The Study of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Asparagus racemosus* Willd Extracts

[1]Pacharamon Soncharoen & [2*]Kamonwan Jongitt
[1]Faculty of Medicine, Mahasarakham University
[2*]Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakhon Campus
[*]Corresponding author: Kamol1802@gmail.com

Received	Reviewed	Revised	Accepted
30/06/2024	20/07/2024	22/08/2024	23/08/2024

Abstract

This research investigates the total phenolic content and antioxidant activity of the herbal plant *Asparagus racemosus* willd (Raksamsib) extracts which using different solvents from Sakon Nakhon, Chaiyaphum, and Phetchabun provinces. The total phenolic content was tested by the Folin-Ciocalteu method, and the antioxidant activity was tested by the DPPH radical scavenging assay. The results showed that the total phenolic content from Phetchabun extracted with methanol was the highest, which measured 180.63±2.39 mg GAE/g, followed by the methanol extract from Sakon Nakhon, which measured 163.38±2.48 mg GAE/g. The lowest phenolic content was found in the 95% ethanol extract from Sakon Nakhon, which measured 62.47±2.00 mg GAE/g. As for the antioxidant activity test, the 95% ethanol extract from Sakon Nakhon exhibited the best antioxidant activity with IC_{50} of DPPH at 0.16 µg/g extract, followed by the methanol extract from Sakon Nakhon with an IC_{50} of DPPH at 0.19 µg/g extract.

Keyword: Total Phenolic Compounds; Antioxidant; *Asparagus racemosus* willd

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดสมุนไพรรากสามสิบ

[1]พชรมน สอนเจริญ และ[2*]กมลวรรณ จงจิตต์
[1]คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม
[2*]คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร จังหวัดสกลนคร
[*]ผู้นิพนธ์หลัก: Kamol1802@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรรากสามสิบเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรรากสามสิบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน จากจังหวัดสกลนคร ชัยภูมิ และเพชรบูรณ์ ทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalteu และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสมุนไพรรากสามสิบจากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 180.63±2.39 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือสมุนไพรรากสามสิบที่สกัดด้วยเมทานอลจากจังหวัดสกลนคร เท่ากับ 163.38±2.48 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และสมุนไพรรากสามสิบที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จากจังหวัดสกลนคร มีปริมาณน้อยที่สุด เท่ากับ 62.47±2.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จากจังหวัดสกลนคร มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.16 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือสารสกัดรากสามสิบด้วยเมทานอลจากจังหวัดสกลนคร มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.19 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ

คำสำคัญ : สารประกอบฟีนอลิก; การต้านอนุมูลอิสระ; สมุนไพรรากสามสิบ

บทนำ

สมุนไพรรากสามสิบ (*Asparagus racemosus* Willd) เป็นพืชในวงศ์ ASPARAGACEAE มีชื่อสามัญ คือ SATAWARI ลักษณะทางพฤษศาสตร์เป็นไม้เลื้อย เถาสีเขียว มีหนามแหลมมักเลื้อยพันต้นไม้อื่น ตามข้อเถามีหนามแหลม มีเหง้าและรากใต้ดินออกเป็นกระจุกคล้ายกระสวยออกเป็นพวงคล้ายรากกระชาย อวบน้ำ เป็นเส้นกลมยาว ใบเดี่ยว แข็ง ออกรอบข้อเป็นฝอยเล็ก ๆ คล้ายหางกระรอก หรือเป็นกระจุก 3-4 ใบ เรียงแบบสลับ ใบรูปเข็ม ช่อดอกออกที่ปลายกิ่งหรือซอกใบ ดอกย่อยสีขาว ผลสดรูปค่อนข้างกลมสีแดงหรือม่วงแดง (Chankhonkaen, P. 2019)

สมุนไพรรากสามสิบ เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีการนำส่วนต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ทางยาสมุนไพรอย่างหลากหลาย เช่น ราก มีรสเย็นหวาน ใช้แก้ขัดเบา ขับปัสสาวะ ขับเสมหะ บำรุงเด็กในครรภ์ บำรุงตับ แก้ตับพิการ และบำรุงกำลัง (Athawongsa, K., 2015) สมุนไพรรากสามสิบมีองค์ประกอบทางเคมีที่พบสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ steroidal saponins, oligospirostanosides, pyrrolizidine alkaloids, isoflavones, flavonoids & sterols (Shameem, I. and Majeedi, S. F., 2020)

สมุนไพรรากสามสิบ ถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน โดยมีรายงานว่าออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิงหรือ estrogen จากการวิเคราะห์ทางเคมีของต้นรากสามสิบ พบว่า ประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดที่เป็นรู้จักกันดี ได้แก่ flavonoids, saponin และอื่นๆ

สาร saponin เป็นสารประกอบทางเคมีที่พบมากในถั่วเหลืองมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมน estrogen ยับยั้งการเจริญของทูเมอร์เซลล์ (tumor cells) รวมทั้งมีฤทธิ์เพิ่มน้ำหนักมดลูกและเพิ่มการบีบตัวของมดลูก นอกจากนี้ saponin ยังมีฤทธิเพิ่มจำนวนเซลล์ของ mucous (mucosal cell proliferation) ของลำไส้เล็กโดยไม่มีผลต่อความผิดปกติของการทำงานของลำไส้และยังมีผลไปลดระดับไขมันคลอเลสเตอรอลในเลือด โดยเชื่อว่าสามารถยับยั้งการดูดซึมของคลอเลสเตอรอล (Ahmad, M.P. et al, 2015)

สาร flavonoids เป็นสารประกอบทางเคมี พบมากในผัก ผลไม้และเมล็ดพืช flavonoids มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอก ได้แก่ MDA-MB-435, MCF-7, HT-29, DU145, LNCap, SK-MEL-5, U87, DMS11 เช่นเดียวกับสาร saponin นอกจากนี้มีหลายรายงานที่แสดงให้เห็นว่าว่าสารในกลุ่ม flavonoids มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ลดการอักเสบและเบาหวาน (Ahmad, M.P. et al, 2015)

ด้านพิษวิทยามีการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน พบว่าสารสกัดจากรากสามสิบด้วยเอทานอลขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่ทำให้เกิดการตายในหนูทดลอง ทำให้สามารถบอกได้ว่า LD_{50} สูงกว่า 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การศึกษาความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลันโดยให้สารสกัดจากรากสามสิบด้วยเอทานอลขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนูต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน พบว่าไม่มีหนูขาวตายในระหว่างการทดสอบ และไม่พบอาการผิดปกติและพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อภายใน รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในเลือด แสดงให้เห็นว่ารากสามสิบมีความความปลอดภัยในการนำไปใช้ (Bhandary, B. S. K., et al, 2017)

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่ารากสามสิบมีฤทธิ์ที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์เหมือนฮอร์โมนเอสโตรเจน กระตุ้นการหลั่งน้ำนม คลายกล้ามเนื้อของมดลูก ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต้านอาการเม็ดเลือดขาวต่ำ ยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ลดการอักเสบและแก้ปวด (Ahmad, M.P. et al, 2015)

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรรากสามสิบในใช้ในตำรับยา และจากการรายงานพบว่าปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่พบในพืชขึ้นอยู่กับภูมิประเทศ สภาพอากาศ และสิ่งแวดล้อม ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรรากสามสิบในตัวทำละลายที่แตกต่างกันด้วยวิธี Folin ciocalteu method และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรรากสามสิบในตัวทำละลายที่แตกต่างกันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ของพื้นที่จังหวัดสกลนคร ชัยภูมิ และเพชรบูรณ์ เพื่อจะเป็นประโยชน์ในการส่งเสริมการปลูกในภาคเกษตรกรรม การกระตุ้นเศรษฐกิจในการใช้สมุนไพร ตลอดจนนำไปสู่การพัฒนาตำรับยาและผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพต่อไป

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพรรากสามสิบ

1.1 นำสมุนไพรรากสามสิบ ส่วนรากที่ได้จากจังหวัดสกลนคร ชัยภูมิ และเพชรบูรณ์ มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำมาบดให้ละเอียด และนำมาเตรียมเป็นสารสกัด 3 วิธี ดังนี้

1) สมุนไพรรากสามสิบมาสกัดด้วยน้ำ ในอัตราส่วน 1:10 (100g:1,000mL.) โดยแช่ทิ้งไว้ในตัวทำละลายนาน 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

2) สมุนไพรรากสามสิบมาสกัดด้วยเอทานอล ในอัตราส่วน 1:10 (100g:1,000mL.) โดยแช่ทิ้งไว้ในตัวทำละลายนาน 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

3) สมุนไพรรากสามสิบมาสกัดด้วยเมทานอล ในอัตราส่วน 1:10 (100g:1,000mL.) โดยแช่ทิ้งไว้ในตัวทำละลายนาน 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

1.2 เมื่อแช่ครบ 5 วัน นำตัวอย่างพืชมากรองเอากากออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

1.3 นำสารสกัดที่ได้ระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียสจนแห้ง

1.4 ชั่งน้ำหนักสารที่สกัดได้แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการคำนวน จากสูตร

$$\%Yield = \frac{b}{a} \times 100\%$$

เมื่อ a = น้ำหนักสารที่สกัดได้ (กรัม)

b = ปริมาณสมุนไพรรากสามสิบที่ใช้ในการสกัด (กรัม)

2. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Butkup, L., 2012)

2.1 การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน มีขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่ง Gallic acid 0.1006 กรัม จากนั้นละลายในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร เก็บไว้เป็น Stock standard solution

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Gallic acid (Stock standard solution) เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้น 10 20 40 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจะได้สารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

3) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Gallic acid แต่ละความเข้มข้นจำนวน 0.2 มิลลิลิตรและเติมสารละลาย Folin-ciocaltou reagent (เจือจาง 10 เท่า) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Sodium carbonate ความเข้มข้นร้อยละ 10

ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโต-มิเตอร์

2.2 การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรากสามสิบ มีขั้นตอนดังนี้

1) ปิเปตสารละลายของสารสกัด ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2) เติมสารละลาย Folin-ciocaltou reagent (เจือจาง 10 เท่า) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Sodium carbonate เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที

3) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

4) คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก และรายงานผลปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay (Brand-Williams, W. et al., 1995)

3.1 การหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรากสามสิบ

ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH โดยเตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมล และตัวอย่างสารสกัดรากสามสิบที่ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย DPPH ปริมาตร 1200 ไมโครลิตร หลีกเลี่ยงการถูกแสง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่มืดนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นค่า IC_{50} คำนวณ หาค่า IC_{50} จากสมการของกราฟคือ $y = mx + c$ และคำนวณหา % ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้ (Butkup, L., 2012)

$$\% \text{ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ} = \frac{controlOD - sampleOD}{controlOD} \text{ X } 100$$

โดย control OD = ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

sample OD = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัด

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

1) การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากรากสามสิบกับสารมาตรฐาน สถิติที่ใช้เป็นการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variances) แบบจำแนกทางเดียว One-Way ANOVA

2) ข้อมูลอื่นๆ มีการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. ปริมาณสารสกัดสมุนไพรรากสามสิบ

1.1 การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำ

ผลการคำนวนหา % Yield ของสารสกัดรากสามสิบ ที่ได้จากพื้นที่ จำนวน 3 แหล่ง พบว่า น้ำหนักของสารสกัดรากสามสิบที่ได้จากสกลนคร ร้อยละ 34.24 ชัยภูมิ ร้อยละ 20.78 และเพชรบูรณ์ ร้อยละ 21.96 ของน้ำหนักผงแห้งและสารสกัดดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Table 1)

1.2 การเตรียมสารสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการคำนวนหา % Yield ของสารสกัดรากสามสิบ ที่ได้จากพื้นที่ จำนวน 3 แหล่ง พบว่า น้ำหนักของสารสกัดรากสามสิบที่ได้จากสกลนคร ร้อยละ 10.76 ชัยภูมิ ร้อยละ 11.74 และเพชรบูรณ์ ร้อยละ 12.20 และสารสกัดดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Table 1)

1.3 การเตรียมสารสกัดด้วยเมทานอล

ผลการคำนวนหา % Yield ของสารสกัดรากสามสิบ ที่ได้จากพื้นที่ จำนวน 3 แหล่ง พบว่า น้ำหนักของสารสกัดรากสามสิบที่ได้จากสกลนคร ร้อยละ 22.84 ชัยภูมิ ร้อยละ 19.16 และเพชรบูรณ์ ร้อยละ 20.12 และสารสกัดดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Table 1)

Table 1: Results of the quantity of Raksamsib (%Yield)

Sample	Quantity of Raksamsib (% Yield)		
	Aqueous	Ethanol 95%	Methanol
Sakon Nakhon	34.24	10.76	22.84
Chaiyaphum	20.78	11.74	19.16
Phetchabun	21.96	12.20	20.12

2. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรรากสามสิบ จากแหล่งสกลนครที่สกัดด้วยเมทานอล และจากแหล่งเพชรบูรณ์ที่สกัดด้วยเมทานอล ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับกรดแกลลิก (Table 2) แหล่งจากจังหวัดสกลนคร ที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เท่ากับ 163.38±2.48 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด รองลงมา คือที่สกัดด้วยน้ำ เท่ากับ 102.33±1.62 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 62.47±2.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด แหล่งจากจังหวัดชัยภูมิ พบว่า สมุนไพรรากสามสิบที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เท่ากับ 139.34±2.52 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือที่สกัดด้วยน้ำ เท่ากับ 107.48±1.78 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และเอทานอล 95 % เท่ากับ 67.96±2.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบูรณ์ พบว่า สมุนไพรรากสามสิบที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เท่ากับ 180.63±2.39 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด

รองลงมาคือที่สกัดด้วยน้ำ เท่ากับ 100.90±1.57 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 66.95±1.89 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (Table 3)

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ตัวอย่างจากจังหวัดชัยภูมิมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด และการสกัดด้วยเมทานอล พบว่าตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบูรณ์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสมุนไพรรากสามสิบทั้ง 3 แหล่ง คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Figure 1) สมการของกราฟคือ $y = 8.004x$, $R^2 = 0.999$ เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรรากสามสิบ และกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Table 2 Results of total phenolic compounds analysis

Sample	Total phenolic compounds (mg GEA/g extract)		
	Aqueous	Ethanol 95%	Methanol
Sakon Nakhon	102.33±1.62	62.47±2.00	163.38±2.48
Chaiyaphum	107.48±1.78	67.96±2.00	139.34±2.52
Phetchabun	100.90±1.57	66.95±1.89	180.63±2.39

Table 3 Statistic of total phenolic compounds prepared with gallic acid

Solvents	Statistic of total phenolic compounds prepared with gallic acid		
	Sakon Nakhon (p-value)	Chaiyaphum (p-value)	Phetchabun (p-value)
Aqueous	0.01*	0.01*	0.02*
Ethanol 95%	0.03*	0.02*	0.02*
Methanol	0.05	0.01*	0.05*

Note: $p<0.05$* is statistically significant.

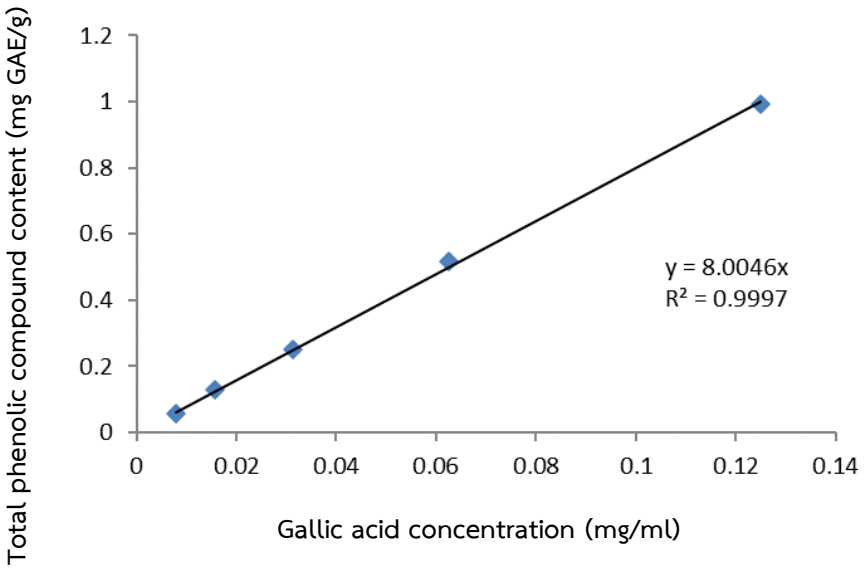

Figure 1 Standard graph of total phenolic compound content of gallic acid

3. ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรรากสามสิบ จาก 3 แหล่ง ได้แก่ สกลนคร ชัยภูมิ และเพชรบูรณ์ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอลและเมทา-นอล พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้น 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สมการของกราฟคือ $y = 1449x + 9.6715$, $R^2 = 0.9996$ (Figure 2)

และพบว่าสมุนไพรรากสามสิบ จากจังหวัดสกลนคร ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.16 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดสมุนไพรรากสามสิบ จากจังหวัดสกลนครที่สกัดด้วยเมทานอล มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.19 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัด ซึ่งสารสกัดของสมุนไพรรากสามสิบจากทั้ง 3 แหล่ง ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์และเมทานอล มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่ากรดแอสคอร์บิก ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.028 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัด (Table 4)

Table 4 Results of antioxidant activity test

Asparagus racemosus Willd.	Sample	Solvents	IC_{50} of DPPH (µg/g extract)	p-value
Root	Sakon Nakhon	Aqueous	0.24	0.00*
		Ethanol 95%	0.16	0.00*
		Methanol	0.19	0.00*
	Chaiyaphum	Aqueous	0.24	0.06*
		Ethanol 95%	0.19	0.00*
		Methanol	0.23	0.00*
	Phetchabun	Aqueous	0.26	0.00*
		Ethanol 95%	0.21	0.00*
		Methanol	0.23	0.00*
Ascorbic acid			0.028	0.00*

Note: p<0.05* is statistically significant.

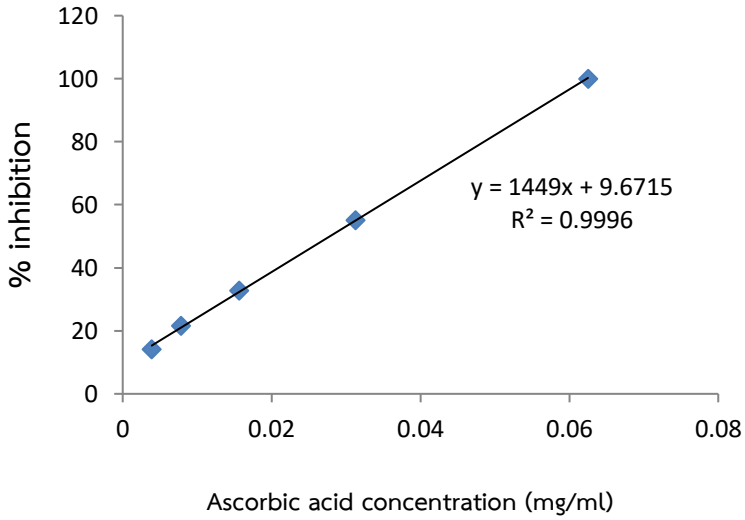

Figure 2 Ascorbic acid antioxidant standard graph

สรุปผลการศึกษา

การเตรียมสารสกัดสมุนไพรรากสามสิบด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า ปริมาณสารสกัดสมุนไพรรากสามสิบ (%Yield) ที่สกัดด้วยน้ำจากจังหวัดสกลนคร มีปริมาณสารสกัดมากที่สุด เท่ากับร้อยละ 34.24 รองลงมาคือ การสกัดด้วยเมทานอลจากจังหวัดเพชรบูรณ์ เท่ากับร้อยละ 26.12 และ การสกัดด้วยเมทานอลจากจังหวัดสกลนคร เท่ากับร้อยละ 22.84 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า การสกัดด้วยน้ำจากจังหวัดชัยภูมิมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เท่ากับ 107.48±1.78 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด การสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จากจังหวัดชัยภูมิมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เท่ากับ 67.96±2.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และการสกัดด้วยเมทานอล จากจังหวัดเพชรบูรณ์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เท่ากับ 180.63±2.39 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าสารสกัดของสมุนไพรรากสามสิบจากทั้ง 3 แหล่ง ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยกว่ากรดแอสคอร์บิก ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.028 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัด สมุนไพรรากสามสิบ จากจังหวัดสกลนคร ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.16 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัด

รองลงมาคือ สารสกัดสมุนไพรรากสามสิบ จากจังหวัดสกลนครที่สกัดด้วยเมทานอล มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.19 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัด

อภิปรายผลการวิจัย

จากการทดสอบหาร้อยละผลผลิต (%Yield) ของสารสกัดจากสมุนไพร 3 แหล่ง ได้แก่ สกลนคร ชัยภูมิและเพชรบูรณ์ พบว่าแหล่งสมุนไพรรากสามสิบจากสกลนครที่สกัดด้วยน้ำให้ผลผลิตสูงสุดที่ ร้อยละ 34.24 รองลงมาคือแหล่งเพชรบูรณ์ที่สกัดด้วยเมทานอล ร้อยละ 26.12 และแหล่งสกลนครที่สกัดด้วยเมทานอล ร้อยละ 22.84 การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าแหล่งวัตถุดิบและชนิดของตัวทำละลายจะมีผลต่อผลผลิตของสารสกัด การที่น้ำเป็นตัวทำละลายที่ให้ผลผลิตสูงสุดอาจเนื่องจากสารประกอบในรากสามสิบมีความเป็นขั้วสูง ทำให้สามารถละลายในน้ำได้ดี

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang, L. et al. (2012) พบว่าการสกัดสารจากสมุนไพรชนิดเป็นสารมีขั้วสามารถละลายน้ำได้ดี ทำให้ได้ร้อยละผลผลิตที่สูง และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Prathanturaruk, S. (2000) ที่พบว่าสมุนไพรจากแหล่งต่างกันมีคุณภาพและปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน แต่มีความแตกต่างจาการศึกษาของ Zhao, L., et al. (2018) ที่พบว่าการสกัดสมุนไพรด้วยเอทานอลมีผลผลิตสูงกว่าการสกัดด้วยเมทานอล และงานวิจัยของ Li, H., et al. (2017) พบว่าการสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอลให้ผลผลิตสูงสุด

การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าแหล่งสกลนครที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาคือน้ำและเอทานอล การทดสอบพบว่ารากสามสิบจากแหล่งสกลนครที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 163.38±2.48 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือสกัดด้วยน้ำ 102.33±1.62 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และเอทานอล 62.47±2.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Renukadevi, K., and Suhani, J. (2011) พบว่าสารสกัดครามที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Li, H., et al. (2017) พบว่าการสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรรากสามสิบ พบว่าสมุนไพรรากสามสิบจาก 3 แหล่ง สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือเมทานอลและน้ำ ตามลำดับ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Prathanturaruk, S. (2000) ที่พบว่าสมุนไพรจากแหล่งต่างกันมีคุณภาพและปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiang, J., et al. (2021) พบว่าการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรด้วยเอทา-นอลมีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ แต่แตกต่างกับงานวิจัยของ Inrod, P. (2008) พบว่าการสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay

ข้อเสนอแนะที่ได้จากผลการศึกษา

ควรมีการศึกษาวิจัยกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรรากสามสิบและดำเนินการศึกษาในระดับคลินิกต่อไป

ควรมีการศึกษาชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เป็นต้น

การนำไปใช้

การส่งเสริมการปลูกในภาคเกษตรกรรม การกระตุ้นเศรษฐกิจในการใช้สมุนไพร ตลอดจนนำไปสู่การพัฒนาตำรับยาและผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพต่อไป

การพัฒนาต่อยอดการศึกษาในโมเดลทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป เช่น การยับยั้งแบคทีเรีย การยับยั้งมะเร็ง ตลอดจนการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

References

Ahmad, M. P., Hussain, A., Siddiqui, H. H., Wahab, S., & Adak, M. (2015). Effect of methanolic antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 921305.

Athawongsa, K. (2015). *Herbal for Menopause.* Bangkok: Herbal Information office, Faculty of Pharmacy Mahidol University.

Bhandary, B. S. K., Sharmila, K., Kumari, N. S., Bhat, V. S., & Fernandes, R. (2017). Acuteand subacute toxicity profile of *Asparagus racemosus* root extract, Isoprinosine and shatvari syrup in Swiss albino mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(05), 129-135.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

Butkup, L. (2012). *Comparative study of flavonoid content. and anti-oxidation effects in various mulberry species: complete research report*. Office of the Science Promotion Board. Research and innovation.

Chankhonkaen, P., Watthanawikayakit, P., & Boonmeviset, S. (2019). Anatomy of *Asparagus racemosus*. *Ramkhamhaeng Research Journal* (Science and Technology), 22(1), 1-10.

Inrod, P. (2008). *Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Extracts from Kaempferia Galanga and Curcuma Aeruginosa* (Master's Thesis). Chonburi: Burapha University.

Jiang, J., Wu, S., & Zhu, W. (2021). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Morus alba L. leaves. *Journal of Food Science and Technology*, 58(4), 1471-1480.

Li, H., Wang, Z., & Liu, Y. (2017). Phenolic profiles and antioxidant activity of Lonicera species. *Food Chemistry*, 212, 343-351.

Prathanturaruk, S. (2000). *Encyclopedia of Herbs, Volume 1.* Bangkok: Sirirukachart Herb Garden, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University.

Prathet, K. (2000). *A Survey of Plant Species in Kamphaeng Phet Historical Park, Mueang District, Kamphaeng Phet Province*. Maha Sarakham: Mahasarakham University.

Renukadevi, K., & Suhani, J. (2011). Phytochemical analysis and total phenolic content in Indigoferatinctoria. *Journal of Medical Plants Research*, 5(15), 3487-3491.

Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887.

Shameem, I., & Majeedi, S. F. (2020). A review on potential properties and therapeutic application of asparagus racemosus wild. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9(7), 2532-2540.

Siriamornpun, S. (2014). *Antioxidants in food*. Bangkok: Odean Store.

Sutthajit, M., Bunjerdpongchai, R., Khukongwiriyapan, W., Siriamornpun S., Chaisut, C., Parasupattana, S., Panich U., Thephinlup, C., Chareansin S. (2012). *Free radicals and Antioxidant*. Chiang Mai: Smart Coating and Service.

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid of extract of Asparagus racemosus Willd. on lipopolysaccharide-induced-oxidative stress in rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(2), 509-513.

Traisomboon, J. (2010). Effects of Asparagus racemosus Willd on Estrogen Hormone

Activity. Bangkok: Office of Science Promotion, Research, and Innovation.

Wang, L., Yang, R., Yuan, B., Liu, Y., & Liu, C. (2012). The antiviral and antioxidant activities licorice, a widely-used Chinese herb. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(3), 668-675.

Zhao, L., Chen, X., & Tang, C. (2018). Comparison of different solvent extraction methods for total phenolics and total flavonoids from guava leaves and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3640-3648.