

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบชุมเห็ดเทศ *Senna alata* (L.) Roxb. ด้วยน้ำกึ่งวิกฤตและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ประนันทภา พิมสี¹, สมโภช ภู่อึ้ง², สุภาภรณ์ คางคำ^{3*}

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เพื่อสุขภาพและความงาม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ กรุงเทพมหานคร

²สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก กรุงเทพมหานคร

³สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร

*Corresponding author email: supp.kh@gmail.com

ได้รับบทความ: 28 ตุลาคม 2568

ได้รับบทความแก้ไข: 3 ธันวาคม 2568

ยอมรับตีพิมพ์: 8 ธันวาคม 2568

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบชุมเห็ดเทศ (*Senna alata* (L.) Roxb.) ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (Subcritical Water Extraction: SWE) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีสะอาดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken Design (BBD) ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด 3 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิการสกัด (80–200 องศาเซลเซียส) ความดันเริ่มต้น (1.0–30.0 บาร์) และระยะเวลา (10–90 นาที) ผลการวิจัยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดต้านอนุมูลอิสระกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ คือ ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ความดันเริ่มต้น 1.0 บาร์ และเวลาในการสกัด 50 นาที ซึ่งให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด 82.95 mg GAE/g และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด 27.13 mg CE/g

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค FT-IR และ GC-MS พบสารสำคัญกลุ่มเทอร์พินอยด์และสารระเหยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ 2-Bornanone (Camphor) และ Phytol-acetate งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคน้ำกึ่งวิกฤตเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ลดระยะเวลาในการสกัด และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง

คำสำคัญ: ชุมเห็ดเทศ/ สารประกอบฟีนอลิก/ สารประกอบฟลาโวนอยด์/ น้ำกึ่งวิกฤต/ การออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

Extraction of Bioactive Compounds from *Senna alata* (L.) Roxb. Leaves Using Subcritical Water and Chemical Characterization

Pranudda Pimsee¹, Sompoch Pooperasupong², Supaporn Khangkham^{3*}

¹Division of Health Sciences and Aesthetics,

Faculty of Science and Technology,

Rajamangala University of Technology Krungthep, Bangkok

²Division of Chemical Engineering, Faculty of Engineering and Architecture,

Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Bangkok

³Chemistry Program, Faculty of Science and Technology,

Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok

*Corresponding author email: supp.kh@gmail.com

Received: 28 October 2025

Revised: 3 December 2025

Accepted: 8 December 2025

Abstract

This research aimed to investigate the optimum conditions for the extraction of bioactive compounds from *Senna alata* (L.) Roxb. leaves by subcritical water extraction (SWE), which is an environmentally friendly and clean technology. The Box-Behnken Design (BBD) was used to design experiments. Three factors affecting the extraction were studied: extraction temperature (80–200 °C), initial pressure (1.0–30.0 bar), and extraction time (10–90 min). The results indicated that the optimum conditions for the extraction of phenolic and flavonoid antioxidants were 200 °C, 1 bar, and 50

min. Under these conditions, the highest total phenolic content of 82.95 mg GAE/g and total flavonoid content of 27.13 mg CE/g were obtained. Chemical composition analysis using FT-IR and GC-MS revealed the presence of major terpenoids and volatile compounds, including biologically active compounds such as 2-Bornanone (Camphor) and Phytol-acetate. This research demonstrates that subcritical water extraction is an efficient, time-saving, and environmentally friendly method suitable for applications in the pharmaceutical and cosmetic industries.

Keywords: *Senna alata* (L.) Roxb. / Phenolic compounds / Flavonoid compounds / Supercritical water / Box-Behnken Design

บทนำ

อนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (Unpaired electron) ส่งผลให้มีความไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมปกติในร่างกายและจากปัจจัยภายนอก หากร่างกายมีการสะสมของอนุมูลอิสระมากเกินไปจะนำไปสู่ภาวะความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ รวมถึงกระบวนการแก่ชราของเซลล์ผิวหนัง [1-4] ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) จึงมีบทบาทสำคัญในการช่วยป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อยับยั้งการทำลายโครงสร้างของเซลล์ เนื้อเยื่อ และสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ [5-7]

ชุมเห็ดเทศ (*Senna alata* (L.) Roxb.) เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ถั่ว (Fabaceae) ที่พบกระจายพันธุ์ทั่วไปในประเทศไทยโดยมักเจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่มีความชื้นสูง สรรพคุณทางยาพื้นบ้านนิยมใช้ใบชุมเห็ดเทศในการรักษาโรคผิวหนัง เช่น กลาก เกลื้อน ผิ และแผลพุพอง จากการศึกษาทางพฤกษเคมีพบว่าใบชุมเห็ดเทศประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายกลุ่ม ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และแอนทราควิโนน (Anthraquinones) เช่น Kaempferol และ Quercetin ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่โดดเด่นในการต้านจุลชีพ ต้านการอักเสบ และมีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ ทำให้สมุนไพรชนิดนี้เป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจสำหรับการพัฒนาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและเครื่องสำอาง [8-10]

ปัจจุบันเทคโนโลยีการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (Subcritical Water Extraction: SWE) ได้รับความสนใจอย่างมากในฐานะเทคโนโลยีสีเขียว (Green Technology) สำหรับสกัดสารสำคัญจากพืช หลักการสำคัญของวิธีนี้คือการใช้ น้ำในสภาวะที่มีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 100 ถึง 374 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันที่สูงพอที่จะรักษาสภาพของน้ำให้อยู่ในสถานะของเหลว ภายใต้สภาวะดังกล่าวค่าคงที่ไดอิเล็กทริกของน้ำจะลดลงอย่างมากเมื่ออุณหภูมิ

เพิ่มขึ้น ทำให้โมเลกุลของน้ำมีคุณสมบัติความมีขั้วลดลงจนใกล้เคียงกับตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล หรือ เอทานอล ส่งผลให้น้ำกึ่งวิกฤตมีความสามารถในการละลายและสกัดสารประกอบอินทรีย์ที่มีขั้วปานกลางถึงต่ำออกจากพืชได้ดีขึ้น นอกจากนี้เทคโนโลยีการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตยังมีข้อดีคือใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้น ประหยัดพลังงาน และที่สำคัญคือปราศจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษ จึงมีความปลอดภัยสูงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม [11-16]

ด้วยเหตุผลดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบชุมเห็ดเทศโดยประยุกต์ใช้กระบวนการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) สูงสุด รวมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ได้ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) และเทคนิค Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) ข้อมูลที่ได้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานสำคัญในการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรท้องถิ่น และส่งเสริมการนำสารสกัดธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพอย่างปลอดภัยและยั่งยืน

วัสดุและวิธีการ

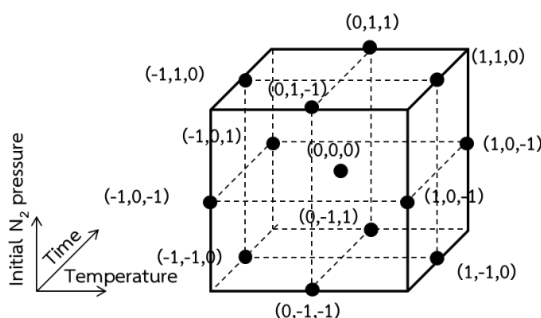
1. วัสดุและสารเคมี

ใบชุมเห็ดเทศเก็บรวบรวมจากอำเภอกาหลง จังหวัดระยอง โดยเลือกเก็บใบที่สมบูรณ์ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป นำมาล้างทำความสะอาด อบแห้งในตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert รุ่น UFE500, Germany) ที่อุณหภูมิ 55 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะได้ใบชุมเห็ดเทศแห้งที่มีความชื้นไม่เกินร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก จากนั้นนำมาบดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนมาตรฐาน (Sieve) เพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคที่สม่ำเสมอ และเก็บรักษาในโถดูดความชื้น (Desiccator) ก่อนนำไปวิเคราะห์ สารเคมีมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ กรดแกลลิก (Gallic acid) และเคอควิทิน (Quercetin) เกรดวิเคราะห์

จากบริษัท SRL (India) สารเคมีอื่น ๆ ได้แก่ Folin-Ciocalteu phenol reagent, Sodium carbonate, Aluminum nitrate และ Sodium hydroxide เกรดวิเคราะห์จากบริษัท Loba Chemie (India) และ QReC (New Zealand) แก๊สไนโตรเจนสำหรับอัดความดัน ความบริสุทธิ์ 99.99 % จาก Praxair (Thailand) และใช้น้ำปราศจากไอออน Type I, 18.2 megohm-cm (Labconco WaterPro PS) ซึ่งเป็นน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูงสุดตามมาตรฐานทั่วไปของห้องปฏิบัติการสำหรับใช้เป็นตัวทำละลายตลอดการทดลอง

2. การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยนี้ใช้การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken Design (BBD) ภาวะที่ใช้ในการทดลองมีการออกแบบไว้ดังภาพที่ 1 และความหมายของตัวเลขที่แสดงรหัสของตัวแปรได้แสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 1 การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken Design (BBD)

ตารางที่ 1 ปัจจัยที่ใช้ในการทดลองและระดับค่าของตัวแปร

ปัจจัย	ระดับค่าของตัวแปร		
	-1	0	1
Temperature (°C)	80	140	200
Initial N ₂ pressure (bar)	1	15.5	30
Operating time (min)	10	50	90

ศึกษาผลของ 3 ปัจจัยที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัด ได้แก่ อุณหภูมิการสกัด (80–200 องศาเซลเซียส) ความดันเริ่มต้น (1.0–30.0 บาร์) และระยะเวลาการสกัด (10–90 นาที) จำนวนการทดลองในแต่ละจุดจะทำ 1 ครั้ง ยกเว้นการทดลองที่จุด (0,0,0) ซึ่งเป็นจุดที่แสดงค่ากลางของแต่ละตัวแปร จะทำซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง เพื่อเป็นตัวแทนในการทดสอบความแม่นยำของการทำการทดลอง ข้อมูลผลการทดลองถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สมการถดถอยพหุนามกำลังสอง (Quadratic Polynomial Regression) เพื่อทำนายสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (Optimal conditions) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทางสถิติ Design Expert ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\text{-value} < 0.05$) สมการถดถอยสำหรับอธิบายความสำคัญของตัวแปรต่าง ๆ และทำนายค่าผลลัพธ์ได้มีสูตรทั่วไปดังสมการที่ 1

$$Y_0 = X_0 + \sum_{i=1}^3 a_i X_i + \sum_{i=1}^3 a_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{1 \leq i < j}^3 a_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

โดยที่ Y_0 คือปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ X_0 คือ ค่าคาดหวังของโมเดล X_i (หรือ X_j) คือ ตัวแปร (เช่น อุณหภูมิ ความดันเริ่มต้น หรือเวลา) และ a_i (หรือ a_{ii} หรือ a_{ij}) คือ สัมประสิทธิ์ของแต่ละพจน์ของสมการถดถอย

3. การสกัดชุมเห็ดเทศด้วยน้ำกึ่งวิกฤต

การสกัดดำเนินการโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ความดันสูง (Pressurized Reactor, Parr Instrument Company รุ่น 4560 Mini Bench Top Reactor, USA) โดยซึ่งผงใบชุมเห็ดเทศแห้ง 0.05 กรัม ใส่ลงในเครื่องปฏิกรณ์และเติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1:2000) การเลือกใช้อัตราส่วนนี้เพื่อให้มั่นใจว่ามีปริมาณตัวทำละลายมากเพียงพอ (Excess solvent) สำหรับการแพร่ของสารออกจากพืช และป้องกันการอิมัตว์ของสารละลายในระบบปิด ปิดฝาเครื่องและทำการไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้นอัดแก๊สไนโตรเจนเพื่อปรับความดันเริ่มต้นตามที่กำหนดในแผนการทดลองที่ออกแบบโดยใช้วิธี Box-Behnken Design (BBD) จำนวน 17 การทดลอง โดยมี

ปัจจัย 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิ (80, 140, 200 องศาเซลเซียส), ความดันเริ่มต้น (1, 15.5, 30 บาร์) และเวลา (10, 50, 90 นาที) เริ่มกระบวนการสกัดโดยกำหนดความดันเริ่มต้นตามแผนการทดลอง จากนั้นให้ความร้อนพร้อมกวนผสมจนถึงอุณหภูมิเป้าหมาย และคงสภาวะไว้ตามเวลาที่กำหนด เมื่อครบเวลาทำการหยุดให้ความร้อนและระบายความร้อนทันทีด้วยระบบหล่อเย็น (Cooling system) เพื่อลดอุณหภูมิลงสู่ระดับอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) ภายในเวลา 10–15 นาที เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารสำคัญจากความร้อนสะสม จากนั้นกรองแยกกากด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อนำสารละลายใส่ไปวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์ต่าง ๆ จะถูกนำไปสร้างแบบจำลองทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดวิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ตามมาตรฐาน ISO 14502-1:2005 โดยเริ่มจากการเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0–100 มิลลิกรัมต่อลิตร) สำหรับตัวอย่างสารสกัดปิเปตสารสกัด 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu (เจือจาง 10% v/v) จำนวน 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Sodium carbonate (7.5% w/v) จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu รุ่น UV-1240, Japan) รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (mg GAE/g dry weight)

5. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content)

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยวิธี Aluminum nitrate colorimetric method โดยเตรียมกราฟมาตรฐานของเคออสทิน (Quercetin) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0–100 มิลลิกรัมต่อลิตร) การวิเคราะห์ทำโดยนำสารสกัด 1 มิลลิลิตร ผสม

กับน้ำปราศจากไอออน 4 มิลลิลิตร และสารละลาย Sodium nitrite (5% w/v) 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม Aluminum nitrate (10% w/v) 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที และเติม Sodium hydroxide (4% w/v) 4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (Shimadzu รุ่น UV-1240, Japan) รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของเคอซีทินต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (mg CE/g dry weight)

6. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันและองค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (Perkin Elmer รุ่น Spectrum One, USA) โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี KBr pellet (ผสมสารสกัดแห้งกับผง Potassium bromide ในอัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วอัดเป็นเม็ด) และสแกนในช่วงเลขคลื่น $4000-400\text{ cm}^{-1}$ เพื่อระบุหมู่ฟังก์ชันของสารสำคัญ

การวิเคราะห์สารระเหยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometer (Agilent Technologies รุ่น 7890B GC system เชื่อมต่อกับ Triple Quadrupole MS, Ion source EI, USA) คอลัมน์ชนิด Capillary column รุ่น HP-5MS (30 เมตร $\times$ 0.25 มิลลิเมตร, 0.25 ไมโครเมตร) สภาวะการวิเคราะห์โปรแกรมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส จนถึง 270 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที และใช้ Split ratio 25 : 1 โดยเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารที่แยกได้กับฐานข้อมูลมาตรฐาน NIST Library เพื่อระบุชนิดของสารประกอบ

ผลการศึกษา

1. ผลของภาวะในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content: TPC)

ผลการทดลองการสกัดสารจากใบชุมเห็ดเทศด้วยน้ำกึ่งวิกฤตตามแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design (BBD) จำนวน 17 การทดลองตามที่แสดงในตารางที่ 1 พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด มีค่าอยู่ในช่วง 33.01 ถึง 82.95 mg GAE/g โดยสภาวะที่ให้ปริมาณสูงสุดคือ การทดลองลำดับที่ 14 (อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส, ความดันเริ่มต้น 1.0 บาร์, เวลา 50 นาที) จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มีความเหมาะสมอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.0006$) และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.95 ซึ่งบ่งบอกว่าแบบจำลองสามารถอธิบายความผันแปรของข้อมูลได้ร้อยละ 95 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปริมาณฟีนอลิกสูงสุดคือ อุณหภูมิ ($p\text{-value} < 0.0001$) ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีที่ว่าอุณหภูมิสูงช่วยลดค่าคงที่ไดอิลิกทริกของน้ำ ทำให้ละลายสารอินทรีย์ได้ดีขึ้น ในขณะที่ ความดันเริ่มต้น ($p\text{-value} > 0.05$) ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากในช่วงความดันที่ศึกษาน้ำยังคงสถานะเป็นของเหลว การเพิ่มความดันจึงไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติการละลายมากนัก จึงสามารถเลือกใช้ความดันเริ่มต้นต่ำสุด (1.0 บาร์) เพื่อประหยัดพลังงานได้ สำหรับการทดลองลำดับที่ 7–11 ซึ่งเป็นการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง (Center points: 140 องศาเซลเซียส, 15.5 บาร์, 50 นาที) พบว่าค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) มีความผันแปรเล็กน้อย (42.84 – 53.47 mg GAE/g) ซึ่งถือเป็นความคลาดเคลื่อนปกติจากการทดลอง (Pure error) และแสดงให้เห็นถึงความแม่นยำหรือความสามารถในการทำซ้ำได้ (Reproducibility) ของกระบวนการสกัด โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด แสดงดังตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดชุมเห็ดเทศ

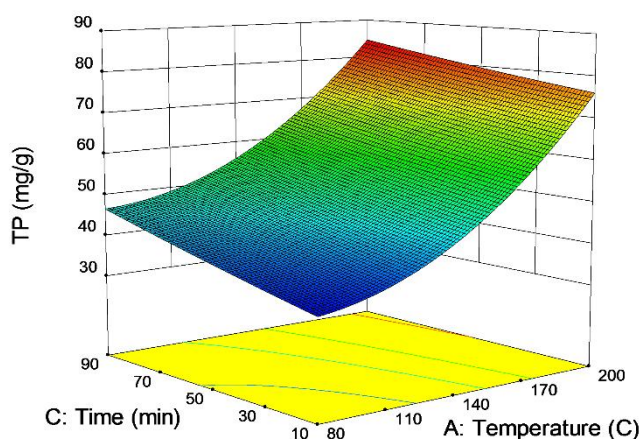
ลำดับ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความดัน (บาร์)	ระยะเวลา (นาที)	ปริมาณฟีนอลิก (mg GAE/g)
1	80	1.0	50	43.26396917
2	80	15.5	10	33.01348748
3	80	15.5	90	42.56647399
4	80	30.0	50	33.78034682
5	140	1.0	10	43.57225434
6	140	1.0	90	52.93256262
7	140	15.5	50	52.93641618
8	140	15.5	50	50.77456647
9	140	15.5	50	53.47206166
10	140	15.5	50	46.34296724
11	140	15.5	50	42.83622351
12	140	30.0	10	52.31984586
13	140	30.0	90	51.39113680
14	200	1.0	50	82.95183044
15	200	15.5	10	76.36223507
16	200	15.5	90	81.37186898
17	200	30.0	50	73.74181118

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value
Model	3713.29	9	412.59	16.73	0.0006
A-Temperature	3272.55	1	3272.55	132.68	< 0.0001
B-Pressure	16.50	1	16.5	0.67	0.4404
C-Time	66.09	1	66.09	2.68	0.1457
AB	0.019	1	0.019	7.59E-04	0.9788
AC	5.16	1	5.16	0.21	0.6612
BC	26.47	1	26.47	1.07	0.3347
A ²	320.04	1	320.04	12.98	0.0087
B ²	0.83	1	0.83	0.034	0.8597
C ²	0.48	1	0.48	0.019	0.8929

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value
Residual	172.66	7	24.67		
Lack of Fit	89.33	3	29.78	1.43	0.3584
Pure Error	83.32	4	20.83		
Core Total	3885.95	16			

*หมายเหตุ โดยที่ A คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส), B คือ ความดันเริ่มต้น (บาร์) และ C คือ เวลาการสกัด (นาที)



ภาพที่ 2 พื้นผิวตอบสนองของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดชุมเห็ดเทศที่อุณหภูมิ และระยะเวลาต่าง ๆ ความดันเริ่มต้น 1 บาร์

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดตาม ตารางที่ 3 พบว่าตัวแปรที่มีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) คือ อุณหภูมิ ในขณะที่ความดันเริ่มต้น และระยะเวลาในการสกัด ไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพื้นผิวตอบสนองของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด แสดงตามภาพที่ 2 และสามารถสร้างสมการถดถอยในเทอมของตัวแปร ตามสมการที่ 2

$$\begin{aligned} \text{TPC} = & 49.27 + 20.23A - 1.44B + 2.87C + 0.07AB - 1.14AC - 2.57BC \\ & + 8.72A^2 + 0.44B^2 + 0.34C^2 \end{aligned} \quad (2)$$

โดยที่ A คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส), B คือ ความดันเริ่มต้น (บาร์) และ C คือ เวลาการสกัด (นาที)

2. ผลของภาวะในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content: TFC)

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด มีค่าสูงสุดเท่ากับ 27.13 mg CE/g ที่สภาวะอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ความดัน 1.0 บาร์ และเวลา 50 นาที ซึ่งสอดคล้องกับผลของสารประกอบฟีนอลิก แม้ว่าผลการวิเคราะห์ ANOVA จะแสดงค่า p -value ของแบบจำลองเท่ากับ 0.0659 (ซึ่งสูงกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 เล็กน้อย) แต่แนวโน้มของข้อมูลแสดงให้เห็นชัดเจนว่า อุณหภูมิ ($p = 0.0011$) เป็นปัจจัยหลักที่ส่งเสริมการสกัดฟลาโวนอยด์ การที่ความดันและเวลาไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญช่วยยืนยันว่ากระบวนการนี้สามารถดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ต้องใช้ความดันสูงหรือเวลานานเกินไป ซึ่งช่วยลดความเสี่ยงในการสลายตัวของสารสำคัญจากความร้อน (Thermal degradation) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดแสดงดังตารางที่ 4 และ 5

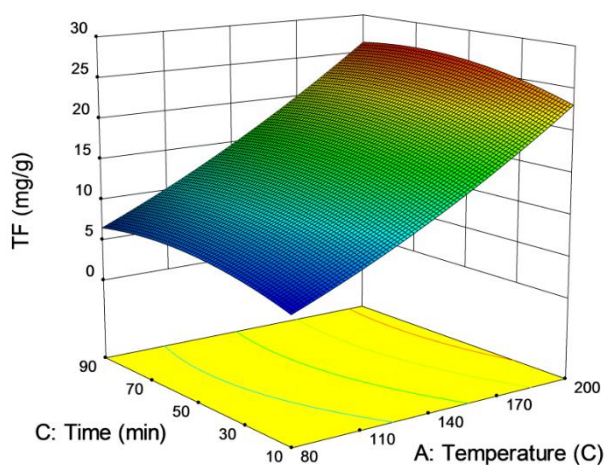
ตารางที่ 4 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดชุมเห็ดเทศ

ลำดับ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความดัน (บาร์)	ระยะเวลา (นาที)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg CE/g)
1	80	1.0	50	11.07
2	80	15.5	10	5.07
3	80	15.5	90	5.07
4	80	30.0	50	8.40
5	140	1.0	10	10.40
6	140	1.0	90	13.13
7	140	15.5	50	17.07
8	140	15.5	50	21.07
9	140	15.5	50	17.13
10	140	15.5	50	7.80
11	140	15.5	50	16.40
12	140	30.0	10	17.07
13	140	30.0	90	16.47
14	200	1.0	50	27.13
15	200	15.5	10	25.07
16	200	15.5	90	26.47
17	200	30.0	50	21.73

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัด

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value
Model	650.1156	9	72.23507	3.276939	0.065882
A-Temperature	626.5800	1	626.5800	28.42476	0.001086
B-Pressure	0.467222	1	0.467222	0.021196	0.888351
C-Time	1.560556	1	1.560556	0.070794	0.79785
AB	1.867778	1	1.867778	0.084732	0.779421
AC	0.490000	1	0.490000	0.022229	0.885684
BC	2.777778	1	2.777778	0.126014	0.733056
A ²	5.763789	1	5.763789	0.261474	0.624839
B ²	0.001684	1	0.001684	7.64E-05	0.993270
C ²	11.41689	1	11.41689	0.517926	0.495048
Residual	154.3042	7	22.04346		
Lack of Fit	58.86778	3	19.62259	0.822436	0.545746
Pure Error	95.43644	4	23.85911		
Core Total	804.4199	16			

*หมายเหตุ โดยที่ A คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส), B คือ ความดันเริ่มต้น (บาร์) และ C คือ เวลาการสกัด (นาที)



ภาพที่ 3 พื้นผิวตอบสนองของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดชุมเห็ดเทศที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ความดันเริ่มต้น 1 บาร์

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดตามตารางที่ 5 พบว่าตัวแปรที่มีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) คืออุณหภูมิ ในขณะที่ความดันเริ่มต้น และระยะเวลาในการสกัดไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพื้นผิวตอบสนองของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัด แสดงตามภาพที่ 3 และสามารถสร้างสมการถดถอยในเทอมของตัวแปร ตามสมการที่ 3

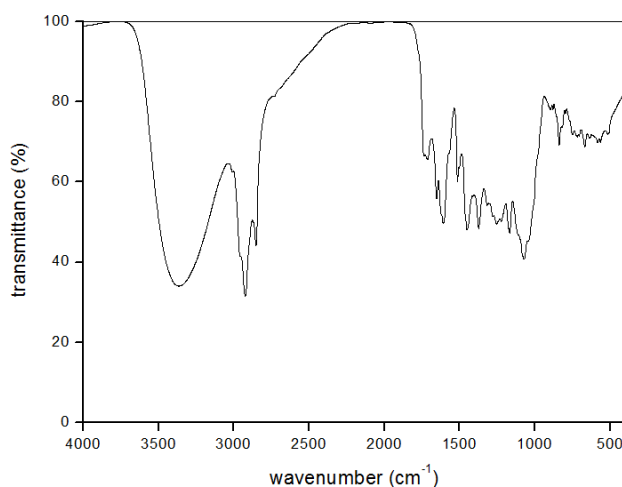
$$\begin{aligned} \text{TFC} = & 15.89 + 8.85A + 0.24B + 0.44C - 0.68AB + 0.35AC - 0.83BC \\ & + 1.17A^2 + 0.02B^2 - 1.65C^2 \end{aligned} \quad (3)$$

โดยที่ A คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส), B คือ ความดันเริ่มต้น (บาร์) และ C คือ เวลาการสกัด (นาที)

3. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารประกอบในสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ

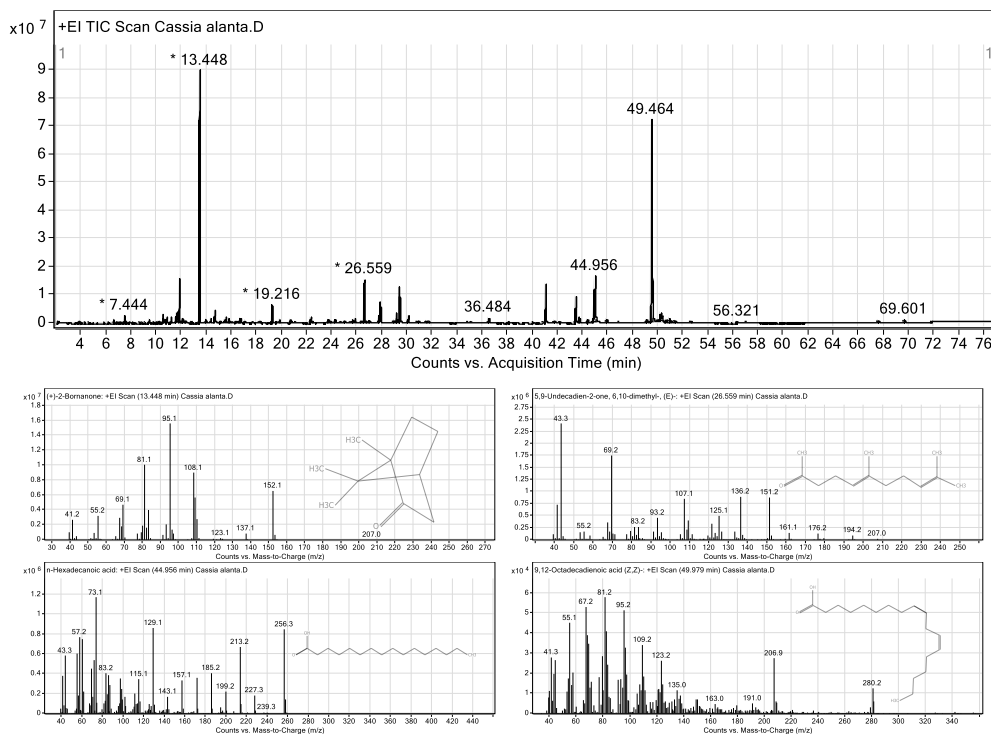
การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) ดังแสดงในภาพที่ 4 พบว่าการสั่นของพันธะในโมเลกุลแสดงในรูปแบบสเปกตรัมอินฟราเรดโดยปรากฏตำแหน่งการดูดกลืนแสงในย่านความถี่ที่สำคัญ ได้แก่ $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, $2875\text{-}2965\text{ cm}^{-1}$, $1640\text{-}1840\text{ cm}^{-1}$ และ $1290\text{-}1390\text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ จากการพิจารณาทฤษฎีการสั่นของพันธะเคมี พบว่าแถบการดูดกลืนแสงกว้างในช่วง $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ เป็นเอกลักษณ์ของการสั่นแบบยืด (Stretching vibration) ของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งเมื่อพิจารณาร่วมกับแถบการดูดกลืนแสงในช่วง $1290\text{-}1390\text{ cm}^{-1}$ ที่เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ C-O (C-O stretching) เป็นหลักฐานบ่งชี้สำคัญถึงการมีอยู่ของสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compounds) ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน O-H เชื่อมต่อกับวงแหวนอะโรมาติก นอกจากนี้แถบการดูดกลืนแสงในช่วง $1640\text{-}1840\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึงเอกลักษณ์ของการสั่นของหมู่คาร์บอนิล (C=O) หรือพันธะคู่ (C=C) ในวงแหวนอะโรมาติก ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างหลักของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) แอนทราควิโนน (Anthraquinones) หรืออนุพันธ์ของกรดคาร์บอกซิลิก ส่วนแถบในช่วง $2875\text{-}2965$

cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ C-H ของหมู่แอลคิล (Alkyl group) ซึ่งเป็นองค์ประกอบพื้นฐานในโครงสร้างของสารอินทรีย์ทั่วไป [17]



ภาพที่ 4 สเปกตรัมอินฟราเรดของสารสกัดชุมเห็ดเทศด้วยเทคนิค
Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

จากข้อมูลสเปกตรัม FT-IR จึงสามารถสรุปได้ว่ากระบวนการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตมีประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์กลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากใบชุมเห็ดเทศ ข้อสรุปนี้ยืนยันความถูกต้องได้เมื่อพิจารณาควบคู่กับผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Colorimetric method) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV/Vis) ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกันว่าสารสกัดที่ได้มีองค์ประกอบสำคัญคือสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์



ภาพที่ 5 โครมาโตแกรมของสารสกัดชุมเห็ดเทศด้วยเทคนิค

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

ผลการวิเคราะห์ GC-MS แสดงดังภาพที่ 5 โครมาโตแกรมแสดงการแยกตัวของสารระเหย (Volatile compounds) หลายชนิด โดยสามารถระบุเอกลักษณ์ของสารสำคัญได้จากการเทียบกับฐานข้อมูล NIST ดังนี้ 2-Bornanone (Camphor) พบที่เวลา Retention time ประมาณ 13.4 นาที เป็นสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) ที่มีสรรพคุณระงับเชื้อและต้านการอักเสบ Phytol-acetate พบที่เวลา Retention time ประมาณ 49.5 นาที ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของวิตามินอีและคลอโรฟิลล์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ด้วย GC-MS สามารถตรวจพบเฉพาะสารระเหยง่ายและสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ในขณะที่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่และไม่ระเหย (Non-volatile) เช่น Quercetin สามารถตรวจพบในปริมาณสูงด้วยการวิเคราะห์ Colorimetric method (Folin-Ciocalteu colorimetric method และ Aluminum nitrate colorimetric method) ดังนั้นข้อมูล

ทั้งหมดจึงถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อยืนยันองค์ประกอบของสารสกัดและสรุปได้ว่าสารสกัดที่ได้มีองค์ประกอบสำคัญคือสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

วิจารณ์

จากการศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบชุมเห็ดเทศด้วยน้ำกึ่งวิกฤตพบว่า อุณหภูมิการสกัดเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุดต่อประสิทธิภาพการสกัดโดยที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดปรากฏการณ์นี้สามารถอธิบายได้ด้วยคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของน้ำกึ่งวิกฤต กล่าวคือ เมื่อน้ำได้รับความร้อนภายใต้ความดันจนถึงสภาวะกึ่งวิกฤต ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric constant) ของน้ำจะลดลงทำให้โมเลกุลของน้ำมีขั้วลดลงและมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvents) เช่น เมทานอล หรือ เอทานอล สอดคล้องกับงานวิจัยที่เลือกใช้น้ำกึ่งวิกฤตในกระบวนการสกัด [11-16] น้ำกึ่งวิกฤตสามารถละลายและสกัดสารประกอบอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วปานกลางถึงต่ำในใบชุมเห็ดเทศ เช่น กลุ่มฟลาโวนอยด์ออกมาได้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ความดันเริ่มต้น (1.0–30.0 บาร์) และเวลาการสกัด (10-90 นาที) พบว่าเป็นปัจจัยที่ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั้นเป็นข้อดีคือสามารถใช้ความดันต่ำ (1.0 บาร์) เพื่อประหยัดพลังงานและเพิ่มความปลอดภัยในการปฏิบัติงานและเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับวิธีการสกัดดั้งเดิม เช่น การสกัดด้วยชุด Soxhlet ที่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และใช้เวลานาน 6-12 ชั่วโมง [19] การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตแสดงให้เห็นจุดเด่นอย่างชัดเจนคือสามารถสกัดสารสำคัญได้ในปริมาณสูงโดยใช้เวลาเพียง 10-50 นาที เท่านั้น นอกจากนี้ การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตยังเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Green Extraction) เนื่องจากใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว จึงไม่มีปัญหาเรื่องสารเคมีตกค้างและความเป็นพิษของตัวทำละลาย ซึ่งสอดคล้องกับแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ปลอดภัย ในส่วนของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี การวิเคราะห์ด้วย Colorimetric method (Folin-Ciocalteu colorimetric

method และ Aluminum nitrate colorimetric method) ยืนยันว่าพบสารกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูง 82.95 mg GAE/g และ 27.13 mg CE/g ตามลำดับ ซึ่งมักเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และไม่ระเหย (Non-volatile compounds) เช่น Quercetin นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ซึ่งมีความสามารถในการวิเคราะห์สารระเหยง่าย (Volatile compounds) ให้ผลวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญเพิ่มเติมอีก คือ 2-Bornanone (Camphor) และ Phytol-acetate ซึ่งสารทั้งสองกลุ่มนี้ทำงานร่วมกันในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสารกลุ่มฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ผ่านกลไกการให้อิเล็กตรอนเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระในขณะที่ Camphor มีฤทธิ์ลดการอักเสบและระงับเชื้อ และ Phytol-acetate มีส่วนช่วยในการต้านจุลชีพและปกป้องผิว ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศด้วยน้ำกึ่งวิกฤตมีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพ เช่น ผลิตภัณฑ์ลดเลือนริ้วรอยหรือผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหนังอักเสบ อย่างไรก็ตาม เพื่อความปลอดภัยสูงสุดของผู้บริโภค งานวิจัยในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเป็นพิษ (Toxicity) ในระดับเซลล์ และการทดสอบความคงตัว (Stability) ของสารสกัดเมื่อนำไปพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

สรุป

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบชุมเห็ดเทศด้วยเทคนิคน้ำกึ่งวิกฤตที่เหมาะสมที่สุดคือ อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ความดัน 1.0 บาร์ และเวลาในการสกัด 50 นาที ภายใต้สภาวะนี้สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงสุด 82.95 mg GAE/g และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด 27.13 mg CE/g นอกจากนี้ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วย FT-IR และ GC-MS ยังตรวจพบสารออกฤทธิ์สำคัญกลุ่มเทอร์พีนอยด์ ได้แก่ 2-Bornanone (Camphor) และ Phytol-acetate ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถลด

ระยะเวลาในการสกัด ลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอันตราย และให้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจและยั่งยืนสำหรับการเตรียมวัตถุดิบสมุนไพรเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เพื่อสุขภาพและความงาม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ รวมถึงบุคลากรในหน่วยงานสำหรับการให้ความสนับสนุนในการทำวิจัยทำให้งานวิจัยนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. อนงนาฏ ไพนุงศ์. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระกับสุขภาพ. วารสารวิชาการชายน์เทศ มรภ. ภูเก็ต 2560;1(2):20-27.
2. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn. Rev 2010 Jul;4(8):118-26. doi: 10.4103/0973-7847.70902.
3. Dhawan V. (2014). Reactive oxygen and nitrogen species: general considerations. In: Ganguly N, Jindal S, Biswal S, Barnes P, Pawankar R, editors. Studies on respiratory disorders. oxidative stress in applied basic research and clinical practice. New York: Humana Press. doi: 10.1007/978-1-4939-0497-6_2
4. Sarma AD, Mallick AR, Ghosh AK. Free radicals and their role in different clinical conditions: An overview. Int J Pharma Sci Res. 2010 Apr;1(3):185-192.

5. Martindah E, Khairullah AR, Widiastuti R, Andriani A, Damayanti R, Mustofa I, et al. Oxidative stress: molecular mechanisms, role in pathology, and therapeutic implications. *Trends Sci.* 2025; 22(12):Article 11462. doi: 10.48048/tis.2025.114
6. Noel KI. A reciprocal relationship between oxidative stress, antioxidants, and cancer: A Review. *Siriraj Medical Journal*; 2024;76(8), 550–556. doi:10.33192/smj.v76i8.268647
7. บุหรณ์ พันธุ์สุวรรณ. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 2556;21(3):275–286.
8. ฉัตรโย สวัสดิไชย, สุรศักดิ์ อิ่มเอี่ยม. ยาน่ารู้: ชุมเห็ดเทศ. *วารสารศูนย์การศึกษาแพทยศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้า* 2560;34(4):352-55.
9. พอตา ชัยกิจ. การทดสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมี การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของชุมเห็ดเทศ [ปริญญานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2559.
10. โชติอนันต์ อินทุไสตระกุล และคณะ. สมุนไพรไทยสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพฯ: ดวงกมลพับลิชชิง; 2551.
11. สมโภช ภูพิระสุพงษ์ และคณะ. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชุมเห็ดเทศแห้งจากการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต. ใน: การประชุมวิชาการวิศวกรรมและการก่อสร้างระดับชาติครั้งที่ 3: The 3rd NECC;18-19 พ.ค. 2566;มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก เขตพื้นที่อุเทนถวาย. กรุงเทพฯ: คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก เขตพื้นที่อุเทนถวาย; 2566. น. 274-279.
12. Cheng Y, Xue F, Yu S, Du S, Yang Y. Subcritical water extraction of natural products. *molecules.* 2021;26(13): Article 4004. doi: 10.3390/molecules 26134004.
13. Kheirkhah H, Baroutian S, Quek SY. Evaluation of bioactive compounds extracted from Hayward kiwifruit pomace by subcritical water extraction. *Food Bioprod Process.* 2019 May;115:143–153. doi :10.1016/j.fbp.2019 .03.007

14. Lachos-Perez D, Baseggio AM, Mayanga-Torres PC, Maróstica MR, Rostagno MA, Martínez J, et al. Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel. *J Supercrit Fluids*. 2018;138:7–16.
15. Zoran Z, et al. Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *J Supercrit Fluids*. 2014;95:560–566. DOI: 10.1016/j.supflu.2014.09.004.
16. Yan Z, Luo X, Cong J, Zhang H, Ma H, Duan Y. Subcritical water extraction, identification and antiproliferation ability on HepG2 of polyphenols from lotus seed epicarp. *Ind Crops Prod*. 2019;129(11):472–479.
17. เย็นหทัย แนนหนา. สเปกโทรสโกปีสำหรับเคมีอินทรีย์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2549.
18. รัตนา อินทรานุกุล. (2547). การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
19. ดวงกมล เรือนงาม. การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง 2557;23(2):120-39.