol - enriched oil from grape seeds by supercritical CO₂. Optimisation of the extraction conditions**, Journal of Food Engineering (Article in press).
- Bright, Frank V. and McNally, Mary Ellen P. 1992 . **Supercritical fluid technology**, Washington D.C., American Chemical Society, pp.1-17.
- Cao X. and Ito Y. 2003 . **Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high - speed counter - current chromatography**, Journal of Chromatography A, Vol. 1021, pp. 117-124.
- Grabetta B., Fuzzati N., Griffini A., Lolla E., Pace R., Ruffilli T. and Peterlonga F. 2000. **Characterization of proanthocyanidins from grape seeds**, Fitoterapia, vol. 71, pp. 162-175.
- Go'mez A. Molero, Lo'pez C. Pereyra and Ossa E. Marti'nez 1996 . **Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction : a comparison with conventional solvent extraction**, The Chemical Engineering Journal, Vol. 61, pp.227-231.
- Makris Dimitris P., Kallithraka S. and Kefalas P. 2006. **Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters**, Journal of food composition and analysis, vol. 19, pp. 396-404.
- Mukhopadhyay Mamata 2000 . **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. CRC Press, New York, pp. 1-9.
- Murga R., Sanz T., Beltra'n and Cabezas J. Luis 2002 . **Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide**, Vol. 23, pp. 113-121.
- นิตยา แซ่ลี 2548 . **เทคนิคการสกัดสารจากพืชสมุนไพรโดยอาศัยของไหลเหนือวิกฤต**. สาขาวิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม และ อาทิตย์ รัชเมสันติวานนท์. 2546 การสกัดสารด้วยของไหลวิกฤติ
ยิ่งยวด. วารสารศูนย์บริการวิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีที่ 11 ฉบับที่ 2 หน้า 37-42.