

พฤษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาแผนไทย: อัคคินิวคณะ

ชวลิต โยรัมย์^{1*} ภาณุพันธ์ ศรีพันธุ์¹ สุวดี โชคชัยศิริ¹ รัมภ์รดา มีบุญญา¹

อรรวรรณ วงษ์อนันต์¹ พิมลวรรณ ศิริปุระ² สุธิดา ดาถำ² จุฑามาศ รดา² เพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง²
และ ปัญญาดา ปัญญาทิพย์³

¹วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

²คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

¹111/1-3 ถนนพระราม 2 อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม 75000

²123 ถนนมิตรภาพ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

³63 ถนนรังสิต-นครนายก อำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก 26120

รับบทความ 24 สิงหาคม 2566 แก้ไขบทความ 14 ธันวาคม 2566 ตอรับบทความ 9 มกราคม 2567

บทคัดย่อ

ตำรับยาอัคคินิวคณะเป็นตำรับยาแผนไทยที่มีส่วนผสมของกัญชาเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเป็นตำรับยาในกลุ่มยาอายุวัฒนะที่มีมาตั้งแต่รัชสมัยสมเด็จพระนารายณ์มหาราช โดยมีสรรพคุณช่วยเจริญอาหาร บำรุงกำลัง แก้คลื่นไส้อาเจียน ซึ่งสรรพคุณดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีที่เป็นองค์ประกอบ แต่จนถึงปัจจุบันยังขาดข้อมูลด้านพฤษเคมีของตำรับอัคคินิวคณะ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีของตำรับอัคคินิวคณะด้วยเทคนิค HPLC ตลอดจนการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษพบว่า สารสกัดเอทานอลตำรับยาอัคคินิวคณะมีค่า IC_{50} เท่ากับ 56.30 ± 0.29 และ 23.39 ± 0.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ตามลำดับ และมีค่า FRAP เท่ากับ 448.01 ± 5.72 มิลลิโมลต่อ 100 กรัมสารสกัด แต่ยังคงมีฤทธิ์น้อยกว่า Trolox (2506.15 ± 13.60 มิลลิโมลต่อ 100 กรัมสารสกัด) และพบว่ามีปริมาณแคนนาบินอยด์สัมพันธ์สูง (8130.00 ± 35.59 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด) โดยมี d9-THC สูงที่สุด อีกทั้งพบว่ามีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สัมพันธ์เท่ากับ 1804.14 ± 4.86 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด นอกจากนี้ในการวิเคราะห์สเปกตรัมสัมพันธ์พบว่า ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณแคนนาบินอยด์ที่มีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมไปถึง Gallic Acid และ p-Hydroxybenzoic Acid ที่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่าตำรับยาอัคคินิวคณะมีศักยภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ โดยสามารถใช้เป็นข้อมูลที่สนับสนุนการใช้ตำรับยาแผนไทยไปพัฒนาสู่เภสัชภัณฑ์ได้

คำสำคัญ : พฤษเคมี; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; อัคคินิวคณะ; กัญชา

Phytochemical and Antioxidant Activity of Thai Traditional Recipe: Akineewakana Recipe

Chawalit Yongram^{1*} Panupan Sripan¹ Suwadee Chokchaisiri¹ Rumrada Meeboonya¹
Orawan Wonganan¹ Pimolwan Siripru² Suthida Datham² Juthamat Ratha²
Ploenthip Puthongking² and Panyada Panyatip³

¹College of Allied Health Sciences, Suan Sunandha Rajabhat University

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

³Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

¹111/1-3 Rama 2 Road, Muang, Samut Songkhram, 75000

²123 Mittraphap Road, Muang, Khon Kaen, 40002

³63 Rangsit-Nakhon Nayok Road, Ongkharak, Nakhon Nayok, 26120

Received 24 August 2023; Revised 14 December 2023; Accepted 9 January 2024

Abstract

Akineewakana recipe is a Thai traditional medicine that has cannabis as an ingredient which is an elixir medicine group in King Narai the Great. This recipe was used for appetizing, analeptic and antiemesis. These properties are related to the type and quantitative of chemical constituents. Currently, Akineewakana recipe was lack data of phytochemicals. Therefore, this research aims to study the type and phytochemical content by HPLC technique, also the antioxidant activity of Akineewakana recipe was determined. The results showed that the ethanolic Akineewakana recipe extract demonstrated the IC₅₀ value of 56.30±0.29 and 23.39±0.44 µg/ml by DPPH and ABTS assay, respectively. The FRAP value was 448.01±5.72 mmol/100 g Extract. However, this recipe showed lower activity than Trolox (2506.15±13.60 mmol/100 g Extract). The cannabinoid analysis showed a high relative cannabinoid abundance (8130.00±35.59 µg/g Extract) which is d9-THC as the highest content. In addition, it found the relative phenolic and flavonoid abundance as 1804.14±4.86 µg/g Extract. Moreover, the correlation analysis showed that the total phenolic and flavonoid and cannabinoid content correlated with antioxidant activity which is gallic acid and *p*-hydroxybenzoic acid showed a high correlation with antioxidant significantly. The result suggested that Akineewakana recipe has the potential to be an antioxidant agent. Moreover, this data was used to support the usage of Thai traditional medicine and development of the pharmaceutical products.

Keywords : Phytochemical; Antioxidant; Akineewakana; Cannabis

** Corresponding Author. Tel.: +668 1579 5948, E-mail Address: chawalit.yo@ssru.ac.th*

1. บทนำ

ตามยุทธศาสตร์ขององค์การอนามัยโลก พ.ศ. 2557-2566 มีเป้าหมายเพื่อเสริมสร้างบทบาทของยาแผนโบราณ โดยเน้นความสำคัญของการส่งเสริมและการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรในระบบสุขภาพของประเทศสมาชิก [1] ซึ่งการแพทย์แผนไทย เป็นระบบการแพทย์แบบองค์รวมที่เน้นการรักษาสมดุลของร่างกายของธาตุทั้ง 4 ได้แก่ ธาตุดิน ธาตุน้ำ ธาตุลม และธาตุไฟ แต่เมื่อร่างกายเกิดการสูญเสียสมดุลนี้ไปจึงทำให้เกิดความเจ็บป่วยขึ้นได้ ดังนั้นการรักษาสมดุลของธาตุเหล่านี้จึงเป็นหลักการในการป้องกันโรคที่เกิดขึ้นได้ [2] ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพเป็นอย่างมาก โดยมีการใช้พืชสมุนไพรทั้งพืชชนิดเดียวหรือพืชหลายชนิดมาผสมใช้ในการรักษาโรคอย่างแพร่หลาย โดยจะนำมาจดบันทึกการนำสมุนไพรขึ้นเป็นตำรับยาที่มีประสิทธิภาพ [3]

อัคคินิวคณา (Akineewakana) เป็นตำรับยาไทยที่มีบันทึกไว้ในคัมภีร์ธาตุพระนารายณ์ซึ่งกล่าวไว้ว่า “ให้เอากัญชา (*Cannabis sativa*) ยิงโสม (*Panax ginseng*) สิ่งละ 1 ส่วน เปลือกอบเชย (*Cinnamomum verum*) ใบกระวาน (*Laurus nobilis*) กานพลู (*Syzygium aromaticum*) สะค้าน (*Piper interruptum*) สิ่งละ 2 ส่วน ชิงแห้ง (*Zingiber ligulatum*) 3 ส่วน รากเจตมูลเพลิง (*Plumbago indica*) ตีป्ली (*Piper longum*) สิ่งละ 4 ส่วน น้ำตาลกรวด 6 ส่วน กระทบเป็นจุน น้ำผึ้งรว เป็นกระสาย บดเสวยหนัก 1 สลึง แก้อาเจียน 4 ประการด้วย ดิกขาคินีกำเรบ แลวิสมาคินี มันทาคินีอันทุพพล จึงคลื่นเหียน อาเจียน มิให้เสวยพระกระยาหารได้ ให้จำเริญพระธาตุทั้ง 4 ให้เสวยพระกระยาหาร เสวยมีรสชุกาลัง ยิ่งนัก ข้าพระพุทธเจ้า ขุนประสิทธิโอสถจิน ประกอบทูลเกล้าฯ ถวาย ครั่งสมเด็จพระนารายณ์เป็นเจ้าเมืองลพบุรี เสวยเพลเข้าอตราตินิกเกล้าฯ” ซึ่งตำรับยานี้จัดอยู่ในกลุ่มยาบำรุง ยาอายุวัฒนะ ที่มีสรรพคุณช่วยเจริญอาหาร บำรุงกำลัง แก้อาเจียนที่เกิดจากการย่อย

อาหารที่ผิดปกติ [4] พืชที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยาอัคคินิวคณาได้แก่ กัญชาที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระมีสารองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ [5] โสมมีความสามารถในการลดอาการของโรคบางชนิดผ่านกลไกต้านอนุมูลอิสระในเซลล์และสัตว์ทดลอง [6] อบเชยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบในหนูทดลอง [7] กระวานมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วยวิธี DPPH [8] สะค้านและตีป्लीมีฤทธิ์ป้องกันภูมิแพ้และยับยั้งไนตริกออกไซด์ [9] ชิงแห้งสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง CL-6, HepG2, Hep-2 ได้ดี [10] และเจตมูลเพลิงสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ดี [11] ซึ่งจะเห็นได้ว่าพืชในตำรับนี้มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรที่มีอิเล็กตรอนอิสระ โดยอนุมูลอิสระจะเป็นต้องจับกับสารอื่นเพื่อทำให้มีความเป็นกลาง ซึ่งอนุมูลอิสระมีหลายชนิดได้แก่ อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ ($NO^{\cdot}$) ลิพิดเปอร์ออกไซด์ ($LO^{\cdot}$) ลิพิดอัลคอกซิล ($LOO^{\cdot}$) และลิพิดเปอร์ออกไซด์ ($LOOH$) รวมไปถึงไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจนซิงเกิล (ROS) เป็นต้น ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสามารถใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสารที่ทำให้อนุมูลอิสระเสถียรขึ้น [12] โดยพบว่าในพืชเป็นแหล่งของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดต่างๆ เช่น อัลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ ลิกนิน และแทนนิน เป็นต้น รวมไปถึงฟีนอลและฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารที่พบมากในผลไม้ ผัก และพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ [13] และยังสามารถใช้เป็นสารชะลอความชราได้ [14] โดยพืชสมุนไพรส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นยาพื้นบ้านสำหรับการรักษาโรคที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันและโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง และเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีและมีประสิทธิภาพ [15] นอกจากนี้แล้วยังไม่มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับตำรับยาอัคคินิวคณาในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์

ด้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแคแทนนินอยด์ ด้วยเทคนิค HPLC รวมไปถึงการศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับองค์ประกอบทางเคมีในตำรับยาอัครินี้วคณะ

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การเตรียมตำรับยาและการสกัด

ตำรายาอัครินี้วคณะใช้ผงเครื่องยาได้แก่ กัญชา 1.85 กรัม โสม 1.85 กรัม เปลือกอบเชย 3.70 กรัม ใบกระวาน 3.70 กรัม กานพลู 3.70 กรัม สะค้าน 3.70 กรัม ชิงแห้ง 5.55 กรัม เจตมูลเพลิง 7.40 กรัม ดีปลี 7.40 กรัม และน้ำตาลกรวด 11.11 กรัม [4] ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำตำรับยาอัครินี้วคณะ 20 กรัม แล้วเติม 95% เอทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำมาสกัดด้วยเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เป็นเวลา 30 นาที (สกัดซ้ำ 3 ครั้ง) นำสารละลายมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ จะได้ร้อยละผลผลิตสารสกัดเท่ากับ 11.45

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

2.2.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจะใช้วิธี Folin-Ciocalteu ในการทดสอบจะผสมสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรกับ Folin-Ciocalteu ร้อยละ 10 จำนวน 100 ไมโครลิตร ในภาตหลอดชนิด 96 หลุม บ่มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Sodium Carbonate ร้อยละ 7 จำนวน 80 ไมโครลิตรบ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader ผลที่ได้จะแสดงผลในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g Extract) [16]

2.2.2 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดในแต่ละตัวอย่างจะใช้ปฏิกิริยาระหว่างสารละลายตัวอย่างผสมกับ $AlCl_3$ ร้อยละ 2 ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ในภาตหลอดชนิด 96 หลุม บ่มเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader โดยแสดงผลในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของเคอควิทินต่อกรัมสารสกัด (mg QE/g Extract) [17]

2.2.3 การหาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ด้วย

เทคนิค HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu Prominence-I LC-2030C 3D; Kyoto, Japan) ด้วย Column Unisol C18, 5 μ m Particle Size, 250x4.6 mm (Torrance, Ca, USA) โดยใช้ Mobile Phase ที่เป็นส่วนผสมระหว่าง Acetic Acid ร้อยละ 1 (โดยปริมาตร) ในน้ำปราศจากไอออน (Solvent A) และ Acetonitrile (Solvent B) ซึ่งใช้ระบบ Gradient Program เริ่มจาก 0-5 นาที, Solvent B ร้อยละ 5; จาก 5-15 นาที, Solvent B ร้อยละ 9; จาก 15-22 นาที, Solvent B ร้อยละ 11; จาก 22-38 นาที, Solvent B ร้อยละ 18; จาก 38-43 นาที, Solvent B ร้อยละ 23; จาก 43-44 นาที, Solvent B ร้อยละ 90; จาก 44-45 นาที, Solvent B ร้อยละ 80; จาก 45-55 นาที, Isocratic ที่ Solvent B ร้อยละ 80; จาก 55-65 นาที, Re-Equilibration ที่ Solvent B ร้อยละ 5; Linear Gradient จาก 65-70 นาที Solvent B ร้อยละ 5 ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อ นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส และฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้ UV-diode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สำหรับสารกลุ่ม Hydroxybenzoic Acids และ 320 นาโนเมตร สำหรับสารกลุ่ม Hydroxycinnamic Acids รวมไปถึง

370 นาโนเมตร สำหรับสารกลุ่ม Flavonols ซึ่ง HPLC Chromatogram ของสารตัวอย่างจะถูกเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่เวลาเดียวกัน [18]

2.2.4 การหาปริมาณแคนนาบินอยด์ด้วยเทคนิค HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D; Kyoto, Japan) ด้วย Column Shimadzu NexLeaf CBX for Potency C18, 2.7 μ m Particle Size, 150x4.6 mm (Columbia, MD, USA) โดยใช้ Mobile Phase ที่เป็นส่วนผสมระหว่าง H_3PO_4 ร้อยละ 0.085 (โดยปริมาตร) ในน้ำ (Solvent A) และ H_3PO_4 ร้อยละ 0.085 (โดยปริมาตร) ใน Acetonitrile (Solvent B) ซึ่งใช้ระบบ Gradient Program เริ่มจาก 0-3 นาที, Solvent B ร้อยละ 70; จาก 3-7 นาที, Solvent B ร้อยละ 85; จาก 7-8 นาที, Solvent B ร้อยละ 95; จาก 8-12 นาที, Solvent B ร้อยละ 70 ที่อัตราการไหล 1.6 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส และฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยใช้ UV-diode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ซึ่ง HPLC Chromatogram ของสารตัวอย่างจะถูกเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแคนนาบินอยด์ที่เวลาเดียวกัน [19]

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.3.1 วิธี DPPH radical-scavenging

ผสมสารสกัด 100 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้นสุดท้าย 10-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิ ลิตร) กับสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 200 มิลลิโมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร ในภาดหลุดชนิด 96 หลุม (96 Well Plate) โดยทำการบ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader โดยใช้สารโทรลอกซ์

(Trolox) เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก คำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งของ DPPH ดังสมการที่ (1) และค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ร้อยละ 50 (50% Inhibition Concentration; IC_{50}) [20]

$$DPPH \text{ inhibition (\%)} = \frac{ABS_{control} - ABS_{sample}}{ABS_{control}} \times 100 \quad (1)$$

โดยที่

$ABS_{control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

ABS_{sample} = ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่าง

2.3.2 วิธี ABTS radical-scavenging

2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonic Acid) (ABTS) จะถูกทำให้เป็นอนุมูลอิสระด้วย Potassium Persulfate (2.45 มิลลิโมลาร์) ในน้ำ กลั่น บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนการใช้งาน ผสมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 100 ไมโครลิตร กับสารละลาย 7 มิลลิโมลาร์ $ABTS^{+}$ 100 ไมโครลิตร ในภาดหลุดชนิด 96 หลุม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ 734 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader และใช้สาร Trolox เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก คำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งของ ABTS ดังสมการที่ (2) และค่า IC_{50} [20]

$$ABTS \text{ inhibition (\%)} = \frac{ABS_{control} - ABS_{sample}}{ABS_{control}} \times 100 \quad (2)$$

โดยที่

$ABS_{control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

ABS_{sample} = ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่าง

2.3.3 วิธี Ferric reducing/antioxidant power (FRAP)

สารละลาย FRAP ถูกเตรียมโดยการผสมระหว่าง 300 มิลลิโมลาร์ Acetate Buffer pH 3.6, 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl และ 20 มิลลิโมลาร์ $FeCl_3$ ในอัตราส่วน 10:1:1 โดยปริมาตร

หลังจากนั้นนำสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย FRAP 80 ไมโครลิตร ในสภาพหลอดชนิด 96 หลุม บ่มเป็นเวลา 4 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader โดยใช้สาร Trolox เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก ผลที่ได้จะแสดงผลในหน่วยมิลลิโมลต่อ 100 กรัมสารสกัด (mmol/100 g Extract) [21]

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลต่างๆ จะถูกแสดงในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยจะใช้ one-way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี Tukey's test ของปริมาณสารสำคัญและความแตกต่างด้วยวิธี t-Test ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) รวมไปถึงการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ด้วยเทคนิค Pearson's Correlation ด้วยโปรแกรม SPSS 26.0

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 องค์ประกอบทางเคมี

3.1.1 ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม

จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยาอค์คินีวคณะโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic Acid โดยมีสมการเส้นตรง เท่ากับ $y = 0.0351x - 0.0334$ และมีค่า $R^2 = 0.9987$ พบว่าสารสกัดตำรับยามีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 83.36 ± 1.76 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Quercetin โดยมีสมการเส้นตรงเท่ากับ $y = 0.0375x + 0.0831$ และมีค่า $R^2 = 0.9990$ พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 23.53 ± 0.25 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อกรัมสารสกัด

3.1.2 ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค HPLC

ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก 9 ชนิด ได้แก่ Gallic Acid, Protocatechuic Acid, *p*-Hydroxybenzoic Acid, Vanillic Acid, Syringic Acid, Chlorogenic Acid, Sinapinic Acid, *p*-Coumaric Acid และ Ferulic Acid และฟลาโวนอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ Rutin และ Quercetin ซึ่งสารทั้ง 11 ชนิดเป็นสารที่พบในชีววิถีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิใน Shikimate Biosynthetic Pathway [22] พบว่าตำรับยาอค์คินีวคณะมีปริมาณฟีนอลิกสัมพันธ์เท่ากับ 1804.14 ± 4.86 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด โดยพบว่ามีปริมาณฟีนอลิกอยู่ในช่วง 102.93 ถึง 392.67 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด ซึ่งมีปริมาณ Gallic Acid มากที่สุด (392.67 ± 1.92 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด) แต่ตรวจไม่พบ Chlorogenic Acid และ Sinapinic Acid ในตำรับยานี้ดังตารางที่ 1 ซึ่งสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีความสำคัญในการยับยั้งอนุมูลอิสระจากความสามารถในการให้อะตอมของไฮโดรเจนให้กับอนุมูลอิสระ [23]

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค HPLC

สารสำคัญ	ปริมาณฟีนอลิก และ	
	ฟลาโวนอยด์	
	(μg/g Extract)	
Gallic Acid	392.67 ± 1.92^a	
Protocatechuic Acid	143.59 ± 0.45^f	
<i>p</i> -Hydroxybenzoic Acid	110.44 ± 1.35^h	
Vanillic Acid	213.38 ± 0.78^d	
Syringic Acid	102.93 ± 0.50^j	
Chlorogenic Acid	ND	
Sinapinic Acid	ND	
<i>p</i> -Coumaric Acid	125.70 ± 0.08^g	
Ferulic Acid	146.83 ± 0.33^e	
Rutin	268.80 ± 0.97^c	
Quercetin	299.79 ± 0.67^b	
ปริมาณสัมพันธ์	1804.14 ± 4.86	

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษหมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ ND คือตรวจไม่พบ

3.1.3 ปริมาณแคนนาบินอยด์ด้วยเทคนิค HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในสารสกัดตำรับยาอค์คินีวคณะ 10 ชนิด ได้แก่ Cannabidivarin (CBDV), Cannabidiolic Acid (CBDA), Cannabigerolic Acid (CBGA), Cannabigerol (CBG), Cannabidiol (CBD), Tetrahydrocannabivarin (THCV), Cannabinol (CBN), Delta-9-tetrahydrocannabinol (d9-THC), และ Tetrahydrocannabinolic Acid (THCA) Cannabichromene (CBC) พบว่ามีปริมาณแคนนาบินอยด์สัมพันธ์เท่ากับ 8130.00 ± 35.59 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด โดยพบ CBDV, CBGA, CBN, d9-THC และ CBC ที่มีปริมาณแสดงดังตารางที่ 2 โดยที่มีปริมาณ d9-THC สูงที่สุดเท่ากับ 5080.00 ± 32.66 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด โดยมีรายงานว่า d9-THC สามารถยับยั้งความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากไฮโดรเปอร์ออกไซด์ได้ [24] และฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ดี [25] อีกทั้งมีการรายงานว่ามีสารในกลุ่มแคนนาบินอยด์ได้แก่ CBG, CBD, d9-THC, CBN, CBGA CBDA และ d9-THCA มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS, DPPH, ORAC, Beta-Carotene CUPRAC และ FRAP [26]

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ด้วยเทคนิค HPLC

สารสำคัญ	ปริมาณแคนนาบินอยด์ ($\mu\text{g/g}$ Extract)
CBDV	1000.00 ± 0.00^c
CBDA	ND
CBGA	396.67 ± 4.71^e
CBG	ND
CBD	ND
THCV	ND
CBN	563.33 ± 9.43^d
d9-THC	5080.00 ± 32.66^a
CBC	1090.00 ± 0.00^b

สารสำคัญ	ปริมาณแคนนาบินอยด์ ($\mu\text{g/g}$ Extract)
THCA	ND
ปริมาณสัมพันธ์	8130.00 ± 35.59

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษหมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ ND คือตรวจไม่พบ

3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาอค์คินีวคณะด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่าสารสกัดตำรับยาอค์คินีวคณะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 56.30 ± 0.29 และ 23.39 ± 0.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 3 และการวัดความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+} (FRAP) พบว่าตำรับยาอค์คินีวคณะมีค่า FRAP เท่ากับ 448.01 ± 5.72 มิลลิโมลต่อ 100 กรัมสารสกัด แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาอค์คินีวคณะยังคงมีฤทธิ์น้อยกว่า Trolox ที่เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก เมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าตำรับยาอค์คินีวคณะมีฤทธิ์ที่ดีมาก (Strongly Active; IC_{50} 10-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) [27] และจัดอยู่ในฤทธิ์ปานกลางเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH (Moderately Active; IC_{50} >50-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) [27] นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาปลูกโพธาดูที่เป็นยาอายุวัฒนะโดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 83.59 ± 0.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [28] และตำรับยาประสะขมิ้นอ้อย ซึ่งมีค่า ED_{50} เท่ากับ 69.05 ± 3.85 และ 88.48 ± 1.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ตามลำดับ [29] ซึ่งพบว่าการศึกษานี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าตำรับยาดังกล่าว เมื่อวิเคราะห์ตำรับยาอค์คินีวคณะโดยมีเจตมูลเพลิง 4 ส่วน และติปลี 4 ส่วน เป็นตัวยาลึกซึ่งพบว่า เจตมูลเพลิงมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีด้วยค่า ED_{50}

เท่ากับ 24.58 ± 1.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม แต่ในดีปซี ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อย ($ED_{50} > 100$) [30] อย่างไรก็ตามสมุนไพรทุกตัวมีสารสำคัญที่มีความสามารถช่วยในการส่งเสริมหรือกระตุ้นออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตำรับนี้ได้

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตำรับยาอัคคินิวคณะ

วิธี	สารสกัดตำรับยา อัคคินิวคณะ	Trolox
DPPH; IC_{50} ($\mu g/ml$)	56.30 ± 0.29^b	4.89 ± 0.03^a
ABTS; IC_{50} ($\mu g/ml$)	23.39 ± 0.44^b	2.97 ± 0.06^a
FRAP ($mmol/100\ g$ Extract)	448.01 ± 5.72^b	2506.15 ± 13.60^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษหมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างตำรับยากับ Trolox ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.3 การวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ DPPH, ABTS และค่า FRAP) กับปริมาณสารสำคัญที่ตรวจพบในตำรับยาอัคคินิวคณะแสดงดังตารางที่ 4 พบว่า DPPH มีความสัมพันธ์กับปริมาณ Gallic Acid อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า $r = 0.999$ ซึ่ง Gallic Acid เป็นสารสำคัญที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านมะเร็ง และด้านการอักเสบ อีกทั้งยังเป็นสารที่ไม่มีความเป็นพิษ [31] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Gallic Acid มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ DPPH [32] อีกทั้ง DPPH ยังสัมพันธ์กับปริมาณ *p*-Hydroxybenzoic Acid, *p*-Coumaric Acid, Ferulic Acid และ d9-THC ในของส่วนปริมาณ TPC, TFC, Protocatechuic Acid, CBDV และ CBC มีความสัมพันธ์กับ ABTS นอกจากนี้แล้ว ปริมาณ Syringic Acid, Vanillic Acid, Rutin, Quercetin, CBDV และ CBC มีความสัมพันธ์กับ

FRAP ดังตารางที่ 4 แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสารสำคัญอื่นๆ มีความสัมพันธ์กันต่ำกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ได้ นอกจากนี้มีรายงานว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลิก [15] ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ รวมไปถึงปริมาณแคนนาบินอยด์ในตำรับยาอัคคินิวคณะเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของตำรับยาอัคคินิวคณะ

พารามิเตอร์	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)		
	DPPH	ABTS	FRAP
TPC	-0.976	0.902	0.304
TFC	-0.976	0.902	0.305
Gallic Acid	0.999*	-0.815	-0.137
Protocatechuic Acid	-0.569	0.955	0.870
<i>p</i> -Hydroxybenzoic Acid	0.827	-0.998*	-0.636
Vanillic Acid	0.643	-0.034	0.704
Syringic Acid	0.440	0.207	0.854
<i>p</i> -Coumaric Acid	0.954	-0.935	-0.384
Ferulic Acid	0.756	-0.192	0.583
Rutin	0.390	0.261	0.882
Quercetin	0.106	0.530	0.981
CBDV	-0.655	0.981	0.812
CBGA	0.655	-0.981	-0.812
CBN	0.655	-0.981	-0.812
d9-THC	0.756	-0.192	0.583
CBC	-0.655	0.981	0.812

หมายเหตุ: * หมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4. สรุป

ตำรับยาอัคคินิวคณะมีศักยภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่ามีปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์

และแคนนาบินอยด์สัมพัทธ์สูง ซึ่งมีปริมาณ Gallic Acid, Quercetin, Rutin, Vanillic Acid, CBDV, CBGA, CBN, CBC สูงและมี d9-THC สูงสุดที่เป็นสารประกอบหลัก (Major Compound) นอกจากนี้แล้วยังพบว่าปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกและปริมาณแคนนาบินอยด์ที่มีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยที่ Gallic Acid และ *p*-Hydroxybenzoic Acid มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าตำรายาอักษิณีวคณจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นข้อมูลที่ใช้สนับสนุนการใช้ตำรายาแผนไทย และสามารถนำไปพัฒนาให้เป็นเภสัชภัณฑ์ที่ดีได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาที่มีส่วนผสมของกัญชาต้องอยู่ในความควบคุมของผู้ที่มีใบประกอบโรคศิลปะ

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้สนับสนุนงบประมาณวิจัยในโครงการนักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2565 (เลขที่สัญญา 11862/2566) จากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ขอขอบคุณสาขาวิชา กัญชาเวชศาสตร์ วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ที่เอื้อเพื่อสถานที่ในการทำวิจัย บริษัท ธาราธรา คอร์ปอเรชั่น จำกัด ที่อนุเคราะห์ให้กัญชาในการทำวิจัย ขอขอบคุณนายพีรพัฒน์ สุรศิริพงษ์ และนายภัทรพล นวลผ่อง ที่ช่วยในการเตรียมตัวอย่างสารสกัดตำรายาอักษิณีวคณ

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] M. Sánchez, E. G. Burgos, I. Iglesias, R. Lozano, and M. P. G. Serranillos, "Current uses and knowledge of medicinal plants in the autonomous community of Madrid (Spain): a descriptive cross-sectional study," *BMC Complementary Medicine and Therapies*, vol. 20, no. 306, pp. 1-13, Oct. 2020.
- [2] N. Lumlerdkij, R. Boonrak, S. Booranasubkajorn, P. Akarasereenont, and M. Heinrich, "In vitro protective effects of plants frequently used traditionally in cancer prevention in Thai traditional medicine: An ethnopharmacological study," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 250, pp. 112409, Mar. 2020.
- [3] W. Kitdamrongtham, A. Manosroi, H. Akazawa, A. Gidado, P. Stienrut, W. Manosroi, W. Lohcharoenkal, T. Akihisa, and J. Manosroi, "Potent anti-cervical cancer activity: synergistic effects of Thai medicinal plants in recipe N040 selected from the MANOSROI III database," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 149, no. 1, pp. 288-296, Aug. 2013.
- [4] Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, *National Thai Traditional Remedies with Ganja*, 1st ed. Bangkok: Samchareon Phanich (Bangkok) Co., Ltd. Press, 2021.
- [5] A. S. Krzemień, S. Sip, P. Szulc, and J. C. Piontek, "Determining antioxidant activity of cannabis leaves extracts from different varieties-unveiling nature's treasure trove," *Antioxidants*, vol. 12, no. 7, pp. 1390, Jul. 2023.
- [6] M. N. Morshed, J. C. Ahn, R. Mathiyalagan, E. J. Rupa, R. Akter, M. R. Karim, D. H. Jung, D.U. Yang, D. C. Yang, and S. K. Jung, "Antioxidant activity of panax ginseng to

- regulate ROS in various chronic diseases,” *Applied Sciences*, vol. 13, no. 5, pp. 2893, Feb. 2023.
- [7] S. Pagliari, M. Forcella, E. Lonati, G. Sacco, F. Romaniello, P. Rovellini, P. Fusi, P. Palestini, L. Campone, M. Labra, A. Bulbarelli, and I. Bruni, “Antioxidant and anti-inflammatory effect of cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) bark extract after in vitro digestion simulation,” *Foods*, vol. 12, no. 3, pp. 452, Jan. 2023.
- [8] I. Mssillou, A. Agour, A. E. Ghouizi, N. Hamamouch, B. Lyoussi, and E. Derwich, “Chemical composition, antioxidant activity, and antifungal effects of essential oil from *Laurus nobilis* L. flowers growing in Morocco,” *Journal of Food Quality*, vol. 2020, pp. 1-8, Dec. 2020.
- [9] D. Daorueang, “Antioxidant activity and effect of sa-khan (*Piper*, *Piperaceae*) on the normal human proximal tubular epithelial cell line,” *Naresuan University Journal: Science and Technology*, vol. 28, no. 4, pp. 29-35, Jun. 2020.
- [10] W. Mahavorasirikul, V. Viyanant, W. Chaijaroenkul, A. Itharat, and K. Na-Bangchang, “Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 28, no. 10, pp. 55, Sep. 2010.
- [11] B. Eldhose, V. Notario, and M. S. Latha, “Evaluation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant activities of *Plumbago indica* root extract,” *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 2, no. 4, pp. 157-161, May. 2013.
- [12] S. Kalam, R. Singh, A. Mani, J. Patel, F. N. Khan, and A. Pandey, “Antioxidants: elixir of life,” *International Multidisciplinary Research Journal*, vol. 2, no.1, pp.18-34, Dec. 2012.
- [13] N. Phuyal, P. K. Jha, P. P. Raturi, and S. Rajbhandary, “Total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activities of fruit, seed, and bark extracts of *Zanthoxylum armatum* DC,” *The Scientific World Journal*, vol. 2020, pp. 1-7, Mar. 2020.
- [14] K. Chaikhong, S. Chumpolphant, P. Rangsinth, C. Sillapachaiyaporn, S. Chuchawankul, T. Tencomnao, and A. Prasansuklab, “Antioxidant and anti-skin aging potential of selected Thai plants: in vitro evaluation and in silico target prediction,” *Plants*, vol. 12, no. 1, pp. 65, Dec. 2022.
- [15] G. J. Molole, A. Gure, and N. Abdissa, “Determination of total phenolic content and antioxidant activity of *Commiphora mollis* (Oliv.) Engl. Resin,” *BMC Chemistry*, vol. 16, pp. 48, Jun. 2022.
- [16] P. Panyatip, T. Padumanonda, C. Yongram, T. Kasikorn, B. Sungthong, and P. Puthongking, “Impact of tea processing on tryptophan, melatonin, phenolic and flavonoid contents in mulberry (*Morus alba* L.) leaves: quantitative analysis by LC-

- MS/MS,” *Molecules*, vol. 27, no.15, pp. 4979, Aug. 2022.
- [17] C. Yongram, S. Thapphasaraphong, P. Mahakunakorn, B. Sungthong, R. Anorach, C. Phiphatwatcharaded, S. Katekaew, and P. Puthongking, “Inhibitory effect of leaf, bark and twig of *Dipterocarpus alatus* on the inflammation mediators, nitric oxide, PGE₂, IL-1 β and TNF- α in Macrophage RAW 264.7,” *Tropical Journal of Natural Product Research*, vol. 5, no. 2, pp. 299-303, Feb. 2021.
- [18] P. Siriparu, P. Panyatip, T. Pota, J. Ratha, C. Yongram, T. Srisongkram, B. Sungthong, and P. Puthongking, “Effect of germination and illumination on melatonin and its metabolites, phenolic content, and antioxidant activity in mung bean sprouts,” *Plants*, vol. 11, no. 21, pp. 2990, Nov. 2022.
- [19] X. Chen, H. Deng, J. A. Heise, D. P. Puthoff, N. B. Abboud, H. Yu, and J. Peng, “Contents of cannabinoids in hemp varieties grown in Maryland,” *ACS Omega*, vol. 6, no. 47, pp. 32186-32197, Nov. 2021.
- [20] C. Yongram, P. Panyatip, P. Siriparu, J. Ratha, B. Sungthong, S. Tadtong, and P. Puthongking, “Influence of maturity stage on tryptophan, phenolic, flavonoid, and anthocyanin content, and antioxidant activity of *Morus alba* L. fruit,” *Rasayan journal of chemistry*, vol. 15, no. 3, pp. 1693-1701, Jul-Sep. 2022.
- [21] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, “The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay,” *Analytical Biochemistry*, vol. 239, no. 1, pp. 70-76, Jul. 1996.
- [22] P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd ed. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd., 2009.
- [23] S. Aryal, M. K. Baniya, K. Danekhu, P. Kunwar, R. Gurung, and N. Koirala, “Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from western Nepal,” *Plants*, vol. 8, no. 4, pp. 96, Apr. 2019.
- [24] A. J. Hampson, M. Grimaldi, J. Axelrod, and D. Wink, “Cannabidiol and (-) delta 9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, vol. 95, no. 14, pp. 8268-8273, Jul. 1998.
- [25] Z. M. C. Yazici, B. Bilge, and S. Bolkent, “Anti-inflammatory potential of delta-9-tetrahydrocannabinol in hyperinsulinemia: an experimental study,” *Molecular Biology Reports*, vol. 49, no. 12, pp. 11891-11899, Dec. 2022.
- [26] A. L. Dawidowicz, M. O. Tomczyk, and R. Typek, “CBG, CBD, Δ 9-THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ 9-THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action,” *Fitoterapia*, vol. 152, pp. 104915, Jul. 2021.
- [27] S. Phongpaichit, J. Nikom, N. Rungjindamai, J. Sakayaroj, N. Hutadilok-Towatana, V. Rukachaisirikul, and K. Kirtikara, “Biological

- activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants,” *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 51, no. 3, pp. 517–525, Dec. 2007.
- [28] P. Pratumyam, K. Lairungruang, P. Thimkorn, S. Obhasi, and S. Sangvichien, “Antioxidant activities and total phenolic contents of plook fai thatu remedy,” *Journal of Traditional Thai Medical Research*, vol.9, no.1, pp. 13-27, Jan-Jun. 2023.
- [29] K. Ouncharoen and W. Leelananthakul, “Antioxidant and anti-inflammatory activities of Prasa Khamin-Oi remedy and its herbal components,” *Journal of Khon Kaen Provincial Health Office*, vol. 4 no. 2, pp. 225-238, Jul-Dec. 2022.
- [30] C. Threrapanithan, N. Jaiaree, A. Itharat, S. Makchuchit, P. Thongdeeying, and S. Panthong, “Anti-inflammatory and antioxidant activities of the Thai traditional remedy called “Leard-ngam” and its plant ingredients,” *Thammasat Medical Journal*, vol. 15, no. 3, pp. 376-383, Jul-Sep. 2015.
- [31] S. H. Nam, J. Park, W. Jun, D. Kim, J. A. Ko, A. M. Abd El-Aty, J. Y. Choi, D. I. Kim, and K. Y. Yang, “Transglycosylation of gallic acid by using *Leuconostoc* glucansucrase and its characterization as a functional cosmetic agent,” *AMB Express*, vol. 7 no. 1, pp. 224, Dec 2017.
- [32] M. A. Awang, M. A. Z. Benjamin, A. Anuar, M. F. Ismail, S. D. Ramaiya, and S. N. A. M. Hashim, “Dataset of gallic acid quantification and their antioxidant and anti-inflammatory activities of different solvent extractions from *Kacip Fatimah* (*Labisia pumila* Benth. & Hook. f.) leaves,” *Data Brief*. vol. 5, no. 51, pp.109644, Dec. 2023.