

บทความวิจัย (Research Article)

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหญ้า
หนวดแมวนรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์^{1*}, ภาวิณี อารีศรีสม², กอบลาภ อารีศรีสม² และ ศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล³Optimization of extraction conditions of phytochemicals and antioxidant activity
of *Orthosiphon aristatus* (Blume) MiqNarin Toakaenchan^{1*}, Pawinee Areesrisom², Koblap Areesrisom² and Sakchai Sateinperakul³¹ Division of Medicinal Plant Science, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290² Division of Resources Management and Development, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290³ Division of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290

* Corresponding author: narin_t15@hotmail.com

Health Science, Science and Technology Reviews. 2024;17(1):52-64.

Received: 8 January 2024; Revised: 27 March 2024; Accepted: 3 April 2024

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพฤกษเคมี (ปริมาณฟีนอลิก และ ฟลาโวนอยด์) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหญ้าหนวดแมว ในการทดลองแรกได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน (การแช่หมัก อัลตราโซนิก และไมโครเวฟ) และอัตราส่วนของเอทานอลกับน้ำ (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 และ 0:100) ต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ สารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปัจจัยทั้งสองส่งผลต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ สารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ โดยสภาวะของสกัดที่เหมาะสมที่สุดคือใช้วิธีการการสกัดด้วยอัลตราโซนิก เวลาสกัด 30 นาที และใช้อัตราส่วนของเอทานอลกับน้ำ (60:40 และ 40:60) ช่วยให้ได้น้ำหนักสารสกัดหยาบ และสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด นอกจากนี้ใช้เมื่ออัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำ 100:0 จะสกัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุด

การทดลองที่สองได้ทำการศึกษาผลของปัจจัยเดียวในการสกัดด้วยอัลตราโซนิก โดยมีสามปัจจัยที่ได้ทำการศึกษา ได้แก่ เวลาในการสกัด (5-90 นาที) อัตราส่วนของเอทานอลกับน้ำ (100:0-0:100) และน้ำหนักตัวอย่าง (0.5-5.0 กรัม) จากผลการวิเคราะห์ปัจจัยเดียวทั้งหมดที่ได้ทำการศึกษามีผลต่อการสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ต่อปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหญ้าหนวดแมว สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยอัลตราโซนิกคือ: ใช้เวลาในการสกัดเท่ากับ 70 นาที อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำเท่ากับ 80:20 และใช้น้ำหนักของตัวอย่างในการสกัดเท่ากับ 5.0 กรัม ด้วยสภาวะการสกัดต่าง ๆ เหล่าทำให้การสกัดสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย 2, 2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) มีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 951.17 ไมโครกรัมสมมูลกรด

¹ สาขาวิทยาการสมุนไพร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290² สาขาการจัดการและพัฒนาทรัพยากร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290³ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

แกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ 2.42 ไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซีตินต่อน้ำหนักมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ และความสามารถในการยับยั้งที่ระดับการยับยั้งร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 154.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: หญ้าหนวดแมว, พฤษกษเคมี, การสกัด, อัลตราโซนิก

Abstract

The objective of this research was to investigate the optimal condition extraction of phytochemicals (phenolic and flavonoid contents) and antioxidant activity from *Orthosiphon aristatus*. The first experimental was studied the different extraction methods (maceration, ultrasonic, and microwave) and the ratio of ethanol and water (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, and 0:100) on yield of extraction, contents of total phenolic, and flavonoids. The experimental results showed that these two parameters affected the yield of extraction, total phenolic, and flavonoid contents. The optimum extraction conditions were using the ultrasonic method by extraction time with 30 mins and ethanol to water ratio (60:40 and 40:60) for the highest yield of extraction and total phenolic, furthermore, using ethanol to water ratio of 100:0 for flavonoid content.

The second experimental was to determine the effect of single-factor by ultrasonic-assisted extraction. Three factors include extraction times (5-90 mins), the ratio of ethanol and water (100:0-0:100) and the sample weight (0.5-5.0 g). According to the analysis results, all single factors significantly affected phenolic, flavonoid content and antioxidant activity of *Orthosiphon aristatus* extract ($p < 0.05$). The optimal an ultrasound-assisted extraction condition were followed: the extraction time was 70 min, the ethanol to water ratio of 80:20 and the sample weight with 5.0 g. Under these conditions, the phenolic, flavonoid content and antioxidant activity with 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were 951.17 μg gallic acid equivalent (GAE)/mg extract, 2.42 mg quercetin equivalent (QE)/mg extract and IC_{50} of antioxidant value of 154.41 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Keywords: *Orthosiphon aristatus*, Phytochemical, Extraction, Ultrasonic

บทนำ

หญ้านวดแมว (*Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq) เป็นพืชล้มลุก สูง 30-60 เซนติเมตร ลำต้น และกิ่งก้านเป็นสี่เหลี่ยม ใบเดี่ยวแตกออกเรียงตรงข้ามกัน กลีบดอกมีสีขาวหรือม่วง ดังแสดงในรูปที่ 1 มีสรรพคุณในการรักษาโรคนี้ ขั้วปัสสาวะ และรักษาโรคเบาหวาน [1] ในหญ้านวดแมวพบสารกลุ่มโพลีฟีนอล ได้แก่ กรดคาเฟอิก (Caffeic Acid) และกรดโรสมารินิก (Rosmarinic Acid) [2-3] ซึ่งมีคุณสมบัติต้านไวรัส ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ[4] เป็นต้น นอกจากนี้แล้วยังพบสาร sinensetin, eupatorin, 3'-hydro-5,6,7,4'-tetramethoxyflavone ซึ่งอยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอลเช่นกัน สารกลุ่มไดเทอร์ปีน (norstaminolactone A, norstaminols B and C, secoorthosiphols A-C and orthosiphols R-T) และไตรเทอร์ปีน (ursolic acid, oleanolic acid, betulinic acid, hydroxybetulinic acid, maslinic acid, α -amyrin และ β -amyrin) [5] จึงมีการนำหญ้านวดแมวมาเป็นวัตถุดิบสมุนไพรเพื่อใช้ในการรักษาโรคต่างๆ



ก ลำต้น



ข ดอก

รูปที่ 1 ลักษณะของต้นหญ้าหนวดแมว

ในปัจจุบันมีวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสมุนไพรเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น เป็นส่วนประกอบของยาโรค เครื่องสำอาง และอาหารเพื่อสุขภาพ เป็นต้น โดยมีวิธีการสกัดที่นิยมใช้อยู่หลายวิธี เช่น การสกัดด้วยสารละลาย การสกัดแบบแช่หมัก หรือการสกัดแบบซอกเลท เป็นต้น โดยข้อเสียของวิธีการดังกล่าวคือ ใช้สารเคมีในปริมาณมาก รวมทั้งใช้ระยะเวลาในการสกัดที่นาน [6] จึงทำให้ในปัจจุบันนักวิจัยหันมาทำการศึกษาวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงมากยิ่งขึ้น เช่น การสกัดด้วยเทคนิคอัลตราโซนิก ไมโครเวฟ หรือการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid CO₂ extraction) [7-8] เป็นต้น ซึ่งวิธีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด เป็นวิธีการที่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง และต้องอาศัยนักวิจัยผู้ที่มีความชำนาญในการทำการสกัด จึงทำให้วิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ และอัลตราโซนิกเป็นวิธีที่มีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เพราะเนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง และสามารถประหยัดเวลาในการสกัดอีกด้วย [9-10] เช่น งานวิจัยของ Correa et al. [11] ได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยเทคนิคอัลตราโซนิกในก้านของ *Adenaria floribunda* หรือ งานวิจัยของ Sai-Ut et al. [12] ได้ศึกษาหาวิธีการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกที่เหมาะสมด้วยเทคนิคไมโครเวฟ ในดอก *Careya sphaerica* Roxb. เป็นต้น นอกจากนี้แล้วปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรมีอยู่หลายด้านด้วยกันได้แก่ เวลาในการสกัด อุณหภูมิ ตัวทำละลาย อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย ซึ่งทั้งหมดล้วนส่งผลต่อประสิทธิภาพของการสกัด [13] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาวิธีการสกัดสารฟลาโวนอยด์ (สารประกอบฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหญ้าหนวดแมวที่เหมาะสม ด้วยวิธีการสกัดแบบไมโครเวฟ อัลตราโซนิก และแช่หมัก เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชสมุนไพรดังกล่าว และเพื่อสามารถผลิตสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อนำไปต่อยอดในการผลิตเป็นยา เครื่องสำอาง หรืออาหารเสริมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างหญ้าหนวดแมว

นำตัวอย่างหญ้าหนวดแมวที่ซื้อมาจากท้องตลาด ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ มายืนยันชนิดของพืชโดยการเปรียบเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย (voucher specimens) หมายเลข QBG no. 109754 จากสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ หลังจากนั้นนำมาล้าง และทำความสะอาด คัดเอาเฉพาะใบที่สมบูรณ์ หลังจากนั้นนำไปอบจนแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนแห้ง นำตัวอย่างมาบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น และร่อนผ่านตะแกรงกรองขนาด 40 เมช เก็บผงตัวอย่างไว้ในภาชนะปิดสนิทเพื่อรอการทดลองต่อไป

การศึกษาผลของวิธีการสกัด และอัตราส่วนของสารที่ใช้สกัดต่อปริมาณน้ำหนักรสสกัดหยาบ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก ในหญ้าหนวดแมว

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาหาวิธีการสกัดที่เหมาะสม คือ วิธีการแช่หมัก การสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก และการสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ โดยใช้อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำในอัตราส่วนที่ต่างกันในการสกัด ได้แก่ อัตราส่วน 100:0 80:20 60:40 40:60 20:80 และ 0:100 ตามลำดับ ออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) การทดลองละ 3 ซ้ำ

การสกัดด้วยวิธีแช่หมัก (Maceration)

ซึ่งตัวอย่างหญ้าหนวดแมวที่บดเป็นผงละเอียดมา 5.0 กรัม (W_1) ถ่ายลงในขวดที่มีฝาปิดสนิท หลังจากนั้นเติมสารสกัดที่อัตราส่วนต่างๆ จำนวน 50 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำของผสมมากรองแล้วนำไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบสูญญากาศ หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดที่สกัดได้ (W_2) และเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป คำนวณปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ตามสูตร

$$\text{ร้อยละน้ำหนักรสสกัดหยาบ (g/100g)} = (W_2/W_1) \times 100$$

การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic)

ซึ่งหญ้าหนวดแมวที่บดเป็นผงละเอียดมา 5.0 กรัม (W_1) ถ่ายลงในขวดที่มีฝาปิดสนิท หลังจากนั้นเติมสารสกัดที่อัตราส่วนต่างๆ จำนวน 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกที่ความถี่ 40 กิโลเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 10 นาที กรองสารละลายที่สกัดได้ นำผงตัวอย่างเดิมมาทำสกัดอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบสูญญากาศ หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักผงสารสกัดที่สกัดได้ (W_2) และเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อรอทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และคำนวณหาปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดตามสูตรข้างต้น

การสกัดด้วยไมโครเวฟ (Microwave)

ซึ่งตัวอย่างหญ้าหนวดแมวที่บดเป็นผงละเอียดมา 5.0 กรัม (W_1) ถ่ายลงในขวดกันกลมแล้วเติมสารสกัดที่อัตราส่วนต่าง ๆ จำนวน 50 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ ที่กำลัง 450 วัตต์ เป็นเวลา 4 นาที นำสารละลายที่สกัดได้มากรอง แล้วนำไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบสูญญากาศ หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักผงสารสกัดที่สกัดได้ (W_2) และเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อรอทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และคำนวณหาปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดตามสูตรข้างต้น

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH จากหญ้าหนวดแมวโดยวิธีใช้คลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic)

ในการศึกษานี้ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโดยคลื่นอัลตราโซนิก โดยทำการศึกษาแบบปัจจัยเดียว (single factor) และออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) การทดลองละ 3 ซ้ำ ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ความเข้มข้นของเอทานอล และน้ำหนักรสของหญ้าหนวดแมวตามลำดับ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดหญ้าหนวดแมว

ทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด ตั้งแต่ 5-90 นาที โดยใช้อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำคงที่เท่ากับ 100:0 สัดส่วนของหญ้าหนวดแมวต่อเอทานอล 1:30 [14] นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกที่ความถี่เท่ากับ 40 กิโลเฮิร์ตซ์ และทำการสกัดที่เวลาต่าง ๆ ตามที่ได้ทำการศึกษา หลังจากครบเวลาในการสกัดทำการกรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 หลังจากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ระเหยจนแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบสูญญากาศ ซึ่งน้ำหนักผงสารสกัดที่สกัดได้ นำสารสกัดตัวอย่างที่เตรียมไปวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging

การศึกษาหาอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำที่เหมาะสมในการสกัดหญาหนดแมว

ทำการศึกษหาอัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำที่เหมาะสม ได้แก่ 100:0 80:20 60:40 40:60 20:80 และ 0:100 ตามลำดับ โดยทำการสกัดที่เวลา 70 นาที และสกัดส่วนของหญาหนดแมวต่อสารสกัดเท่ากับ 1:30 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามกระบวนการข้างต้น หลังจากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไปวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging

การศึกษาหาน้ำหนักของหญาหนดแมวต่อปริมาตรของสกัดที่เหมาะสม

ทำการศึกษหาน้ำหนักของหญาหนดแมวที่เหมาะสม ได้แก่ 0.5-5.0 กรัม ทำการสกัดที่เวลา 70 นาที อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำที่ 80:20 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ตามกระบวนการข้างต้น หลังจากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไปวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (TFC) โดยใช้วิธี Aluminium Chloride Colorimetric [15] เตรียมตัวอย่างจากสารสกัดหญาหนดแมว ให้มีความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย DMSO ปิเปิดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้มาอย่างละ 250 ไมโครลิตร นำไปผสมกับน้ำกลั่น 1.25 มิลลิตร และสารละลายโซเดียมไนเตรทเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Genesys 10S, Thermo Scientific, USA) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน รายงานผลเป็นปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ในหน่วยไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซีตินต่อน้ำหนักมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ ($\mu\text{gQE}/\text{mg extract}$)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (TPC) ด้วย Folin-ciocalteu's reagent [16] โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดหญาหนดแมว ให้มีความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย DMSO หลังจากนั้นปิเปิดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้มา 0.3 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-ciocalteu ความเข้มข้น 1:10 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำสารตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Genesys 10S, Thermo Scientific, USA) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก รายงานผลเป็นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อน้ำหนักมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ ($\mu\text{gGAE}/\text{mg extract}$)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอส

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอส (DPPH radical scavenging) [17] เตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 2.0-0.08 mg/mL ด้วย DMSO ปิเปิดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้มา 0.1 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน สำหรับสารละลายควบคุมจะใช้ DMSO ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย DPPH เช่นเดียวกันกับสารละลายตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Genesys 10S, Thermo Scientific, USA)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของสารละลายตัวอย่างมาคำนวณร้อยละการยับยั้ง ดังสมการ หลังจากนั้นนำค่าร้อยละการยับยั้งที่ได้ไปคำนวณหาความสามารถในการยับยั้งที่ระดับการยับยั้งร้อยละ 50 (IC₅₀) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารสกัดหยาบ และร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = \left(\frac{A_{\text{ctrl}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{ctrl}}} \right) \times 100$$

เมื่อ A_{ctrl} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม
 A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

งานวิจัยครั้งนี้วิเคราะห์ผลการทดสอบทางสถิติ โดยวิเคราะห์หาความแปรปรวน (analysis of variance) แบบ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างผลการทดสอบวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 17.0

ผลการศึกษา

การเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดที่แตกต่างกันในหญ้าหนวดแมว

ในขั้นตอนแรกงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก ด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกันได้แก่ วิธีการแช่หมัก เครื่องอัลตราโซนิก และสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ และแต่ละวิธีการการสกัดใช้เอทานอลที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นสารสกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 กระบวนการสกัด และอัตราส่วนของสารสกัด ต่อปริมาณน้ำหนักรากสารสกัดหยาบ สารประกอบฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ ในหญ้าหนวดแมว

วิธีการสกัด	เวลาที่ใช้ในการสกัด	อุณหภูมิหลังการสกัด (°C)	อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำ	ร้อยละน้ำหนักสารสกัดหยาบ	สารประกอบฟีนอลิก (µgGAE/mg extract)	สารฟลาโวนอยด์ (µgQE/mg extract)
แช่หมัก	7 วัน	30	100:0	6.71±0.69 ^{gh}	749.28±20.42 ^d	24.55±2.38 ^g
			80:20	10.05±0.12 ^e	1203.95±105.51 ^c	46.68±4.67 ^b
			60:40	12.72±0.33 ^b	781.28±78.46 ^d	32.68±2.41 ^f
			40:60	8.24±0.53 ^f	301.95±10.28 ^{fg}	5.15±0.39 ^h
			20:80	6.66±0.36 ^{gh}	278.62±27.31 ^{fg}	5.82±0.51 ^h
			0:100	5.98±0.81 ^{hij}	234.62±8.74 ^g	5.88±0.56 ^h
คลื่นอัลตราโซนิก	30 นาที	30	100:0	5.15±0.22 ^j	347.28±11.79 ^f	51.82±1.33 ^a
			80:20	11.43±0.82 ^d	1340.62±48.01 ^b	35.68±3.04 ^{df}
			60:40	21.17±1.14 ^a	1497.95±39.83 ^a	47.08±4.23 ^{ab}
			40:60	20.40±1.75 ^a	1421.95±52.72 ^a	8.42±0.53 ^h
			20:80	16.94±0.60 ^b	263.95±23.43 ^{fg}	4.55±0.47 ^h
			0:100	16.79±0.97 ^b	265.28±8.65 ^{fg}	8.95±0.87 ^h

ตารางที่ 1 กระบวนการสกัด และอัตราส่วนของสารสกัด ต่อปริมาณน้ำหนักรสสารสกัดหยาบ สารประกอบฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ ในหญ้าหนวดแมว (ต่อ)

วิธีการสกัด	เวลาที่ใช้ในการสกัด	อุณหภูมิหลังการสกัด (°C)	อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำ	ร้อยละน้ำหนักรสสารสกัดหยาบ	สารประกอบฟีนอลิก (µgGAE/mg extract)	สารฟลาโวนอยด์ (µgQE/mg extract)
ไมโครเวฟ	4 นาที	90	100:0	6.41±0.26 ^{hi}	325.95±7.85 ^f	45.35±4.43 ^b
			80:20	10.05±0.12 ^e	585.95±5.32 ^e	37.08±3.25 ^{cde}
			60:40	12.72±0.33 ^b	773.95±22.61 ^d	39.48±4.21 ^{cd}
			40:60	8.24±0.58 ^f	789.28±14.01 ^d	47.75±4.01 ^{ab}
			20:80	7.80±0.11 ^{fg}	548.62±8.89 ^e	42.82±0.76 ^{bc}
			0:100	5.28±0.35 ^{ij}	615.28±10.78 ^e	22.48±1.92 ^g

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

จากการศึกษาผลของวิธีการสกัด และอัตราส่วนของเอทานอลต่อปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกันในหญ้าหนวดแมว โดยวิธีการแช่หมัก การสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก และการสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ โดยใช้อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำที่แตกต่างกันได้แก่ 100:0 80:20 60:40 40:60 20:80 และ 0:100 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า การสกัดด้วยวิธีการแช่หมักใช้ระยะเวลาในการสกัดนานที่สุดคือใช้เวลาทั้งหมด 7 วัน โดยน้ำหนักรสสารสกัดหยาบที่สกัดได้ มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 5-13 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจวัดได้มีค่าตั้งแต่ 200-1,203 µgGAE/mg extract และปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีค่าอยู่ในช่วง 5-47 µgQE/mg extract ตามลำดับ และอุณหภูมิของสารละลายหลังการสกัดมีค่าเท่ากับ 30 °C

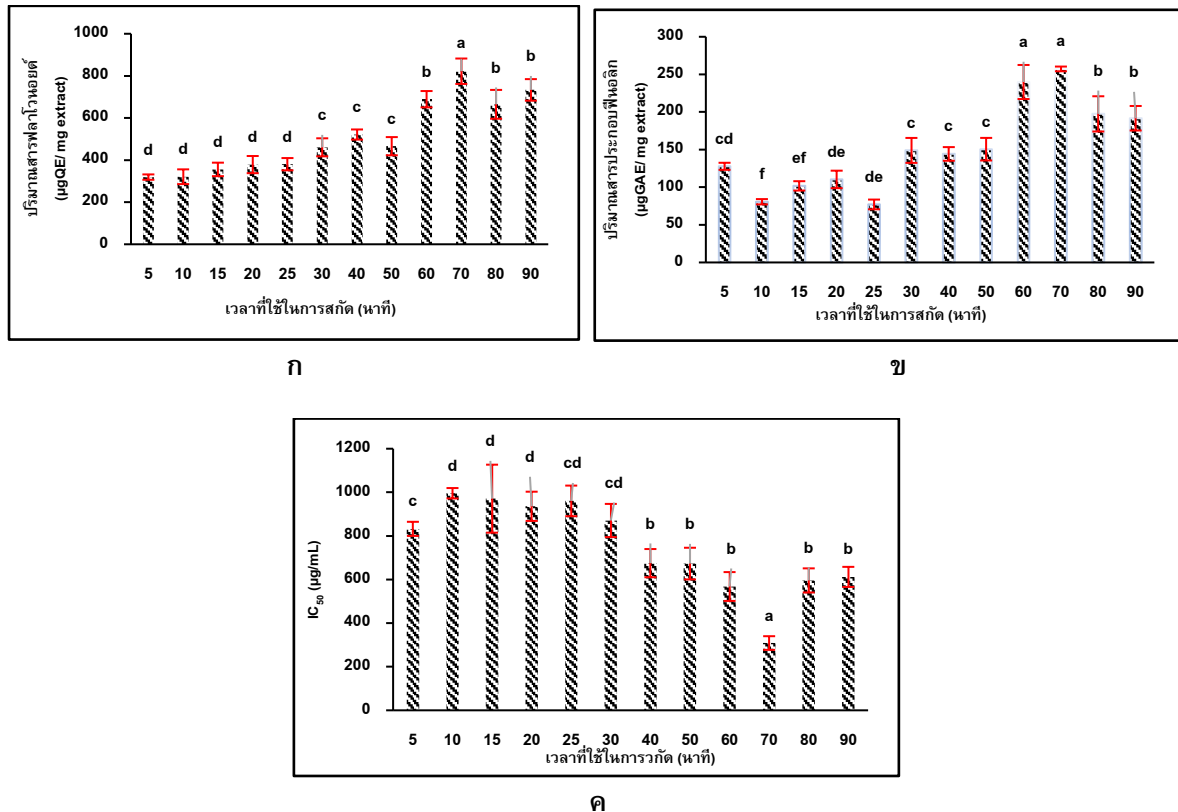
การสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก ใช้เวลาในการสกัดทั้งหมด 30 นาที โดยน้ำหนักรสสารสกัดหยาบที่สกัดได้ มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 5-20 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ได้มีค่าตั้งแต่ 265-1,498 µgGAE/mg extract และปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีค่าอยู่ในช่วง 4-47 µgQE/mg extract ตามลำดับ สำหรับการสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 4 นาที โดยน้ำหนักรสสารสกัดหยาบที่สกัดได้มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 5-13 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจวัดได้มีค่าตั้งแต่ 325-774 µgGAE/mg extract และปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีค่าอยู่ในช่วง 22-45 µgQE/mg extract ตามลำดับ สำหรับอุณหภูมิของสารละลายหลังทำการสกัดของวิธีการสกัดด้วยอัลตราโซนิกมีค่าเท่ากับ 30 °C ในขณะที่การสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟมีค่าสูงถึง 90 °C

ผลการทดลองที่ได้พบว่า วิธีการสกัดที่แตกต่างกัน และอัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำที่แตกต่างกัน มีผลต่อปริมาณน้ำหนักรสสารสกัดหยาบ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพบว่าการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก และใช้สารสกัดด้วยเอทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วน 60:40 ได้น้ำหนักรสสารสกัดหยาบมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 21.17 และ 40:60 จะได้น้ำหนักรสสารสกัดหยาบเท่ากับร้อยละ 20.40 ตามลำดับ สำหรับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่าการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก และใช้สารสกัดด้วยเอทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วน 40:60 และ 60:40 จะได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหญ้าหนวดแมวมากที่สุดเท่ากับ 1421.95 และ 1497.95 µgGAE/mg extract ตามลำดับ สำหรับสารฟลาโวนอยด์เมื่อสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก และใช้สารสกัดด้วยเอทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วน 100:0 จะได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดเท่ากับ 51.48 µgQE/mg extract ดังนั้นวิธีการสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์รวม ที่เหมาะสมควรจะทำการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก โดยใช้เอทานอลต่อน้ำเป็นสารที่ใช้สกัด ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจะได้ทำศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดหญ้าหนวดแมวด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ ได้ทำการศึกษาค้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟลาโวนอยด์รวม สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระจากหญ้าหนวดแมว ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำการศึกษาได้แก่ ระยะเวลาในการสกัด อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำ และน้ำหนักหญ้าหนวดแมว

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด



รูปที่ 2 ผลของระยะเวลาที่ในการสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (ก), สารประกอบฟีนอลิก (ข), และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (ค)

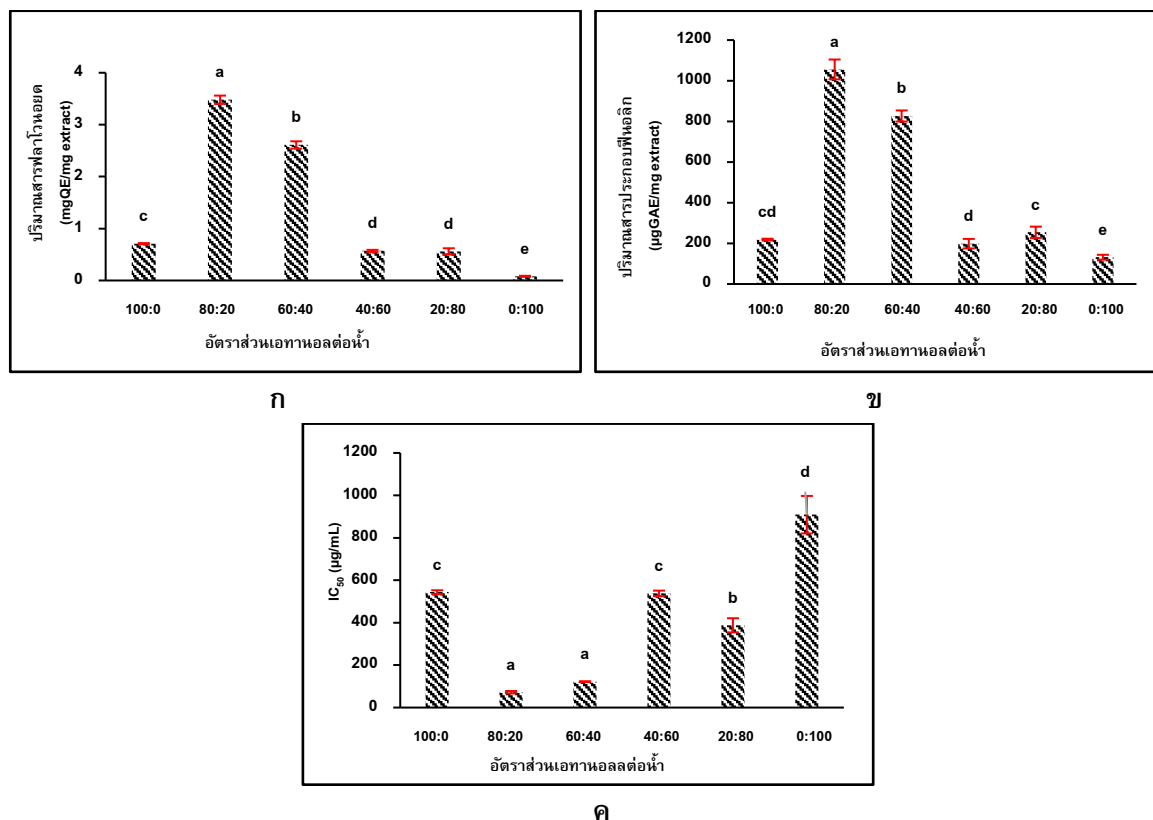
หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันในกลุ่ม หมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาระยะเวลาของเครื่องอัลตราโซนิก 12 ช่วงเวลา ตั้งแต่ 5-90 นาที ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูป 2 จากผลการทดลองที่ได้พบเมื่อเพิ่มระยะเวลาเพิ่มจากชั้น จาก 5-70 นาที ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ก็จะเพิ่มขึ้นตาม และถึงแม้เมื่อเพิ่มเวลามากขึ้นปริมาณสารที่สกัดได้ก็มีแนวโน้มคงที่ เมื่อนำผลการวิเคราะห์ทั้งหมดมาทำการเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่าระยะเวลาของการสกัดส่งผลให้มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ต่อการสกัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH โดยพบว่าการสกัดที่เวลา 70 นาที จะทำให้การสกัดสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (IC_{50}) มากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ $822.23 \mu\text{gQE}/\text{mg extract}$, $257.28 \mu\text{gGAE}/\text{mg extract}$ และ $308.60 \mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเลือกช่วงเวลาในการสกัดที่เท่ากับ 70 นาที

ผลการศึกษาอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำที่แตกต่างกันต่อการสกัดที่เหมาะสม

ในส่วนของการศึกษาอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำ ที่ใช้ในการสกัด จากการศึกษาอัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำที่แตกต่างกัน 6 อัตราส่วนได้แก่ 100:0 80:20 60:40 40:60 20:80 และ 0:100 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้น

ของเอทานอลส่งผลต่อการสกัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในภาพ 3 โดยพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้สกัด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับ ความเข้มข้นอื่น ๆ คือการสกัดที่อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำ 80:20 โดยมีสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และ คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (IC_{50}) เท่ากับ 3.48 mgQE/mg extract, 1055.70 μ gGAE/mg extract และ 72.33 μ g/mL ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำดังกล่าวในการสกัดสารจากหญ้าหนวดแมว

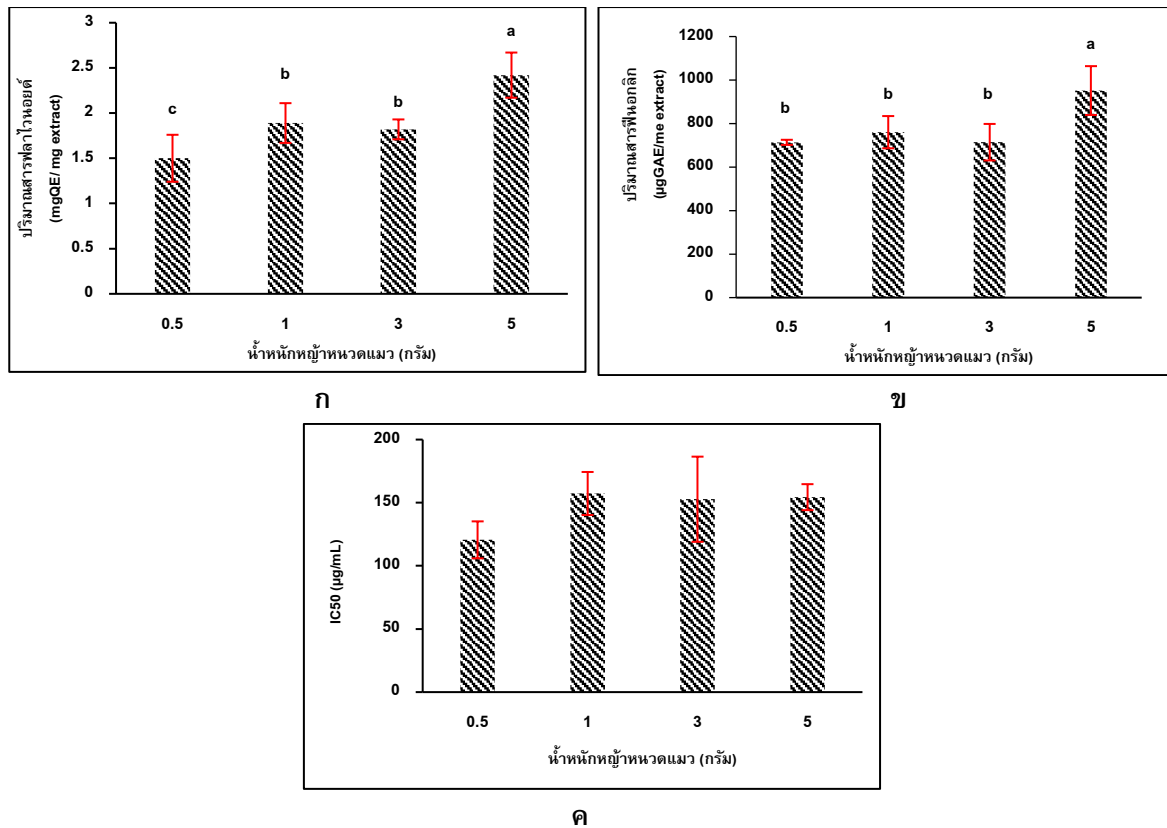


รูปที่ 3 ผลของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (ก), สารประกอบฟีนอลิก (ข) และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (ค)

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันในรูปแบบ หมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการศึกษาหน้าหนกของหญ้าหนวดแมวที่ใช้ในการสกัดที่เหมาะสม

สำหรับการศึกษาน้ำหนกของหญ้าหนวดแมวที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระนั้น ได้ทำการศึกษาน้ำหนกที่แตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 0.5 1.0 3.0 และ 5.0 กรัม ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังในภาพ 4 น้ำหนกของหญ้าหนวดแมวส่งผลต่อการสกัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ผลการทดลองพบว่าน้ำหนกของหญ้าหนวดแมวที่มีความเหมาะสมที่ใช้ในการสกัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 5.0 กรัม โดยมีสารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 2.42 mgQE/mg extract และ 951.70 μ gGAE/mg extract ในขณะที่คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยไม่ว่าจะใช้น้ำหนกของหญ้าหนวดแมวในการสกัด 0.5-5.0 กรัม ได้คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ไม่แตกต่างกัน ซึ่งค่าคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (IC_{50}) มีค่าอยู่ในช่วง 120.59-157.30 μ g/mL ตามลำดับ



รูปที่ 4 ผลของน้ำหนักรากของหัวหนวดแมวที่ในการสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (ก), สารประกอบฟีนอลิก (ข)

และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (ค)

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันในรูปแบบ หมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

วิจารณ์

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการสกัด (แช่หมัก อัลตราโซนิก และไมโครเวฟ) และความเข้มข้นของสารสกัดที่แตกต่างกัน (อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำที่แตกต่างกันได้แก่ 100:0 80:20 60:40 40:60 20:80 และ 0:100) พบว่าส่งผลน้ำหนักรากสกัดหยาบ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก โดยการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก และใช้อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำที่ 60:40 และ 40:60 จะทำการสกัดได้น้ำหนักรากสกัดหยาบ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด และสำหรับสารฟลาโวนอยด์เมื่อทำการสกัดด้วยเอทานอลต่อน้ำที่ 100:0 จะสกัดได้ปริมาณมากที่สุด ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในกระบวนการสกัดสารสำคัญในพืช และพืชสมุนไพรมีหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ชนิดของสารสกัด ความมีขี้ของสารสกัด และวิธีการสกัด เป็นต้น [18] การสกัดแบบแช่หมักเป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมโดยวิธีการดังกล่าวนี้อาศัยคุณสมบัติของทำตัวทำละลายเพื่อทำหน้าที่ในการดึงเอาสารสำคัญที่สนใจออกมาจากใบพืช และต้องใช้เวลาที่ยาวนานเพื่อให้สามารถสกัดสารสำคัญออกมาได้ จากการทดลองในการวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าการสกัดแบบแช่หมักใช้เวลาในการสกัด 7 วันต่อหนึ่งตัวอย่าง แต่ก็ยังมีประสิทธิภาพในการสกัดสารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์น้อยเมื่อเทียบกับสองวิธีที่ได้ทำการทดลอง คือ อัลตราโซนิก และวิธีไมโครเวฟ ซึ่งวิธีการสกัดอัลตราโซนิกเป็นการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในช่วง 20 กิโลเฮิร์ตซ์ ถึง 2,000 กิโลเฮิร์ตซ์เพื่อทำให้เกิดการสั่นสะเทือนหรือเสียดสีกันเป็นความร้อนทำให้เกิดการสกัด และเกิดการปลดปล่อยสารสำคัญจากสมุนไพรออกมา สำหรับวิธีไมโครเวฟนั้นใช้คลื่นไมโครเวฟซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งคลื่นนี้จะเปลี่ยนไปเป็นความร้อนโดยการทำให้อนุภาคหรือโมเลกุลที่มีขี้เสียดสีกัน และเกิดความร้อนขึ้น ซึ่งมีผลต่อเซลล์พืชเกิดการสกัดออกมาของสารสำคัญนั่นเอง [19]

จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่าเมื่อทำการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิกมีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่มีปริมาณมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสกัดด้วยอัลตราโซนิกเป็นวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีการใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าในการสกัดเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟ (ตาราง 1) จึงอาจทำให้การสลายตัวของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิกน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟ นี่จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้การสกัดด้วยวิธีของอัลตราโซนิก มีประสิทธิภาพในการสกัดที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดไมโครเวฟ และวิธีการแช่หมัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลาย ๆ ชิ้นที่พบว่า การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืช และพืชสมุนไพรด้วยวิธีอัลตราโซนิกมีประสิทธิภาพดี [20-21] ปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดคือความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ทำการสกัดตามกฎ Like dissolves like โดยสารที่มีขั้วจะถูกสกัดออกมาได้ดีด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว จากการทดลองนี้ได้ทำการเลือกใช้อีทานอลกับน้ำ ซึ่งน้ำจะมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วมากที่สุด โดยมีค่า polar index เท่ากับ 10.2 ในขณะที่เอทานอลมีค่า polar index เท่ากับ 5.2 ซึ่งความเป็นขั้วของสารละลายจะลดลงมา [22] ดังนั้นเมื่อนำไปทำการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบเป็นองค์ประกอบในหญ้าหนวดแมว เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของสารสำคัญทั้งสองกลุ่มพบว่าสารกลุ่มฟีนอลิกมีคุณสมบัติของความมีขั้วมากกว่า เมื่อเทียบกับสารกลุ่มของฟลาโวนอยด์ ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุให้เมื่อทำการสกัดด้วยสารละลายเอทานอลอัตราส่วนที่มีปริมาณน้ำผสมเพิ่มมากขึ้น (ที่อัตราส่วน 60:40) มีประสิทธิภาพในการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกได้ดีที่สุด ในขณะที่กลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถละลายออกมาได้มากกว่าเมื่อใช้สารละลายที่เป็นเอทานอลเท่านั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Maulana et al. (2019) [23] ที่พบว่าการสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในใบของ *Surian. T. Sinensis* (Meliaceae) ด้วยสารละลายเอทานอล 96 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพการสกัดที่ดีที่สุด และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของน้ำเพิ่มมากขึ้นจะสามารถสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกได้ดีขึ้นเช่นกัน

ในการศึกษาหาวิธีการสกัดที่เหมาะสม (optimization) ของการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิก เป็นอีกหนึ่งวิธีการที่มีการศึกษาในปัจจุบัน โดยการสกัดดังกล่าวใช้คลื่นอัลตราซาวด์ หรือปรากฏการณ์คาวิตีชัน โดยปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในตัวพา ได้แก่ น้ำหรือ ตัวทำละลายอินทรีย์ส่งผลให้เกิดฟองแก๊ส ซึ่งฟองแก๊สจะหด และขยายตัวเป็นวัฏจักร เมื่อฟองแก๊สขยายตัวจะดึงสารที่อยู่ภายในวัตถุให้ละลายออกมาในตัวทำละลาย และในขณะที่ฟองแก๊สแตกออกจะเกิดความดัน และความร้อนปริมาณมากในบริเวณดังกล่าว พื้นที่ผิวบริเวณผนังเซลล์จึงถูกทำลาย ทำให้สารที่ต้องการสกัดออกมาได้ง่ายขึ้น [24] โดยประสิทธิภาพของการสกัดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ระยะเวลาในการสกัด ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้สกัด น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้สกัด เป็นต้น ผลการทดลองที่ได้ในการศึกษาระยะเวลาในการสกัดพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสกัดจาก 5 จนถึง 70 นาที พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มเวลามากกว่านี้จะทำให้ปริมาณสารสำคัญ และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมีค่าลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเวลาในการสกัดที่เพิ่มขึ้นสามารถเอื้อต่อการเกิดปรากฏการณ์คาวิตีชันได้ดีกว่าที่ระยะเวลาสั้น รวมถึงช่วยเพิ่มเวลาให้สารละลายสัมผัสกับเซลล์พืชได้นานกว่า ทำให้สารภายในเซลล์สามารถละลาย และแพร่ออกมาได้มากกว่าการใช้เวลาสั้น และเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มสูงขึ้นจนเกินจุดสมดุล อาจจะทำให้มีการปล่อยพลังงานของคลื่นเสียงความถี่สูงซึ่งส่งผลให้ความร้อนที่สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญต่าง ๆ เลยทำให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li et al.[14] ที่ได้ทำการสกัดสารแอนโทไซยานินในผลเบอร์รี่ โดยพบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดมากขึ้นจะช่วยทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น และเมื่อเพิ่มเวลาจนเลยจุดสมดุลจะทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพลดลง ในส่วนของความเข้มข้นของเอทานอลต่อน้ำที่ใช้ในการสกัดพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลต่อน้ำที่ 80:20 มีประสิทธิภาพในการสกัดที่ดีที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tabaraki and Nateghi [25] พบว่าการสกัดใบเจียวกุหลาบด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ส่งผลให้การสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มากที่สุดทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเอทานอลผสมน้ำทำให้มีคุณสมบัติความเป็นขั้วเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้สามารถสกัดสารออกมาจากเซลล์ได้ง่ายขึ้นนั่นเอง และในส่วนสุดท้ายในการทำการศึกษาคือน้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้สกัดจากการทดลองทำการศึกษาน้ำหนักของหญ้าหนวดแมวตั้งแต่ 0.5-5 กรัม พบว่าเมื่อเพิ่มน้ำหนักของตัวอย่างมากขึ้นจะทำให้การสกัดสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก เพิ่มขึ้นตามน้ำหนักที่ใช้ในการสกัด เนื่องจากเมื่อมีการเพิ่มน้ำหนัก

ของตัวอย่าง ปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในพืชก็จะมีเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นจึงส่งผลทำให้เมื่อใช้ตัวอย่างของหญ้าหนวดแมวมากที่สุดเท่ากับ 5.0 กรัม ทำให้การสกัดสารทั้งสองกลุ่มมีค่ามากที่สุด แต่คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระพบว่าน้ำหนักของตัวอย่างไม่มีผลต่อคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมจากการสกัดหญ้าหนวดแมวโดยใช้วิธีอัลตราโซนิก โดยวิธีการดังกล่าวนี้มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหรือสภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการสกัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลาในการสกัด อัตราส่วนเอทานอล ต่อน้ำ และน้ำหนักหญ้าหนวดแมว จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดใบหญ้าหนวดแมว คือ ทำการสกัดที่เวลา 70 นาที อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำ 80:20 และผงหญ้าหนวดแมว 5.0 กรัม ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่โจ้ และทุนสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 จากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนเงินทุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2565 (มจ.1-65-041) และสาขาวิทยาการสมุนไพร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จนเสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- [1] Alshehade SA, Zarzour RHA, Mathai M, Giribabu N, Seyedan A, Kaur G, et al. *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq alleviates non-alcoholic fatty liver disease via antioxidant activities in C57BL/6 obese mice and palmitic–oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Pharmaceuticals*. 2023;16(109):1-25.
- [2] Ashraf K; Sultan S; Adam A. *Orthosiphon stamineus* Benth. is an outstanding food medicine: Review of phytochemical and pharmacological activities. *J. Pharm. Bioallied Sci*. 2018;10: 109–18.
- [3] Faramayuda F, Mariani TS, Elfahmi, Sukrasno. Plant tissue culture of cat whiskers (*Orthosiphon aristatus* Blume Miq): A review of secondary metabolite production and micropropagation. *Pharmacy Education*. 2022; 22(2):92-7.
- [4] Nadeem M, Imran M, Gondal TA, Imran A, Shahbaz M, Amir RM, et al. Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review. *Appl. Sci*. 2019;9(3139):1-23.
- [5] Chua LS, Lua CH, Chew CY, Ismail NIM, Soontongun N. Phytochemical profile of *Orthosiphon aristatus* extracts after storage: rosmarinic acid and other caffeic acid derivatives. *Phytomedicine*. 2018;39(15):49-55.
- [6] Masota NE, Vogg G, Heller E, Holzgrabe U. Comparison of extraction efficiency and selectivity between low-temperature pressurized microwave-assisted extraction and prolonged maceration. *Arch. Pharm*. 2020; 353(10):1-11.
- [7] Georgiopoulou I, Louli V, Magoulas, K. Comparative study of conventional, microwave-assisted and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from microalgae: The case of *Scenedesmus obliquus*. *Separations*. 2023;10(290): 1-23.
- [8] Chuyen HV, Nguyen MH, Roach PD, Golding JB, Parks SE. Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. *Food Sci Nutr*. 2018;6:189–96.
- [9] Siramon P, Wongsheree T, Yuadyong S. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from coconut endocarp and its radical scavenging activity. *Naresaun Phayao J*. 2020;13(3):22-8. (in Thai)

- [10] Cui L, Zhang Z, Li H, Li N, Li X, Chen T. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from *Perilla* leaves using response surface methodology. *Food Sci. Technol.* 2017;23(4): 535-43.
- [11] Correa ML, Dugue BEV, Tobbon JFO. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Adenaria floribunda* stem: Economic Assessment. *Foods.* 2022;11(2904):1-6.
- [12] Sai-Ut S, Kingwacharapong P, Mazumder MAR, Rawdkuen S. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from *Careya sphaerica* Roxb. flowers using response surface methodology. *Appl. Food Res.* 2024;4(100379):1-2.
- [13] Zhang QW, Lin LQ, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin. Med.* 2018;13(20):1-26.
- [14] Li Y, Tao F, Cui K, Song Y, Nan L, Cui C, et al. Optimization of ultrasonic extraction of anthocyanin in mulberry residue by response surface methodology. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2020;559 (012024).1-10.
- [15] 17. Chang CH, Lin HY, Chang CY, Liua, YC. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze dried and hot-air-dried tomatoes. *J. Food. Eng.* 2006;77:478-85.
- [16] Ueda Y, Apiphuwasukcharoen N, Tsutsumi S, Matsuda Y, Areekul V, Yasuda, S, Optimization of hot water extraction of dried yacon herbal tea leaves: enhanced antioxidant activities and total phenolic content by response surface methodology. *Food Sci. Technol.* 2019;25(1):131-9.
- [17] Singh JP, Kaur A, Singh, N, Nim, L, Shevkani K, Kaur, H, et al. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. *LWT Food. Sci. Technol.* 2016;65:1025–30.
- [18] Dent M, Uzelac VD, Penic M, Branic M, Bosiljkov T, Levaj N. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food. Technol. Biotechnol.* 2013;51(1):84-91.
- [19] Suede A. Microwave-assisted extraction of active compounds from medicinal plants. *EAU Heritage Journal Science and Technology.* 2017; 11(1):1-4. (in Thai)
- [20] Jamshaid S, Ahmed D, Aydar AY. Ultrasound-assisted extraction optimization of polyphenols, flavonoids, and antioxidant compounds from fruit of *Melia azedarach* using a glycerol-based green deep eutectic solvent. *J. Food Process. Preserv.* 2022;46(8): e16657.
- [21] Kumar N, Kumar G, Prabhakar PK, Sahu JK, Naik S. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from giloy (*Tinospora cordifolia*) stem: Quantitative process optimization and bioactives analysis. *J. Food Process Eng.* 2023;46(6): e14259.
- [22] Kkeiman M, Ryu KA, Kahn APE. 2016. Determination of factors influencing the wet etching of polydimethylsiloxane using tetra-n-butyl ammonium fluoride. *Macromol. Chem. Phys.* 2016;217: 284-91.
- [23] Maulana TI, Falah S, Andrianto D.1. Total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity of water and ethanol extract from Surian (*Toona sinensis*) leaves. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2019;299. 1-9.
- [24] Kamkayan P, Assatarakul K. Effect of single-factor by ultrasound-assisted extraction on antioxidant properties of extract from Jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*) leaves. *JFTSU.* 2021;16(2):95-108.
- [25] Tabaraki R, Nateghi A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 2011;18(6):1279-86.