

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม จากสารสกัดยาอายุวัฒนะ

จิรภัทร เล่ห์สิงห์¹ ธิญญา พรหมศรี^{1*} กริยาภา หลายรุ่งเรือง² และ เจมส์ พิงผล³

¹สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

²วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี คณะสาธารณสุขศาสตร์และสหเวชศาสตร์

สถาบันพระบรมราชชนก กระทรวงสาธารณสุข

³วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนาภิเษก คณะสาธารณสุขศาสตร์และสหเวชศาสตร์

สถาบันพระบรมราชชนก กระทรวงสาธารณสุข

¹ 1 ถนนอุทองนอก แขวงดุสิต เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร 10300

² 225 หมู่ 11 ตำบลไม้เค็ด อำเภอมืองปราจีนบุรี จังหวัดปราจีนบุรี 25230

³ 56 หมู่ 1 ถนนคลองขวาง-เจ้าเฟื่อง ตำบลราษฎร์นิยม อำเภอนนทบุรี 11150

รับบทความ 1 ตุลาคม 2565 แก้ไขบทความ 20 มกราคม 2566 ตอรับบทความ 13 กุมภาพันธ์ 2566

บทคัดย่อ

ตามความเชื่อของแพทย์พื้นบ้าน ยาอายุวัฒนะเป็นยาบำรุงร่างกายที่มีสรรพคุณช่วยให้คนมีสุขภาพดี และมีอายุยืน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกรวมจากสารสกัดยาอายุวัฒนะชนิดลูกกลอน สกัดยาโดยการต้มยาด้วยน้ำกลั่น และการหมักยาในเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และพบปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด โดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 87.23 ± 1.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay แสดงค่า FRAP เท่ากับ 40.96 ± 0.91 มิลลิกรัมสมมูลของกรดเฟอริกต่อกรัมสารสกัด และแสดงค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) เท่ากับ 20.33 ± 0.85 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด และปริมาณฟีนอลิกรวมมีค่าเท่ากับ 25.53 ± 1.54 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 70, 95 และการต้มยาด้วยน้ำกลั่น ให้ผลน้อยกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 ตามลำดับ

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; ยาอายุวัฒนะ; ลูกกลอน; ปริมาณฟีนอลิกรวม

Study on Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents Analysis from the Elixir Extracts

Jirapat Laysing¹ Thanya Promsorn^{1*} Kriyapa Lairungruang² and James Phungphol³

¹Applied Thai Traditional Medicine Program, Graduate School, Sunandha Rajabhat University

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

³Kanchanabhishek Institute of Medical and Public Health Technology, Faculty of Public Health and Allied Health Sciences, Praboromarajchanok Institute, Ministry of Public Health

¹ 1 U-Thong Nok Road., Dusit., Bangkok 10300 Thailand

²225 Moo. 11, Maiket Mueang Prachinburi Prachinburi 25230 Thailand

³56 Moo. 1, Khlong Khwang-Chao Fueng Rat Niyom Sai Noi Nonthaburi 11150 Thailand

Received 1 October 2022; Revised 20 January 2023; Accepted 13 February 2023

Abstract

According to folk medicine beliefs, elixir was a body tonic with properties that help people stay healthy and live longer. The purposes of this research were to compare the antioxidant activities, and to compare the total phenolic contents from bolus elixir extracts. The drug was extracted by boiling with distilled water and maceration with 95%, 70%, and 50% ethanol, respectively. The results showed that extracts with 50% ethanol had the best antioxidant activities, and found the highest total phenolic contents as follows: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay gave IC_{50} of 87.23 ± 1.53 $\mu\text{g/mL}$, Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay showed the value was 40.96 ± 0.91 $\text{mgFe}^{2+}/\text{g}$, and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) value was 20.33 ± 0.85 mgTrolox/g , and total phenolic contents was equal to 25.53 ± 1.54 mg GAE/g . The extracts with 70%, 95% ethanol, and distilled water showed less effective than the extracts with 50%, respectively.

Keywords : Antioxidant Activity; Elixir; Bolus; Total phenolic contents

** Corresponding Author. Tel.: +669 1797 4242, E-mail Address: thanya.pr@ssru.ac.th*

1. บทนำ

“สารต้านอนุมูลอิสระ” หรือ “สารแอนติออกซิแดนท์” เป็นสารที่ทำหน้าที่ชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน [1] แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ (Enzyme) ได้แก่ Superoxide Dismutase, Catalase, และ Glutathione Peroxidase 2) สารต้านอนุมูลอิสระ ที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Nonenzymatic) โดยส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม ที่มักพบในพืชธรรมชาติ ได้แก่ Ascorbic acid หรือ วิตามินซีและกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds) จำพวก ฟีนอล (Phenol) ฟีนอลิก (Phenolic Acids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) แทนนิน (Tannins) ไกลโคไซด์ (Glycosides) อัลคาลอยด์ (Alkaloids) ลิกนิน (Lignins) และอื่นๆ [2] อย่างไรก็ตามแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญและนับว่าปลอดภัยที่สุด คืออาหาร พืช ผัก และผลไม้ [3] ขณะที่ร่างกายมีอายุมากขึ้น ความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระกลับลดลง ทำให้ขาดความสมดุลระหว่างปริมาณอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการรับประทานอาหารประเภท พืช ผัก และผลไม้ ซึ่งเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระประเภทวิตามิน และเกลือแร่ เพื่อปรับสมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย และเป็นการป้องกันโรคต่าง ๆ ที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ

วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay) เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็นสารมาตรฐานคือ BHT หรือ Butylated Hydroxytoluene (3, 5-di-tert-butyl-4-hydroxytol) และการวิเคราะห์ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) เทียบกับกรฟามาตรฐาน Ferrous Sulfate ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจโดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง การประเมินประสิทธิภาพเชิงปริมาณของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนิยมประเมินได้ 2 แบบ คือ แบบปริมาณ

ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่างซึ่งค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และแบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 (IC_{50} , 50% of Inhibitory Concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง [4] และการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Contents) ใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu (F-C reagent) เป็นการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่มักพบในพืชธรรมชาติ [5]

ตำรับยาอายุวัฒนะจากบันทึกของแผ่นดิน 7 “สมุนไพรรักษาแม่หญิง” เขียนโดย ภญ.ดร.สุภาภรณ์ ปิติพร โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี กล่าวว่า “หึ่งอากาศ พาดต้นไม้ หงายธรณีหนีสงสาร ไปนิพพานไม่กลับ” เมื่อถอดรหัสตำรับยาอายุวัฒนะแล้วเห็นว่ามีส่วนประกอบอยู่ 5 สิ่ง คือ หึ่งอากาศ คือ น้ำผึ้ง พาดต้นไม้ คือ บอระเพ็ด หงายธรณี คือ หัวเหวหมู หนีสงสาร คือ ขมิ้นชัน ไปนิพพานไม่กลับ คือ ผักเสี้ยน สรรพคุณ ทำให้ผายลม บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้อืดเมื่อย ทำให้นอนหลับ ช่วยให้การขับถ่ายเป็นปกติ ดังนั้นยาอายุวัฒนะเป็นยาที่ต้องรักษาก่อนเพื่อเป็นการสร้างร่างกายให้สมบูรณ์แข็งแรง มีภูมิคุ้มกันต่อโรคได้ดี แล้วจึงรักษาอาการป่วยที่เกิดจากความเสื่อมของร่างกายได้ ซึ่งส่วนมากจะเป็นโรคเรื้อรัง เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคอัมพฤกษ์อัมพาต โรคเมเร็ง โรคหัวใจ โรคผอมแห้ง โรคอ้วน โรคแก่เร็วเกินไป ที่เกิดจากร่างกายขาดความสมดุลระหว่างปริมาณสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ ในทางแพทย์แผนไทยหมายถึงธาตุไม่ปกติ ซึ่งยาอายุวัฒนะเข้าไปส่งเสริมธาตุให้ปกติ [6]

บอระเพ็ด มีการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ด้วยน้ำกลั่น เอทานอล เท่ากับ 1.10 ± 0.01 และ 7.21 ± 1.24 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินอีต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ [7]

หัวเหวหมู มีการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ด้วยน้ำกลั่น เอทานอล เท่ากับ 4.03 ± 1.93

และ 3.99 ± 2.25 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินอีต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ [7]

ขมิ้นชัน มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สกัดด้วยเมทานอล โดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging (DPPH) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 52.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร [8]

ผักเสี้ยนผี มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และ น้ำกลั่น จากการศึกษาพบว่าสารสกัดผักเสี้ยนผีในปิโตรเลียมอีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม ไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่สารสกัดเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging (DPPH) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 56.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide scavenging activity) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 919.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร [9]

หลักการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อสกัดให้ได้สารที่ต้องการออกมามาก และไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เป็นตัวทำละลายที่ดีแต่เกิด emulsion ง่าย เฮกเซน (Hexane) มีความเป็นพิษต่อระบบประสาท คือ อาการแขน-ขาอ่อนแรง และอาจเป็นอัมพาตได้ แอลกอฮอล์ (Alcohol) ที่ใช้มากคือ เมทานอลและเอทานอล เนื่องจากมีคุณสมบัติในการละลายได้กว้างทั้งสารที่มีขั้วและไม่ขั้วและยังใช้ทำลายเอนไซม์ในพืชได้ [10]

ถึงแม้จะมีข้อมูลสนับสนุนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรายาอายุวัฒนะ แต่ยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยาอายุวัฒนะชนิดลูกกลอน ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกรวมจากสารสกัดยาอายุวัฒนะชนิดลูกกลอน ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นข้อมูลในการสนับสนุนในการเลือกใช้ตำรายาอายุวัฒนะ และเพื่อเผยแพร่ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ให้กับประชาชน หน่วยงาน และบุคลากรที่เกี่ยวข้อง

2. ระเบียบวิธีวิจัย

ยาลูกกลอนตำรายาอายุวัฒนะ โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี มีส่วนประกอบ ได้แก่ บอระเพ็ด หัวแห้วหมู ขมิ้นชัน ผักเสี้ยนผี หนังกิ่งละ 15 กรัม และน้ำผึ้ง ปั่นเป็นลูกกลอน นำยาลูกกลอนมาสกัดโดยการหมักด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 และสกัดด้วยวิธีการต้มยาด้วยน้ำกลั่น ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay) และ วิเคราะห์ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay (Ferric Reducing Antioxidant Power) รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Contents)

2.1 ขั้นตอนการวิจัย

2.1.1 เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AB 204-S, Switzerland) เครื่องระเหยสุญญากาศ (ยี่ห้อ Buchi รุ่น R-100, Switzerland) เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ยี่ห้อ Sp scientetific รุ่น Advantage pro, England) เครื่องอ่านไมโครเพลท (ยี่ห้อ Biotek รุ่น Synergy H1 MFD, USA) สารเคมี 95% ethanol, commercial grade (บริษัท C.M.J. Anchor, Thailand) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (บริษัท Fluka, USA) และ 3, 5-di-tert-butyl-4-hydroxytol (BHT) (บริษัท Fluka, USA)

2.1.2 การเตรียมสารสกัด

2.1.2.1 การหมัก (Maceration)

นำยาลูกกลอนตัวอย่างละ 50 กรัม ใส่ในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 อย่างละ 100 มิลลิตรลงไปตามลำดับ ปิดฝาหมักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าวันละ 3 เวลา เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมารองแยกกากออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำกากตัวอย่างเดิมมาสกัดซ้ำอีก 2 รอบ นำส่วนที่เป็นสารสกัดมาระเหยเอาตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่อง

ระเหยสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดที่มีลักษณะข้นและเหนียวหนืด จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดจนน้ำหนักคงที่ แล้วเก็บสารสกัดไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส [11]

2.1.1.2 การต้ม (Decoction)

นำยาลูกกลอนตัวอย่างละ 50 กรัม จากนั้นใส่ลงในหม้อต้มน้ำ จนท่วมตัวยาคือ ต้มเดือดนาน 15 นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อแยกเอากากออก ทำ 3 ซ้ำ นำสารละลายที่ได้จากการกรองไปทำแห้ง โดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งน้ำหนักแห้งของสารสกัด เก็บในภาชนะปิดสนิท เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส [12] การคำนวณหาค่า % Yield ดังสมการที่ (1)

$$\% \text{ Yield (Dry Weight Basis)} = \frac{(W_1 \times 100)}{W_2} \quad (1)$$

โดยที่

% Yield = ร้อยละของสารสกัดที่ได้

W_1 = น้ำหนัก (กรัม) ของสารสกัดหลังจากระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

W_2 = น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่าง

2.1.3 วิธีการตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงจาก Hatano และคณะ (1989) และ Yamasaki และคณะ (1994) DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนในโมเลกุลได้ ซึ่งจะทำให้เกิดสารละลายสีม่วง เมื่อได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง [13], [14]

2.1.3.1 การเตรียมสารละลาย DPPH

เตรียม DPPH ความเข้มข้น 6×10^{-5} โมลาร์ ซึ่ง 2.4 มิลลิกรัม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol แล้วเก็บในที่พ้นแสง

2.1.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Butylated Hydroxytoluene (BHT) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol จากนั้นนำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 100, 50, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.1.3.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

เตรียมสารสกัดยา ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยตัวทำละลายของสารสกัด ความเข้มข้น 100, 50, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.1.3.4 วิธีการทดสอบ

1) ปิเปตต์สารสกัด 100 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม ที่ความเข้มข้น 100, 50, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร เพื่อทำปฏิกิริยา

2) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านไมโครเพลท

3) รายงานผลการทดลอง เป็นค่า 50% Inhibitory Concentration (IC_{50}) คือค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชัน คำนวณผลโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 9.3.1 รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM ดังสมการที่ (2)

การคำนวณหาค่า % inhibition

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[A (\text{Control}) - A (\text{Sample})]}{A (\text{Control})} \times 100 \quad (2)$$

โดยที่

% Inhibition = ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

$A (\text{Control})$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

A (Sample) = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารสกัดผสมกับสารละลาย DPPH
หมายเหตุ ในแต่ละความเข้มข้นจะทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (Triplicate)

2.1.4 วิธีการตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (ดัดแปลงจาก Brand และคณะ (1995) เตรียม FRAP Reagent โดยผสม Acetate Buffer, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), ($C_{18}H_{12}N_6$) และ Ferric Chloride ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ [15]

2.1.4.1 การเตรียมสารละลาย

1) เตรียมสารละลาย Acetate Buffer เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 ซึ่ง Sodium Acetate Trihydrate ($C_2H_3NaO_2$) และผสม Glacial Acetic Acid 16 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้อง

2) เตรียมสารละลาย TPTZ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ใน 40 มิลลิโมลาร์ (M.W. 312.34) โดยชั่ง TPTZ 15.617 มิลลิกรัม ผสมกับ 40 มิลลิโมลาร์ HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้อง หลีกเลี่ยงการสัมผัสแสง

3) เตรียมสารละลาย Ferric Chloride เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่ง $FeCl_3 \cdot 27.03$ มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้อง

4) นำสารละลาย 1) และ 2) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นผสมสารละลาย 3) จะได้เป็น FRAP Reagent สารละลายเป็นสีน้ำตาลเทาหม่น

2.1.4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1) เตรียม Trolox เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วย Absolute Ethanol ให้ได้เป็น 6 ความเข้มข้น ดังนี้

300, 200, 100, 50, 25 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2) เตรียม Ferrous Sulfate ($FeSO_4$) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้เป็น 6 ความเข้มข้น คือ 300, 200, 100, 50, 25 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน Butylated Hydroxytoluene (BHT) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วย Absolute Ethanol

2.1.4.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

เตรียมสารสกัดยา ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยตัวทำละลายของสารสกัด

2.1.4.4 วิธีการทดสอบ

1) ปิเปตต์สารสกัดและสารละลายมาตรฐาน 20 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม

2) เติม FRAP reagent 180 ไมโครลิตร ที่ถูกอุ่นด้วยอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำไปเติมลงในไมโครเพลท 96 หลุม

3) ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านไมโครเพลท

2.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Contents)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Contents) โดยวิธี Folin-Ciocalteu's Procedure (ดัดแปลงจาก Miliauskas และคณะ (2004) [5]

2.1.5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1) กรดแกลลิก เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เตรียมกรดแกลลิก 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วย Absolute Ethanol ให้ได้เป็น 7 ความเข้มข้น ดังนี้ 500, 250, 100, 50, 25, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2) เตรียม Sodium Carbonate Anhydrous 1.875 กรัม จำนวน 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วย น้ำกลั่น 7 ความเข้มข้น ดังนี้ 500, 250, 100, 50, 25, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3) Folin-Ciocalteu's Phenol ความเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร (10% v/v) นำสารละลาย Folin-Ciocalteu's Phenol ให้มีความเข้มข้นเป็น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วย น้ำกลั่น ให้ได้เป็น 7 ความเข้มข้น ดังนี้ 500, 250, 100, 50, 25, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน Butylated Hydroxytoluene (BHT) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วย Absolute Ethanol

2.1.5.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

1) เตรียมสารสกัดยา ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยตัวทำละลายของ สารสกัด

2.1.5.3 วิธีการทดสอบ

1) ปิเปตต์สารสกัดและสารละลายมาตรฐาน 20 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม

2) ปิเปตต์กรดแกลลิก 20 ไมโครลิตร 7 ความเข้มข้น คือ 500, 250, 100, 50, 25, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม

3) เติมสารละลายของ Folin-Ciocalteu's Phenol เจือจาง 100 ไมโครลิตร ใส่ในข้อ 1) และ 2)

4) เติมสารละลาย Sodium Carbonate 80 ไมโครลิตร ใส่ในข้อ 1) และ 2)

5) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่าน ไมโครเพลท รายงานผลการทดลอง

การคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่างสารสกัด

$$\text{mgGAE/g} = \left(\frac{\text{Absorbance } 765 - X}{\text{Slope}} \right) \times \left(\frac{\text{Dilution} \times \text{Volume}}{1000} \right) \times W \quad (3)$$

โดยที่

mgGAE/g = มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม สารสกัด

W = น้ำหนักของตัวอย่างยา มีหน่วยกรัม

Slope = ความชันจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

Volume = ปริมาตรของสารสกัดทั้งหมด มีหน่วย มิลลิลิตร

Dilution = ค่าการเจือจางตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์

Absorbance = ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ของตัวอย่าง หรือสารมาตรฐานนำค่า Absorbance ที่วัดได้ทำการหา มาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และ หาค่า Linear Regression หาค่าความเข้มข้นของ สารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก หมายถึง ในแต่ละความเข้มข้นจะทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (Triplicate)

2.1.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ความคลาดเคลื่อน (SEM) จากข้อมูลผลการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ค่า IC_{50} คำนวณด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 9.3.1 และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 22 ใช้ One-Way, ANOVA เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน และเพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดตำรับ ยาอายุวัฒนะที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน

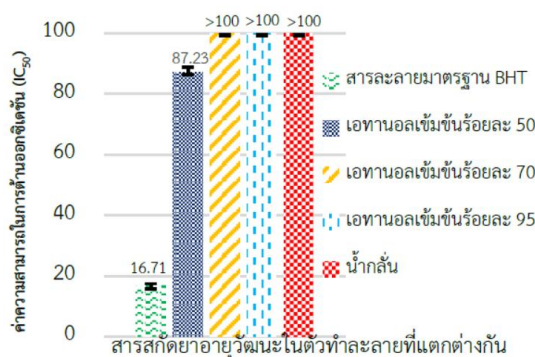
3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

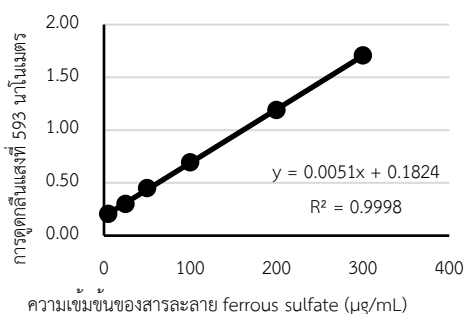
3.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดยาอายุวัฒนะ พบว่า สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ

87.23±1.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ ความเข้มข้น ร้อยละ 95 70 และน้ำกลั่น ไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ สารละลายมาตรฐาน BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.71±0.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีของสารสกัดยาอายุวัฒนะ ชนิดลูกกลอน ที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่แตกต่างกัน

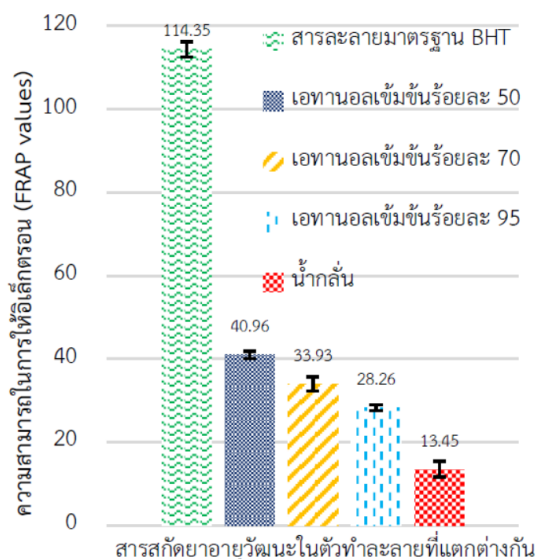


รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานแสดงการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ด้วยวิธี FRAP ของสารละลาย Ferrous sulfate ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.1.2 การทดสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

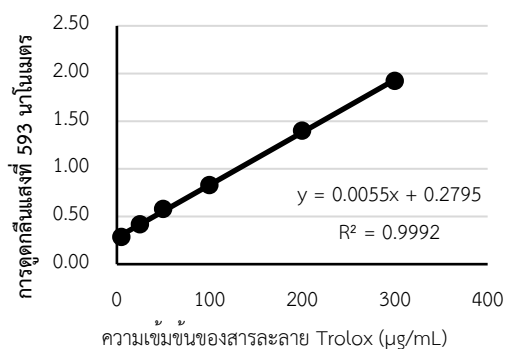
3.1.2.1 ผลการทดสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP คำนวณได้จากการ

สร้างกราฟมาตรฐาน Ferrous sulfate จากกราฟมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9998 และมีสมการคือ $y=0.0051x+0.1824$ แสดงดังรูปที่ 2 สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ ความเข้มข้น ร้อยละ 50 มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนสูงที่สุด โดยมีค่า FRAP เท่ากับ 40.96±0.91 มิลลิกรัมสมมูลของกรดเพอริกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ ความเข้มข้น ร้อยละ 70 และ 95 มีค่า FRAP เท่ากับ 33.93±1.68 และ 28.26±0.70 มิลลิกรัมสมมูลของกรดเพอริกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และสารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยน้ำกลั่น มีค่าในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด มีค่า FRAP เท่ากับ 13.45±1.88 มิลลิกรัมสมมูลของกรดเพอริกต่อกรัมสารสกัด สารละลายมาตรฐาน BHT มีค่า FRAP เท่ากับ 114.35±1.85 มิลลิกรัมสมมูลของกรดเพอริกต่อกรัมสารสกัด แสดงดังรูปที่ 3

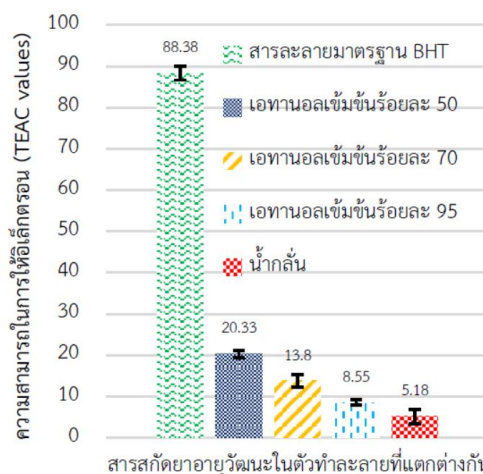


รูปที่ 3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP values) ของสารสกัดยาอายุวัฒนะชนิดลูกกลอน ที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่แตกต่างกัน

3.1.2.2 ผลการทดสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP คำนวณได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน Trolox (Trolox equivalent capacity; TEAC) จากกราฟมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9992 และมีสมการคือ $y=0.0055x+0.2795$ แสดงดังรูปที่ 4 สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า TEAC เท่ากับ 20.33 ± 0.85 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95 มีค่า TEAC เท่ากับ 13.80 ± 1.55 และ 8.55 ± 0.65 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และสารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยน้ำกลั่น มีค่าในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด มีค่า TEAC เท่ากับ 5.18 ± 1.74 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด สารละลายมาตรฐาน BHT มีค่า TEAC เท่ากับ 88.38 ± 1.72 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด แสดงดังรูปที่ 5



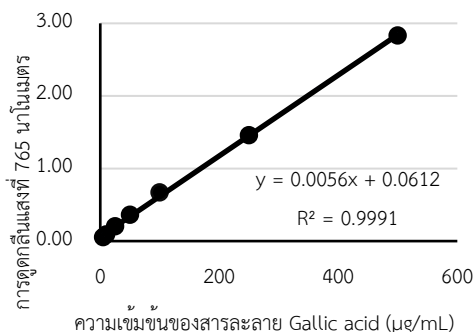
รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานแสดงการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ด้วยวิธี FRAP ของสารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ



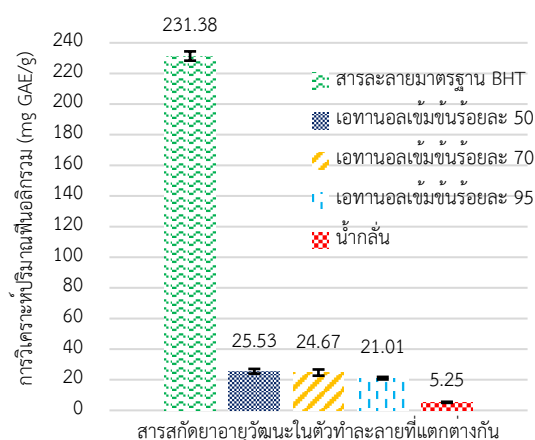
รูปที่ 5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (TEAC values) ของสารสกัดยาอายุวัฒนะ ชนิดลูกกลอน ที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่แตกต่างกัน

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

ปริมาณฟีนอลิกรวมคำนวณได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน จากกราฟมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9991 และมีสมการคือ $y=0.0056x+0.0612$ แสดงดังรูปที่ 6 พบว่า สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด เท่ากับ 25.53 ± 1.54 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95 มีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 24.67 ± 2.03 และ 21.01 ± 0.85 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95 มีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และสารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยน้ำกลั่น มีปริมาณฟีนอลิก รวมต่ำที่สุด เท่ากับ 5.25 ± 0.35 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด แสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 6 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP values) ของสารสกัดยาอายุวัฒนะชนิดลูกกลอน ที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่แตกต่างกัน



รูปที่ 7 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) ของสารสกัดยาอายุวัฒนะชนิดลูกกลอน ที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่แตกต่างกัน

3.3 การเปรียบเทียบระหว่างการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิเคราะห์ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

ผลการศึกษาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในตัวทำละลายแต่ละชนิด พบว่า สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และน้ำกลั่น ไม่มีความแตกต่างกัน แต่สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 และสารละลายมาตรฐาน BHT มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ผลการศึกษาความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ในตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ผลการศึกษากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม ในตัวทำละลายแต่ละชนิด พบว่า สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่สารสกัดยาอายุวัฒนะ ด้วยน้ำกลั่น และสารละลายมาตรฐาน BHT มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดยาอายุวัฒนะ

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	FRAP		ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg GAE/g)
		FRAP values (mgFe ²⁺ /g)	TEAC values (mgTrolox/g)	
เอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95	>100 ^c	28.26±0.70 ^d	8.55±0.65 ^d	21.01±0.85 ^b
เอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 70	>100 ^c	33.93±1.68 ^c	13.80±1.55 ^c	24.67±2.03 ^b
เอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50	87.23±1.53 ^b	40.96±0.91 ^b	20.33±0.85 ^b	25.53±1.54 ^b
น้ำกลั่น	>100 ^c	13.45±1.88 ^e	5.18±1.74 ^e	5.25±0.35 ^c
สารละลายมาตรฐาน BHT	16.71±0.67 ^a	114.35±1.85 ^a	88.38±1.72 ^a	231.38±3.02 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษร a, b, c, d, e ที่แตกต่างกันในแนวดิ่งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4. สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดยา พบว่า สารสกัดยาด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และสกัดได้ปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดยาด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70, 95 และวิธีการต้มยาด้วยน้ำกลั่น ตามลำดับ สารสกัดยาด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และได้ปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่น ๆ

เอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 มีข้อที่เหมาะสมกับการสกัดสารออกมาได้มากกว่าสารสกัดยาด้วยวิธีการต้มยาด้วยน้ำกลั่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด อาจเนื่องมาจากวิธีการต้มเป็นกระบวนการใช้ความร้อนจึงส่งผลให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสลายตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในการยับยั้งอนุมูลอิสระในพืช [16] มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรวัดเดียวในตำรับยาอายุวัฒนะ พบว่า สารสกัดผักเสี้ยนผีที่สกัดด้วยตัวเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 มีค่า IC_{50} มากกว่า 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 3.52 ± 0.05 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด [17] สารสกัดบอระเพ็ดและหัวเห็ดหมีที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 7.21 ± 1.24 และ 3.99 ± 2.25 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินอีต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้งตามลำดับ [7] มีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 8.02 ± 1.14 [7] และ 222.14 ± 1.29 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด [7] สารสกัดขมิ้นชัน ที่สกัดด้วยเมทานอลมีความเข้มข้นร้อยละ 99.8 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 136.56 ± 0.531 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 415.56 ± 0.012 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด [18] สารสกัดผักเสี้ยนผี และขมิ้นชันมีค่า IC_{50} มากกว่ายาลูกกลอนสารสกัดหัวเห็ดหมี

และบอระเพ็ดไม่ได้รายงานเป็นค่า IC_{50} ขมิ้นชัน และหัวเห็ดหมีมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยาลูกกลอน แต่บอระเพ็ดและผักเสี้ยนผี มีปริมาณฟีนอลิก รวมน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยาลูกกลอนที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 ของงานวิจัยนี้

ผลที่ได้จากการศึกษานี้ทำให้มีข้อเสนอว่าหากต้องการบริหารยาลูกกลอนนี้ให้ได้ประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระควรใช้ยาในรูปแบบของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกัน และใช้วิธีวิเคราะห์วิธีเดียวกันกับสมุนไพรวัดเดียวเทียบกับตำรับยา นอกจากนี้ควรมีการศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC Fingerprint) เพื่อใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของตำรับยาอายุวัฒนะ ควรมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของยา และควรมีการศึกษาหาสารปนเปื้อนในเม็ดยา

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุขกาญจนาภิเษกที่เอื้อเพื่อห้องปฏิบัติการในการทำวิจัย และมูลนิธิโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร ที่อนุญาตให้ใช้ตำรับยาอายุวัฒนะในการทำวิจัยครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problem and concepts," *Arch Biochem Biophys*, vol. 246, pp. 501-514, May 1986.
- [2] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra, "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health," *Pharmacogn Rev*, vol. 4, no. 8, pp. 118-26, Jul-Dec 2010.

- [3] A.M. Papas, "Determinants of Antioxidant Status in Humans," in *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*, 1st ed. New York: CRC Press, 1999, pp. 89-95.
- [4] B. Phansawan, "Free radicals, Antioxidants and Antioxidant Activity Determination," *Thai Science and Technology*, vol. 21, no. 3, pp. 266-286, Jul - Sep 2013.
- [5] P.R. Miliauskas, Venskutonis, and T.A. Van Beek, "Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts," *Food Chemistry*, vol. 85, no. 2, pp. 231-237, April 2004.
- [6] S. Pitiporn, "Records of the Land, 7 Medicinal Herbs for Mae Ying," in *Chaophraya Abhaibhubejhr Hospital Prachinburi*, 1st ed. Bangkok, 2014
- [7] R. Tangbuchakiat, "Total Antioxidant Activity of Herbals in Anti-Aging Formulas Extracted with Different Solvents Using Abts Radical Scavenging Assay," in *Proceeding of National Rangsit University, Collage of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani, Thailand*, 2019, pp.1-9
- [8] W. Boonsinchai, S. Thapphasaraphong, N. Nualkaew and S. Nualkaew "Antioxidant activity and total phenolics of herbal extract of combination from mulberry leaves, turmeric rhizome ,lakoocha's wood and shiitake." In *Proceeding The 7th Annual Northeast Pharmacy Research Conference* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand, 2015, pp.267-272
- [9] A. Upadhyay, P. Chattopadhyay, D. Goyary, PM. Mazumder and V. Veer, "In vitro fibroblast growth stimulatory and in vivo wound healing activity of *Cleome viscosa*,". *The Journal of Orient Pharm Exp Med*, vol.14, no 269-278., Feb, 2014
- [10] S. Lenapun, J. Jamthaweeikul and J.Chaiwut, "Chemical Specifications of Piper sarmentosum Roxb. Roots," *The Journal of Thai Traditional and Alternative Medicine*, vol.12 no. 2, May-Aug, 2014
- [11] Y. Maneepisamai, P. Yasin and S. Simarugumpai, "Anti- inflammatory activity and anti-dermatitis-causing bacterial activity of *Blumea balsamifera* (L.) DC. leaf extracts," *Chandrasem Rajabhat University*, vol. 18, no. 35, Jul-Dec, 2012.
- [12] W. Neelapong, B. Phonyotin and W. Sittikijyothin, "Extraction of Active Compounds from Thai Herbs: Powder and Extract," *The Journal of KMUTNB*, vol. 29, no. 1, Jan-Mar, 2019.
- [13] T. Hatano, R. Edamatsu, M. Hiramatsu, A. Mori Y. Fujita, T. Yasuhara, T. Yoshida and T. Okuda, "Effect of the interaction of tannin with co-existing substances VI. Effect of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1, 1 - diphenyl-2 - picrylhydrazyl radical," *Chem. Pharm. Bull*, vol. 37, no. 8, pp. 2016-2021, 1989.
- [14] K. Yamazaki, A. Hashimoto, Y. Kokusenya, T. Miyamoto and T. Sato, "Electrochemical method for estimating the antioxidative

- effect of methanol extracts of crude drugs,” *Chem Pharm Bull*, vol 42, no. 8, pp. 1663-1665, 1994.
- [15] I.I.F. Benzie, J.J. Strain, “The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay,” *Anal Biochem*, vol. 239, no. 1, pp. 70–76, July 1996.
- [16] K. Rodriguez, K.S Ah-Hen, A. Vega-Galvez, V. Vasquez, I. Quispe-Fuentes, P. Rojas, and R. Lemus-Mondaca, “Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz, berries during drying”: *LWT - Food Science and Technology*, vol 65, pp. 537-542, Jan, 2016.
- [17] K. Koedkeao, T. Phanhun and A. Sunthitikawinsakul, “Analysis of Antioxidant Activity, Total Phenolics and Total Flavonoids Contents,” in *Proceeding of 10th National Kasetsart University, Nakhon Pathom Rajabhat University*, Thailand, 2013, pp. 1-8
- [18] N. Huayhongthong, “Phytochemical Screening and Biological Activities of some Thai Medicinal Plants Using in the Diabetes Therapy,” M.S. thesis, Radiation Lab., Univ. Thailand, 2016.
- [19] O. Chantaravichit and C. Ongard, “Total Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, and Antimicrobial of Weed Extracts,” *Agricultural Sci. J*, vol 46, no. 3, pp.285-288, 2015.