นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของตำรับยาปลูกไฟธาตุ

พัชรี ประทุมแย้ม[1*] กริยาภา หลายรุ่งเรือง[2] ปิยะนุช ทิมคร[2] สุฐิตา โอภาษี[2] และ สรรใจ แสงวิเชียร[1]

[1]สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

[2]วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี คณะสาธารณสุขศาสตร์และสหเวชศาสตร์ สถาบันพระบรมราชชนก กระทรวงสาธารณสุข

*ผู้นิพนธ์ที่ให้การติดต่อ E-mail: patcharee@acttm.ac.th

Received date: November 25, 2022; Revised date: February 13, 2023; Accepted date: May 13, 2023

บทคัดย่อ

ตำรับยาปลูกไฟธาตุ เป็นยาที่ถูกบันทึกไว้ในพระคัมภีร์มหาโชตรัต โดยระบุสรรพคุณส่วนหนึ่งว่าเป็นยาอายุวัฒนะ ปัจจุบันยาปลูกไฟธาตุเป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติตามประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2562 ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของตำรับ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมของตำรับยาปลูกไฟธาตุ ที่ทำการสกัดด้วย 50% เอทานอล, 95% เอทานอลและต้มด้วยน้ำ นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP รวมถึงหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน คือ สารสกัด 95% เอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาสารสกัดด้วย50% เอทานอลและสารสกัดชั้นน้ำ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 83.59±0.58, 93.28±1.57 และ 98.27±0.69 µg/mL ตามลำดับ และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัด 95% เอทานอล, 50% เอทานอลและสารสกัดชั้นน้ำมีค่าเท่ากับ 124.61±6.57, 117.47±2.98 และ 74.78±2.31 mgFe^{2+}/gextract ตามลำดับ ส่วนค่า TEAC ของสารสกัดมีค่าเท่ากับ 43.44±2.56, 40.65±1.16 และ 24.00±0.90 mgTrolox/g extract ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า สารสกัดด้วย 50% เอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วย 95% เอทานอลและสารสกัดชั้นน้ำ โดยมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 45.04±1.85, 36.85±1.96 และ 23.09±1.70 mg GAE/g extract ตามลำดับ จากงานวิจัยพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุดในอนาคตควรมีการศึกษาต่อยอดฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เพื่อยืนยันสรรพคุณของตำรับยาปลูกไฟธาตุ

คำสำคัญ: ปลูกไฟธาตุ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม

Original Article

Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of Plook Fai Thatu Remedy

Patcharee Pratumyam[1*], Kriyapa Lairungruang[2], Phiyanuch Thimkorn[2], Suthita Obhasi[2] and Sanjai Sangvichien[1]

[1]Applied Thai Traditional Medicine, Graduate School, Suan Sunandha Rajabhat University

[2]Abhaibhubejhr College of Thai Traditional Medicine Prachinburi, Faculty of Public Health and Allied Health Sciences, Praboromarajchanok Institute, Ministry of Public Health

*Corresponding Author E-mail: patcharee@acttm.ac.th

Abstract

Plook Fai Thatu Remedy (PT) is recorded in the Maha Chotirat scripture and has been used as an elixir. Currently, PT is a drug included in the National List of Essential Medicines (NLEM), according to the announcement of the National Drug System Development Committee in 2019.PT has not been studied for the biological activities. Therefore, the objectives of this study were to study the antioxidant activities and to determine the total phenolic contents. PT was extracted with 50% ethanol, 95% ethanol, and water. The antioxidant activity was performed by using DPPH and FRAP methods. The total phenolic content was determined by the Folin - Ciocalteu method. The results revealed that the antioxidant activity by DPPH and FRAP methods exhibited a similar trend. 95% ethanol extract exhibited the most potent antioxidant activity, followed by 50% ethanol extract and water extract with the EC50 values of83.59±0.58, 93.28±1.57 and 98.27±0.69 µg/mL, respectively. In addition the FRAP values of 95% ethanol, 50% ethanol, and water extracts are124.61±6.57, 117.47±2.98 and 74.78±2.31 mg Fe^{2+}/g extract, respectively whereas the TEAC values are43.44±2.56, 40.65±1.16 and 24.00±0.90 mg Trolox/g extract, respectively. In addition,50% ethanol extract exhibited the highest total phenolic contents, followed by 95% ethanol extract and water extract (45.04±1.85, 36.85±1.96 and 23.09±1.70 mg GAE/g extract, respectively). In this study was found that the ethanol extract showed the strongest antioxidant activities and the highest total phenolic contents. Future research should be emphasized on the study of biological activity for the confirmation of the action of PT remedy.

Keywords: Plook Fai Thatu, Antioxidant Activity, Total Phenolic Contents

บทนำ

การดำรงชีวิตของมนุษย์ในปัจจุบันเปลี่ยนแปลงไปตามกระแสโลกาภิวัตน์อย่างรวดเร็วส่งผลกระทบต่อปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมและสุขภาพร่างกาย การทำงานหนัก การพักผ่อนไม่เพียงพอ การได้รับมลพิษจากสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอย่างน้อย 1 อิเล็กตรอนเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก อนุมูลอิสระนั้นไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น ผลที่ตามมาคือโมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่[1] การที่ร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นได้ ภาวะ oxidative stress นั้นหากเกิดขึ้นในระยะเวลาสั้นๆเพียงชั่วขณะจะไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมากนัก[2] แต่หากเกิดภาวะดังกล่าวเป็นเวลานาน จากงานวิจัยมากมายพบว่าอนุมูลอิสระมีผลต่อการเสื่อมสภาพของเซลล์ในร่างกายมนุษย์ และก่อให้เกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ มากมาย เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความจำเสื่อมโรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิตสูงและโรคเบาหวานเป็นต้น[3] ซึ่งกลุ่มโรค Noncommunicable diseases (NCDs) หรือโรคไม่ติดต่อ ประกอบด้วย โรคหลอดเลือดสมอง, โรคหัวใจขาดเลือด, โรคเบาหวาน, ภาวะความดันโลหิตสูง และโรคทางเดินหายใจอุดกั้นเรื้อรัง[4] กลุ่มโรคไม่ติดต่อยังคงเป็นปัญหาสุขภาพอันดับหนึ่งของโลกทั้งจำนวนการเสียชีวิตและภาระโรคโดยรวมจะเห็นได้ว่ากลุ่มโรคไม่ติดต่อยังเป็นปัญหาสุขภาพอันดับหนึ่งของประเทศไทย ที่มีจำนวนผู้เสียชีวิตเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มทวีความรุนแรงมากขึ้น ส่งผลให้เกิดความสูญเสียต่อสุขภาวะและส่งผลกระทบโดยตรงต่อเศรษฐกิจและสังคม[5]

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยา oxidation ดังนั้นร่างกายจึงต้องสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมา โดยปกติแล้วการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีอย่างเพียงพอต่อการเกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกาย แต่หากมีสภาวะผิดปกติในร่างกาย เช่น ความเครียด การนอนดึกติดต่อกันนาน ๆ การรับประทานยาที่มีผลลด antioxidant enzyme หรือสภาวะโรคต่าง ๆ ก็อาจจะทำให้การสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นจนเสียสมดุลระหว่าง antioxidant และ อนุมูลอิสระเกิดเป็นภาวะ oxidative stress อนุมูลอิสระที่ไม่ได้ถูกกำจัดจะไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดการอักเสบ และโรคต่าง ๆ ได้จะเห็นได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคและความเสื่อมของร่างกายเป็นอย่างมาก[6,7] ปัจจุบันความใส่ใจเรื่องสุขภาพมากยิ่งขึ้น การศึกษาวิจัยเพื่อหาสารที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเสริมสุขภาพที่ดีของร่างกาย จึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะงานวิจัยเกี่ยวกับอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

ยาอายุวัฒนะ (น.) เรียกยาที่ถือว่ากินแล้วมีอายุยืน[8] และหนึ่งในตำรับยาที่มีคำว่ายาอายุวัฒนะระบุไว้ในพระคัมภีร์ คือ ยาปลูกไฟธาตุ ซึ่งเป็นยาที่ปรากฏในคัมภีร์มหาโชตรัตโดยในคัมภีร์ระบุว่า “ยาปลูกไฟธาตุ เป็นยาอายุวัฒนะท่านให้เอา ดีปลี รากช้าพลูผักแพวแดง สะค้าน ขิงแห้ง ผลผักชีล้อม ว่านน้ำ หัวแห้วหมู ผลพิลังกาสา ผิวมะกรูดยาทั้งนี้เอาเสมอภาค พริกไทยล่อนเท่ายาทั้งหลาย ทำผง ละลายน้ำผึ้งก็ได้ น้ำส้มซ่าก็ได้ น้ำร้อนก็ได้ สุราก็ได้”

จากการศึกษาข้อมูลสมุนไพรเดี่ยวในตำรับยาปลูกไฟธาตุที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัด 95% เอทานอลของผิวมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) มีสารกลุ่มฟีนอล[9] สารสกัด 95% เอทานอลของแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) มีสารกลุ่มฟีนอลิกแทนนินและฟลาโวนอยด์[10] สารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลของลูกผักชีล้อม (*Oenanthe javanica* (Blume) DC.) สารสกัด 95% เอทานอลจากใบพิลังกาสา (*Ardisia polycephala*

Wall. ex A. DC.) สารสกัดด้วยเอทานอลของใบและลำต้นของผักแพวแดง (*Iresine herbstii* Hook.) สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบพริกไทย (*Piper nigrum* L.) ล้วนพบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวม[11-14] ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีรายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดน้ำของเถาสะค้าน (*Piper ribesioides* Wall) รากช้าพลู (*Piper sarmentosum*Roxb.) ดอกดีปลี (*Piper retrofractum*Vahl) และเหง้าขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี FRAP[15] แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาปลูกไฟธาตุ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP รวมถึงการหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม เพื่อยืนยันสรรพคุณของตำรับยาปลูกไฟธาตุกับการใช้เป็นยาอายุวัฒนะตามที่ระบุไว้ในคัมภีร์

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยาปลูกไฟธาตุที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัตถุดิบ

สมุนไพรตำรับยาปลูกไฟธาตุ ประกอบด้วยสมุนไพร 11 ชนิด ประกอบด้วย เมล็ดพริกไทยล่อน (*Piper nigrum* L.) ดอกดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl) รากช้าพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) ผักแพวแดง (*Iresine herbstii* Hook.) เถาสะค้าน (*Piper interruptum* Opiz) เหง้าขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) ลูกผักชีล้อม (*Oenanthe javanica* (Blume) DC.) เหง้าว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.) หัวแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) ผิวมะกรูด (*Citrus hystrix*DC.) และลูกพิลังกาสา (*Ardisia polycephala* Wall. ex A. DC.)[16] ซื้อจากบริษัทอุทัยประสิทธิ์ จำกัด อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี เป็นบริษัทที่ได้รับการอนุญาตผลิตยาแผนโบราณ และได้รับมาตรฐาน GMP

2. การสกัด

นำสมุนไพรแห้งแต่ละชนิดมาทำความสะอาดคัดเลือกสิ่งปลอมปน อบที่อุณหภูมิ 45°C บดละเอียดและผ่านแร่งเบอร์ 80 จากนั้นนำผงยามาผสมรวมเป็นตำรับ จากนั้นเลือกตัวทำละลายจากกึ่งมีขั้วไปจนถึงตัวทำละลายที่มีขั้วเพื่อให้ครอบคลุมในทุกกลุ่มสาร โดยเรียงลำดับดังนี้ สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 95%, 50% และสกัดด้วยการต้มน้ำ

2.1 การหมัก (Maceration)

ชั่งผงตำรับยา100 กรัม (ผสมผงยาในอัตราส่วน ดอกดีปลี, รากช้าพลู, ผักแพวแดง, เถาสะค้าน, เหง้าขิง, ลูกผักชีล้อม, เหง้าว่านน้ำ, หัวแห้วหมู, ผิวมะกรูด และลูกพิลังกาสา อย่างละ 5 กรัม เมล็ดพริกไทยล่อน 50 กรัม)หมักด้วย 95%เอทานอล และ 50% เอทานอลใส่ตัวทำละลายอัตราส่วน 1:3(ตัวทำละลาย 300 มิลลิลิตร) หมักเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง คนสารทุกวัน เมื่อครบ 3 วันกรองแยกกากยาออก ด้วยกระดาษกรอง Whatman no. 1 นำกากมาหมักซ้ำทำเช่นเดิม ทั้งหมด 3 ซ้ำ สารสกัด 95% เอทานอลระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) สำหรับสารสกัด 50% เอทานอล ระเหยตัวทำละลายเอ

ทานอลออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) และระเหยน้ำออกด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) คำนวณหาปริมาณสารสกัด (% Yield) เก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ-20°C

2.2 การต้ม (Decoction)

ชั่งผงตำรับยา500 กรัม (ผสมผงยาในอัตราส่วน ดอกดีปลี, รากช้าพลู, ผักแพวแดง, เถาสะค้าน, เหง้าขิง, ลูกผักชีล้อม, เหง้าว่านน้ำ, หัวแห้วหมู, ผิวมะกรูด และลูกพิลังกาสา อย่างละ 25 กรัมเมล็ดพริกไทยล่อน 250 กรัม) เติมน้ำในอัตราส่วน 1:3(ตัวทำละลาย 1,500 มิลลิลิตร) ต้มเดือดจับเวลา 15 นาทีกรองเอากากออก ด้วยกระดาษกรอง Whatman no. 1นำกากมาต้มซ้ำทั้งหมด3 รอบ จากนั้นนำน้ำที่ได้จากการต้มทั้ง 3 รอบมาต้มจาก3 ส่วน ให้เหลือ 1 ส่วน นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) คำนวณหาปริมาณสารสกัด (% Yield) เก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20°C

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay[17] โดยการทดสอบใช้ butylated hydroxytoluene (BHT) เป็นสารมาตรฐาน เตรียมสารสกัดและสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 mg/mL สารมาตรฐานละลายด้วย absolute ethanol, สารสกัด 95% เอทานอลละลายด้วย 95% เอทานอล, สารสกัด 50% เอทานอลละลายด้วย 50% เอทานอล และสารสกัดน้ำละลายด้วยน้ำ จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 10 และ 1 µg/mL ตามลำดับ ทำการทดสอบโดยปิเปตสารสกัดและสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100, 50, 10 และ 1 µg/mL ปริมาตร 100 µL และเติมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น $6x10^{-5}$M ปริมาตร 100 µL ลงในเพลท 96 หลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % Inhibition ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

AA = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆผสมกับ DPPH

AB = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

นำ % Inhibition ที่ความเข้มข้น 100, 50, 10 และ 1 µg/mL ของสารสกัดและสารมาตรฐานมาคำนวณหาค่า 50% Effective Concentration (EC_{50}) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 8 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ±SD (N=3)

4. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP[18] เทียบกับสมการสารมาตรฐานFe^{2+} ที่ความเข้มข้นดังนี้ 300, 200, 100, 50, 25 และ5 µg/mL ตามลำดับและ Trolox ที่ความเข้มข้นดังนี้ 300, 200, 100, 50, 25 และ 5 µg/mL ตามลำดับทำการเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 mg/mL (สารสกัด 95% เอทานอลละลายด้วย 95% เอทานอล, สารสกัด 50% เอทานอลละลายด้วย 50% เอทานอล และสารสกัดน้ำละลายด้วยน้ำ) และเตรียม FRAP reagent โดยผสมสารละลาย (ก) acetate buffer ความเข้มข้น 300 mM pH 3.6, (ข) 2,4,6-tripyridyl-s-trizine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 mM ใน 40 mM HCL และ (ค) Ferric chloride ($FeCl_3$) ความเข้มข้น 20 mM ในอัตราส่วน ก:ข:ค (10:1:1) ทำการทดสอบโดยปิเปตสารสกัดและสารมาตรฐานปริมาตร 20 µL ลงในเพลท 96 หลุม ทำปฏิกิริยากับ FRAP reagent ปริมาตร 180 µL (นำ FRAP reagent ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 นาที ก่อนทำปฏิกิริยากับสารสกัดและสารมาตรฐาน) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าที่ได้มาแทนค่าในสมการของ

สารมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานนำเสนอเป็นค่า FRAP (mg Fe^{2+}/g extract) และ TEAC(mg Trolox Equivalent Antioxidant Capacity/g extract) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (N=3)

5. การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu[19] เทียบกับสมการสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นดังนี้ 500, 250, 100, 50, 25, 10 และ 5 µg/mL ตามลำดับทำการเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 mg/mL (สารสกัด 95% เอทานอลละลายด้วย 95% เอทานอล, สารสกัด 50% เอทานอลละลายด้วย 50% เอทานอล และสารสกัดน้ำละลายด้วยน้ำ) ทำการทดสอบโดยปิเปตสารสกัดและสารมาตรฐานปริมาตร 20 µL ลงในเพลท 96 หลุม ทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 µL และ Sodium carbonate ปริมาตร 80 µL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าที่ได้มาแทนค่าในสมการของสารมาตรฐาน ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานนำเสนอเป็นค่า mg Gallic Acid Equivalent (GAE)/g extract ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (N=3)

ผลการศึกษา

1. ปริมาณสารสกัด(% Yield)

จากการคำนวณหาปริมาณสารสกัด (% Yield) พบว่า สารสกัดด้วย 50% เอทานอลมีปริมาณสารสกัด (% Yield) มากที่สุด รองลงมาคือ 95% เอทานอลและน้ำ (9.84%, 9.03% และ 1.79% ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 1

2. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดด้วย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วย 50% เอทานอลและสารสกัดชั้นน้ำโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 83.59±0.58, 93.28±1.57 และ 98.27±0.69µg/mL ตามลำดับ โดยมีค่า %Inhibition ดังแสดงในตารางที่ 2 จากผลการศึกษาเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน butylated hydroxytoluene (BHT) พบว่าสารมาตรฐานมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดตำรับยาปลูกไฟธาตุ โดยสารมาตรฐานมีค่า EC_{50} เท่ากับ16.09±1.01 µg/mL

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP แสดงผลดังตารางที่ 5 โดยค่า FRAP จากการแทนค่าในสมการ y=0.0039x+0.1827, R^2 =0.9998 ของสารละลายมาตรฐาน Ferrous sulfate แสดงค่าดังตารางที่ 3 และภาพที่ 1 พบว่า สารสกัดด้วย 95% เอทานอล มีค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP value) เท่ากับ 124.61±6.57mg Fe^{2+}/g extract รองลงมาคือ สารสกัดด้วย 50% เอทานอลและสารสกัดด้วยน้ำมีค่า FRAP เท่ากับ 117.47±2.98 และ 74.78±2.31 mgFe^{2+}/gextract ตามลำดับ ค่า TEAC จากการแทนค่าในสมการ y = 0.01x+0.2343, R^2 = 0.9994 ของสารละลายมาตรฐาน Trolox แสดงค่าดังตารางที่ 3 และภาพที่ 2 พบว่าสารสกัดด้วย 95% เอทานอล มีค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (TEAC value) เท่ากับ 43.44±2.56 mg Trolox/g extract รองลงมาคือ สารสกัดด้วย 50% เอทานอล และสารสกัดด้วยน้ำมีค่า TEAC เท่ากับ 40.65±1.16 และ 24.00±0.90 mg Trolox/g extract ตามลำดับสารมาตรฐาน BHT มีค่า FRAP และ TEAC ที่

มากกว่าสารสกัดตำรับยาปลูกไฟธาตุ โดยมีค่า FRAP เท่ากับ 307.60±6.80mg Fe^{2+}/g extract และ ค่า TEAC เท่ากับ 114.80±2.65 mg Trolox/g extract

4. การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin – Ciocalteu แสดงผลดังตารางที่ 5 จากการแทนค่าในสมการ y = 0.0054x + 0.0632, R^2 =0.9997 ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid แสดงค่าดังตารางที่ 4 และภาพที่ 3 พบว่าสารสกัดด้วย 50% เอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วย 95% เอทานอลและสารสกัดด้วยน้ำ โดยมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 45.04±1.85, 36.85±1.96 และ 23.09±1.70 mg GAE/g extract ตามลำดับ

อภิปรายผล

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดตำรับยาปลูกไฟธาตุ พบว่า สารสกัดด้วย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วย 50% เอทานอล และสารสกัดด้วยน้ำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin -Ciocalteu พบว่าสารสกัดด้วย 50% เอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วย 95% เอทานอลและสารสกัดด้วยน้ำจากผลการทดลองพบว่าสารสกัดด้วย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดแต่มีปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin – Ciocalteu น้อยกว่าสารสกัดด้วย 50% เอทานอล ซึ่งองค์ประกอบของสาระสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดด้วย 95% เอทานอลอาจมีสารกลุ่มอื่นนอกเหนือจากสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกันจากผลการทดลองสอดคล้องกับข้อมูลสารฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบของสมุนไพรเป็นโมเลกุลที่มีขั้วจึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว[20] การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล และน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกัน จึงทำให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP และการหาปริมาณฟีนอลิกรวมไม่แตกต่างกันมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วจึงสามารถสกัดเฉพาะสารที่มีขั้วออกมาได้ แต่เอทานอลเป็นตัวทำละลายกึ่งมีขั้วจึงสามารถสกัดสารได้หลากหลายชนิดจึงอาจส่งผลให้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกสกัดออกมาทำให้การสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำ จากข้อมูลงานวิจัยสมุนไพรเดี่ยวในตำรับพบว่า จากงานวิจัยของ Duangsri และคณะ[9] ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากสารสกัด 95% เอทานอลของผิวมะกรูด (*Citrus hystrix*DC.) พบว่ามีค่า EC_{50}>100 µg/mL และวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม มีค่า 40.20±1.21 mg GAE/gextract งานวิจัยของ Luanchoy และ Tiangkul[10] ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากสารสกัด 95% เอทานอลของแห้วหมู (*Cyperus rotundus*L.) พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 235.91µg/mL และการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นพบว่า สารสกัดแห้วหมูมีสารกลุ่มฟีนอลิกแทนนิน และฟลาโวนอยด์ งานวิจัยของ Panchakulและคณะ[15] ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin -Ciocalteu สารสกัดชั้นน้ำของเถาสะค้าน (*Piper ribesioides* Wall) รากช้าพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) ดอกดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl) และเหง้าขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) พบว่าการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่า EC_{50}เท่ากับ 44.87±2.21, 59.37±1.84, >100และ >100 µg/mL ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบค่า FRAP เท่ากับ 228.49±9.75, 87.83±2.33, 70.45±1.24 และ 81.27±7.33 mg Fe^{2+}/g extract ตามลำดับ ค่า TEAC เท่ากับ 88.32±4.30, 26.26±1.03, 20.42±0.55 และ 23.37±3.24 mg Trolox/g extract ตามลำดับ งานวิจัยของ

Kakatum และคณะ[21] ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัด 95% เอทานอลของดอกดีปลี (*Piper retrofractum*Vahl) เหง้าว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.) และเมล็ดพริกไทยล่อน (*Piper nigrum* L.) พบว่ามีค่า EC_{50}>100 µg/mL การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin – Ciocalteu จากงานวิจัยของ Bhaigyabati และคณะ[11] พบว่าสารสกัดด้วยน้ำ และเมทานอลของลูกผักชีล้อม (*Oenanthe javanica* (Blume) DC.) มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 48.81±0.02และ 41.86±0.06mg GAE/g extract ตามลำดับ งานวิจัยของ Buachoon[12] ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin – Ciocalteu ของสารสกัด 95% เอทานอลจากใบพิลังกาสา (*Ardisia polycephala*Wall. ex A. DC.) พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 612.79±0.01 mg GAE/g extract และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่า EC_{50}เท่ากับ 12.28±0.03 mg/mL และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบค่า FRAP เท่ากับ 192.39±0.23 mMFe^{2+}/g extract การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin - Ciocalteu จากงานวิจัยของ Chaudhuri และSevanan[13] พบว่าใบและลำต้นของผักแพวแดง (*Iresine herbstii* Hook.) ที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 79.00±1.00 และ 105.67±1.53 mg GAE/g extract ตามลำดับ ซึ่งจากผลการวิจัยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวมแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรเดี่ยวในตำรับยาปลูกไฟธาตุมีทั้งสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยแสดงค่า EC_{50}< 100 และ> 100 µg/mL แต่เมื่อนำสมุนไพรมารวมเป็นตำรับก็ยังคงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า EC_{50}< 100 µg/mL ทั้งสารสกัดที่สกัดด้วย 95% เอทานอล, 50% เอทานอล และสารสกัดชั้นน้ำ รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และยังพบปริมาณฟีนอลิกรวมในตำรับยาปลูกไฟธาตุ แต่ก็ยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าสารมาตรฐานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP วิธีการที่ใช้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันรวมในหลอดทดลองมีข้อดีและข้อเสียต่างกันกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ การประเมินจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระต่าง ๆ เช่นวิธี DPPH, FRAPและ TEAC และการประเมินจากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระเช่น วิธี ORAC ส่วนใหญ่จะเกิดทั้งสองกลไกควบคู่กันไปเสมอ[22] จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin -Ciocalteu พบว่าสารสกัดด้วย 50% เอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาผลของการสกัดพืชด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ กับปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลผสมกับน้ำสามารถสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกออกมาได้ปริมาณสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอล หรือ น้ำเพียงอย่างเดียว[23, 24] แต่อย่างไรก็ตามในส่วนของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีแนวโน้มลำดับของสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเรียงจากสูงไปต่ำได้ดังนี้ คือ 95% เอทานอล, 50% เอทานอลและน้ำที่เป็นเช่นนี้มีสาเหตุมาจากสารที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอลอาจมีสารกลุ่มอื่นที่ถูกสกัดออกมาและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า และอาจเกี่ยวข้องกับชนิดของสารพฤกษเคมีที่อยู่ในกลุ่มฟีนอลิกซึ่งแม้จะมีปริมาณน้อยแต่สามารถออกฤทธิ์ได้ดี ดังนั้น สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีทั้งกลุ่มที่มีโครงสร้างมีขั้วและไม่มีขั้ว ซึ่งมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วหรือไม่มีขั้วต่างกัน ดังนั้นการทดสอบที่มีความแตกต่างกันของตัวทำละลายอาจมีผลต่อการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร

ตำรับยาปลูกไฟธาตุมีส่วนประกอบของเมล็ดพริกไทยล่อน (*Piper nigrum* L.) ในปริมาณมากที่สุด และยังประกอบไปด้วยดอกดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl) รากช้าพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) และเถาสะค้าน (*Piper interruptum* Opiz) ที่อยู่ในสกุล Piper เช่นกัน ซึ่งพืชในสกุลนี้จะประกอบด้วยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคือpiperine[25] ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ piperine โดยวิธี DPPH พบว่ามีค่า scavenging activity ประมาณร้อยละ 6 ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ซึ่งเป็นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างต่ำแต่เมื่อทำการศึกษาส่วน

สกัด (fraction) ซึ่งปราศจาก piperine กลับแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 26.31 µg/mL โดยพบว่าสารที่มี hydroxyl group เป็นองค์ประกอบน่าจะเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[26] ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าตำรับยาปลูกไฟธาตุซึ่งมีส่วนประกอบของเมล็ดพริกไทยล่อนในปริมาณมากที่สุดจึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ข้อสรุป

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยาปลูกไฟธาตุ พบว่า สารสกัดด้วย 95% เอทานอล, 50% เอทานอล และสกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณฟีนอลิกรวมจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า สารสกัดทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารมาตรฐาน แต่เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดพบว่า สารสกัดด้วย 50% เอทานอลและ 95% เอทานอล ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การหาปริมาณฟีนอลิกรวมเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดพบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยภาพรวมพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมที่ดีกว่าสารสกัดชั้นน้ำ อย่างไรก็ตามควรมีการต่อยอดเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีอื่นวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chromatography: TLC) วิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เพิ่มเติม และอาจนำข้อมูลไปศึกษาในประเด็นวิธีการสกัด รวมถึงการเลือกใช้ตัวทำละลาย เพื่อยืนยันสรรพคุณของตำรับยาปลูกไฟธาตุต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี, วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุขกาญจนาภิเษก และมูลนิธิโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมีและห้องปฏิบัติการวิจัย

ตาราง ภาพ และแผนภาพ

ตารางที่ 1 แสดงค่า % Yield ของสารสกัดตำรับยาปลูกไฟธาตุ

ตัวทำละลาย	% Yield
95% เอทานอล	9.03
50% เอทานอล	9.84
น้ำ	1.79

ตารางที่ 2 แสดงค่า % Inhibition และค่า EC50 (µg/mL) ของสารสกัดตำรับยาปลูกไฟธาตุ (N=3) ด้วยวิธี DPPH

ตัวทำละลาย	% Inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆ±SD (µg/mL)				EC_{50}±SD (µg/mL)
	100	50	10	1	
95% เอทานอล	56.20±1.14	34.21±1.76	8.37±3.06	1.94±0.72	83.59±0.58*
50% เอทานอล	52.35±0.41	30.80±1.41	5.85±1.35	0.23±0.16	93.28±1.57*
น้ำ	50.74±0.25	28.42±0.38	7.63±1.06	2.40±1.37	98.27±0.69*
สารมาตรฐาน BHT	83.28±0.28	69.64±1.05	34.56±1.19	2.11±2.54	16.09±1.01*

**p*-value < 0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(one-way ANOVA)เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน และตัวทำละลายที่ต่างกัน

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น593 นาโนเมตร ด้วยวิธี FRAP ของสารละลาย Ferrous sulfate และ Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (N=3)

ความเข้มข้น (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Ferrous sulfate Mean±SD	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Trolox Mean±SD
5	0.2013±0.0086	0.2517±0.0072
25	0.2770±0.0171	0.4822±0.0175
50	0.3763±0.0275	0.7434±0.0235
100	0.5793±0.0289	1.2513±0.0526
200	0.9457±0.0351	2.2638±0.0502
300	1.3477±0.0673	3.1955±0.0896

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของสารละลาย Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (N=3)

ความเข้มข้น (µg/mL)	**ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Gallic acid Mean±SD**
5	0.0673±0.0042
10	0.1039±0.0108
25	0.1956±0.0226
50	0.3564±0.0138
100	0.6207±0.0699
250	1.3979±0.0383
500	2.7411±0.0889

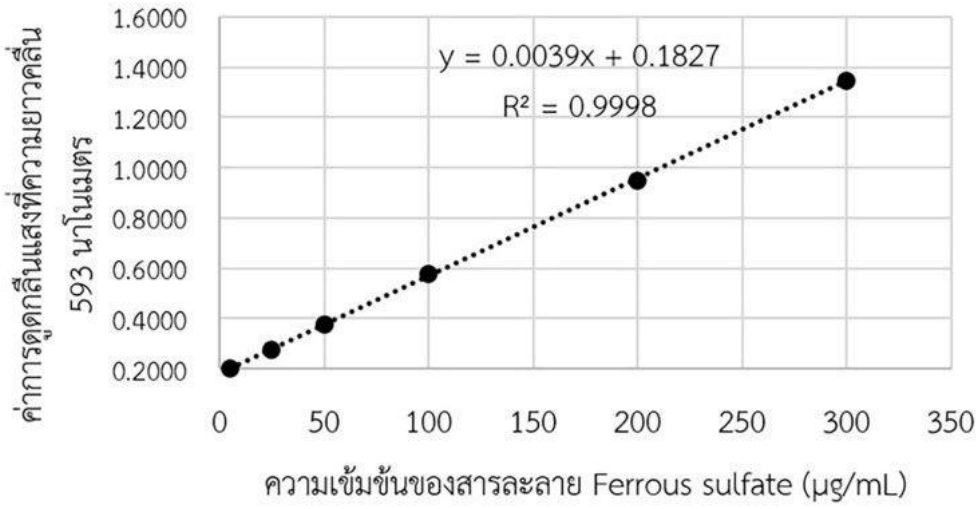
ตารางที่ 5 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยาปลูกไฟธาตุ (N=3)

ตัวทำละลาย	**FRAP**		**ปริมาณฟีนอลิกรวม±SD (mg GAE/g extract)**
	FRAP values±SD ($mgFe^{2+}$/g extract)	**TEAC values±SD (mgTrolox/gextract)**	
95% เอทานอล	124.61±6.57*,***	43.44±2.56*,***	36.85±1.96**
50% เอทานอล	117.47±2.98*,***	40.65±1.16*,***	45.04±1.85**
น้ำ	74.78±2.31*,**	24.00±0.90*,**	23.09±1.70**
สารมาตรฐาน BHT	307.60±6.80*	114.80±2.65*	-

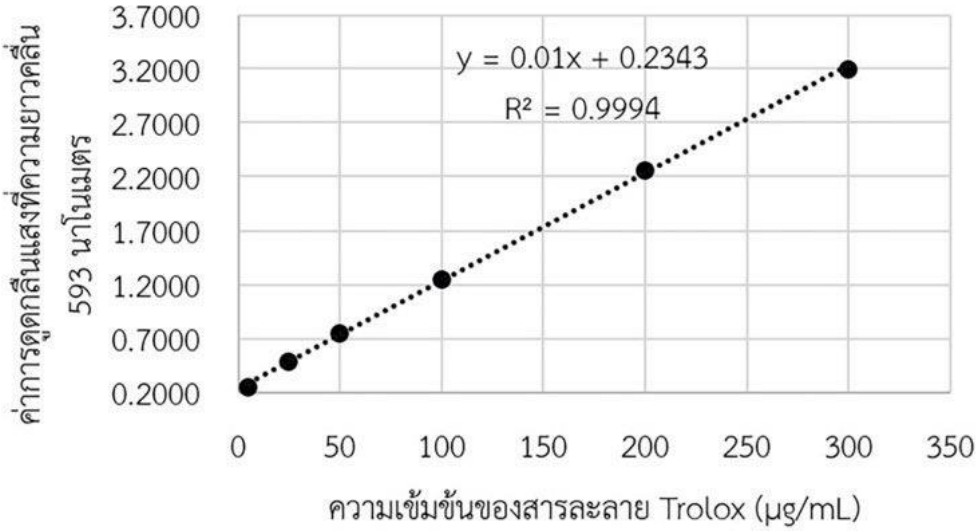
**p*-value < 0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (one-way ANOVA)เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

***p*-value < 0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (one-way ANOVA)เปรียบเทียบตัวทำละลายที่ต่างกัน

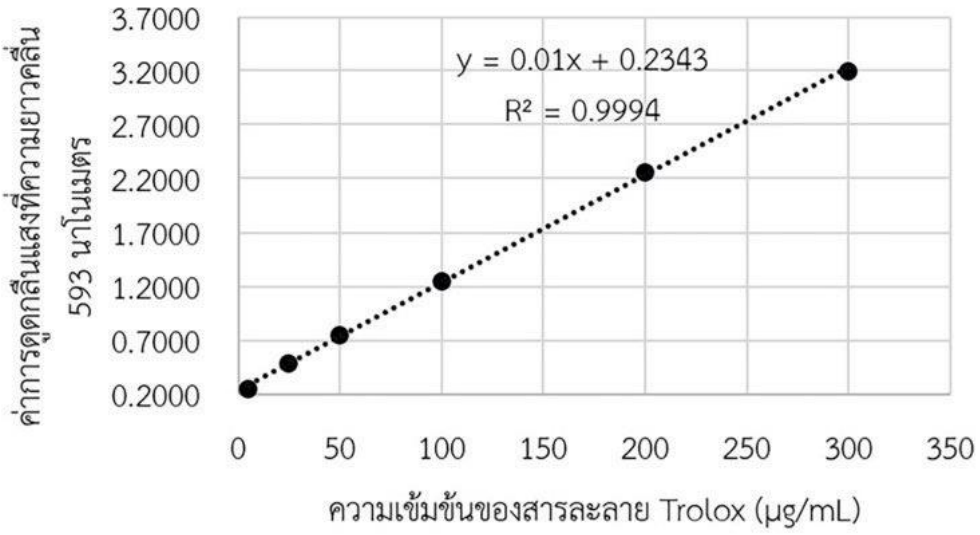
****p*-value > 0.05 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (one-way ANOVA) เปรียบเทียบตัวทำละลายที่ต่างกัน



ภาพที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรของสารละลาย Ferrous sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี FRAP (N=3)



ภาพที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรของสารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี FRAP (N=3)



ภาพที่ 3แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765นาโนเมตรของสารละลาย Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี Folin-Clocalteu (N=3)

เอกสารอ้างอิง

1. Cornelli U. (2009). Antioxidant Use in Nutraceuticals. **Clinics in Dermatology**. 27(2), 175-194.
2. Nimse SB, and Pal D. (2015). Free Radicals, Natural Antioxidants and Their Reaction Mechanisms. **RSC Advances**. 5(35), 27986-28006.
3. Phansawan B. (2013). Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination. **Thai Science and Technology Journal.** 21(3), 275-286.
4. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2559). **สรุปแนวทางการวิเคราะห์ระบบเฝ้าระวัง 5 กลุ่มโรค 5 มิติ ปี พ.ศ. 2559.** พิมพ์ครั้งที่ 1.บริษัท ทีเอส อินเตอร์พริ้นท์ จำกัด.
5. กลุ่มเทคโนโลยีระบาดวิทยา และมาตรการชุมชน กองโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2563). **รายงานสถานการณ์โรค NCDs เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้อง พ.ศ. 2562.**พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์.
6. Kumar S. (2014). The Importace of Antioxidant and Their Role in Phamaceutical Science-A Review. **Asian Journal of Research in Chemistry and Phamaceutical Sciences.** 1(1), 27-44.
7. Mason P. (2011). Dietary Supplements. Fourth ed. London: **Pharmaceutical Press**.
8. ราชบัณฑิตยสถาน. (2556) (2 ed.). กรุงเทพฯ: **ราชบัณฑิตยสถาน.**
9. Duangsri W, et al. (2022). *In Vitro*α-Amylase, α-Glucosidase Inhibition and Anti-Oxidant Activities of Plant Components in Ya-Hom Teppajid. **Asian Medical Journal and Alternative Medicine.** 22, S22-S32.
10. Luanchoy S, and Tiangkul S. (2008).**การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับสมุนไพรอายุวัฒนะของไทย.**วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
11. Bhaigyabati T, et al.(2017). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content of *Oenanthe javanica* Blume (DC) collected from Imphal West District. **International Research Journal of Pharmacy.** 8, 63-68.
12. Buachoon N. (2021). การศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบใบพิลังกาสา. **VRU Research and Development Journal Science and Technology.** 16(3), 15-24.
13. Chaudhuri D, and Sevanan M. (2012). Phytochemical composition of the extracts from *Iresineherbstii* and its therapeutic use via antioxidant and cytotoxic potential by multiple *in vitro* assays. **International Journal of Phytomedicine.** 4(4), 477-485.
14. Naijitra C, and Cheoymang A. (2016). Evaluation of Antioxidant Activity, Total Phenolicand Nicotine Contents of 15 Thai Herbs.**Thai Science and Technology Journal.**24(2), 351-361.
15. Panchakul C, et al. (2022). Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of the Aqueous Extracts of a Thai Blood Tonic (Bhamrung-Lohit) Remedy and Its Plant Components. **Asian Medical Journal and Alternative Medicine.** 22(2), 89-101.

16. คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ. (2562). **บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2562.** กรุงเทพฯ: ราชกิจจานุเบกษา.
17. Yamazaki K, et al. (1994). Electochemical method for estimating the antioxidant effects of methanol extracts of crude drugs. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin.** 42,1663-1665.
18. Benzie IF, and Strain JJ. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology.** 299,15-27.
19. Folin O, and Ciocalteu V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry.** 73(2),627-650.
20. Phowichit S, et al. (2019).Anti-oxidant activity, phenolic and flavonoid constituents of crude extracts from *Piper ribesioides* and *Zanthoxylum limonella* traditional herbal medicine in Northern Thailand. **Research Journal Rajamangala University of Technology Thanyaburi.** 18(1), 25-39.
21. Kakatum N, et al. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of Thai medicinal plants in Sahasthara remedy for muscle pain treatment. **Journal of the Medical Association of Thailand=Chotmaihetthangphaet.** 95, 120-126.
22. Loypimai P. (2011). Total Antioxidant Capacity Assessments *in vitro*. **Journal of Science and Technology Mahasarakham University**. 31(2), 164-170.
23. Jun HI, et al. (2012). Antioxidant activities and phenolic compounds of pigmented rice bran extracts. **Journal of Food Science**. 77(7), C759–C764.
24. Sun C, et al. (2015). Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts.**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**
25. Parmar VS, et al. (1997). Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry.**46(4), 597-673.
26. นิวัติ แก้วประดับ และนิธิกาญจน์ ขันติวรพงศ์. (2543). **การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพริกไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรมคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.