ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหญ้าแห้วหมู

Total Phenolic Content and Antioxidant Capacities of *Cyperus roundus* Extract

หทัยขวัญ บุญผดุง
อีเมล์: benzhataikuan@gmail.com
หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
สำนักวิชา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ดร.ถวนันท์ ศรีพิสุทธิ์
อีเมล์: tawanun.sri@mfu.ac.th
ดร.ฐาปกรณ์ ตรีอุดม
อีเมล์: thapakorn.tre@mfu.ac.th
สำนักวิชา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหญ้าแห้วหมู ที่หมักแช่ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิล อะซิเตท เอทานอล และน้ำกลั่น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องทำแห้งสุญญากาศ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดเอทานอลแสดงค่าปริมาณสารประกอบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.764 ± 0.056 และ 9.748 ± 0.962 mg QE/g sample ตามลำดับ นอกจากนั้นสารสกัดเอทานอลยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.137 ± 0.001 mg AAC/g sample, 11.039 ± 0.111 mg AAC/g sample และ 13.220 ± 0.268 mg TEAC/g sample ตามลำดับ และสารสกัดที่ดีรองลงมาคือ น้ำ เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน งานวิจัยนี้จึงยืนยันได้ว่า เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารประกอบฟีนอล และ ฟลาโวนอยด์ จากหญ้าแห้วหมู รวมทั้งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี เพื่อใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอางในการพัฒนาสูตรต่อไป

คำสำคัญ: หญ้าแห้วหมู / สารประกอบฟีนอลิก / สารประกอบฟลาโวนอยด์ / ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ / เอทานอล

Abstract

This study aimed to investigate total polyphenol content, total flavonoid content and antioxidant activity in *Cyperus rotundus* obtained by maceration with 4 solvents including hexanes, ethyl acetate, ethanol and DI water for 24 hour and filtration. The filtrates were evaporated until dry. The results showed that ethanol extract showed the highest total phenolic content and total flavonoid content of 1.764 ± 0.056mg GAE/g sample and 9.748 ± 0.962mg QE/g sample, respectively. Moreover, ethanol extract showed that the strongest antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP assays of 1.137 ± 0.001 mg AAC/g sample, 11.039 ± 0.111 mg AAC/g sample และ 13.220 ± 0.268 mg TEAC/g sample, 11.04 ± 0.11 mg AAC/g sample and 13.22 ± 0.11 mg TEAC/g sample, respectively. The results were following by DI water, ethyl acetate and hexanes, respectively. This research insisted that ethanol extract showed the highest polyphenol and flavonoid contents and also antioxidant activity for cosmetic application in the future.

Keywords: *Cyperus rotundus* / polyphenolic content / flavonoid content / radical scavenging activity / ethanol

บทนำ

คนไทยในยุคปัจจุบันทุกเพศ ทุกวัย ต่างให้ความใส่ใจในเรื่องสุขภาพ ความงาม และผิวพรรณกันมากขึ้น จึงมีการผลิตผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับความสวยความงามกันอย่างแพร่หลาย เหตุนี้จึงทำให้มีข้อเปรียบเทียบได้มากมาย ทั้งราคาและประสิทธิภาพได้อย่างชัดเจน จากการวิเคราะห์ของศูนย์พยากรณ์เศรษฐกิจและธุรกิจ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย ประจำปี 2559 (มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย, 2559) การผลิตเครื่องสำอางเป็นสาขาธุรกิจที่ถูกจัดอันดับให้เป็น 1 ใน 10 ธุรกิจที่โดดเด่นน่าสนใจลงทุน อีกทั้งในช่วงที่ผ่านมายังพบว่า มูลค่าการส่งออกสินค้าประเภทเครื่องสำอางไปยังกลุ่มประเทศ CLMV (กัมพูชา ลาว เมียนมา และเวียดนาม) มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน เนื่องจากเครื่องสำอางแบรนด์ไทยได้รับความนิยมและเป็นที่ยอมรับในด้านคุณภาพ จึงถือเป็นอีกหนึ่งช่องทางที่ทำ ให้ผู้ประกอบการไทยสามารถทำ การตลาดและเป็นศูนย์กลางในการกระจายสินค้าไปยังกลุ่มประเทศ CLMV (กัมพูชา ลาว เมียนมา และเวียดนาม) อีกด้วย

แต่ในปัจจุบันการทำเครื่องสำอางนั้นมีวัตถุดิบที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ จึงทำให้มีต้นทุนในการผลิตแต่ละครั้งค่อนข้างสูง ซึ่งในขณะเดียวกันนั้นแนวโน้มของการผลิตเครื่องสำอาง

พบว่า ผู้ผลิตมุ่งเน้นการสร้างนวัตกรรมใหม่ๆ และใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติรวมทั้งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้นตามเทรนด์ของผู้บริโภคที่ให้ความสำคัญกับเรื่องที่กล่าวมา

หญ้าแห้วหมู เป็นวัชพืชที่กำจัดยาก และกระจายพันธุ์เร็วมากในประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล และฟลาโวนอย์ของสารสกัดที่ได้จากหญ้าแห้วหมูด้วยตัวทำละลายต่างๆ เพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสกัดและเปรียบเทียบ ตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญจากหญ้าแห้วหมู
2. เพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหญ้าแห้วหมู

ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2. เตรียมสารสกัดหญ้าแห้วหมูจาก ตัวทำละลายที่ต่างกัน 4 ชนิด เฮกเซน, เอทิล อะซิเตท, เอทานอล และน้ำ
3. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ในหญ้าแห้วหมู

การทบทวนวรรณกรรม

1. แนวคิดหลักการทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

หญ้าแห้วหมูเป็นสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบ นิยมนำส่วนหัวที่อยู่ใต้ดินมาใช้ทำยา มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือ มีฤทธิ์ยับยั้งการหดเกร็งและการบีบตัวของลำไส้ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านเชื้อมาลาเรีย ต้านเชื้อไวรัส ฆ่าแมลง แก้ไข้ แก้ปวด ต้านมะเร็ง แก้อาเจียน ทำให้น้ำหนักตัวลดลง กดการทำงานของหัวใจ กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาว ปัจจุบันมีการนำหญ้าแห้วหมูไปเข้าตำรับยาแก้ปวด แก้โรคกระเพาะ แก้ปวดประจำเดือน เป็นหนึ่งในสมุนไพรที่มีการวิจัยพบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระสูง (Manasthaisong, 2012)

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในหัวหญ้าแห้วหมู ได้แก่ 4,6,3,4-tetramethoxyaurone, rotundine B, (-)-eudesma-2,4(15)-11-triene, cyperusol D, gamma-calacorene, 4,7-dimethyl-1-tetralone, (+)-beta-Rotunol และ isocorymbolone (Kandikattu, 2015)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant agent) (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) และ (ปวีณา พันทอง, 2559) มีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันมาก โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระประกอบ ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (Synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ Propyl gallate, 2-Butylated hydroxyanisole, 3-Butylate hydroxyanisole, Butylated hydroxytoluene (BHT) และ Tertiary butylhydroquinone และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่นๆ เช่น Vitamin C, Vitamin E และ Glutathione เป็นต้น

2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัย ของ Kilani-Jaziri S. และคณะ (Kilani-Jaziri S., 2011) ได้ใช้ 4 ตัวทำละลาย คือ DI water, water/Acetone mixture (1:2 v/v), Ethyl acetate และ Methanol ในการหา Polyphenols, Flavonoids และ Tannins (พบว่า water/Acetone mixture มีปริมาณฟลาโวนอยด์และสารประกอบโพลีฟีนอลสูงที่สุด ตามด้วย DI water, ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ) โดย 1 มิลลิกรัมของสารสกัด TOF มีความเข้มข้นเท่ากับ 670 ไมโครกรัมของกรดแกลลิคและ 340 ไมโครกรัมของ quercetin อย่างไรก็ตาม 1 มิลลิกรัม ของแต่ละตัวทำละลาย DI water, Ethyl acetate และ Methanol มีความเข้มข้นเท่ากับ 440, 330 และ 260 ไมโครกรัมของกรดแกลลิค ตามลำดับ และ 320, 290 และ 200 ไมโครกรัมของ quercetin โดยปริมาณสูงสุดของแทนนินคือ TOF เท่ากับ 229 มิลลิกรัม/100 กรัม และ Ethyl acetate มี 117.1 มิลลิกรัม/100 กรัม ในการเปรียบเทียบปริมาณแทนนินใน DI water และ Methanol มีค่าเท่ากับ 68.7 และ 59.61 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ ส่วน Ethyl acetate มีเฉพาะ sterols อยู่ 2.75% (Kilani-Jaziri, 2011).

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหญ้าแห้วหมูเพื่อใช้ในการสกัด

นำหัวหญ้าแห้วหมูแบบแห้ง ไปปั่นให้เป็นผงละเอียด ชั่งน้ำหนักผงหัวหญ้าแห้วหมูแบบแห้ง 50 กรัม ลงไปในขวดชมพู จำนวน 4 ขวด เติมตัวทำละลาย 4 ชนิด คือเฮกเซน (Hexane), เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate), เอทานอล (Ethanol) และน้ำ (DI water) อย่างละ 150 มิลลิลิตร ใส่แต่ละขวด ตามลำดับ แล้วหมักแช่ (Maceration) ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 24 ชม. จากนั้นนำสารสกัดมากรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นนำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องทำแห้งสุญญากาศ

2. การวิเคราะห์คุณภาพสารสกัดทางเคมี

2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid โดยเตรียม Gallic acid ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในช่วงความเข้มข้น 20-1,000 ppm โดยทำการทดสอบเริ่มจากปิเปตน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Gallic acid หรือสารสกัดจากหญ้าแห้วหมูละลายในน้ำปริมาตร 125 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย Folin Cioculteu's reagent ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 7% w/w Sodium carbonate ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่น เป็น Blank แสดงปริมาณสารฟีนอลรวมเฉลี่ยในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิค (GAE) ต่อส่วนสกัด 1 กรัม จากกราฟมาตรฐานของ Gallic acid และรายงานผลเป็นปริมาณ Gallic acid equivalent (mg GAE/g sample) (ปริยานุช อินทร์รอด, 2551) และ (สุชาดา มานอก, 2558)

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

ปิเปตสารสกัดจากหญ้าแห้วหมู 0.5 มิลลิลิตร นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร เติม $NaNO_2$ ความเข้มข้น 5% w/w ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเติม $AlCl_3$ ความเข้มข้น 10% w/w ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร เติม NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ใช้ Quercetin เป็นสารละลายมาตรฐาน วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยการคำนวณความแตกต่างทางสถิติ และเปรียบเทียบหาค่าเฉลี่ย จากกราฟมาตรฐานของ Quercetin และรายงานผลเป็นปริมาณ Quercetin equivalent (mg QE/g sample) (อดิศร จารูญ, 2558)

3. วิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหญ้าแห้วหมู

3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

เตรียมสารละลาย DPPH radical ในเมทานอลความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์และเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 ppm 100 ppm 50 ppm และ 10 ppm ในเมทานอล ในอัตราส่วน 1.5:1.5 และเติม DPPH ลงไปในสารละลายที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาทีนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (n=3) โดยเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันสารมาตรฐาน คือ กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) จากนั้นทำการคำนวณ % radical scavenging และคำนวณหาค่า IC_{50} จากผลการทดลองที่ได้โดยคำนวณหา % radical scavenging จากกราฟมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) วิเคราะห์ และรายงานผลเป็น (mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AAC)/g sample extract) (สุชาดา มานอก, 2558)

3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย $Na_2S_2O_8$ ที่ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ผสมสารละลาย ABTS กับสารละลาย Potassium persulfate ในอัตรา 1:0.5 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำใช้ จากนั้นนำสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ไปเจือจางด้วยเอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร หลังจากนั้นเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 ppm ในเอทานอล ปิเปตสารตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันสารมาตรฐาน คือกรดแอสคอร์บิก แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลย์ของกรดแอสคอร์บิก/กรัมสารสกัด (mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AAC)/g sample extract) ทำการคำนวณ % radical scavenging จากกราฟมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) วิเคราะห์ และรายงานผลเป็น (mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AAC)/g sample extract) (สุชาดา มานอก, 2558)

3.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

เตรียมโดยนำสารสกัดตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 3 มิลลิลิตรของสารละลาย FRAP ที่ประกอบด้วยสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ 4,6-Tripryridyls-triazine (TPTZ), 300 มิลลิโมลาร์ Acetate buffer pH 3.6, 20 mM Ferric chloride ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl (อัตราส่วน 1:10:1) นำสารละลายผสมกับน้ำกลั่น (DI water) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันบ่มในตู้บ่ม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ

ยาวคลื่น 593 นาโนเมตรคำนวณความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP value) โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ Trolox แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลย์ของ Fe^{2+}/กรัม สารสกัด สกัด (mg Fe^{2+} equivalent /g sample extract) จากกราฟมาตรฐานของ Trolox และรายงานผลเป็นปริมาณ Trolox equivalent (mg TEAC/g sample) (สุชาดา มานอก, 2558) และ (วีระพล บุญทวี, 2559)

4. การวิเคราะห์สารองค์ประกอบด้วย Thin Layer Chromatography Fingerprints

นำสารสกัดหญ้าแห้วหมูทั้ง 4 ตัวทำละลาย มาวิเคราะห์ TLC Fingerprints ซึ่งตรวจสอบ โดยอาศัยการแยกของสารด้วยวิธี Thin Layer Chromatography โดยตัวดูดซับที่ใช้เป็นชนิด Reverse phase TLC นำไป Development ในตัวชะที่เหมาะสม ซึ่งทำในระบบปิด โดยระบบที่ใช้แยกสารสกัด คือ 50% Methanol in water จากนั้นนำแผ่น TLC ออกจาก Tank ที่ใช้เป็นระบบปิดแล้วทำให้แห้ง นำไปวัดใต้แสง 254 nm สารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบ คือ Quercetin, Gallic acid monohydrate, Caffeine acid, Chlorogenic acid, (±)-Catechin hydrate, (-)-Epigallocatechingallate, *trans*-Ferulic acid, Rutin hydrate และ Kojic acid

5. วิเคราะห์ผลการศึกษาทางสถิติ

นำผลการศึกษาที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS version 21

ผลการวิจัย

1. ปริมาณสารสกัดหยาบ

จากการสกัดสารออกฤทธิ์จากหัวหญ้าแห้วหมูด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ Hexane, Ethyl acetate, Ethanol และ DI water ได้สารสกัดที่ต่างกันออกไป คือ Hexane ได้สีเหลือง Ethyl acetate ได้สีเหลืองเข้ม Ethanol ได้สีน้ำตาล และ DI water ได้สีน้ำตาลเข้ม ทุกสารสกัดมีกลิ่นของหญ้าแห้วหมูและตัวทำละลายต่างปน เมื่อแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotatory evaporator ได้สารสกัดที่ต่างกันออกไป คือ Hexanes ได้สีเหลืองเข้ม Ethyl acetate ได้สีน้ำตาล Ethanol ได้สีน้ำตาลเข้ม และ DI water ได้สีน้ำตาลเข้ม ไม่มีกลิ่นตัวทำละลายต่างๆ เหลืออยู่ มีลักษณะข้นหนืด จากนั้นนำสารสกัดที่ได้แต่ละตัวทำละลายทั้ง 3 ซ้ำมาคำนวณหาร้อยละผลผลิต มีค่าเท่ากับ 0.667, 0.920, 0.860 และ 7.480 ตามลำดับ

2. ปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหัวหญ้าแห้วหมู

2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

นำสารสกัดที่ได้จากหัวหญ้าแห้วหมูแต่ละตัวทำละลาย มาทำการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิก โดยใช้สารละลาย Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำสารสกัดหัวหญ้าแห้วหมูในแต่ละตัวทำละลาย มาทำการหาปริมาณฟีนอลิก พบว่า หัวหญ้าแห้วหมูที่หมักแช่ด้วยตัวทำละลาย ethanol มีปริมาณฟีนอลิคมากที่สุด โดยสารสกัด 1 กรัม มีปริมาณฟีนอลิก เทียบเท่ากับ Gallic acid เท่ากับ 1.764±0.056 mg GAE/g sample รองลงมา คือ DI water, Ehyl acetate และ Hexane โดยสกัด 1 กรัม มีปริมาณฟีนอลิก เทียบเท่ากับ Gallic acid 0.473±0.010, 0.233±0.006, 0.111±0.001 mg GAE /g sample ตามลำดับ

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประเภทฟลาโวนอยด์

นำสารสกัดที่ได้จากหัวหญ้าแห้วหมูในแต่ละตัวทำละลาย มาทำการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยใช้สารละลาย Quercetin เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำสารสกัดหัวหญ้าแห้วหมูในแต่ละตัวทำละลาย มาทำการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่า หัวหญ้าแห้วหมูที่หมักแช่ด้วยตัวทำละลายมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด โดยสารสกัด Ethanol 1 กรัม มีปริมาณฟลาโวนอยด์ เทียบเท่ากับ Quercetin เท่ากับ 9748.181±962.339 mg QE/g sample รองลงมา คือ DI water, Ethyl acetate, Hexane โดยสารสกัด 1 กรัม มีปริมาณฟลาโวนอยด์ เทียบเท่ากับ Quercetin 2139.022±51.436, 847.630±14.270 และ 806.044±5.875 mg QE /g sample ตามลำดับ

3. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวหญ้าแห้วหมู

3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

นำสารสกัดที่ได้จากหัวหญ้าแห้วหมูแต่ละตัวทำละลาย มาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สารละลาย กรดแอสคอร์บิก เป็นสารมาตรฐาน โดยนำสารมาตรฐานมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) เพื่อหา IC_{50} พบว่า กรดแอสคอร์บิก มี IC_{50} เท่ากับ 9.766 μg/ml ซึ่งให้ผลสอดคล้องใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมาเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน พบว่า กรดแอสคอร์บิก มี IC_{50} เท่ากับ 9.34 μg/ml (บังอร วงศ์รักษ์, 2549) จากนั้นนำสารสกัดหัวหญ้าแห้วหมูในแต่ละตัวทำละลาย มาทำการหาปริมาณในการยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่า หัวหญ้าแห้วหมูที่หมักแช่ด้วยตัวทำละลายแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยสารสกัด Ethanol 1 กรัม มีปริมาณในการยับยั้งอนุมูลอิสระ เทียบเท่ากับ กรดแอสคอร์บิก 1.137±0.001 mg AAC/g sample รองลงมาคือ DI water, Ethyl acetate และ Hexanes โดยสารสกัด 1

กรัม มีปริมาณในการยับยั้งอนุมูลอิสระ เทียบเท่ากับ กรดแอสคอร์บิก 1.087±0.004, 1.036±0.013 และ 1.032±0.020 mg AAC/g sample ตามลำดับ

3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

นำสารสกัดที่ได้จากหัวหญ้าแห้วหมูในแต่ละตัวทำละลาย มาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยใช้สารละลาย กรดแอสคอร์บิก เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำสารสกัดหัวหญ้าแห้วหมูแต่ละตัวทำละลาย มาทำการหาปริมาณในการยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่า หัวหญ้าแห้วหมูที่หมักแช่ด้วยตัวทำละลายแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยสารสกัด Ethanol 1 กรัม มีปริมาณในการยับยั้งอนุมูลอิสระ เทียบเท่ากับ กรดแอสคอร์บิก 11.039±0.111 mg AAC/g sample รองลงมาคือ DI water, Ethyl acetate และ Hexanes โดยสารสกัด 1 กรัม มีปริมาณในการยับยั้งอนุมูลอิสระ เทียบเท่ากับ กรดแอสคอร์บิก 7.783±0.222, 3.957±0.184 และ 2.986±0.310 mg AAC/g sample ตามลำดับ

3.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

นำสารสกัดที่ได้จากหัวหญ้าแห้วหมูในแต่ละตัวทำละลาย มาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAB โดยใช้สารละลาย Trolox เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำสารสกัดหัวหญ้าแห้วหมูแต่ละตัวทำละลาย มาทำการหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า หัวหญ้าแห้วหมูที่หมักแช่ด้วยตัวทำละลายแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยสารสกัด Ethanol 1 กรัม มีปริมาณในการต้านอนุมูลอิสระ เทียบเท่ากับ Trolox 13.220±0.268 mg TEAC/g sample รองลงมา คือ DI water, Ethyl acetate, Hexanes โดยสารสกัด 1 กรัม มีปริมาณในการต้านอนุมูลอิสระ เทียบเท่ากับ Trolox 13.702±0.408, 10.763±0.862, 2.636±0.082 mg TEAC/g sample ตามลำดับ

ผลการทดลองงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่า ในการทดสอบสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหญ้าแห้วหมูนั้น มีค่าของแต่ละตัวทำละลายในแต่ละการทดสอบมีความสอดคล้องไปในทางเดียวกัน คือ ตัวทำละลาย ethanol มีค่าในการยับยั้งอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากที่สุด และเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาเรื่องการศึกษาพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและกรดไขมันของสาหร่ายมงกุฎหนามจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ประเทศไทย (ฐิติพรรณ ฉิมสุข, 2558) พบว่า สารสกัดสาหร่ายมงกุฎหนามที่สกัดด้วยเอทานอล ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มากที่สุดเช่นเดียวกัน ซึ่งผลสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารประกอบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ ผลรวมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหญ้าแห้วหมู

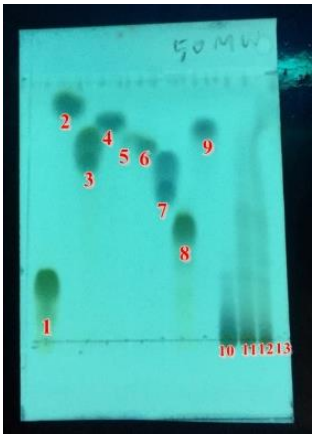
Sample	**ปริมาณฟีนอลิก (mg GAE/g sample)**	**ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg QE/g sample)**	**DPPH (mg VEAC/g sample)**	**ABTS (mg VEAC/g sample)**	**FRAP (mg TEAC/g sample)**
Hexane	0.111±0.001[a]	0.806±0.006[a]	1.032±0.020[a]	2.986±0.310[a]	2.636±0.082[a]
Ethyl Acetate	0.233±0.006[b]	0.848±0.014[b]	1.036±0.013[a]	3.957±0.184[b]	10.763±0.862[b]
Ethanol	1.764±0.056[d]	9.748±0.962[d]	1.137±0.001[c]	11.039±0.111[d]	13.220±0.268[c]
DI Water	0.473±0.010[c]	2.139±0.051[c]	1.087±0.004[b]	7.783±0.222[c]	13.702±0.408[c]

หมายเหตุ. ตัวหนังสือยกที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

นำข้อมูลที่ได้จากทดสอบต่างๆ มาศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ผลการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอล และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอล ที่มีความสอดคล้องในทิศทางเดียวกันมากที่สุด คือ ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH กับปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยพิจารณาจากค่า Correlation coefficient (R^2) เท่ากับ 0.8818 ($P > 0.05$) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ที่มีความสอดคล้องในทิศทางเดียวกันมากที่สุด คือ ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH กับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยพิจารณาจากค่า Correlation coefficient (R^2) เท่ากับ 0.8472 ($P >0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เมื่อมีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มาก จะทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากขึ้นตามโดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH

4. การวิเคราะห์สารองค์ประกอบด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) Fingerprints

นำแผ่น Reverse phase C_{18} TLC มา spot จุด ทั้ง 13 จุด ดังภาพที่ 1 จากนั้นนำแผ่น TLC ไปวางใน tank ซึ่งมีระบบเป็น 50% MeOH-H_2O และรอจนสารเคลื่อนที่ถึงขีดที่กำหนด แล้วทำให้แห้ง นำไปวัดใต้แสง 254 nm



ภาพที่ 1 แผ่น TLC หลังนำไป run ใน tank ทั้ง13 จุด คือ กลุ่มสารมาตรฐาน 1. Quercetin 2. Gallic acid monohydrate 3. Caffeine acid 4. Chlorogenic acid 5.(±)-Catechin hydrate 6. (−)-Epigallocatechin gallate 7. *trans*-Ferulic acid 8. Rutin hydrate 9. Kojic acid และกลุ่มสารตัวอย่าง 10. Hexanes 11. Ethyl acetate 12. Ethanol 13. DI water

พบว่า สารละลายตัวอย่างได้มีการเคลื่อนที่ไปอย่างไม่มีจุดสิ้นสุด เนื่องจาก ในระบบนี้ใช้ 50% MeOH-H_2O เป็นตัวนำพาที่มีขั้วสูง จึงทำให้สารละลายตัวอย่างที่มีขั้วต่างกันนั้นพยายามที่จะเคลื่อนที่ออกมาอย่างรวดเร็ว และสารที่มีขั้วไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่นำมาใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีขั้วสูงเช่นเดียวกัน โดยสารมาตรฐานเหล่านี้มีขั้วที่ใกล้เคียงกับสารตัวนำพา ทำให้สามารถเห็นสารนั้นจะถูกดูดซับไว้แน่นและเคลื่อนที่ช้า อย่างเห็นได้ชัดเจน (ยุทธนา วรวุธ, 2558) ดังภาพที่ 1 เมื่อนำข้อมูลจากภาพที่ 1 มาหาค่า Rf ของสารมาตรฐาน Quercetin, Gallic acid monohydrate, Caffeine acid, Chlorogenic acid, (±)-Catechin hydrate, (-)-Epigallocatechingallate, *trans*-Ferulic acid, Rutin hydrate, Kojic acid จะได้ค่า Rf เท่ากับ 0.242, 0.909, 0.758 และ 0.682, 0.833, 0.758, 0.742, 0.682 และ 0.561, 0.576, 0.970 cm ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า Rf ของสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน	ค่า Rf
Quercetin	0.242
Gallic acid monohydrate	0.909
Caffeine acid	0.758 และ 0.682
Chlorogenic acid	0.833
(±)-Catechin hydrate	0.758
(-)-Epigallocatechingallate	0.742
trans-Ferulic acid	0.682 และ 0.561
Rutin hydrate	0.576
Kojic acid	0.970

อภิปรายผลการวิจัย

การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหญ้าแห้วหมู โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน, เอทิล อะซิเตท, เอทานอล และน้ำ พบว่าสารสกัดที่ได้มากที่สุดคือ สารสกัดจากน้ำ (7.480%) และสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงค่าปริมาณสารประกอบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 1.76±0.06 mg GAE/g sample และ 9.75±0.96 mg QE/g sample ตามลำดับ นอกจากนั้น สารสกัดเอทานอลยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.14±0.00 mg AAC/g sample, 11.04±0.11 mg AAC/g sample และ 13.22±0.11 mg TEAC/g sample ตามลำดับ และสารสกัดที่ดีรองลงมาคือ น้ำ เอทิล อะซิเตท และเฮกเซน ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า ค่าของตัวทำละลายทุกตัว มีความสัมพันธ์ ไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงยืนยันได้ว่า เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหญ้าแห้วหมู เพื่อใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอางในการพัฒนาสูตรต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. หัวหญ้าแห้วหมูมีความสามารถในการต้านอนุมลอิสระ และราคาถูก (80 บาท/kg.) จึงเป็นการดีที่จะนำหัวหญ้าแห้วหมูมาพัฒนาลงในตำรับเครื่องสำอางต่อไป

2. สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบในการทดสอบการวิเคราะห์รูปแบบองค์ประกอบของสารสกัดหัวหญ้าแห้วหมูด้วยวิธี TLC ไม่เหมาะสมกับสารสำคัญในสารประกอบหัวหญ้าแห้วหมู จึงทำให้ได้ทราบถึงขั้วของสารประกอบหัวหญ้าแห้วหมูเท่านั้น ดังนั้นการตรวจสอบด้วย HPLC ผลที่ได้จะชัดเจนและแม่นยำกว่า

รายการอ้างอิง

ฐิติพรรณ ฉิมสุข. (2558). การประชุมวิชาการวิจัยรำไพพรรณี ครั้งที่ 9 "การบูรณาการงานวิจัย เพื่อพัฒนาท้องถิ่นอย่างยั้งยืน". *การศึกษาพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและกรดไขมันของสาหร่ายมงกุฎหนามจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ประเทศไทย*, 9, 292.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (กรกฎาคม - กันยายน 2556 2556). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. *อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ*, 21(3), 278.

ปริยานุช อินทร์รอด. (2551). ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง*, 21.

ปวีณา พันทอง. (สิงหาคม 2559). หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. *การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC.*

วีระพล บุญทวี. (2559). การประชุมวิชาการ “มหาวิทยาลัยมหาสารคามวิจัย ครั้งที่ 12. *การตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดโดยตัวทำละลายที่แตกต่างกันจากเห็ดปลูก*, 12, 593.

สุชาดา มานอก. (2558). Advanced Science. *การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DDPH, ABTS และ FRAP และปริมานสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร*, 15, 109-110.

อดิศร จารูญ. (2558). วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. *การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกล้วยหินและกล้วยเล็บมือนาง*, 2, 38-42.

Kilani-Jaziri, S. (2011). South African Journal of Botany. *Phytochemical, antimicrobial, antioxidant and antigenotoxic potentials of Cyperus rotundus* extracts, 77, 771.

Suwit Manasthaisong. (2012). *มหัศจรรย์แห่งสมุนไพรไทย*. สืบค้นใช้เมื่อ 17 พฤศจิกายน 2559 จาก www.thaiherb-tip108.blogspot.com: http://thaiherb-tip108.blogspot.com/2011/03/blog-post_4094.html