

ฤทธิ์ทางชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรไทยกระชายขาว

(*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf)

Biological Activity and Bioactive Compound of Thai Medicinal Plant

Boesenbergia rotunda (L.) Mansf.

สุนทรต์ ชูลักษณ์ (Sunthorn Chooluck)* บุษราคัม ป้อมทอง (Busarakum Pomthong)**
ณัฐพัฒน์ สามีพิมพ์ (Natapat Sapim)*** วิหุดา จันทร์ข้างแรม (Wichuda Jankangram)^{1****}

(Received: March 15, 2023; Revised: May 22, 2023; Accepted: May 23, 2023)

บทคัดย่อ

กระชายขาว (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ เมื่อเทียบกับยาที่สังเคราะห์ทางเคมีแล้วการใช้ยาสมุนไพรในด้านสุขภาพให้ประสิทธิผลที่ดีและมีความปลอดภัยสูง ในการวิจัยนี้ศึกษาผลของเวลาในการสกัดต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณโปรตีนจากกระชายขาวแห้งบดละเอียด จากวิสาหกิจชุมชนจังหวัดสระแก้ว ด้วยวิธีการแช่หมักในเอทานอลนาน 3 6 9 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดเมื่อสกัดนาน 3 ชั่วโมง (6.80 ± 0.07 mg GAE/g DW) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดเมื่อทำการสกัดนาน 12 ชั่วโมง (2.14 ± 0.02 mg QE/g DW) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อสกัดนาน 24 ชั่วโมง ($80.2 \pm 0.7\%$ inhibition) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อสกัดนาน 3 ชั่วโมง ($87.68 \pm 0.34\%$ inhibition) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay พบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 64.70 ± 15.28 μ g/ml เมื่อสกัดนาน 24 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford พบว่าสูงสุดเมื่อสกัดนาน 24 ชั่วโมง (12.22 ± 0.32 mg BSA/g DW) และพบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุดเมื่อสกัดนาน 3 ชั่วโมง ($67.33 \pm 0.85\%$ inhibition)

¹Corresponding author: wichudajan@buu.ac.th

*อาจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Lecturer, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University

**อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

Teacher, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University

***นิสิต หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Student, Bachelor of Science Degree, Program Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University

****ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

Assistant Professor, Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University, Sa Kaeo Campus

ABSTRACT

Boesenbergia rotunda (L.) Mansf., more often known as white galangale, is a medicinal plant with bioactive compounds able to inhibit free radicals. Using alternative herbal medications offers good efficacy as well as great safety for health compared to chemically manufactured drug treatments. In this research, antioxidant capacity, total phenolic content, flavonoid content and tyrosinase inhibitory assay of *B. rotunda* (L.) Mansf. were studied in relation to extraction duration. Ground, dried white galangale obtained from Sa Kaeo Province cooperatives were extracted by ethanolic maceration for 3, 6, 9, 12, and 24 hours respectively. The total phenolic content of all extracts were determined and extraction for 3 hour has the highest value (6.80 ± 0.07 mg GAE/g DW). Extraction for 12 hours yielded the highest total flavonoid content (2.14 ± 0.02 mg QE/g DW). Extraction for 24 hours resulted in the maximum antioxidant activity ($80.2 \pm 0.7\%$ inhibition) with the ABTS assay while extraction for 3 hours appears to possess the highest antioxidant activity ($87.68 \pm 0.34\%$ inhibition) for DPPH assay. The most powerful reducing ability of 64.70 ± 15.28 g/ml was found after 24 hours of extraction using a potassium ferricyanide reducing power test. Bradford assay revealed that 24 hour extracts contain highest protein content (12.22 ± 0.32 mg BSA/g DW). The tyrosinase inhibitory activity was also analyzed using dopachrome method. The results suggested that 3 hour extracts possessed the highest inhibitory effect ($67.33 \pm 0.85\%$ inhibition).

คำสำคัญ: กระชายขาว สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Keywords: *Boesenbergia rotunda* (L.), Biological activity, Antioxidant activity

บทนำ

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรไทย มาใช้อย่างแพร่หลาย ทั้งในการแพทย์ เวชสำอาง และสุขภาพ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี ตามที่องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ระบุไว้ว่าประมาณ 80% ของประชากรโลก อาศัยการใช้อยาสมุนไพรในการดำรงชีวิต [1] สมุนไพรเหล่านี้มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้และเมื่อเทียบกับยาที่สังเคราะห์ทางเคมีแล้วการใช้ยาสมุนไพรช่วยในด้านสุขภาพนอกจากจะมีความปลอดภัยสูงและมีประสิทธิภาพที่ดี [2] กระชายขาว (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) เป็นสมุนไพรไทยที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น เป็นสายพันธุ์ซึ่งอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae และเติบโตในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย ศรีลังกา และจีนตอนใต้ [3] เป็นไม้ล้มลุกที่มีลำต้นสั้นแทนที่ด้วยฝักเทียมที่ประกอบด้วยกาบใบและสามารถเติบโตได้สูงได้ถึง 50 ซม. มีใบเป็นรูปไข่หรือทรงยาว 3-4 ใบ กว้าง 7-11 ซม. ยาว 25-50 ซม. เหง้ามีสีน้ำตาลอ่อนด้านนอกและด้านในสีเหลือง มีลักษณะกลมรีมีกลิ่นหอมมาก พืชนี้เป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ น้ำมันหอมระเหย และโพลีฟีนอล เหง้าจะถูกนำมาใช้เป็นเครื่องเทศ สารแต่งกลิ่น สีข้อม และยาแผนโบราณ [4] สมบัติทางพฤกษเคมีของ *Boesenbergia rotunda* ได้แก่ ต่อด้านโรคภูมิแพ้ [5] ด้านแบคทีเรีย [6] ด้านมะเร็ง [7] ด้านการอักเสบ [8] ด้านอนุมูลอิสระ [9] กิจกรรมต่อต้านไวรัสริบ [10] และการรักษาบาดแผล [11] จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ด้านการแพทย์ ด้านอุตสาหกรรมเวชสำอาง เป็นต้น จึงมีการศึกษาวิธีการสกัดและวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรกันอย่างแพร่หลาย การสกัดสารจากสมุนไพรมีหลายวิธีที่นิยมใช้กัน เช่น การแช่

ในตัวทำละลาย การให้ตัวทำละลายไหลผ่าน การย่อย การสกัดด้วยวิธีการขง และการสกัดด้วยการต้มในน้ำเดือด แต่ละวิธีก็จะมีข้อจำกัด ข้อดี ข้อเด่น แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดหรือส่วนของสมุนไพรที่นำมาสกัด ความเสถียรของสารที่สนใจในสมุนไพร และการทำให้ปลอดภัยก่อนนำไปใช้ ดังนั้นจึงนิยมใช้การสกัดด้วยสารที่ปลอดภัย เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ง่ายและราคาถูก ได้แก่ การศึกษาโดยอัญชลี (2556) [12] ได้ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในกระชายดำโดยการสกัดด้วยเอทานอล พบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจหลายอย่าง มีความปลอดภัยสูง และมีการพัฒนามาตรฐานของวัตถุบริสุทธิ์สมุนไพร พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพรได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารสกัดกระชายเหลืองแห้ง [13] กระชายขาว [14] ด้วยเอทานอล พบว่าสารสกัดที่ได้มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS สูง

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในสมุนไพรชนิดอื่นๆ ด้วยเอทานอล เช่น มีการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในกะเม็ง พบว่ากะเม็งที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ โดยการสกัดแบบแช่หมักพบสารสำคัญ คือ wedelolactone จัดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มควาลิโนและแทนนิน [15] เช่นเดียวกันกับงานวิจัยที่ได้ศึกษาการสกัดกะเม็งแห้งด้วยตัวทำละลายเมทานอล โดยการสกัดแบบแช่พบสารสำคัญในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ควาลิโน วงแลกโตน สเตอรอยด์และไตรเทอร์ปีนอยด์ [16] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrsoiflorum* และ Jumbo 4320 ได้ถูกนำมาสกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเอทิลอะซิเตท จากการตรวจสอบสารพฤษเคมีของสารสกัดโหระพาไทยทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า สารสกัดน้ำสายพันธุ์ Jumbo 4320 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด สูงสุดที่ $4,596.19 \pm 3.07 \mu\text{gGAE/g DW}$ ตามด้วยสารสกัดเอทานอลและสารสกัด เอทิลอะซิเตท ตามลำดับ จากการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า สารสกัดเอทานอล สายพันธุ์ Jumbo 4320 มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดที่ $5,571.16 \pm 14.27 \mu\text{gC/g DW}$ ตามด้วยสารสกัดเอทิลอะซิเตทและสารสกัดน้ำตามลำดับ ในส่วนของคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโหระพาไทย ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH, FRAP และ DCFH-DA พบว่า สารสกัดน้ำสายพันธุ์ Jumbo 4320 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงสุดที่ค่า $\text{IC}_{50} 48.52 \pm 1.15 \text{ mgDW/ml}$ ตามด้วย สารสกัดเอทานอลและสารสกัดเอทิลอะซิเตท โดยสารต้านอนุมูลอิสระอ้างอิงมาตรฐาน BHT และ กรดแอสคอร์บิก มีค่า $\text{IC}_{50} 0.18$ และ 0.06 mg/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม สารสกัดเอทานอลสายพันธุ์ *thyrsoiflorum* แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP สูงสุดที่ค่า $18.64 \pm 0.13 \mu\text{MFe}^{2+}/\text{g DW}$ ตามด้วยสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทิลอะซิเตท สารสกัดโหระพาทั้งสองสายพันธุ์มีศักยภาพในการพัฒนาให้เป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อสุขภาพได้ [17]

และมีการวิจัยการพัฒนากระบวนการเตรียมสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยผลสรุปการคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยการสกัดพืชสมุนไพรด้วยวิธีการแช่หมักในเอทานอล พบว่าสารสกัดแก่นฝางและสารสกัดผลมะขามป้อมมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดผลสมอไทย สารสกัดผลสมอพิเภก และสารสกัดลำต้นบอระเพ็ด เนื่องจากมีปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกรวมสูงถึง 699.68 ± 27.77 และ $369.42 \pm 4.40 \text{ mg GAE/g DW}$ ตามลำดับ และต้านอนุมูลอิสระสูง $\text{IC}_{50} 5.13 \pm 0.62$ และ $5.18 \pm 0.56 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด นี้ไปสกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท เพื่อคัดเลือกว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการเตรียมสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งผลปรากฏว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายเหมาะสมต่อกระบวนการเตรียมสารสกัดแก่นฝางและสารสกัดผลมะขามป้อมที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และเอทานอล เป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษต่ำราคาถูก จึงมีความเหมาะสมต่อสกัดสารออกฤทธิ์จากแก่นฝางและผลมะขามป้อมในระดับอุตสาหกรรมและชุมชนเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรและเพิ่มความหลากหลายในการใช้

ประโยชน์ทางเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาฤทธิ์ในเชิงลึกที่เกี่ยวกับโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง [18] กระจายขาวเป็นพืชสมุนไพรอินทรีย์ ที่ได้รับความนิยมและที่มีมูลค่าการส่งออกสูงเป็นลำดับต้นๆ ของจังหวัดสระแก้ว ทั้งยังพบว่ามีความสำคัญปริมาณสูง และยังพบว่าฤทธิ์ต้านโควิด-19 สูงมากด้วย จึงเป็นที่ต้องการของตลาด

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากเหง้ากระจายขาวคผง ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของวิสาหกิจชุมชนสมุนไพรฟาร์มจันทูล จังหวัดสระแก้ว โดยการสกัดด้วยเอทานอล เป็นเวลา 3 6 9 12 และ 24 ชั่วโมง

2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetric method ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay, ABTS radical scavenging assay และ potassium ferricyanide reducing power assay

วิธีการดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างกระจายขาวที่ใช้ทดสอบ

กระจายขาว *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. พงแห้งจากส่วนเหง้าโดยได้รับความอนุเคราะห์มาจากวิสาหกิจชุมชนสมุนไพรฟาร์มจันทูล จังหวัดสระแก้ว

การเตรียมสารสกัดหยาบจากกระจายขาวด้วยเอทานอล 95 %

นำตัวอย่างผงแห้งจากส่วนเหง้าของกระจายขาว 1 กรัม ไปแช่หมัก (maceration) ในเอทานอล 95% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 6 9 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วเก็บส่วนใส (สารสกัดตัวอย่าง) ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay

ใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999 [19] โดยนำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเติมโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มสารในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร จากนั้นจึงคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง คำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากสมการ $C = cV/m$ เมื่อ C = ปริมาณโพลีฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g) c = ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง เทียบกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (mg/ml) V = ปริมาตรของสารสกัดตัวอย่าง (ml) m = น้ำหนักของตัวอย่างผงแห้งที่ใช้สกัด (g)

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay

โดยนำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมเอทานอล 95% ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมอลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มสารในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบ

กับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเคอควิทิน (Quercetin) ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอควิทินต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Chandra S, Khan S, Avula B, Lata H, Yang MH, ElSohly MA, et al, 2014 [20]

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

โดยเตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ละลายด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ อัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS ด้วยสารละลายเอทานอลให้มีความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.7 ± 0.02 จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเติมเอทานอล 95% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS^{•+} ปริมาตร 1500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที นำสารไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเทียบกับวิตามินซี [21] คำนวณเป็น % inhibition = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$ โดยที่ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมของ ABTS ที่ผสมกับเอทานอล (control) A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ ABTS

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

โดยการเตรียมสารละลาย 2,2- diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH) ในเอทานอลความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ เก็บในที่มืด จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่าง 1000 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดตัวอย่างเทียบกับวิตามินซี คำนวณเป็น DPPH radical scavenging assay (%) = $[A_0 - A_1 / A_0] \times 100\%$ โดยที่ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมของ DPPH ที่ผสมกับเอทานอล (control) A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี potassium ferricyanide reducing power assay

โดยการนำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 40 ไมโครลิตร มาเติม phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ (0.1 mM, pH 6.6) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเติม 1% Potassium ferricyanide 1% ($K_3Fe(CN)_6$) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที จากนั้นนำมาผสมกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้น 10 % (w/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 1000 rpm นาน 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนบน 500 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร เติม ferric chloride ($FeCl_3$) ความเข้มข้น 1% (w/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน [22]

การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยนำสารสกัดตัวอย่างที่สกัดปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 0.1 โมลาร์ Potassium phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์ mushroom tyrosinase (0.1 unit/ml) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 10 นาที แล้วเติม L- 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในสารละลาย 0.1 M Potassium phosphate buffer (pH 6.8) เป็น substrate ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร จากนั้นนำมาคำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส [23] % Tyrosinase Inhibition = $[(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

โดยทำการเจือจาง Protein assay dye reagent concentrate (Commercial product, Bio-rad) 5 เท่าด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างมา 20 ไมโครลิตร แล้วเติม Protein assay dye reagent ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ใช้สาร Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน [24]

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Pearson's Correlation Coefficient, 2008)

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ เป็นเทคนิคทางสถิติในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไป (หรือข้อมูล 2 ชุดขึ้นไป) ว่ามีความสัมพันธ์กันในระดับใด และมีความสัมพันธ์ในทิศทางใด โดยใช้การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson Correlation) ค่าที่ใช้วัดความสัมพันธ์เรียกว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics content)

ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric assay พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 5.20 – 6.79 mgGAE /g DW โดยจะพบมากที่สุดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (6.79 ± 0.14 mgGAE /g DW) จะเห็นได้ว่าระยะเวลาที่เหมาะสมที่สกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ที่ 3 ชั่วโมง โดยมีรายงานว่า การใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดนั้นจะส่งผลให้สกัด secondary metabolites ที่มีขั้วได้ดี [25] สารสำคัญที่ละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกับเอทานอลได้ดี และโดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันกลุ่มหลักในสมุนไพรต่างๆ [26] นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกยังมีหมู่ฟีนอลบนวงเบนซีน [27] ซึ่งสามารถให้อิเล็กตรอน หรือไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ จึงช่วยยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งมีสมบัติในการต้านออกซิเดชันที่ดี เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์สามารถให้อิเล็กตรอน หรือไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวมากขึ้น จึงช่วยยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ [28] จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดสมุนไพรกระชายขาว พบมีค่าอยู่ระหว่าง 1.00 – 2.14 mgQE/g DW โดยจะพบมากที่สุดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (2.14 ± 0.02 mgQE/g DW) ตามด้วยเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (2.13 ± 0.03 mgQE/g DW)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดสมุนไพรกระชายขาว ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่ามีค่า % inhibition ของสารสกัดสมุนไพรกระชายขาวเจือจาง 10 เท่า อยู่ในระดับ 80.00 ถึง 87.68% โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ($87.68 \pm 0.33\%$ inhibition) ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 3

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect assay

พบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (80.20 ± 0.73 % inhibition) ตามด้วยเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (78.97 ± 0.36 % inhibition) เมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 9 และ 12 ชั่วโมงมีค่าระหว่าง ($77.00 - 78.20$ % inhibition) และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (74.21 ± 0.19 % inhibition) ผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางที่ 4

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay

ผลการวิเคราะห์พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี Vitamin C equivalent อยู่ที่ 164.70 ± 15.28 $\mu\text{g/ml}$ รองลงมาเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (152.94 ± 2.94 $\mu\text{g/ml}$) เมื่อทำการเป็นเวลา 6 และ 9 ชั่วโมงมีค่าระหว่าง $133.00 - 134.50$ $\mu\text{g/ml}$ และพบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (97.06 ± 22.97 $\mu\text{g/ml}$) ผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ABTS decolorization scavenging effect assay และ potassium ferricyanide reducing power assay พบว่าสารสกัดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ส่วนในการวิเคราะห์ DPPH radical scavenging assay สารสกัดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ซึ่งจากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี potassium ferricyanide reducing power assay บอกได้ว่าสารสกัดดังกล่าวมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระเพื่อให้อยู่ในสถานะเสถียรเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และจากการวิเคราะห์หาฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ซึ่งพบค่อนข้างสูงเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงทำให้พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถบอกได้ว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ได้ และเนื่องจากสาร ABTS กับ DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ซึ่ง ABTS ไม่เป็นสารอนุมูลอิสระธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระแต่มีข้อดีคือ ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง [32] ซึ่งต่างจากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH อนุมูลอิสระ DPPH ละลายในเอทานอลจะมีสีม่วงเมื่อสารละลาย DPPH เข้าทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปรีดิวซ์ อนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง [33]

การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดสมุนไพรกระชายขาวด้วยวิธี Dopachrome [34] ซึ่งพบร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 3 และ 24 ชั่วโมง (67.32 ± 0.85 และ 66.61 ± 0.86 % inhibition) ตามลำดับ ตามด้วยเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (63.73 ± 3.07 % inhibition) และ 9 ชั่วโมง (61.42 ± 0.88 % inhibition) และร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำสุดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (56.11 ± 1.53 % inhibition) ผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางที่ 6 สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ทั้งสารสังเคราะห์และสารที่พบในธรรมชาติซึ่งอาจเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ เทอร์ปีนสเตอรอยด์ กรดคาร์บอกซิลิก กรดไขมัน คูมาริน สเติลบินไบไพเพอริดิน ไอโซคูมาริน รวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปวิตามินซีและวิตามินอี ในทางชีวเคมี [35] และจากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าสมุนไพรกระชายขาวมีปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิก

และฟลาโวนอยด์ที่ค่อนข้างสูงจึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยมีรายงานกล่าวไว้ว่าสารในกลุ่มนี้มีความสามารถในการลดการสร้างเม็ดสีจากการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยตรง [36]

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

พบปริมาณโปรตีนสูงสุดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (12.22 ± 0.32 mg/g DW) ตามด้วยเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (10.01 ± 0.65 mg/g DW) และที่ทำการสกัดเป็นเวลา 6 และ 9 ชั่วโมงมีค่าอยู่ระหว่าง ($7.90 - 8.60$ mg/g DW) และพบปริมาณโปรตีนต่ำสุดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (4.39 ± 0.39 mg/g DW) ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 7 มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณโปรตีนในพืชผลของขนาดของเพปไทด์ต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยที่เพปไทด์ที่มีขนาดเล็กมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเพปไทด์ขนาดใหญ่ โปรตีนไฮโดรไลเซตจาก African yam bean ไฮโดรไลซ์ด้วย alcalase ได้เพปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 1 kDa มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ ferric reducing power และการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH และ hydroxyl สูงกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดมากกว่า 1 kDa [37]

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlation analysis)

ทำการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) เป็นเทคนิคทางสถิติในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง TPC, TFC, DPPH, ABTS⁺ และ RPA ในสารสกัดกระชายขาว (ตารางที่ 8) ผลจากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ในสารสกัดกระชายขาว พบว่า TPC และ TFC มีความสัมพันธ์ปานกลางในเชิงบวก โดยมีค่า ($r = 0.7048025$) ในขณะที่ TPC และ DPPH assay มีความสัมพันธ์กันมากในเชิงลบ โดยมีค่า ($r = -0.9395565$) ส่วน TPC และ ABTS assay มีความสัมพันธ์กันมากในเชิงบวก โดยมีค่า ($r = 0.8245139$) และ TPC กับ RPA มีความสัมพันธ์กันมากในเชิงบวก โดยมีค่า ($r = 0.8416143$) TFC และ DPPH assay มีความสัมพันธ์กันมากในเชิงลบ โดยมีค่า ($r = -0.85631$) ในขณะที่ TFC และ ABTS assay มีความสัมพันธ์กันปานกลางในเชิงบวก โดยมีค่า ($r = 0.61505$) ส่วน TFC และ RPA มีความสัมพันธ์กันมากในเชิงบวก โดยมีค่า ($r = 0.850656$) จะเห็นได้ว่าสารสำคัญในกระชายขาวที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS assay และ reducing power assay ส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ (ตารางที่ 4-8) เพราะมีความสัมพันธ์กันปานกลางไปจนถึงมากในเชิงบวกเมื่อวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์เพียร์สัน ส่วนสารสำคัญในกระชายขาวที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay นั้นน่าจะเป็นสารในกลุ่มอื่น เนื่องจากมีความสัมพันธ์กันมากในเชิงลบกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (ตารางที่ 8)

สรุปผลการวิจัย

การใช้สมุนไพรนั้นมีมาตั้งแต่สมัยโบราณ ความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรมีในตำราแพทย์ตั้งแต่สมัยกรีก อินเดีย จีน นอกจากนี้ก็มีการศึกษาค้นคว้าต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน [38] [39] ถ้าจะพูดถึงประโยชน์ของสมุนไพร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแพทย์ไทยแผนโบราณ ในปัจจุบันยาต่างๆ ที่ใช้กันอยู่มีจำนวนไม่น้อยที่ได้มาจากสมุนไพรโดยตรง โดยสารองค์ประกอบหลักของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆ ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอล [40] ซึ่งพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ เปลือก ลำต้น ราก เหง้า ผล ดอก และเมล็ด งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญจากเหง้ากระชายขาวผดงและนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ในพืชในวงศ์เดียวกันพบว่าสารพฤษเคมีที่สำคัญคือสารจำพวกอัลคาลอยด์ น้ำมันหอมระเหย ฟลา

โวนอยด์ และสารประกอบฟีนอล ซึ่งส่งผลให้พืชในวงศ์นี้มีสรรพคุณทางยาที่มีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้สาร Panduratin A สามารถแสดงสมบัติเป็น anti-SARS-CoV-2 agents ได้อีกด้วย [41] จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการแพทย์แผนไทยและแผนปัจจุบันต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนบางส่วนจากคณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

1. Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*. 2014; (4): 1-10.
2. Jimenez- Garcia SN, Vazquez- Cruz MA, Ramirez- Gomez XS, Beltran- Campos V, Contreras- Medina LM, GarciaTrejo JF, et al. Changes in the content of phenolic compounds and biological activity in traditional Mexican herbal infusions with different drying methods. *Molecules*. 2020; 25(7): 1-19.
3. Tan EC, Lee YK, Chee CF, Heh CH, Wong SM, Christina Thio LP, et al. *Boesenbergia rotunda* from ethnomedicine to drug discovery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012: 1-25.
4. Ongwisetpaiboon O, Jiraungkoorskul W. Fingerroot, *Boesenbergia rotunda* and its aphrodisiac activity. *Pharmacognosy Reviews*. 2017; 11(21): 27-30.
5. Madaka F, Tewtrakul S. Anti-allergic activity of some selected plants in the genus *Boesenbergia* and *Kaempferia*. *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*. 2011; 33(3): 301-304.
6. Udomthanadech K, Vajrodaya S, Paisooksantivatana Y. Antibacterial properties of the extracts from some Zingiberaceous species in Thailand against bacteria causing diarrhea and food poisoning in human. *International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies*. 2015; 6(5): 203-213.
7. Cheah SC, Appleton DR, Lee ST, Lam ML, Hadi AHA, Mustafa M. Panduratin A inhibits the growth of A549 cells through induction of a poptosis and inhibition of NF-KappaB translocation. *Molecules*. 2011; 16(3): 2583-2598.
8. Isa N, Abdelwahab S, Mohan S, Abdul A, Sukari M, Taha M, et al. In vitro anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of boesenbergin A, a chalcone isolated from *Boesenbergia rotunda* (L.)(fingerroot). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2012; 45: 524-530.
9. Chiang M, Kurmoo Y, Khoo TJ. Chemical- and cell-based antioxidant capacity of methanolic extracts of three Commonly edible plants from Zingiberaceae family. *Free Radicals and Antioxidants*. 2017; 7(1): 57-62.
10. Wua N, Kong Y, Zu Y, Fu Y, Liu Z, Meng R, et al. Activity investigation of pinostrobin towards *herpes simplex virus-1* as determined by atomic force microscopy. *Phytomedicine*. 2011; 18(2-3): 110-118.

11. Mahmood A, Mariod AA, Abdelwahab SI, Ismail S, Al-Bayaty F. Potential activity of ethanolic extract of *Boesenbergia rotunda* rhizomes extract in accelerating wound healing in rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010; 4(15): 1570-1576.
12. Juthaputti A. Black galingale: herbal champion product. *Journal of Thai Traditional and Alternative Medicine*. 2013; 11(1): 1-118. Thai.
13. Sooksing K, Jirapakkul W. Effect of drying on flavonoid content and antioxidant capacity in fingerroots (*Boesenbergia pandurata*). In 49th Kasetsart University Annual Conference. 2011: 641-648. Bangkok, Thailand.
14. Kanjanasirirat P, Suksatu A, Manopwisedjaroen S, Munyoo B, Tuchinda P, Jearawuttanakul K, et al. High-content screening of Thai medicinal plants reveals *Boesenbergia rotunda* extract and its component Panduratin A as anti - SARS-CoV-2 agents. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 1-12.
15. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*. 2004; 74(17): 2157-2184.
16. Pitpiengchan P, Watcharothai S, Dilokkunan U, Sukatta U. Primary oxidation of Kameng. In the report of the 49th Kasetsart University Academic Conference: Science. Kasetsart University Academic Conference. 2011; 49: 432-441. The Office of the Research Fund. Thai.
17. Unsivilai R, Thetkathuk S. Research report on the properties of bioactive compounds of Thai Basil Extract, Nakhon Ratchasima : Wisdom Bank, Suranaree University of Technology. 2018. Thai.
18. Phonprapai C, Oontawee S. Development of extraction process for preparing high anti-oxidant extracts from thai herbs. *Thai Journal of Science and Technology*. 2019; 8(5): 479-492.
19. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 1999; 299: 152-178.
20. Chandra S, Khan S, Avula B, Lata H, Yang MH, ElSohly MA, et al. Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014: 1-9.
21. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999; 26(9-10): 1231-1237.
22. Jebur AB, Mokhamer MH, El-Demerdash FM. A review on oxidative stress and role of antioxidants in diabetes mellitus. *Austin Endocrinology and Diabetes Case Reports*. 2016; 1(1): 1-6.
23. Keunho J, It-sup GT. A study on the tyrosinase inhibitory and antioxidant effect of microalga extracts. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 2021; 49(2): 167-173.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72(1): 248-254.
25. Abubakar AR, Haque M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2020; 12(1): 1-10.

26. Sae-leaw T, Chantanawarangoon S, Jirapakkul W. Effect of solvent on total phenolic content and antioxidant capacity of fingerroot (*Boesenbergia pandurata*). In 6th Kasetsart University Annual Conference. 2008; 538-545. Bangkok, Thailand.
27. Hu C, Kitts DD. Studies on the antioxidant activity of echinacea root extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48(5): 1466-1472.
28. Cook NC, Samman S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 1996; 7(2): 66-76.
29. Abubakar AR, Haque M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2020; 12(1): 1-10.
30. Sae-leaw T, Chantanawarangoon S, Jirapakkul W. Effect of solvent on total phenolic content and antioxidant capacity of fingerroot (*Boesenbergia pandurata*). In 6th Kasetsart University Annual Conference. 2008: 538-545. Bangkok, Thailand.
31. Hu C, Kitts DD. Studies on the antioxidant activity of echinacea root extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48(5): 1466-1472.
32. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*; 1999; 26(9-10): 1231-1237.
33. Krushna GS, Kareem MA, Reddy VD, Padmavathi P, Hussain SA, Devi Kodihela L. *Aegle marmelos* fruit extract attenuates isoproterenol-induced oxidative stress in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2012; 50(3): 199-204.
34. Keunho J, It sup.. A study on the tyrosinase inhibitory and antioxidant effect of microalgae extracts. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 2021; 49(2): 167-173.
35. Sarkar R, Chugh S, Garg VK. Newer and upcoming therapies for melasma. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. 2012; 78(4): 417-428.
36. Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009; 10(9): 4066-4087.
37. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 2010; 31(10): 1949-1956.
38. Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 2013; 10(5): 210-229.
39. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*. 2012; 6(11): 1-5.
40. Arias A, Feijoo G, Moreira MT. Exploring the potential of antioxidants from fruits and vegetables and strategies for their recovery. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2022; 77: 1-16.
41. Kanjanasirirat P, Suksatu A, Manopwisedjaroen S, Munyoo B, Tuchinda P, Jearawuttanakul K, et al. High-content screening of Thai medicinal plants reveals *Boesenbergia rotunda* extract and its component Panduratin A as anti SARS CoV-2 agents. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 1-12.

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกระชายขาว

ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/g DW)
3	6.79 ± 0.14
6	5.47 ± 0.65
9	5.08 ± 0.31
12	5.63 ± 0.88
24	5.22 ± 0.64

ตารางที่ 2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดสมุนไพรรกระชายขาว

ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mgGAE/g DW)
3	1.84 ± 0.04
6	1.11 ± 0.01
9	1.87 ± 0.03
12	2.14 ± 0.02
24	2.13 ± 0.04

ตารางที่ 3ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ของสารสกัดสมุนไพรรกระชายขาว

ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)	Vitamin C equivalent (µg/ml)	% inhibition
3	10.30 ± 0.04	87.68 ± 0.33
6	9.65 ± 0.44	82.24 ± 3.70
9	9.44 ± 0.04	80.42 ± 0.39
12	9.44 ± 0.06	80.42 ± 0.51
24	9.44 ± 0.10	80.48 ± 0.83

ตารางที่ 4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay ของสารสกัดสมุนไพรรกระชายขาว

ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)	Vitamin C equivalent (µg/ml)	% inhibition
3	18.07 ± 0.05	74.21 ± 0.19
6	19.26 ± 0.09	78.97 ± 0.36
9	19.04 ± 0.13	78.11 ± 0.54
12	18.96 ± 0.17	77.78 ± 0.68
24	19.56 ± 0.18	80.20 ± 0.73

ตารางที่ 5 ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารสกัดสมุนไพรกระชายขาว ด้วยวิธี potassium ferricyanide reducing power assay

ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)	Vitamin C equivalent ($\mu\text{g/ml}$)
3	97.06 $\pm$ 22.97
6	134.31 $\pm$ 22.07
9	133.34 $\pm$ 12.24
12	152.94 $\pm$ 2.94
24	164.70 $\pm$ 15.28

ตารางที่ 6ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด Dichloromethane สมุนไพรกระชายขาว

ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)	Vitamin C equivalent ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition
3	368.36 $\pm$ 4.50	67.32 $\pm$ 0.85
6	349.30 $\pm$ 16.31	63.73 $\pm$ 3.07
9	337.03 $\pm$ 4.66	61.42 $\pm$ 0.87
12	308.90 $\pm$ 8.14	56.11 $\pm$ 1.53
24	364.56 $\pm$ 4.60	66.61 $\pm$ 0.86

ตารางที่ 7 ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ของสารสกัดสมุนไพรกระชายขาว สารสกัดตัวอย่างเจือจาง 10 เท่า

ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)	ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{gBSA/ml}$)	ปริมาณโปรตีน/กรัม (mg/g DW)
3	62.70 $\pm$ 5.55	4.39 $\pm$ 0.39
6	110.19 $\pm$ 7.08	8.54 $\pm$ 0.55
9	106.02 $\pm$ 7.08	7.95 $\pm$ 0.53
12	133.52 $\pm$ 8.67	10.01 $\pm$ 0.65
24	157.69 $\pm$ 4.11	12.22 $\pm$ 0.32

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง TPC TFC DPPH ABTS⁺ และ RPA ในสารสกัดกระชายขาว

	TPC	TFC	DPPH	ABTS ⁺	RPA
TPC	1				
TFC	0.7048025*	1			
DPPH	-0.9395565*	-0.85631*	1		
ABTS ⁺	0.8245139*	0.61505*	-0.86375*	1	
RPA	0.8416143*	0.850656*	-0.89582*	0.891643*	1

TPC: Total phenolics content, TFC: Total flavonoid content, DPPH: DPPH radical scavenging assay, ABTS⁺: ABTS decolorization scavenging effect assay, RPA: Potassium ferricyanide reducing power assay (*correlation coefficient)