

ผลของวิธีการสกัดและสายพันธุ์บัวบกต่อปริมาณผลผลิต สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

The effect of extraction methods and *Centella asiatica* species on yield,
total phenolic content and antioxidant activity of extract

เจวดี มีสัตย์^{1*}, อภิรตธี ศรีธร¹, ยุทธศักดิ์ สุขการ¹

Rewadee Meesat^{1*}, Apiratree Srithon¹, Yuttasak Subkaree¹

รับบทความ 25 กรกฎาคม 2567 แก้ไขบทความ 8 เมษายน 2568 ยอมรับตีพิมพ์ 8 เมษายน 2568

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารสำคัญจากบัวบกสายพันธุ์ท้องถิ่น วิธีการสกัดแบ่งได้เป็น 3 วิธีคือการสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเอทานอล และการสกัดด้วยเอทานอล สายพันธุ์บัวบกที่ใช้สำหรับการศึกษา คือ สายพันธุ์นครปฐม สายพันธุ์ระยอง และสายพันธุ์อุบลราชธานี สารสกัดจากแต่ละสายพันธุ์จะถูกวัดปริมาณผลผลิต ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH และการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (FRAP) วิธีการสกัดด้วยน้ำใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที วิธีการสกัดด้วยเอทานอลใช้เอทานอลเกรด วิสโคไซม์ Viscozyme L ปริมาณร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ส่วนวิธีการสกัดด้วยเอทานอลใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที การศึกษานี้พบว่าวิธีการสกัดและสายพันธุ์บัวบกมีผลต่อปริมาณผลผลิต สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ การสกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณผลผลิตสารสกัดสูงสุด ตามด้วยการสกัดด้วยน้ำและเอทานอล ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การสกัดด้วยน้ำและเอทานอลให้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) บัวบกสายพันธุ์ระยองให้ปริมาณผลผลิต ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสูงกว่าบัวบกสายพันธุ์นครปฐมและสายพันธุ์อุบลราชธานี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นวิธีการสกัดและสายพันธุ์บัวบกที่เหมาะสมคือวิธีการสกัดด้วยน้ำและบัวบกสายพันธุ์ระยอง โดยให้ปริมาณผลผลิตสารสกัดร้อยละ 35.94 ± 0.54 โดยน้ำหนัก สารสกัดมีสารประกอบฟีนอลิก 36.02 ± 0.51 mg GAE/g ความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.16 ± 0.01 mg/mL และมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (FRAP) เท่ากับ 727.38 ± 27.47 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ สารสกัดจากบัวบกที่ได้สามารถละลายน้ำได้ดีเหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารและเครื่องดื่ม

คำสำคัญ: สายพันธุ์บัวบก, การสกัดด้วยน้ำ, การสกัดด้วยเอทานอล, การสกัดด้วยเอทานอล, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมอาหารสุขภาพ (ศนอ.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

Abstract

This research aims to study the comparison of extraction methods for local Asiatic Pennywort or *Centella asiatica* species. The extract techniques were divided into three methods, water extraction, enzyme extraction and ethanol extraction. The local *Centella asiatica* species, Nakhon Pathom, Rayong, and Ubon Ratchathani species were used as extracted samples. The extracted products were evaluated for extraction yield, total phenolic content (TPC) and antioxidant properties using DPPH assay and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The Water extraction method was performed at 95 °C for 60 min and enzyme extraction method was applied Viscozyme L 3% (w/w) at pH 5.0, and 50 °C for 60 min. Additionally, the ethanol extraction method was carried out at 25 °C for 60 min. This study found that the extraction methods and the *C. asiatica* species had a significant effect on the extracted yield, TPC and antioxidant activity ($p < 0.05$). The highest yield could be extracted by the enzyme extraction, follow by the water and ethanol extraction method, respectively. However, the TPC and antioxidant activities of the extract products obtained from the water and ethanol extraction method exhibited significantly higher than those from the enzyme extraction method ($p < 0.05$). The Rayong species gave a significantly higher extraction yield, TPC and antioxidant activity compared to Nakhon Pathom and Ubon Ratchathani species ($p < 0.05$). Thus, the appropriate extraction technique and *C. asiatica* species were the water extraction method and the Rayong specie. The water extraction was used to extract active compounds from the local specie, yielding $35.94 \pm 0.54\%$ (w/w). The TPC was 36.02 ± 0.51 mg GAE/g, while the IC_{50} and FRAP values were 0.16 ± 0.01 mg/mL and 727.38 ± 27.47 μ mol Fe^{2+} /g, respectively. The extract of *Centella asiatica* showed high solubility in water and could be applied as an ingredient for food and drink products.

Keywords: *Centella asiatica* species, Water extraction, Enzyme extraction, Ethanol extraction, Antioxidant activity

¹Expert Centre of Innovative Health Food (InnoFood), Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR)

*Corresponding author e-mail address: Rewadee@tistr.or.th

1. บทนำ (Introduction)

บัวบก (*Centella asiatica* L. Urb.) เป็นพืชที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายและนิยมใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์หลายชนิดทั้งยา อาหารเสริม เครื่องสำอาง และอาหาร [1-3] ทั้งนี้เพราะบัวบกเป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติหลายอย่าง เช่น รักษาแผล ด้านการอักเสบ ด้านเชื้อจุลินทรีย์ ด้านอนุมูลอิสระ ด้านมะเร็ง ป้องกันแผลในกระเพาะอาหาร ช่วยเพิ่มความจำ สามารถรักษาโรคผิวหนังได้หลายชนิด เช่น โรคเรื้อน โรคสะเก็ดเงิน กลากเกลื้อน และผื่นคัน เป็นต้น รักษาอาการใช้โรคดีซ่าน โรคบิด ท้องเสีย ปวดทางจิต ช่วยเพิ่มการสังเคราะห์คอลลาเจน และต้านริ้วรอย เป็นต้น [1-5] บัวบกมีสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น เอเชียดิโคไซด์ แมดิแคสโซไซด์ กรดเอเชียดิก กรดแมดิแคสซิด โพลีฟีนอล ฟีนอลโพรพานอยด์ ฟลาโวนอยด์ คาเทชิน นารินจิน รูติน เทอร์ปีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ เทนิน เบต้าแคโรทีน และวิตามินซี เป็นต้น [1,3-4,6-7]

การสกัดสารสำคัญหรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชมีความสำคัญอย่างมากต่ออุตสาหกรรมยาและอาหาร เป็นกระบวนการแรกในการแยกสารสำคัญออกจากพืชเพื่อให้ได้สารสำคัญที่มีความเข้มข้นสูงและมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง นอกจากนั้นกระบวนการสกัดต้องให้ผลผลิตสูง ใช้เวลาน้อย และต้นทุนต่ำ [8-9] ในการสกัดสารสำคัญมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดและคุณภาพของสารสกัด เช่น วิธีการสกัด สารละลายที่ใช้ในการสกัด ชนิดตัวถูกละลาย อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณตัวถูกละลาย และระยะเวลาการสกัด เป็นต้น [9] วิธีการสกัดมีผลอย่างมากต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารสำคัญจากบัวบกและสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การแช่ตัวอย่างบัวบกในตัวทำละลายที่อุณหภูมิ และระยะเวลาต่าง ๆ ตัวอย่างตัวทำละลาย เช่น น้ำ เมทานอล เอทานอล และอะซิโตน เป็นต้น [1,4,9-10] วิธีการนี้จะทำให้เซลล์พืชอ่อนนุ่มทำให้สารสำคัญถูกสกัดหรือละลายออกมากับตัวทำละลายได้ ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะมีความเป็นขั้วแตกต่างกันทำให้มีความจำเพาะต่อสารสำคัญแตกต่างกัน ส่งผลให้ในการสกัดได้สารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน [4] วิธีการนี้เป็นวิธีดั้งเดิมที่ง่ายและสะดวก แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้อาจจะใช้เวลานาน อุณหภูมิสูง และต้องใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก [1,9] นอกจากนั้นตัวทำละลายบางชนิดไม่เหมาะต่อการนำมาสกัดเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร [8] การคัดเลือกตัวทำละลายจึงมีความสำคัญ การสกัดด้วยเอนไซม์จะเป็นการใช้เอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสในการทำลายผนังเซลล์ของพืช โดยเฉพาะโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสทำให้สามารถสกัดสารสำคัญได้ [11-12] เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและให้ผลผลิตการสกัดสูง [12] อีกทั้งเป็นวิธีการที่เหมาะสมต่อการสกัดเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร นอกจากนั้นยังมีเทคนิคอื่น ๆ ที่สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด เช่น การใช้คลื่นไมโครเวฟ การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ การใช้ความดันสูง เป็นต้น [2,13-15] สายพันธุ์บัวบกเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพและคุณภาพของสารสกัดจากการศึกษาของประนอม ใจอ้าย [16] พบว่า บัวบกสายพันธุ์ระยองจะให้สารสำคัญ (เอเชียดิโคไซด์) สูงสุด ตามด้วยสายพันธุ์พะเยา สายพันธุ์ราชบุรี สายพันธุ์ตราด สายพันธุ์เชียงราย สายพันธุ์เพชรบุรี สายพันธุ์จันทบุรี สายพันธุ์นครปฐม และสายพันธุ์เลย ตามลำดับ จากการศึกษาของ Bakar และคณะ [17] พบว่าบัวบกสายพันธุ์ Pegaga Kampung ให้สารเอเชียดิโคไซด์สูงกว่าบัวบกสายพันธุ์ Pegaga Nyonya และสายพันธุ์ Pegaga Salad

ดังนั้น งานวิจัยนี้จะศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารสำคัญด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเอนไซม์ และการสกัดด้วยเอทานอล จากบัวบกสายพันธุ์นครปฐม สายพันธุ์ระยอง และสายพันธุ์อุบลราชธานี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการสกัดและสายพันธุ์บัวบกที่เหมาะสมสำหรับการสกัดที่ให้ผลผลิต สารสำคัญ (สารประกอบฟีนอลิก) และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง

2. วิธีการวิจัย (Experimental Methods)

2.1 วัตถุดิบบวบก

บวบก (*Centella asiatica* L. Urb.) ที่ใช้ในการศึกษานี้มี 3 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์นครปฐม (Nakhon Pathom) สายพันธุ์ระยอง (Rayong) และสายพันธุ์อุบลราชธานี (Ubon Ratchathani) ในการเตรียมใบบวบกทำโดยการนำใบบวบกสดไปล้างทำความสะอาด จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Memmert, เยอรมัน) เป็นเวลา 4 - 5 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร (Spring Green Evolution PG2500, จีน) และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 เมช (0.60 มิลลิเมตร) ใส่ถุงซิปล็อคและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.2 การศึกษาการสกัดสารสำคัญจากใบบวบก

2.2.1 การสกัดด้วยน้ำ (Water extraction)

นำผงใบบวบกที่ผ่านการบดและร่อนผ่านตะแกรงไปเติมน้ำให้ได้อัตราส่วน 1:20 (ผงใบบวบกต่อน้ำ) แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส (Memmert, เยอรมัน) เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปกรองแยกกากด้วยการกรองแบบสุญญากาศผ่านผ้ากรองไนลอนขนาด 50 เมช นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid) และคำนวณปริมาณผลผลิตสารสกัด (Extracted yield) ตามสมการที่ 1 วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content) ปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

$$\text{ปริมาณผลผลิตสารสกัด (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณของแข็งที่ได้จากการสกัด (กรัมแห้ง)} \times 100}{\text{ปริมาณวัตถุดิบเริ่มต้น (กรัมแห้ง)}} \quad (1)$$

2.2.2 การสกัดด้วยเอนไซม์ (Enzyme extraction)

นำผงใบบวบกที่ผ่านการบดและร่อนผ่านตะแกรงไปเติมน้ำให้ได้อัตราส่วน 1:20 (ผงใบบวบกต่อน้ำ) แล้วปรับพีเอชให้ได้ 5.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ และเติมเอนไซม์เซลลูเลสชนิด Viscozyme L ปริมาณร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก แล้วนำไปย่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Memmert, เยอรมัน) อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปกรองแยกกากด้วยการกรองแบบสุญญากาศผ่านผ้ากรองไนลอนขนาด 50 เมช นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid) และคำนวณปริมาณผลผลิตสารสกัด (Extracted yield) ตามสมการที่ 1 วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content) ปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

2.2.3 การสกัดด้วยเอทานอล (Ethanol extraction)

นำผงใบบวบกที่ผ่านการบดและร่อนผ่านตะแกรงไปเติมเอทานอลร้อยละ 95 ให้ได้อัตราส่วน 1:20 (ผงใบบวบกต่อเอทานอล) แล้วแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปกรองแยกกากด้วยการกรองแบบสุญญากาศผ่านผ้ากรองไนลอนขนาด 50 เมช นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid) และคำนวณปริมาณผลผลิตสารสกัด (Extracted yield) ตามสมการที่ 1 วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content) ปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

2.3 การวิเคราะห์

2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid; TS)

ทำการอบครุชีเบิ้ลอะลูมิเนียมที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส (Memmert, เยอรมัน) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ ซึ่งน้ำหนักครุชีเบิ้ลอะลูมิเนียม (W1) จากนั้นดูดสารละลายที่ได้จากการสกัดใบบวบกปริมาณ 10.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในครุชีเบิ้ลอะลูมิเนียมข้างต้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส (Memmert, เยอรมัน) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ แล้วชั่งน้ำหนัก (W2) คำนวณปริมาณของแข็งทั้งหมดออกมาในรูปร้อยละ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (% , w/v) ตามสมการที่ 2

$$\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{(W2 - W1) \times 100}{\text{ปริมาตรสารสกัด (มิลลิลิตร)}} \quad (2)$$

2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content; TPC)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic contents) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent โดยประยุกต์จากงานวิจัยของ Thamnarathip และคณะ [18] ทำการเจือจางตัวอย่างสารสกัดใบบวบกด้วยน้ำกลั่นให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมแล้วดูดสารละลายตัวอย่างปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) ความเข้มข้นร้อยละ 7.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (SPECORD®200 PLUS, เยอรมัน) โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น Blank และใช้สารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 0.01 - 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดรายงานในรูปของมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg Gallic Acid Equivalent, mg GAE/g)

2.3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging assay)

วิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay โดยประยุกต์จากงานวิจัยของ Chen และคณะ [19] ทำการเจือจางตัวอย่างสารสกัดใบบวบกด้วยน้ำกลั่นให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมประมาณ 0.02 - 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้ว นำไปศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยการดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.02 M, pH 6.0) ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอลร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร และเติมสารละลายตัวอย่างปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (SPECORD®200 PLUS, เยอรมัน) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็น Blank คำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (ร้อยละ) ในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ตามสมการที่ 3 จากนั้นหาปริมาณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง (ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀)

$$\text{ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)} = \frac{(\text{Abs (DPPH)} - \text{Abs (sample)}) \times 100}{\text{Abs (DPPH)}} \quad (3)$$

โดย Abs (DPPH) เป็นค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ผสมกับบัฟเฟอร์ และ Abs (sample) เป็นค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ผสมกับตัวอย่าง

2.3.4 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (Ferric reducing antioxidant power; FRAP)

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) ประยุกต์จาก Thamnarathip และคณะ [18] ทำการเจือจางตัวอย่าง (สารสกัดจากใบบัวบก) ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมแล้วดูดสารละลายตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย FRAP ปริมาณ 3,000 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (SPECORD®200 PLUS, เยอรมัน) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank และใช้สารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 100 - 1400 ไมโครโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน คำนวณผลที่ได้ให้แสดงออกมาในรูปไมโครโมล Fe^{2+} ต่อกรัม ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) สำหรับสารละลาย FRAP ให้เตรียมเมื่อต้องการใช้โดยการผสมสารละลาย Acetate buffer (300 mM, pH 3.6) กับสารละลาย TPTZ (10 mM) และสารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) ในอัตราส่วน 10:1:1 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปใช้

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ (Replication) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DRMT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS statistic (Version 19.0) แสดงผลในรูป ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3. ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)

ในการศึกษาผลของวิธีการสกัด (การสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเอทานอล และการสกัดด้วยเอทานอล) และสายพันธุ์บัวบก (สายพันธุ์นครปฐม สายพันธุ์ระยอง และสายพันธุ์อุบลราชธานี) ต่อปริมาณผลผลิต สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ บัวบกทั้ง 3 สายพันธุ์ จะถูกนำมาล้างทำความสะอาด อบ บด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 เมช (0.60 มิลลิเมตร) ก่อนนำไปสกัดสารสำคัญ การสกัดด้วยน้ำจะใช้อัตราส่วนผงบัวบกต่อน้ำ 1:20 และต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที การสกัดด้วยเอทานอลจะใช้อัตราส่วนผงบัวบกต่อน้ำ 1:20 ย่อยด้วยเอทานอลเกรด Viscozyme L ปริมาณร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที การสกัดด้วยเอทานอลจะใช้อัตราส่วนผงบัวบกต่อเอทานอล 1:20 แช่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากการศึกษาพบว่าวิธีการสกัดมีผลต่อปริมาณผลผลิต ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (รูปที่ 1 - 4) วิธีการสกัดด้วยเอทานอลจะให้ปริมาณผลผลิต ($37.91 \pm 2.23 - 48.39 \pm 0.46\%$, w/w) สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ ($31.22 \pm 0.30 - 35.94 \pm 0.54\%$, w/w) และการสกัดด้วยเอทานอล ($11.09 \pm 0.90 - 15.12 \pm 0.32\%$, w/w) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 1) ทั้งนี้เพราะในการสกัดด้วยเอทานอลจะใช้เอทานอลเกรด Viscozyme L ซึ่งเป็นเอทานอลเชิงซ้อนประกอบด้วยเอทานอลหลายชนิด เช่น เซลลูโลส อะราบินอส เพคตินเนส เพนโตซานเนส และไซลาลเนส เป็นต้น โดยเอทานอลเกรดและไซลาลเนสสามารถย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่เป็นโครงสร้างหลักของผนังเซลล์พืช [12] เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเมื่อถูกย่อยจะละลายน้ำและกลายเป็นส่วนหนึ่งของสารสกัด นอกจากนั้นเมื่อโครงสร้างของผนังเซลล์พืชถูกทำลายจะทำให้โครงสร้างอื่น ๆ ที่สามารถละลายน้ำได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต (แป้งที่ละลายได้ในน้ำร้อน น้ำตาล และเส้นใยอาหารละลายน้ำ) โปรตีน เถ้า รวมถึงสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอลิก เบต้าแคโรทีน และวิตามิน เป็นต้น จะละลายน้ำและถูกสกัดออกมาได้เพิ่มขึ้นและกลายเป็นส่วนหนึ่งของสารสกัดด้วยเช่นเดียวกัน ส่งผลให้การสกัดด้วยเอทานอลได้ปริมาณผลผลิตสารสกัดสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยน้ำและการสกัดด้วยเอทานอล สำหรับการสกัดด้วยน้ำจะให้ผลผลิตสารสกัดต่ำกว่าการสกัดด้วยเอทานอล แต่สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอล ทั้งนี้เพราะองค์ประกอบของเซลล์พืชโดยส่วนใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรต (แป้ง น้ำตาล และเส้นใยอาหารละลายน้ำ) โปรตีน เถ้า รวมถึงสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดจะละลายน้ำได้ดีกว่าละลายในเอทานอล นอกจากนั้นการสกัดด้วยน้ำในครั้งนี้จะใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ความร้อนสามารถช่วยเพิ่มการละลายขององค์ประกอบต่าง ๆ และสามารถ

ทำลายผนังเซลล์พืชได้บางส่วน ส่งผลให้องค์ประกอบของเซลล์พืชถูกสกัดออกมาได้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม การใช้ความร้อนในระดับอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ไม่สามารถทำลายผนังเซลล์พืชโดยเฉพาะโครงสร้างของเซลล์ลูโลสและเฮมิเซลล์ลูโลสได้เท่ากับการใช้เอนไซม์ ทำให้การสกัดด้วยน้ำให้ผลผลิตต่ำกว่าการสกัดด้วยเอนไซม์ ส่วนการสกัดด้วยเอทานอลจะให้ผลผลิตต่ำสุดและต่ำกว่าการสกัดด้วยเอนไซม์และการสกัดด้วยน้ำมากกว่า 2 เท่าตัว สอดคล้องกับการศึกษาของ Binh และ Oanh [12] ซึ่งพบว่าการสกัดด้วยเอนไซม์ Viscozyme จะให้ผลผลิตสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอล 2 เท่า ทั้งนี้เพราะในเซลล์พืชมีองค์ประกอบจำนวนน้อยที่สามารถละลายในเอทานอลได้ดี เช่น ไขมัน สารสี และสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิด เป็นต้น นอกจากนั้นในการสกัดครั้งนี้ใช้เอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95 และแช่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) โดยจากการศึกษาของ Rahman และคณะ [4] ระบุว่าเอทานอลความเข้มข้นสูงมีความสามารถในการสกัดสารจากพืชได้ต่ำกว่าเอทานอลความเข้มข้นต่ำและน้ำ ในระหว่างการสกัดตัวทำละลายจะแพร่เข้าไปในวัตถุดิบและละลายสารที่มีลักษณะความเป็นขี้เหมือนกัน น้ำมีความเป็นขี้สูงกว่าเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 (Absolute ethanol) จึงละลายองค์ประกอบของเซลล์พืชได้มากกว่า อีกทั้งการสกัดด้วยเอทานอลในครั้งนี้จะแช่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งจะละลายองค์ประกอบของเซลล์พืชได้ต่ำกว่าการใช้อุณหภูมิ 50 และ 95 องศาเซลเซียส นี่จึงเป็นเหตุผลให้การสกัดด้วยเอทานอลได้ผลผลิตต่ำสุด

แต่อย่างไรก็ตาม การสกัดด้วยน้ำและการสกัดด้วยเอทานอลจะให้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (27.40 ± 0.77 - 36.02 ± 0.51 และ 26.22 ± 0.51 - 36.84 ± 0.56 mg GAE/g) สูงกว่าการสกัดด้วยเอนไซม์ (13.29 ± 0.64 - 18.01 ± 0.37 mg GAE/g) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 2) ทั้งนี้เพราะสารประกอบฟีนอลิก เช่น โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน เป็นต้น สามารถละลายได้ดีทั้งในน้ำและเอทานอล [4] นอกจากนี้ในการสกัดด้วยน้ำจะใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ความร้อนจะช่วยเพิ่มการละลายหรือการสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้เพิ่มขึ้นด้วย ทำให้ในการสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำมีสารประกอบฟีนอลิกสูง ส่วนการสกัดด้วยเอทานอลเนื่องจากมีองค์ประกอบของเซลล์พืชที่ละลายในเอทานอลได้น้อยแต่สารประกอบฟีนอลิกยังคงละลายได้ดีในเอทานอล ทำให้การสกัดด้วยเอทานอลได้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงแต่มีผลผลิตสารสกัดต่ำ (รูปที่ 1) สำหรับการสกัดด้วยเอนไซม์จะใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สารประกอบฟีนอลิกละลายได้น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นการสกัดด้วยเอนไซม์จะมีองค์ประกอบอื่น ๆ โดยเฉพาะองค์ประกอบที่เกิดจากการย่อยของเอนไซม์เซลล์ลูโลสและเฮมิเซลล์ลูโลสทำให้สารสกัดที่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกต่ำ อย่างไรก็ตาม เมื่อคำนวณปริมาณผลผลิตของสารประกอบฟีนอลิกเทียบกับปริมาณวัตถุดิบเริ่มต้นที่ใช้พบว่าการสกัดด้วยน้ำจะให้ผลผลิตสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด (8.64 ± 0.33 - 12.95 ± 0.25 mg GAE/g) ตามด้วยการสกัดด้วยเอนไซม์ (5.66 ± 0.32 - 8.71 ± 0.19 mg GAE/g) และการสกัดด้วยเอทานอล (3.04 ± 0.25 - 5.29 ± 0.28 mg GAE/g) ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษานี้บ่งบอกได้ว่าการสกัดด้วยน้ำมีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากบัวบกมากกว่าการสกัดด้วยเอนไซม์และเอทานอลเพราะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงและผลผลิตสูง ในการศึกษาครั้งนี้มีแนวโน้มสอดคล้องกับการศึกษาของ Riza และคณะ [10] ระบุว่า การสกัดด้วยน้ำจะให้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (251.88 ± 0.96 mg GAE/g) สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 (172.43 ± 0.98 mg GAE/g) และการสกัดด้วยเมทานอล (95.77 ± 0.95 mg GAE/g) และการศึกษาของ Rahman และคณะ [4] ซึ่งพบว่าการสกัดด้วยน้ำให้โพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้จะให้ผลแตกต่างจากการศึกษาอื่น ๆ ในหลายงานวิจัยเมื่อใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ในการสกัด ซึ่งจะให้สารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ เช่น จากการศึกษาของ Rahmawati และคณะ [2] พบว่าการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (52.128 mg GAE/g) สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ (45.654 mg GAE/g) การศึกษาของ Kandasamy และคณะ [7] พบว่าการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (106.2 ± 7.5 mg GAE/g) สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ (34.4 ± 1.1 mg GAE/g) และการศึกษาของ Rahman และคณะ [4] พบว่าการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 จะให้ปริมาณสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ ทั้งนี้เพราะระดับความเป็น

ตัวของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความแตกต่างจึงละลายได้ดีในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เช่น สารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ละลายในสารที่มีความเป็นขั้วสูง เช่น น้ำ ได้ดีกว่าสารที่มีความเป็นขั้วต่ำ เช่น เอทานอล แต่จะละลายในสารที่มีความเป็นขั้วปานกลาง เช่น เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ได้สูงสุด ส่วนแทนนินจะละลายได้ดีในสารที่มีความเป็นขั้วต่ำ เช่น เอทานอล [4] นอกจากนี้ในการศึกษาแต่ละงานวิจัยใช้ตัวบ่งชี้ต่างสายพันธุ์ทำให้มีองค์ประกอบและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกัน สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารสำคัญที่มีความสามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ทำให้สารประกอบฟีนอลิกมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing agents) ตัวให้ไฮโดรเจน (Hydrogen donors) ตัวยับยั้งการทำงานของออกซิเจนเดี่ยว (Singlet oxygen quenchers) และตัวจับประจุโลหะ (Metal chelators) [4] หรือเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [10] โดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้นจากแยกตัวออกมาเป็นไอออนประจุลบ (Anion) และโปรตอน (Proton) หลังจากนั้นจึงทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระเกิดเป็นสารประกอบของอนุมูลอิสระกับฟีนอล สารสกัดที่มีสารประกอบฟีนอลิกสูงจึงมีแนวโน้มที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงด้วย [4]

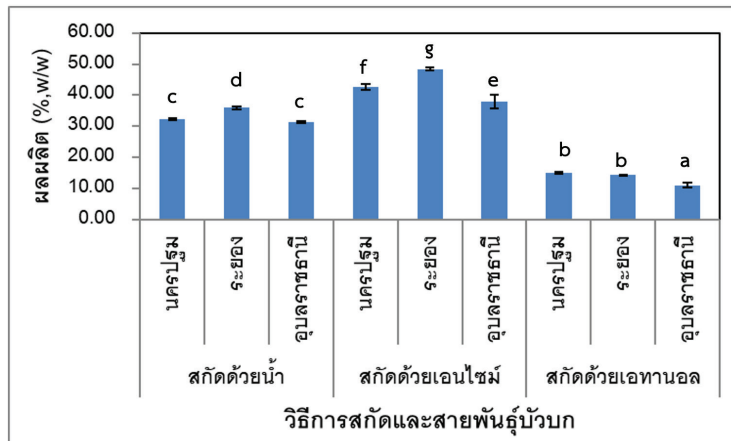
การสกัดด้วยน้ำและการสกัดด้วยเอทานอลนอกจากจะให้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าการสกัดด้วยเฮกซ์เมทิลแล้ว ยังให้ฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าด้วย จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวัดปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} ผลแสดงในรูปที่ 3 โดยสารสกัดที่มีค่า IC_{50} ต่ำกว่าจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเนื่องจากใช้ปริมาณสารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำกว่าในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 จากรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำและการสกัดด้วยเอทานอลจะให้ค่า IC_{50} (0.16 - 0.27 mg/mL และ 0.24 - 0.30 mg/mL) ต่ำกว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกซ์เมทิล (0.35 - 0.63 mg/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นั้นหมายความว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำและการสกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกซ์เมทิล และในบางบวบสายพันธุ์ (สายพันธุ์นครปฐมและสายพันธุ์ระยอง) สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำมีค่า IC_{50} (0.16 - 0.24 mg/mL) ต่ำกว่าการสกัดด้วยเอทานอล (0.24 - 0.30 mg/mL) บ่งบอกได้ว่าการสกัดด้วยน้ำเป็นวิธีการสกัดที่ให้สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและเฮกซ์เมทิล ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Riza และคณะ [10] ระบุว่าสารสกัดด้วยน้ำจะให้สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC_{50} เท่ากับ $24.09 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$) สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 (IC_{50} เท่ากับ $54.22 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$) และการสกัดด้วยเมทานอล (IC_{50} เท่ากับ $113.91 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$) และการศึกษาของ Rahman และคณะ [4] ซึ่งพบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} เท่ากับ $10.23 \pm 1.20 \mu\text{g/mL}$) สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 100 (IC_{50} เท่ากับ $35.56 \pm 1.24 \mu\text{g/mL}$) นอกจากนี้จากการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอริก (FRAP) จะให้ผลในลักษณะเช่นเดียวกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำและการสกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก ($510.38 \pm 2.43 - 727.38 \pm 27.47$ และ $613.95 \pm 54.03 - 768.66 \pm 1.97 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) สูงกว่าการสกัดด้วยเฮกซ์เมทิล ($229.89 \pm 11.49 - 396.55 \pm 29.18 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลมีแนวโน้มมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (FRAP) สูงกว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำโดยเฉพาะการสกัดบวบสายพันธุ์นครปฐม (รูปที่ 4) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลมีชนิดสารสำคัญแตกต่างจากสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล ส่วนสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (FRAP) ได้ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะเป็นการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการให้ H^+ กับสารอนุมูลอิสระ DPPH ดังนั้นสารที่มีความสามารถในการให้ H^+ จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี ส่วนความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (FRAP) จะเป็นการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} ดังนั้นสาร

มีความสามารถในการให้ e^- ได้ดีจะมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอรริก (FRAP) ได้ดี สารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระของบัวบกนอกจากจะมีสารประกอบฟีนอลิกแล้วยังมีสารกลุ่มอื่น ๆ ด้วย เช่น เอเซียติโคไซด์ เมดิแคสโซไซด์ กรดเอเซียติก และกรดเมดิแคสซิก เบต้าแคโรทีน และวิตามินซี เป็นต้น [1,4,6] น้ำและเอทานอลมีความเป็นขั้วต่างกัน จึงสกัดได้สารสำคัญแตกต่างกันเพราะสารสำคัญแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อความเป็นขั้วของตัวทำละลาย เช่น โพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์จะถูกสกัดได้ดีด้วยสารที่มีขั้วปานกลาง เช่น เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 แทนนินและเบต้าแคโรทีนจะถูกสกัดได้ดีด้วยสารที่มีขั้วต่ำ เช่น เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 ส่วนวิตามินซีจะถูกสกัดได้ดีด้วยสารทั้งสองชนิดทั้งที่มีขั้วสูงและขั้วต่ำ [4] ดังนั้น จากการศึกษาวิธีการสกัดสารสำคัญจากบัวบกในครั้งนี้น่าจะสามารถสรุปได้ว่าการสกัดด้วยน้ำเป็นวิธีการสกัดที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยเอทานอลและการสกัดด้วยเอทานอล เนื่องจากการสกัดด้วยน้ำเป็นวิธีการสกัดที่ให้ผลผลิตสูง อีกทั้งสารสกัดที่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนั้นวิธีการสกัดด้วยน้ำเป็นวิธีการที่ใช้ต้นทุนต่ำและเป็นวิธีที่ได้สารสกัดที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบอาหาร

สายพันธุ์บัวบก (*C. asiatica*) มีผลต่อปริมาณผลผลิต ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (รูปที่ 1-4) บัวบกสายพันธุ์ระยองจะให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์นครปฐมและสายพันธุ์อุบลราชธานีเมื่อสกัดด้วยน้ำและเอทานอล แต่ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์นครปฐมเมื่อใช้วิธีการสกัดด้วยเอทานอล (รูปที่ 1) บัวบกสายพันธุ์ระยองจะให้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าสายพันธุ์นครปฐมและสายพันธุ์อุบลราชธานีเมื่อสกัดด้วยน้ำและเอทานอลแต่ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์อุบลราชธานีเมื่อสกัดด้วยเอทานอล (รูปที่ 2) บัวบกสายพันธุ์ระยองจะให้สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP สูงกว่าสายพันธุ์นครปฐมและสายพันธุ์อุบลราชธานีเมื่อสกัดด้วยน้ำและเอทานอล (รูปที่ 3-4) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะบัวบกแต่ละสายพันธุ์มีองค์ประกอบทางเคมี เช่น คาร์โบไฮเดรต (แป้ง น้ำตาล และเส้นใยอาหารละลายน้ำ) โปรตีน เถ้า รวมถึงสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอลิก เบต้าแคโรทีน และวิตามิน เป็นต้น แตกต่างกัน บัวบกสายพันธุ์ระยองอาจจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถละลายน้ำได้สูงกว่าบัวบกสายพันธุ์นครปฐมและสายพันธุ์อุบลราชธานี แต่มีองค์ประกอบที่สามารถละลายในเอทานอลได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์นครปฐม การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของประนอม ใจอ้าย [16] ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ระยองจะให้สารเอเซียติโคไซด์ (Asiaticoside) สูงสุด รองลงมาคือ สายพันธุ์พะเยา สายพันธุ์ราชบุรี สายพันธุ์ตรวด สายพันธุ์เชียงราย สายพันธุ์เพชรบุรี สายพันธุ์จันทบุรี สายพันธุ์นครปฐม และสายพันธุ์เลย ตามลำดับ ดังนั้นจากการศึกษาสายพันธุ์บัวบกในครั้งนี้น่าจะสามารถสรุปได้ว่าบัวบกสายพันธุ์ระยองเป็นสายพันธุ์บัวบกที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์นครปฐมและสายพันธุ์อุบลราชธานี เนื่องจากบัวบกสายพันธุ์ระยองให้ปริมาณผลผลิต ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP สูงสุด

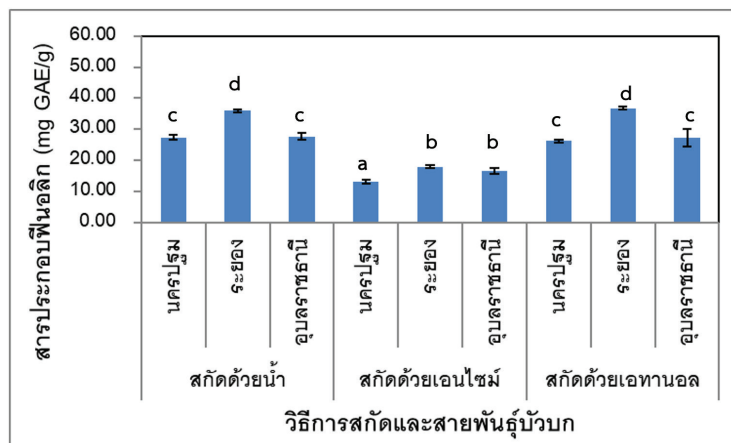
จากการศึกษาในครั้งนี้น่าจะสามารถสรุปได้ว่า การสกัดด้วยน้ำ และบัวบกสายพันธุ์ระยอง เป็นวิธีการสกัดและสายพันธุ์บัวบกที่ดีที่สุดสำหรับการสกัดสารสำคัญ วิธีการนี้จะให้ผลผลิต $35.94 \pm 0.54\%$ (w/w) สารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 36.02 ± 0.51 mg GAE/g ปริมาณความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} เท่ากับ 0.16 ± 0.01 mg/mL และความสามารถในการรีดิวซ์ (FRAP) เท่ากับ 727.38 ± 27.47 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ โดยปริมาณผลผลิตที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะต่ำกว่าการศึกษาของ Kandasamy และคณะ [7] ที่ให้ปริมาณผลผลิต $60.1 \pm 1.12\%$ สารสกัดที่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าการศึกษาของ Pittella และคณะ [20] ซึ่งให้สารประกอบฟีนอลิก 26.6 mg GAE/g ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Kandasamy และคณะ [7] ซึ่งให้สารประกอบฟีนอลิก 34.4 ± 1.1 mg GAE/g แต่ต่ำกว่าจากการศึกษาของ Riza และคณะ [10] และ Rahmawati และคณะ [2] ที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 251.88 ± 0.96 และ 45.654 mg GAE/g ตามลำดับ มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่าการศึกษาของ Riza และคณะ [10], Rahman และคณะ [4], Pittella และคณะ [20] และ Kandasamy และคณะ [7] ทั้งนี้อาจเป็นเพราะหลายปัจจัย สายพันธุ์บัวบกซึ่งบัวบกแต่ละสายพันธุ์มีองค์ประกอบทางเคมีและสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างกัน [5,21] การเตรียมวัตถุดิบซึ่งการศึกษาของ Kandasamy และคณะ [7] ระบุว่าการเตรียมวัตถุดิบด้วยวิธีการทำแห้ง

แบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) จะให้ผลผลิตและฤทธิ์ทางชีวภาพดีกว่าการอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัดโดยในการสกัดโดยส่วนใหญ่จะใช้ระยะเวลาในการสกัดนาน เช่น จากการศึกษาของ Riza และคณะ [10], Pittella และคณะ [20] และ Kandasamy และคณะ [7] ซึ่งใช้ระยะเวลาในการสกัดประมาณ 24 ถึง 48 ชั่วโมง ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการสกัดสารสำคัญจากพืชนอกจากจะขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดและสายพันธุ์บัวบกแล้วยังมีปัจจัยอื่น ๆ เช่น ระยะเวลาการเก็บเกี่ยว การเตรียมวัตถุดิบ Kandasamy และคณะ [7] ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัด อุณหภูมิ ระยะเวลา ขนาดวัตถุดิบ [8] เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีเทคนิคอื่น ๆ เช่น การใช้คลื่นไมโครเวฟ การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ การใช้ความดันสูง เป็นต้น [2,13-15]



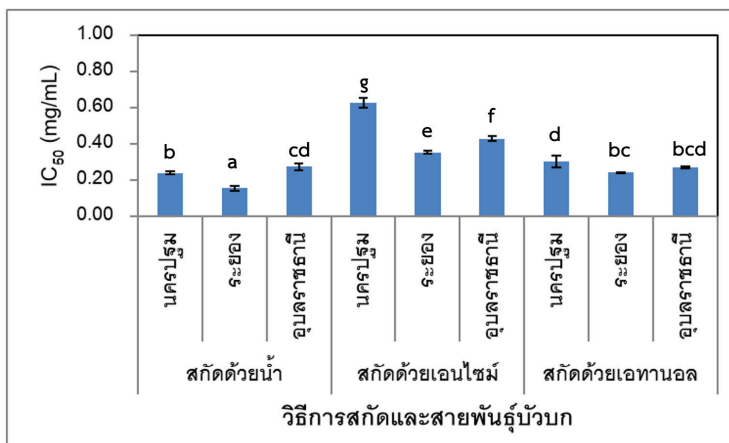
รูปที่ 1 ปริมาณผลผลิต (%Yield) ของสารสกัดที่ได้จากการสกัดบัวบกสายพันธุ์นครปฐม สายพันธุ์ระยอง และสายพันธุ์อุบลราชธานี ด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเอทานอล และการสกัดด้วยเยือกแข็ง

หมายเหตุ : a, b และ c.... แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของผลผลิตที่ได้จากการสกัดบัวบกแต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ



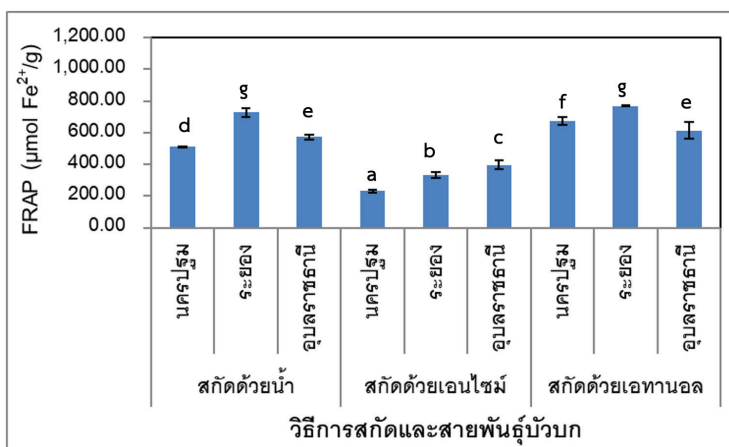
รูปที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (TPC) ของสารสกัดที่ได้จากการสกัดบัวบกสายพันธุ์นครปฐม สายพันธุ์ระยอง และสายพันธุ์อุบลราชธานี ด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเอทานอล และการสกัดด้วยเยือกแข็ง

หมายเหตุ : a, b และ c.... แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดบัวบกแต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ



รูปที่ 3 ปริมาณความเข้มข้นสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของสารสกัดที่ได้จากการสกัดบวบก สายพันธุ์นครปฐม สายพันธุ์ระยอง และสายพันธุ์อุบลราชธานี ด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเอทานอล และการสกัดด้วยเอทานอล

หมายเหตุ : a, b และ c.... แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของปริมาณ IC₅₀ ที่ได้จากการสกัดบวบกแต่ละสายพันธุ์ ด้วยวิธีการต่าง ๆ



รูปที่ 4 ความสามารถในการรีดิวส์เฟอร์ริก (FRAP) ของสารสกัดที่ได้จากการสกัดบวบกสายพันธุ์นครปฐม สายพันธุ์ระยอง และสายพันธุ์อุบลราชธานี ด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเอทานอล และการสกัดด้วยเอทานอล

หมายเหตุ : a, b และ c.... แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของปริมาณ FRAP ที่ได้จากการสกัดบวบกแต่ละสายพันธุ์ ด้วยวิธีการต่าง ๆ

4. สรุปผลการทดลอง (Conclusion)

วิธีการสกัดและสายพันธุ์บัวบกมีผลต่อปริมาณผลผลิต สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ การสกัดด้วยเอโนไซม์จะให้ปริมาณผลผลิตสูงสุดตามด้วยการสกัดด้วยน้ำและการสกัดด้วยเอทานอล ตามลำดับ แต่การสกัดด้วยน้ำและการสกัดด้วยเอทานอลจะให้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดด้วยเอโนไซม์ บัวบกสายพันธุ์ระยองให้ปริมาณผลผลิต สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสูงกว่าบัวบกสายพันธุ์นครปฐมและสายพันธุ์อุบลราชธานี วิธีการสกัดและสายพันธุ์บัวบกที่ดีที่สุด คือ การสกัดด้วยน้ำ และบัวบกสายพันธุ์ระยอง ตามลำดับ วิธีการนี้จะให้ผลผลิตสารสกัดร้อยละ 35.94 ± 0.54 โดยน้ำหนัก เป็นสารสกัดที่มีสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนั้นเป็นสารสกัดที่ละลายน้ำได้มีโอกาสมารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมอาหารสุขภาพ (ศนอ.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่กรุณาเอื้อเพื่อให้ใช้สถานที่สำหรับการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Idris FN, Nadzir MM. Comparative studies on different extraction methods of *Centella asiatica* and extracts bioactive compounds effect on antimicrobial activity. *Antibiotics*. 2021;10(4):457.
- [2] Rahmawati A, Fachri BA, Safitri RA. Comparison of extraction solvents used for the extraction of total phenolic content from pegagan (*Centella asiatica* L) using microwave-assisted extraction. *AIP Conf Proc*. 2022;2493(1):1-9.
- [3] Yasurin P, Sriariyanun M, Phusantisampan T. The bioavailability activity of *Centella asiatica*. *KMUTNB Int J Appl Sci Technol*. 2016;9(1):1-9.
- [4] Rahman M, Hossain S, Rahaman A, Fatima N, Nahar T, Uddin B, et al. Antioxidant activity of *Centella asiatica* (Linn.) Urban: Impact of extraction solvent polarity. *J Pharmacogn Phytochem*. 2013;1(6):27-32.
- [5] จันทพร ทองเอกแก้ว. บัวบก: สมุนไพรมากคุณประโยชน์. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 2556;15(3):70-5.
- [6] จตุพร พลศรีดา. บัวบก. *จดหมายข่าว กลุ่มงานเภสัชกรรม โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชสว่างดินแดน จังหวัดสกลนคร*. 2556;4(54):1.
- [7] Kandasamy A, Aruchamy K, Rangasamy P, Varadhaiyan D, Gowri C, Oh TH, et al. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Centella asiatica* extracts: An experimental and theoretical investigation of flavonoids. *Plants*. 2023;12(20):3547.
- [8] Borhan MZ, Ahmad R, Rusop M, Abdullah S. Green extraction: Enhanced extraction yield of asiatic acid from *Centella asiatica* (L.) nanopowders. *J Appl Chem*. 2013;(1):460168.
- [9] Mohapatra P, Ray A, Jena S, Nayak S, Mohanty S. Influence of extraction methods and solvent system on the chemical composition and antioxidant activity of *Centella asiatica* L. leaves. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2021;33:101971.
- [10] Riza A, Ilyas S, Sjamsudin E, Delyuzar D. Effect of extraction method and solvent type on total phenolics content, total flavonoid and antioxidant activity of pegagan extract (*Centella asiatica* (Linn.) Urban). *Bioscientia Medicina: J Biomed Transl Res*. 2024;8(1):3873-81.

- [11] Wang CX, Han W, Fan L, Wang CL. Enzymatic pretreatment and microwave extraction of asiaticoside from *Centella asiatica*. J Biomed Sci Eng. 2009;2:526-31.
- [12] Binh NT, Oanh HN. Optimization of the treatment and extraction procedures for *Centella asiatica* (L.) Urban. Int J Pharm Sci Invest. 2017;6(6):15-21.
- [13] Rahmawati A, Fachri BA, Oktavia S, Abrori F. Extraction bioactive compound of pegagan (*Centella asiatica* L.) using solvent-free microwave-assisted extraction. International conference on chemical and material engineering. 2021;1053:1-7.
- [14] Thong-on W, Pathomwichaiwat T, Boonsith S, Koo-amornpattana W, Prathanturug S. Green extraction optimization of triterpenoid glycoside-enriched extract from *Centella asiatica* (L.) Urban using response surface methodology (RSM). Sci Rep. 2021;11(1):22026.
- [15] Kim WJ, Kim J, Veriansyah B, Kim JD, Lee YW, Oh SG, et al. Extraction of bioactive components from *Centella asiatica* using subcritical water. J Supercritical Fluids. 2009;48(3):211-6.
- [16] ประพนธ์ ใจอ้าย. รายงานการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตบัวบก. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร; 2556.
- [17] Bakar INA, Ibrahim MF, Hakiman M, Abd-Aziz S, Prasongsuk S, Tin LCY, et al. Characterization of asiaticoside concentration, total phenolic compounds, and antioxidant activity of different varieties of *Centella asiatica* (L.) and essential oil extraction using hydro-distillation with enzyme assisted. Biocatal Agric Biotechnol. 2022;44:102474.
- [18] Thamnarathip P, Jangchud K, Nitisinprasert S, Vardhanabhuti B. Identification of peptide molecular weight from rice bran protein hydrolysate with high antioxidant activity. J Cereal Sci. 2016;69:329-35.
- [19] Chen GT, Zhao L, Zhao LY, Cong T, Bao SF. In vitro study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. J Sci Food Agric. 2007;87(2):357-62.
- [20] Pittella F, Dutra RC, Junior DD, Lopes MTP, Barbosa NR. Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L) Urb. Int J Mol Sci. 2009;10(9):3713-21.
- [21] Ogunka-Nnoka CU, Igwe FU, Agwu J, Peter OJ, Wolugbom PH. Nutrient and phytochemical composition of *Centella asiatica* leaves. Med Aromat Plants. 2020;9(2):1-7.