

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุ

รัฐศาสตร์ เต็นชัย^{1*} สุรพงศ์ รัตนะ²

Received : July 7, 2023

Revised : February 7, 2024

Accepted : March 22, 2024

บทคัดย่อ

ตรีธาตุ ประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด คือ เปลือกอบเชย (*Cinnamomum verum* J. Presl.) เมล็ด กระวาน (*Amomum testaceum* Ridl.) และดอกจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 มีสรรพคุณ แก้อาการท้องอืด แน่นท้อง ขับลม ขับเสมหะ แก้ไข้ บำรุงดวงจิต แก้ปวดมดลูก ปลูกธาตุอันดับให้เจริญ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุ ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือน้ำ เอทานอลร้อยละ 50 เอทานอลร้อยละ 80 และเอทานอลร้อยละ 95 นำสารสกัดมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุ พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดวิธี DPPH โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 10.72 ± 0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิก ($p < 0.05$) และวิธี FRAP สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด มีค่า ไมโครโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสไอออนต่อกรัมสารสกัดเท่ากับ 1.79 ± 0.05 มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสไอออนต่อกรัมของสารสกัด มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือกรดแอสคอร์บิกและแอลฟาโทโคฟีรอล ($p < 0.05$) และการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า สารสกัดด้วยน้ำ มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 2.62 ± 0.32 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด

คำสำคัญ: กระวานไทย ดอกจันทน์ ตำรับยาตรีธาตุ ฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อบเชย

¹ อาจารย์ประจำหลักสูตร สาขาการแพทย์แผนไทย คณะสหเวชศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา
อีเมล: rathazart_d@hotmail.com

² อาจารย์ประจำหลักสูตร สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม
อีเมล: surapong.r@npu.ac.th

* ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล: rathazart_d@hotmail.com

TOTAL PHENOLIC CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF THE EXTRACT OF TRI-CHATIKA PHARMACOPOEIA

Rattazart Denchai^{1*} Surapong Rattana²

Abstract

The Tri-Chatika formula contains three types of herbs: cinnamon bark (*Cinnamomum verum* J. Presl.), cardamom seeds (*Amomum testaceum* Ridl.), and mace (*Myristica fragrans* Houtt) in a 1:1:1 ratio. The Tri-Chatika formula possesses properties to relieve dyspepsia, flatulence, clear excess phlegm, reduce fever, nourish the mind, relieve uterine pain, and promote a well-balanced body composition of the four elements. The objective of this research was to investigate the total phenolic and antioxidant capacity of the Tri-Chatika pharmacopoeia using four extract solvents: water, 50% ethanolic, 80% ethanolic, and 95% ethanolic. The extracts were analyzed for antioxidant activities using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assays, and the total phenolic contents were determined using the Folin-Ciocalteu assay. The results showed that the 95% ethanolic extract of the Tri-Chatika formula exhibited the highest antioxidant activities in the DPPH assay ($EC_{50} = 10.72 \pm 0.20 \mu\text{g/ml}$), with differences observed compared to the ethanolic extract and standard ascorbic acid ($p < 0.05$). The Tri-Chatika formula also exhibited the highest antioxidant activities in the FRAP assay ($1.79 \pm 0.05 \text{ mM Fe}^{2+} \text{ equivalent/g extract}$), with differences observed among the ethanolic extract, standard ascorbic acid, and α -Tocopherol ($p < 0.05$). Upon investigating the total phenolic contents of the Tri-Chatika formula, it was found that the phenolic content was $2.62 \pm 0.32 \text{ mg gallic acid equivalent/g extract}$ when extracted with water.

Keywords: *Amomum krervanh*, *Myristica fragrans*, Tri-Chatika pharmacopoeia, Total Phenolic, Antioxidant activities, *Cinnamomum verum*

¹ Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Nakhonratchasima College,
e-mail: rathazart_d@hotmail.com

² Division of Science Education, Faculty of Education, Nakhon Phanom University,
e-mail: surapong.r@npu.ac.th

* Corresponding author, e-mail: rathazart_d@hotmail.com

บทนำ

ประเทศไทยมีการนำพืชสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่สมัยอดีตจนถึงปัจจุบัน และในปัจจุบันได้รับความนิยมนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ยารักษาโรค ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เวชสำอาง และเครื่องสำอาง เป็นต้น พฤติกรรมของผู้บริโภคมีการหันมาใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติมากขึ้นเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ดังนั้นการวิจัยและพัฒนานวัตกรรมด้านผลิตภัณฑ์สมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์เวชสำอางจากสมุนไพรไทยให้มีคุณภาพมาตรฐาน และความปลอดภัยจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง รวมถึงการสนับสนุนของรัฐบาลโดยกำหนดแผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564 ที่มีเป้าหมายส่งเสริมผลิตผลของสมุนไพรที่มีศักยภาพ พัฒนาอุตสาหกรรมและตลาดสมุนไพรให้มีคุณภาพระดับสากล สนับสนุนการใช้สมุนไพรเพื่อการรักษาโรคและการส่งเสริมสุขภาพอย่างยั่งยืน (กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, 2559) อย่างไรก็ตามยังมีสมุนไพรอีกจำนวนมากที่ยังขาดข้อมูลด้านวิทยาศาสตร์ รวมถึงพิกัดยาตราด ที่เป็พิกัดยาสมุนไพรพิกัดหนึ่งที่มีการใช้มาตั้งแต่อดีต แต่ยังขาดข้อมูลการวิจัยด้านฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตราด (ตรีชาติ) ประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด คือ เปลือกอบเชย (*Cinnamomum verum* J. Presl.) เมล็ดกระวาน (*Amomum testaceum* Ridl.) และดอกจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) (สำนักงานราชบัณฑิตยสภา กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, 2559) การนำสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้มารวมแต่ละอย่างมีน้ำหนัสมือภาคหรือเท่ากัน เรียกว่า พิกัดตราด หากตัวยามีน้ำหนักยาไม่เท่ากัน เรียกว่า มหาพิกัด (มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์ไทยเดิมฯ อายุรเวทวิทยาลัย (ชีวโกมารภักจ), 2548) และจากสรรพคุณสมุนไพรเดี่ยวในตำรับยามีข้อมูลของ อบเชย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cinnamomum verum* J. Presl. อบเชยเป็นเครื่องยา และเครื่องเทศ ที่ได้จากการชูดเอาเปลือกชั้นนอกออกให้หมด แล้วลอกเปลือกชั้นในออกจากแก่นลำต้น โดยใช้มีดกรีดตามยาวของกิ่ง แล้วรวบรวมนำไปผึ่งที่ร่มสลับกับการนำออกตากแดดประมาณ 5 วัน ขณะตากใช้มือม้วนขอบทั้งสองข้างเข้าหากัน จนเปลือกแห้งจึงมัดรวมกัน เปลือกอบเชยที่ดีจะมีสีน้ำตาลอ่อน (สีสนิม) มีความตรงและบางสม่ำเสมอ ยาวประมาณ 1 เมตร มีกลิ่นหอมเฉพาะ รสสุขุม เผ็ด หวานเล็กน้อย (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2551) กระวาน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep. ตามสรรพคุณตำรายาไทย ผลแก่ มีรสเผ็ดร้อน กลิ่นหอม ใช้แก้อาหารท้องอืด ท้องเฟ้อ ช่วยขับลม และแก้แน่นจุกเสียด มีฤทธิ์ขับลม และบำรุงธาตุ แก้อาการไม่ปกติ บำรุงกำลัง ขับโลหิต แก้อลมในอกให้ปิตธาตุ แก้อลมเสมหะให้ปิตธาตุ แก้อลมในลำไส้ เจริญอาหาร รักษาโรครำมะนาด แก้อลมสันนิบาต แก้อลมอีก แก้อัมพาตรักษาอาการเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน เมล็ด แก้อาการพิการ อุจจาระพิการ บำรุงธาตุ ขับเสมหะ แก้อปวดท้อง ขับลม (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2551) ดอกจันทน์ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Myristica fragrans* Houtt. ลักษณะภายนอกของเครื่องยาดอกจันทน์ (mace) คือส่วนเยื่อหุ้มเมล็ด ลักษณะเป็นริ้วสีแดง

จัด ดูเหมือนร่างแห เป็นแผ่นบางมีหลายแฉกหุ้มเมล็ด มีกลิ่นหอม รสขม ฝาด เผ็ดร้อน มีสรรพคุณบำรุงโลหิต บำรุงธาตุ ขับลม แก้ปวดมดลูก แก้กท้องร่วง บำรุงกำลัง บำรุงผิวเนื้อให้เจริญ น้ำมันระเหยง่ายใช้เป็นส่วนผสมของ ขี้ผึ้งที่ใช้ทากระบังความปวด ใช้ขับประจำเดือน ทำให้แห้ง ทำให้ประสาทหลอน ประเทศอินโดนีเซียใช้บำรุงธาตุ แก้ปวดข้อ กระดูก (นพมาศ สุนทรเจริญนท์, 2551)

ดังนั้นผลของการวิจัยในครั้งนี้ จึงเป็นแนวทางในการพิสูจน์ว่าสารละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดจาก ตำรายาตรีธาตุที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่ดี เพื่อการสนับสนุนภูมิปัญญาทางการแพทย์แผนไทยและสร้างความเชื่อมั่นต่อประโยชน์ของตำรายาตรีธาตุมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตำรายาตรีธาตุ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัด

1.1 นำสมุนไพรแห้งทั้ง 3 ชนิด ประกอบด้วย กระวานไทย อบเชย และดอกจันทน์ มาทำการ คัดเลือกสิ่งปลอมปนหรือสิ่งแปลกปลอมออก แล้วนำไปล้างทำความสะอาดและหั่นเป็นชิ้น จากนั้นจึงนำไปอบใน ตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทกันแสง จนกว่าจะนำไปใช้

1.2 นำสมุนไพรที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 1.1 ทั้ง 3 ชนิด ประกอบด้วยกระวานไทย อบเชย ดอกจันทน์ มาทำการชั่งน้ำหนักในอัตราส่วน 1:1:1 นำมาผสมกันเป็นตำรายาตรีธาตุ และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ น้ำ เอทานอล ร้อยละ 50 เอทานอล ร้อยละ 80 เอทานอลร้อยละ 95 แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหย แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุนด้วยแรงดัน (Rotary evaporator) และนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง เยือกแข็งแบบระเหิดในสุญญากาศ (Freeze dry) จากนั้นเก็บตัวอย่างสารสกัดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป แล้วคำนวณหาร้อยละของสารสกัด (% yield) จากสมการที่ 1 แล้วจึงนำเก็บในภาชนะปิด ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สมการที่ 1

$$\% \text{ Yield} = \left[\frac{\text{น้ำหนักของส่วนสกัดหยาบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักของพืชตัวอย่าง (กรัม)}} \right] \times 100$$

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงจาก พัทรินทร์ บุญหล้า และคณะ, 2557) เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ในเมทานอล ปิเปตสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุ หรือสารมาตรฐาน แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ใน 96-well plate ตั้งทิ้งไว้ที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลิ่นแสงด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader (BMG Labtech รุ่น: Spectrostar Nano) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดสอบทั้งหมด 5 ซ้ำ หาค่า % radical scavenging จากสมการที่ 2 จากนั้นนำค่า % Inhibition คำนวณค่า EC₅₀ (ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50) โดยการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างและ % inhibition

$$\% \text{ DPPH radical scavenging} = [(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}] \times 100$$

เมื่อ OD_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ในเมทานอล

OD_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH รวมกับสารสกัดตัวอย่างในเมทานอล

2.2 การทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี FRAP

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างด้วยวิธี FRAP (Benzie & Strain, 1996) เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ Ascorbic acid และ α -tocopherol ทำการเตรียมสารตัวอย่าง ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และสารละลาย FRAP Reagent โดยผสม 300 มิลลิโมลาร์ Acetate buffer (pH 3.6), 20 มิลลิโมลาร์ Ferric chloride solution และ 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine ใน 40 mM HCl) อัตราส่วน 10:1:1 จากนั้นนำสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ FRAP reagent ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใน 96-well microplate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลิ่นแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วย 96-well microplate reader ทำการทดลองตัวอย่างละ 6 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนคลิ่นแสงที่ได้เทียบกับโดยเปรียบเทียบกับค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ Ferrous sulfate (FeSO₄) แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลของ Fe²⁺ ต่อกรัมสารสกัด (mM Fe²⁺ equivalent/g sample extract)

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ใช้วิธี Folin-Ciocalteu (Gong et al., 2012) และอ่านค่าสัญญาณด้วยเครื่อง Microplate reader โดยเตรียมสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 3.90, 7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำกลั่น และเตรียมสารสกัดตัวอย่างเจือจาง 1:3 โดยปริมาตร โดยปิเปตสารละลายสารสกัดตัวอย่างที่ได้จากการสกัด 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ 1.5 มิลลิลิตร ในขวดใส่สารพลาสติกขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin-Ciocalteu reagent

(เจือจางด้วยน้ำ 1:5 โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม NaOH 0.35 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน หลุมไมโครเวลเพลท ทิ้งไว้นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิ ห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายที่ยังไม่เติมสารตัวอย่าง (blank) หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลาย gallic acid ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g of crude extract)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่า EC_{50} และใช้สถิติเชิงอนุมาน ได้แก่ สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way analysis of variance: One-way ANOVA)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

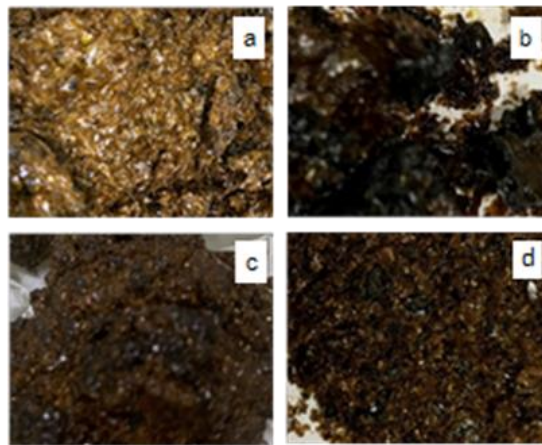
ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดตำรับยาตรีธาตุ

จากการนำผงตำรับยาตรีธาตุมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ เอทานอลร้อยละ 50 เอทานอลร้อยละ 80 และเอทานอลร้อยละ 95 พบว่า สารสกัดด้วยน้ำ มีลักษณะเป็นผง สีน้ำตาล สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 มีลักษณะเป็นผง สีน้ำตาลดำ สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 มีลักษณะเป็นผง สีน้ำตาลดำ และสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีลักษณะเป็นผง สีน้ำตาลดำ ดังแสดงในรูปภาพที่ 1 เมื่อชั่งน้ำหนักแห้งและคิร้อยละของสารสกัด พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีร้อยละของการสกัดสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 14.21 สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 คิดเป็นร้อยละ 12.84 สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 คิดเป็นร้อยละ 10.74 และสารสกัดด้วยน้ำ มีร้อยละของการสกัดต่ำที่สุด คิดเป็นร้อยละ 8.36 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ร้อยละน้ำหนักสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุ

ชนิดตัวทำละลาย	น้ำหนักผงยา (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของผลผลิต
น้ำ	300	38.53	8.36
เอทานอลร้อยละ 50	300	25.08	10.74
เอทานอลร้อยละ 80	300	42.63	12.84
เอทานอลร้อยละ 95	300	32.21	14.21



ภาพที่ 1 ลักษณะของสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุ

- (a) สารสกัดด้วยน้ำ (b) สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95
(c) สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 (d) สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50

2. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุ ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ เอทานอลร้อยละ 50 เอทานอลร้อยละ 80 และเอทานอลร้อยละ 95 ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และคำนวณค่า 50% Effective Concentration (EC_{50}) เปรียบเทียบกับ Ascorbic acid พบว่า สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด มีค่า $EC_{50} = 10.72 \pm 0.20$ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร รองลงมา คือ สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยเอทานอลร้อยละ 50 มีค่า $EC_{50} = 27.45 \pm 0.94$ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยเอทานอลร้อยละ 80 มีค่า $EC_{50} = 36.66 \pm 0.47$ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยน้ำ มีค่า $EC_{50} = 63.87 \pm 0.50$ ไมโครกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

สารสกัดตรีธาตุ	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) (Mean $\pm$ S.D., n=5)
น้ำ	63.87 ± 0.50^e
เอทานอลร้อยละ 50	27.45 ± 0.94^d
เอทานอลร้อยละ 80	36.66 ± 0.47^c
เอทานอลร้อยละ 95	10.72 ± 0.20^b
Ascorbic acid	$2.40 \pm 0.07^{a*}$

หมายเหตุ a, b, c, d, e อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

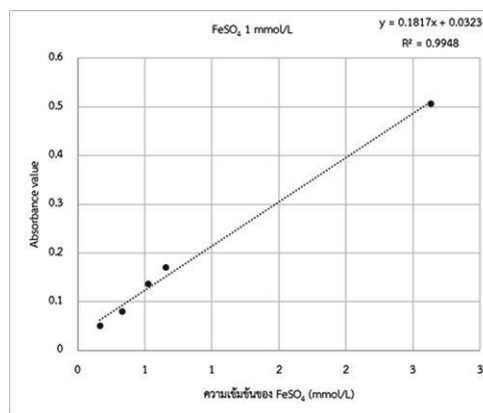
2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือน้ำ เอทานอลร้อยละ 50 เอทานอลร้อยละ 80 และเอทานอลร้อยละ 95 ด้วยวิธี Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ ascorbic acid และ α -tocopherol โดยใช้ปริมาณความเข้มข้นของ FeSO_4 เป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ดังแสดงภาพที่ 2 และรายงานค่าเป็นมิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสไอออนต่อกรัมของสารสกัด (mM Fe^{2+} equivalent/g extract) พบว่า สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยเอทานอล ร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยเอทานอล ร้อยละ 80 สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยเอทานอลร้อยละ 50 และสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยน้ำ มีค่ามิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสไอออนต่อกรัมของสารสกัดเท่ากับ 1.79 ± 0.05 , 1.73 ± 0.05 , 0.76 ± 0.01 และ 0.27 ± 0.03 มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสไอออนต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

สารสกัดตรีธาตุ	mM Fe ²⁺ equivalents/g extract (Mean $\pm$ S.D., n=6)
น้ำ	0.27 ± 0.03^c
เอทานอลร้อยละ 50	0.76 ± 0.01^b
เอทานอลร้อยละ 80	1.73 ± 0.05^a
เอทานอลร้อยละ 95	$1.79 \pm 0.05^{a*}$
Ascorbic acid	30.16 ± 1.16
α -Tocopherol	9.00 ± 1.22

หมายเหตุ a, b, c อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานสารละลาย FeSO_4 (n = 3)

3. การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ เอทานอลร้อยละ 50 เอทานอลร้อยละ 80 และเอทานอลร้อยละ 95 พบว่า สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยน้ำ เอทานอลร้อยละ 50 เอทานอลร้อยละ 80 และเอทานอลร้อยละ 95 มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 2.62 ± 0.32 , 2.21 ± 0.42 , 0.43 ± 0.06 , และ 0.52 ± 0.03 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic) ของสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุ

สารสกัดตรีธาตุ	Gallic acid Equivalent (mg GAE/g extract)
	(Mean $\pm$ S.D., n=6)
น้ำ	2.62 ± 0.32^a
เอทานอลร้อยละ 50	0.52 ± 0.00^c
เอทานอลร้อยละ 80	0.43 ± 0.06^d
เอทานอลร้อยละ 95	2.21 ± 0.42^b

หมายเหตุ a, b, c, d อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

อภิปรายผล

การศึกษาร้อยละของผลผลิต (% yield) พบว่า การใช้เอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลายให้ผลผลิตสูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ 14.21 สอดคล้องกับการศึกษาของอรพิน เกิดชูชื่น และคณะ (2553) รายงานว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายให้ค่าร้อยละของผลผลิตสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์ (Petroleum ether) ในการสกัดสารสกัดหยาบจากพริกไทยขาว พลูและขึ้นฉ่าย สอดคล้องกับการศึกษาของจิราภรณ์ บุราคร และเรื่อนแก้ว ประพฤติ (2555) รายงานว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายให้ค่าร้อยละของผลผลิตสูงที่สุดในการสกัดสารสกัดหยาบจากโหระพา คิดเป็นร้อยละ 34.65 เมื่อเปรียบเทียบกับเมทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลาย มีค่าร้อยละของผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 20.00 และ 4.10 ตามลำดับ และมีรายงานสนับสนุนของจาตุรงค์ จงจิ้น (2557) รายงานว่าร้อยละของผลผลิตจากสารสกัดหยาบใบสาบเสือมีค่าสูงเมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย คิดเป็นร้อยละ 18.34 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ให้ผลผลิตสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามการเลือกตัวทำละลายควรพิจารณาถึงความสามารถในการละลายสารสำคัญมากที่สุด และควรพิจารณาถึงความคงตัว หาได้ง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป และเหมาะสมต่อการสกัดตามสภาพของสมุนไพร (จักรรินทร์ ศรีวิไล และพิพรธพงศ์ จบมะรุ่ม, 2551)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ เอทานอลร้อยละ 95 เอทานอลร้อยละ 80 และเอทานอลร้อยละ 50 พบว่า ในการทดสอบทั้ง 2 วิธี สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 10.72 ± 0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และถ้าค่า EC_{50} ต่ำกว่า 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแสดงว่ามีฤทธิ์ดีมาก (Gomes de Melo et al., 2010) ในขณะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลด้วยวิธี FRAP พบว่า สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยเอทานอลร้อยละ 95 และร้อยละ 80 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sindhe et. al. (2013) และรัฐศาสตร์ เค้นชัย และคณะ (2564) ที่พบว่า สารสกัดเอทานอลของสมุนไพรให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดน้ำ

การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุในครั้งนี้ พบว่า สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุด้วยน้ำมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด แต่สารสกัดน้ำแสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด อาจเนื่องมาจากสารสกัดน้ำมีสารกลุ่มแทนนินออกมาด้วย เนื่องจากแทนนินให้ผลบวกกับการหาปริมาณฟีนอลิก เนื่องจากในโมเลกุลแทนนินมีโครงสร้างของกลุ่มฟีนอล สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของคัปรอบทางเคมีของสารสกัดจากเปลือกอบเชยด้วยน้ำมีแทนนินเป็นองค์ประกอบ (Saeed et. al., 2020) และการศึกษาของ Kim (2013) พบว่า สารสกัดผลพีชตระกูลส้มมีค่า Total tannin ในสารสกัดน้ำสูงกว่าสารสกัดเอทานอล และค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขึ้นเอทานอลให้ฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดขึ้นน้ำ เนื่องแทนนินบางชนิดมีโครงสร้างใหญ่ (รัตนาน อินทรานุปกรณ์, 2547) และเมื่อเปรียบเทียบกับสารกลุ่มกรดฟีนอลิก (Phenolic acid) ที่ได้จากชั้นเอทานอลทำให้เป็นอุปสรรคต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับโครงสร้างของ DPPH และ FRAP (โอภา วัชรคุปต์, 2550) แต่อย่างไรก็ตามการเลือกใช้ตัวทำละลายและการนำปริมาณสารสกัดมาใช้ควรศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษประกอบด้วย (รัตนาน อินทรานุปกรณ์, 2547)

สรุป

ในการศึกษาครั้งนี้สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ให้ร้อยละของผลผลิตสูงที่สุด และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี DPPH และวิธี FRAP ดีที่สุด และสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น โดยการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากตำรับยาตรีธาตุที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH และวิธี FRAP ดีที่สุด จึงควรศึกษาความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นของสารสกัดตำรับยาตรีธาตุที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากวิทยาลัยนครราชสีมา ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. (2559). แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ.2560-2564. ทีเอส อินเทอร์เน็ต:กรุงเทพมหานคร.
- จักรรินทร์ ศรีวิไล, และพิพรธพงศ์ จบมะรุม. (2551). รายงานการวิจัยเรื่อง การศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากผลมะแขว่น (*Zanthoxylum limonella* (Dennst) Alston). พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- จาทรงค์ จงจีน. (2557). รายงานการวิจัยเรื่อง ผลของสารสกัดจากสาบเสือต่อการ เจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc. สาเหตุโรคใบไหม้ของข้าว. อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี.
- จิราภรณ์ บุราคร, และเรือนแก้ว ประพฤติ. (2555). ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทย จำนวน 7 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 10, 11-22.
- นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, และนงลักษณ์ เรื่องพิเศษ. (2551). วิเคราะห์ วิจัย คุณภาพเครื่องยาไทย. คอนเซ็ปท์ เมดิคัล จำกัด: กรุงเทพมหานคร.
- พัชรินทร์ บุญหล้า, เมธิ์น ผดุงกิจ, อุดมศักดิ์ มหาวิวัฒน์, และอิศรัตน์ สมดี. (2557). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดใบชะพลู. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน, 10(3), 283-294.
- มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์ไทยเดิมฯ आयुरुเวทวิทยาลัย (ชีวกโกมารภัจจ์). (2548). ตำราเภสัชกรรมไทย. 1 ed. กรุงเทพฯ: พิษณุโลก: พิมพ์ครั้งที่ 1. เซ็นเตอร์.

รัฐศาสตร์ เเด่นชัย, ผลิตา ไพบูลย์, นพวรรณ พรศิริ, และสุรพงศ์ รัตน์. (2564).ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ สารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดมะหาด (*Lepisanthes rubiginosa*). **วารสารวิทยาศาสตร์ คชสาร**, 43(2), 1-9.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร**. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานราชบัณฑิตยสภา กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. (2559). **พจนานุกรมศัพท์แพทย์และเภสัชกรรมไทย ฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ.2559**. กรุงเทพฯ : ราชบัณฑิตยสถาน.

โอภา วัชรคุปต์. (2550). **สารต้านอนุมูลอิสระ = Radical scavenging agents**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: พิมพ์ลักษณ์.

อรพิน เกิดชูชื่น, ญัฐรา เลาทกุลจิตต์, และมณฑาทาญจน์ ชนะภัย. (2553). คุณลักษณะสารสกัดจากพืชวงศ์ Apiaceae และ Piperaceae จำนวน 4 ชนิด. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต**, 3, 35-44.

Benzie, I. F. F., & Strain, J.J. (1996). The Feric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

Gong, Y., Liu, X., He, W. -H., Xu, H. -G., Yuan, F., & Gao, Y. -X. (2012). Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. **Fitoterapia**, 83(3), 481-489. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.013>.

Gomes de Melo, J., De Sousa Araújo, T. A., Thijian Nobre de Almeida e Castro, V., Lyra de Vasconcelos Cabral, D., Do Desterro Rodrigues, M., Carneiro do Nascimento, S., Cavalcanti de Amorim, E. L., et al. (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. **Molecules**, 15(12), 8534–8542. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules15128534>.

Kim J. S. (2013). Preliminary evaluation for comparative antioxidant activity in the water and ethanol extracts of dried citrus fruit (*Citrus unshiu*) peel using chemical and biochemical *in Vitro* assays. **Food and Nutrition Sciences**, 4(2), 177-188.

- Saeed, M., Erwa, I., Ahmed, H., Ramadhani, A., & Ishag, O. (2020). Phytochemical Screening, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Cinnamon verum* Bark. **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry**, 21, 36-43.
- Sindhe, M. A., Yadav, D. B., & Chandrashekar A. (2013). Antioxidant and *In Vivo* anti-hyperglycemic activity of *Muntingia calabura* leaves extracts. **Der Pharmacia Lettre**, 5, 427-435.