การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร

สุชาดา มานอก* ปวีณา ลิ้มเจริญ*

*สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ
Corresponding author e-mail : a_manok@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพร 46 ชนิด ในตำรับยาหอมเทพจิตรซึ่งนำแต่ละตัวอย่างของพืชแห้ง 100 กรัม ทำการสกัดด้วยเอทานอลและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุนตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical cation decolorization assay และ ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay และตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu จากการศึกษาพบว่าสมุนไพรที่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ ดอกกานพลู (IC_{50} = 0.240 ppm) เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และพบว่าสมุนไพรโกฐพุงปลา มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ สูงที่สุด โดยมีค่า VEAC (Ascorbic acid Equivalents Antioxidant Capacity) และ TEAC (α-Tocopherol Equivalent Antioxidative Capacity) เท่ากับ 2.714 และ 2.109 mM/g ตามลำดับ และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของดอกกานพลูเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay มีค่า FRAP value สูงสุดเท่ากับ 7.026 mM/g นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากดอกกานพลูมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (1,906.083 ppm) ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้งหมด 46 ชนิด ในตำรับยาหอมเทพจิตรนั้น สารสกัดจากดอกกานพลู และโกศพุงปลา สามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด สารสกัดจากดอกกานพลูมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งอาจเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จึงควรศึกษาเพื่อหาสารสำคัญและกลไกการออกฤทธิ์ในการพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางยาต่อไป

คำสำคัญ : อนุมูลอิสระ/ สารต้านอนุมูลอิสระ/ ยาหอมเทพจิตร/ วิธี DPPH/ วิธี ABTS/ วิธี FRAP/ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Investigating Antioxidant Activity by DPPH, ABTS and FRAP Assay and Total Phenolic Compounds of Herbal Extracts in Ya-Hom Thepphachit

Suchada Manok* Paveena Limcharoen*

*Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok

Corresponding author e-mail : a_manok@hotmail.com

Abstract

The aims of this study were to determine antioxidant activity of the extraction from 46 herbs in Ya-Hom Thepphachit. Each dried herb, 100 g approximately, was extracted by ethanol and then dried by rotary evaporator. The crude extract was determined the antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP assays and total phenolic compounds by Folin-Ciocalteu method. The strongest antioxidant activity (IC_{50} = 0.240 ppm) was found in the extract from flower part of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry. according to DPPH assay. The highest values of VEAC and TEAC, respectively equal to 2.714 and 2.109 mM/g, were found in *Dischidia major* (Vahl) Merr. extract based on ABTS assay. In addition, the highest FRAP value (7.026 mM/g) and the highest amount of total phenolic compounds (1,906.083 ppm) were found in the extract from flower part of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry. In conclusions, the extracts from flower part of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry. and *Dischidia major* (Vahl) Merr. exhibited the strongest antioxidant activity. In addition, the extract from flower part of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry. contained the highest amount of total phenolic compounds, which might represent the antioxidant activity. Therefore, the chemical constituent and mechanism of action of active compound obtained from flower extract of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry. should be further evaluated.

Keywords : free radical/ antioxidant/ Ya-Hom Thepphachit/ DPPH assay/ ABTS assay/ FRAP assay/ total phenolic compound

บทนำ

ในช่วงสิบปีที่ผ่านมามนุษย์มีความใส่ใจในเรื่องสุขภาพและความงามมากขึ้นดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารที่มีผลเสียต่อร่างกายและสารที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเสริมสุขภาพที่ดีของร่างกายจึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะงานวิจัยเกี่ยวกับอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระจากข้อมูลทางสถิติ พ.ศ. 2550-2554 สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขได้สำรวจจำนวนและอัตราการตายต่อประชากร 100,000 คน จำแนกสาเหตุที่สำคัญ พบว่าคนไทยมีอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งและเนื้องอก ความดันเลือดสูง โรคหลอดเลือดในสมอง และโรคหัวใจ มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (กลุ่มภารกิจด้านข้อมูลข่าวสารสุขภาพ, 2554) ซึ่งมีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระเป็นส่วนใหญ่จากข้อมูลทางสถิติข้างต้นทำให้คนไทยหันมาให้ความสำคัญกับสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ เหล่านี้มากขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระจะช่วยปกป้องเซลล์ที่ถูกทำลายหรือได้รับความเสียหายจากโมเลกุลของอนุมูลอิสระ (Polterait, 1997) โดยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่จะประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปของสารประกอบฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์กรดฟีนอลิก (Klimczak, *et al*., 2007) แทนนินฟีนอลิกไดเทอร์ปีนแคโรทีนอยด์เทอร์ปีนอยด์และวิตามิน เป็นต้น (Rupasinghe & Clegg, 2007) จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผักผลไม้และสมุนไพรมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่และมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ถ้ารับประทานอาหารประเภทผัก ผลไม้และสมุนไพรเป็นประจำทำให้ร่างกายสามารถป้องกันโรคที่มีสาเหตุจากการทำลายของอนุมูลอิสระเช่นโรคไขมันในเลือดสูง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ เบาหวาน โรคมะเร็ง โรคไต รวมทั้งความแก่ชราได้ (Steinberg, 1991; Ascherio, *et al*., 1992; Block, *et al*., 1992; Ames, *et al*., 1993; Gillman, *et al*., 1995) ดังนั้นการหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติใหม่ๆ ในสมุนไพร ซึ่งสามารถนำไปชะลอหรือป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วจึงได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน

ยาหอมเป็นผลผลิตทางวัฒนธรรมที่อยู่คู่กับสังคมไทยมาตั้งแต่สมัยโบราณ ใช้เป็นยาบำรุงหัวใจและปรับการทำงานของลมที่เคลื่อนไหวทั่วร่างกายมนุษย์โดยจะส่งผลต่อจิตใจอารมณ์ ความรู้สึก การหมุนเวียนของระบบโลหิตนอกจากนี้ยังช่วยในเรื่องของอาการจุกเสียดตำรับยาหอมประกอบด้วยสมุนไพรจำนวนมากเพื่อปรับการทำงานของธาตุ ดิน น้ำ ลม ไฟ ให้เข้าสู่ภาวะสมดุล (รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, 2553) ตามประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ พ.ศ. 2555 ยาหอมมีอยู่ด้วยกัน 4 ชนิด คือ ยาหอมเทพจิตร ยาหอมนวโกฐ ยาหอมทิพโอสถ และยาหอมอินทจักร์ (คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ, 2555) ซึ่งมีสรรพคุณแตกต่างกันออกไป โดยยาหอมเทพจิตรนั้นเป็นตำรับที่ใช้แก้ลมวิงเวียนศีรษะหน้ามืดตามัวใจสั่นเซื่องซึมอ่อนเพลียแก้ลมขึ้นเบื้องสูงเป็นยาบำรุงหัวใจ ประกอบด้วยตัวยา 48 ชนิด ตัวยาหลักคือ ดอกมะลิ ซึ่งเป็นครึ่งหนึ่งของน้ำหนักทั้งตำรับ และเปลือกส้ม 8 ชนิด ซึ่งในปัจจุบันนี้สังคมไทยเกิดการเปลี่ยนแปลงการแพทย์แบบวิทยาศาสตร์เข้ามามีบทบาททางด้านการรักษามากยิ่งขึ้นดังนั้นยาหอมจึงถูกจำกัดอยู่เฉพาะกลุ่มของผู้สูงอายุ ในภาพลักษณ์ของยาแผนโบราณ จากการที่ยาและการรักษาโรคแบบตะวันตกเริ่มเข้ามามีบทบาทในประเทศไทยมากขึ้นประกอบกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแบบตะวันตก ซึ่งวิถีการดูแลสุขภาพแบบตะวันตกต้องมีผลรองรับหรือมีการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงตระหนักถึงการพิสูจน์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตัวยาแต่ละชนิดในตำรับยาหอมเทพจิตร โดยสูตรตำรับในผงยา 366 กรัม ประกอบด้วยดอกพิกุล บุนนาคสารภีเกสรบัวหลวงบัวขม บัวเผื่อน หนักสิ่งละ 4 กรัมดอกมะลิหนัก 183 กรัมผิวมะกรูดมะงั่ว มะนาวส้มตรังกานูหรือส้มจุกส้มจีน ส้มโอ ส้มเขียวหวาน หนักสิ่งละ 4 กรัม ผิวส้มซ่า หนัก 28 กรัมโกฐสอ โกฐเขมา โกฐหัวบัว โกฐเชียง โกฐ

จุฬาลัมพา โกฐกระดูก โกฐก้านพร้าว โกฐพุงปลาโกฐชฎามังสี หนักสิ่งละ 4 กรัมเทียนดำ เทียนแดง เทียนขาว เทียนข้าวเปลือก เทียนตาตั๊กแตน เทียนเยาวพาณีเทียนสัตตบุษย์ เทียนเกล็ดหอย เทียนตากบ หนักสิ่งละ 4 กรัมลูกจันทน์ดอกจันทน์ลูกกระวาน ดอกกานพลูแก่นจันทน์แดง แก่นจันทน์ขาวหรือแก่นจันทน์ชะมด กฤษณา กระลำพัก ขอนดอกเปลือกชะลูด เปลือกอบเชย หัวเปราะหอมราก แฝกหอม หนักสิ่งละ 2 กรัมพิมเสน หนัก 4 กรัมการบูร หนัก 1 กรัม (คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ, 2555) ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางพิสูจน์ฤทธิ์ทางด้านวิทยาศาสตร์ในการสนับสนุนภูมิปัญญาทางการแพทย์แผนไทยที่สะสมกันมาเป็นระยะเวลานาน อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่าการรับประทานยาหอมนั้นช่วยให้ระบบของร่างกายดีขึ้น อาจจะเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวยาสมุนไพร ไม่ใช่เพียงแค่ใช้เพื่อให้หายเป็นลมหรือวิงเวียน อีกทั้งยังเป็นการสนับสนุนให้คนไทยหันมารับประทานยาไทย นอกจากนี้ยังช่วยลดการนำเข้ายาแผนปัจจุบันจากต่างประเทศ และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวยาแต่ละชนิดในตำรับยาหอมเทพจิตรโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-ciocalteu reagent

ขอบเขตของงานวิจัย

1. สกัดสารสำคัญจากตัวยาสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับยาหอมเทพจิตร จำนวน 46 ตัวอย่าง

2. ทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวยาแต่ละชนิดในตำรับยาหอมเทพจิตรด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP

3. ตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากตัวยาแต่ละชนิด โดยวิธี Folin-ciocalteu reagent

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ทราบถึงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวยาแต่ละชนิดในตำรับยาหอมเทพจิตร

2. สร้างความเชื่อมั่น ส่งเสริมการใช้ตำรับยาสมุนไพรในการรักษาโรค

3. เพื่อนำข้อมูลสมบัติการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวยาสมุนไพรและตำรับยาไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ทางยา อาหาร เครื่องสำอาง และอาหารเสริม เป็นต้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดตัวอย่างสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตรโดยวิธี Maceration

นำตัวอย่างสมุนไพรแห้งที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยาหอมเทพจิตร ตามประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2555 จำนวน 46 ตัวอย่าง ทำการบดให้ละเอียด แร่งด้วยตะแกรงขนาด 100 ไมโครเมตร จากนั้นนำผงสมุนไพรมา 100 กรัม ใส่ลงในถังเติมเอทานอล 500 มิลลิลิตรแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมากรองแยกกากออก นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน เก็บสารสกัดที่ได้เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH radical ในเมทานอลความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ และเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10,000 ppm ในเมทานอล จากนั้นเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นในช่วง 10-1000 ppm และเติม DPPH ลงไปในสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่ได้เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (n=3) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) และแอลฟา-โทโคฟีรอล (α-tocopherol)จากนั้นทำการคำนวณ % radical scavenging และคำนวณหาค่า IC_{50} จากผล

การทดลองที่ได้โดยคำนวณหา % radical scavenging จากสมการ

$$\% \text{ radical scavenging} = [1 - (A_{sample}/A_{control})] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง และ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์และสารละลาย Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ผสมสารละลาย ABTS กับสารละลาย Potassium persulfate ในอัตราส่วน 1:0.5 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ หลังจากนั้นเจือจางสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยเอทานอลให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7±0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 ppm ในเอทานอลปิเปตสารตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตรแล้วเติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ 10 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (n=3) คำนวณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิก และแอลฟา-โทโคฟีรอล แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลย์ของกรดแอสคอร์บิก/กรัมสารสกัด (mM ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (VEAC)/g sample extract) และมิลลิโมลาร์สมมูลย์ของแอลฟา-โทโคฟีรอล/กรัมสารสกัด (mMα-tocopherol equivalent antioxidant capacity (TEAC)/g sample extract) (ดัดแปลงจาก Re *et al.*, 1999)

4. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 300 มิลลิโมลาร์ Acetate buffer pH 3.6 สารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ $FeCl_3.6H_2O$ และสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ จากนั้นเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100 ppm ในเอทานอลปิเปตสารตัวอย่างผสมกับ FRAP reagent ดังตารางที่ 1 เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (n = 3) คำนวณค่าการดูดกลืนแสงจากสมการ

$$\text{Absorbance} = A - B - C$$

คำนวณความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP value) โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ Ferrous sulfate ($FeSO_4$) แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลย์ของ Fe^{2+}/กรัม สารสกัด (mM Fe^{2+} equivalent/g sample extract) (ดัดแปลงจาก Benzie & Strain, 1996)

ตารางที่ 1 ตัวแปรในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

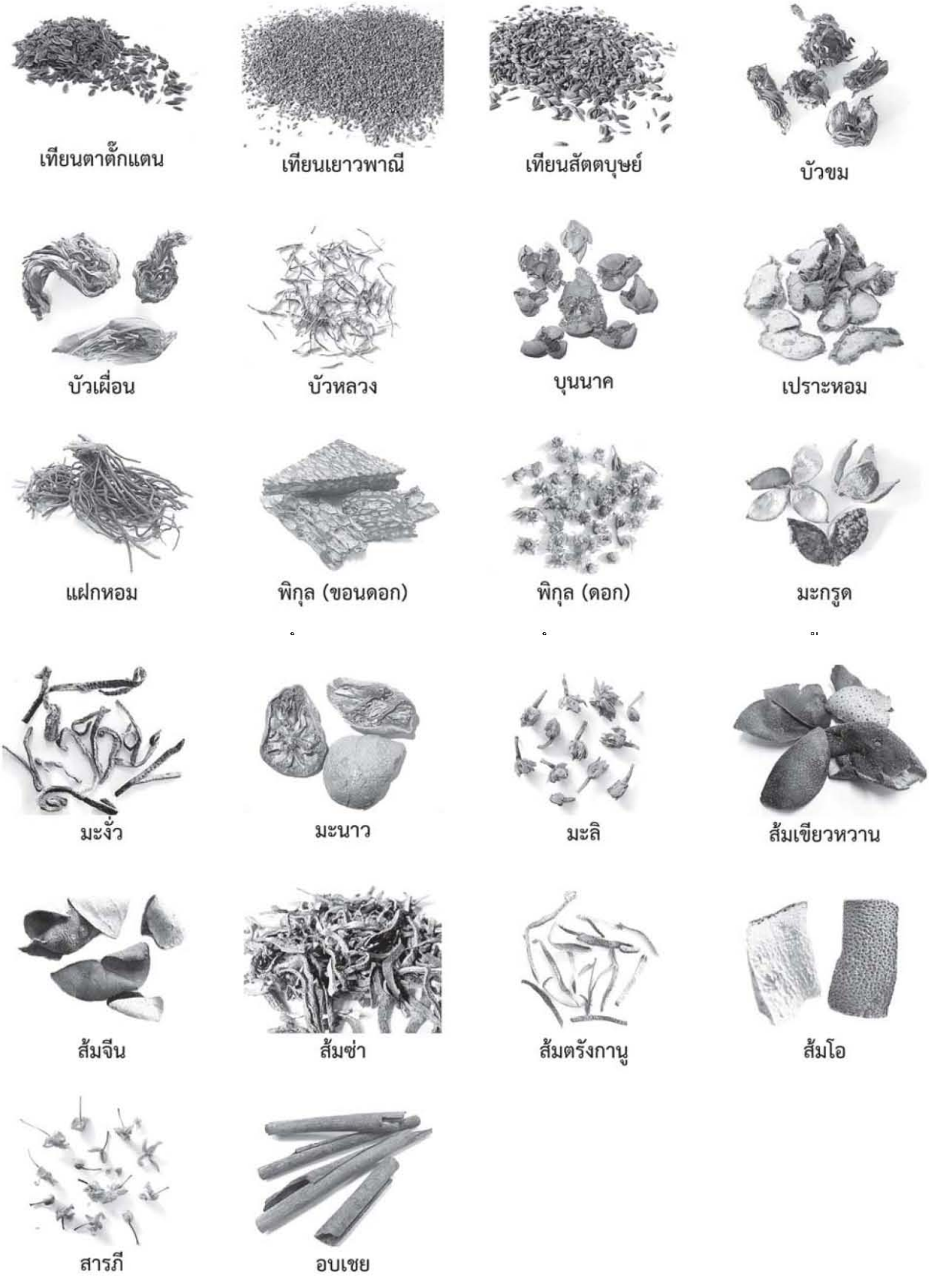
ตัวแปร	ส่วนประกอบ
A (Test sample)	Sample ที่ความเข้มข้น 100 ppm 1 ml + FRAP reagent 9 ml
B (Blank)	Sample ที่ความเข้มข้น 100 ppm 1 ml + Acetate buffer 9 ml
C (Control)	Ethanol 1 ml + FRAP reagent 9 ml

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 ppm ในเอทานอล จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง แล้วเติม Sodium bicarbonate เข้มข้นร้อยละ 7 จำนวน 4 มิลลิลิตรและ Folin-Ciocalteu's reagent 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยามคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณ Total phenolic โดย

เปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid) (Habila, *et al.*, 2010)

ภาพที่ 1 สมุนไพรที่ใช้ในตำรับยาหอมเทพจิตรตามประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ พ.ศ. 2555



ภาพที่ 1 สมุนไพรที่ใช้ในตำรับยาหอมเทพจิตรตามประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ พ.ศ. 2555 (ต่อ)

ผลการวิจัย และการอภิปรายผล

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองเมื่อทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากดอกกานพลูโกฐพุงปลาและดอกบัวเผื่อน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.240, 5.284 และ 6.607 ppm ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดจากดอกกานพลูสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกและแอลฟา-โทโคฟีรอลซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.895 และ 14.454 ppm ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ แสดงค่าเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกในรูป Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (VEAC)/g sample extract พบว่าสารสกัดจากโกฐพุงปลาเปลือกอบเชยและดอกกานพลูมีค่า VEAC เท่ากับ 2.714, 2.678 และ 2.443 มิลลิโมลาร์ ascorbic acid/g sample extract ตามลำดับ ซึ่งสามารถกำจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ได้สูงกว่าสารสกัดชนิดอื่นในตำรับยาหอมเทพจิตร

เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดดังกล่าวเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอลฟา-โทโคฟีรอล ซึ่งแสดงค่าในรูป α-tocopherol equivalent antioxidant capacity (TEAC)/g sample extract พบว่าสามารถกำจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ได้สูงที่สุดอีกด้วยโดยมีค่า TEAC เท่ากับ 2.109, 2.081 และ 1.894 มิลลิโมลาร์ α-tocopherol/g sample extract ตามลำดับ

นอกจากนี้พบว่าความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วย FRAP assay ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดที่อยู่ในตำรับยาหอมเทพจิตร คือ ดอกกานพลูโกฐพุงปลาและเปลือกอบเชยมีค่า FRAP value สูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 7.026, 3.653 และ 2.609 มิลลิโมลาร์ Fe^{2+} equivalents/g sample extract ตามลำดับ (ดังตารางที่ 2) และสารสกัดทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวนี้ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 1,906.083, 1,865.667 และ 697.542 ppm ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่างๆ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร

ลำดับที่	สารสกัดสมุนไพร	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่างๆ				ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ppm)
		IC_{50} of DPPH (ppm)	VEAC valueof ABTS (mM/g)	TEAC valueof ABTS (mM/g)	FRAP value (mM Fe^{2+}/g)	
1	กรดแอสคอร์บิก	3.890	-	-	-	-
2	แอลฟา-โทโคฟีรอล	12.882	-	-	-	-
3	ดอกพิกุล	19.953	1.622	1.241	1.290	176.083
4	ดอกบุนนาค	57.544	0.973	0.725	0.945	229.625
5	ดอกสารภี	11.749	1.463	1.115	1.281	199.417
6	เกสรบัวหลวง	1,288.250	0.120	0.047	0.632	181.292
7	ดอกบัวขม	12.303	2.339	1.812	1.923	399.000
8	ดอกบัวเผื่อน	6.607	0.578	0.411	2.135	346.083
9	ดอกมะลิ	851.138	-0.027	-0.070	0.693	97.333
10	ผิวมะกรูด	323.594	0.423	0.288	0.671	192.333

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่างๆ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดสมุนไพร	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่างๆ				ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ppm)
		IC_{50} of DPPH (ppm)	VEAC valueof ABTS (mM/g)	TEAC valueof ABTS (mM/g)	FRAP value (mM Fe^{2+}/g)	
11	ผิวมะงั่ว	97.724	0.678	0.491	0.827	198.375
12	ผิวมะนาว	186.209	0.271	0.168	0.706	108.167
13	ผิวส้มตรังกานู	97.724	0.682	0.494	0.788	190.250
14	ผิวส้มจีน	141.254	0.582	0.415	0.741	148.375
15	ผิวส้มโอ	1,949.845	0.315	0.202	0.531	82.958
16	ผิวส้มเขียวหวาน	309.030	0.235	0.139	0.679	106.708
17	ผิวส้มซ่า	93.325	0.574	0.408	0.939	214.000
18	โกศสอ	72.444	0.929	0.690	0.900	280.250
19	โกศเขมา	173.780	0.315	0.202	0.536	83.375
20	โกศหัวบัว	154.882	0.108	0.038	0.538	60.667
21	โกศเชียง	549.541	0.140	0.063	0.510	66.917
22	โกฐจุฬาลัมพา	144.544	0.327	0.212	0.590	182.125
23	โกศกระดูก	549.541	0.279	0.174	0.555	92.333
24	โกฐก้านพร้าว	91.201	0.459	0.316	0.624	185.875
25	โกศพุงปลา	5.284	2.714	2.109	3.653	1,865.667
26	โกศชฎามังสี	64.565	0.566	0.402	0.822	209.833
27	เทียนดำ	158,489.319	0.056	-0.003	0.972	171.292
28	เทียนแดง	89.125	0.431	0.294	0.876	146.292
29	เทียนขาว	1,949.845	0.164	0.082	0.542	158.583
30	เทียนข้าวเปลือก	338.844	0.160	0.079	0.639	121.500
31	เทียนตาตั๊กแตน	1,862.087	0.271	0.168	0.766	95.250
32	เทียนเยาวพาณี	181.970	1.124	0.845	1.089	380.458
33	เทียนสัตตบุษย์	223.872	0.124	0.050	0.647	124.625
34	เทียนเกล็ดหอย	95.499	0.235	0.139	0.745	104.208
35	เทียนตากบ	870.964	-0.087	-0.118	0.645	219.000
36	ลูกจันทร์	19.953	1.646	1.260	1.798	471.917
37	ดอกจันทร์	10.715	1.455	1.108	1.608	419.208
38	ลูกกระวาน	323.594	0.447	0.307	0.590	139.417
39	ดอกกานพลู	0.240	2.443	1.894	7.026	1,906.083
40	แก่นจันทร์แดง	51.286	2.235	1.729	1.165	574.000
41	แก่นจันทร์ขาว	269.153	0.749	0.548	0.900	193.167
42	เนื้อไม้กฤษณา	213.796	0.327	0.212	0.633	141.917
43	กระลำพัก	43.652	1.028	0.769	0.985	247.750
44	ขอนดอก	812.831	0.188	0.101	0.481	88.583

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่างๆ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดสมุนไพร	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่างๆ				ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ppm)
		IC_{50} of DPPH (ppm)	VEAC valueof ABTS (mM/g)	TEAC valueof ABTS (mM/g)	FRAP value (mM Fe^{2+}/g)	
45	เปลือกชะลูด	147.911	0.028	-0.026	0.862	132.542
46	เปลือกอบเชย	7.943	2.678	2.081	2.609	697.542
47	หัวเปราะหอม	2,884.032	0.096	0.028	0.504	65.250
48	รากแฝกหอม	223.872	0.136	0.060	0.559	40.875

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระ (Free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจาก DPPH และ ABTS เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร โดยอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว ไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ โดยเป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม ซึ่งเป็นวิธีเบื้องต้นที่นิยมใช้ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยทั่วไปส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกซี เนื่องจาก $ABTS^{\bullet+}$ เป็นอนุมูลอิสระที่สลายตัวให้อนุมูลเปอรออกซี ซึ่งการทดสอบทั้งสองวิธีนี้ทำปฏิกิริยาในตัวกลางที่เป็นสารอินทรีย์ (Organic solvent) (ดวงพร อมรเลิศพิศาล และคณะ, 2551; บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) เพราะละลายสารสกัดด้วยเมทานอลและเอทานอล แต่ในความเป็นจริงแล้ว เซลล์ในร่างกายของมนุษย์อยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำ หรือมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยน้ำ เพราะฉะนั้นควรมีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในตัวกลางที่เป็นน้ำด้วยต่อไป นอกจากนี้ยังศึกษาสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างแก่อนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบ โดยอาศัยการวัดปฏิกิริยา Reduction ของ Fe^{3+}-TPTZ ไปเป็น Fe^{2+}-TPTZ ด้วยวิธี FRAP เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบทั้ง 3 วิธีนี้ จะเห็นว่าในวิธี DPPH นั้นสารสกัดจากดอกกานพลู มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดอันดับ 1 สามารถกำจัดอนุมูลอิสระโดยให้ไฮโดรเจนอะตอมกับ DPPH ได้ดี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในการศึกษาทางพฤษเคมี (Phytochemical) ของดอกกานพลูพบว่ามีสาร Freeeugenol, Eugenol acetate, Caryophyllene, Sesquetrepeneester (Rastogi & Mehrotra, 1984), Phenylpropanoid (Miyazawa & Hisama, 2003), β-caryophyllene (Ghelardini *et al*., 2001), Eugenol and Acetyle eugenol (Srivastava, 1993) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่โครงสร้างหลักประกอบด้วย Aromatic ring แทนที่ด้วย Hydroxy group ส่วนมากเป็นสารที่มีขั้วละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดีกลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคือเมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไปแต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (Delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป (Pietta, 2000) ปฏิกิริยาลูกโซ่จึงสิ้นสุดลงนอกจากนี้ผลการทดสอบยังสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP อีกด้วย แต่ในวิธี ABTS สารสกัดดอกกานพลูอาจจะกำจัดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีไม่ดีเท่ากับโกฐพุงปลาซึ่งสามารถลดอนุมูลเปอร์ออกซีได้

ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรเดี่ยว 46 ชนิด ในตำรับทั้งหมด

สรุปผลการวิจัย

จากการเปรียบเทียบความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว 46 ชนิด ในตำรับยาหอมเทพจิตรโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-ciocalteu reagent แสดงให้เห็นว่าสารสกัดแต่ละชนิดมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันไป โดยในวิธี DPPH สารสกัดที่ให้ไฮโดรเจนอะตอมในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดี คือ ดอกกานพลูโกฐพุงปลาและบัวเผื่อนส่วนในวิธี ABTS สารสกัดที่กำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกซีได้ดี คือ โกฐพุงปลาอบเชย และกานพลู และในวิธี FRAP สารสกัดที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ดี เพื่อเปลี่ยนรูปให้อยู่ในสภาวะที่เสถียรสูงที่สุด คือ กานพลูโกฐพุงปลาและอบเชย ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ให้ผลสูงที่สุดเนื่องจากสารสกัดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จัดว่าเป็นสารสกัดหยาบ ซึ่งอาจจะประกอบด้วยสารหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรวมกันอยู่แต่สารออกฤทธิ์ที่เป็นหลักในการต้านอนุมูลอิสระน่าจะเป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก

ดังนั้นเพื่อพัฒนาสารจากสมุนไพรมาใช้เป็นยาต่อไปจึงควรมีการศึกษาต่อยอด เพื่อทราบถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้ในครั้งนี้เป็นผลมาจากสารสำคัญชนิดใด และศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ รวมถึงศึกษาความปลอดภัยในการใช้ยาสมุนไพรทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มภารกิจด้านข้อมูลข่าวสารสุขภาพ สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์. (2554). **จำนวนและอัตราตายต่อประชากร 100,000 คนตามลำดับของกลุ่มสาเหตุการตาย 10 กลุ่มแรก (ตามบัญชีจำแนกโรคระหว่างประเทศฉบับแก้ไขครั้งที่ 10) พ.ศ. 2550 – 2554.** สืบค้นเมื่อวันที่ 31 พฤษภาคม 2556, จาก http://bps.ops.moph.go.th/Ebook/statistic/statistic52/statistic52.html.

คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ. (2555). **บัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2555.** ประกาศ ณ วันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2555. ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ลงวันที่ 23 มกราคม 2556.

ดวงพร อมรเลิศพิศาล ยุวดี พีรพรพิศาล ธวัช แต้โสตถิกุล อุเทน จำใจ มัณฑนา นวลเจริญ และดวงตา กาญจนโพธิ์. (2551). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ *Sargassumpolycystum* C. Agardh. **วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง**, 2(2), 96-103.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 21(3), 275-286.

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล และพินิต ชินสร้อย. (2553). **ยาหอม ยาลม.** เอกสารวิชาการ ในมหกรรมสมุนไพรแห่งชาติ ครั้งที่ 7 เรื่อง หอมกรุ่นทั่วไทย หอมไกลทั่วโลก.

Ames, B. M., Shinena, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 90, 7915-7922.

Ascherio, A., Rimm, E. B., Glovannucci, E. L., Colditz, G. A., Rosner, B., Willett, W. C., Sacks & Stampfer, M. J. (1992). A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men. **Circulation**, 86, 1475-1484.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power" The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, 239, 70-76.

Block, G., Patterson, B., & Subar, A. (1992). Fruits vegetables and cancer

preventive: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, 18, 1-29.

Ghelardini, C., Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, & G., Bartolini, A. (2001). Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene, **Farmaco**, 56, 387-389.

Gillman, M. W., Cupples, L. A., Gagnon, D., Posner, B. M., Ellison, R. C., Castelli, W. P. & Wolf, P. A. (1995). Protective effect of fruits and vegetables on development of stroke in men. **JAMA**, 273, 113-117.

Habila, J. D., Bello, I. A., Dzikwi, A. A., Musa, H. & Abubakar, N. (2010). Total phenolics and antioxidant activity of *Tridaxprocumbens* Linn. **Afr. J. Pharm. Pharmacol**, 4(3), 123-126.

Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M., & Gliszczynska-wiglo. A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **J Food Compos Anal**, 20, 313-322.

Miyazawa, M. & Hisama, M. (2003). Antimutagenic activity of Phenylpropanoids from clove (*Syzygiumaromaticum*). **J Agric Food chem**, 51, 6413-6422.

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, 63, 1035-1042.

Polterait, O. (1997). Antioxidants and free-radical scavengers of Natural Origin. **Current Org. Chem**, 1, 415-440.

Rastogi, R. P. & Mehrotra, B. N. (1984). **Syzygiumaromaticum.In : Compendium of Indian Medicinal Plants Volume III.** Edited by: Rastogi, R. P., Mehrotra, B. N. Lucknow, India. Central Drug Research Institute, 620.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biol. Med**, 26, 1231-1237.

Rupasinghe, V. H. P., & Clegg, S. (2007). Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. **J Food ComposAnal**, 20, 133-137.

Srivastava, K. C. (1993). Antiplatelets principles from a food spice clove (*Syzygiumaromaticum*L.). **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 47, 885.

Steinberg, D. (1991). Antioxidants and athero sclerosis: a current assessment. **Circulation**, 84, 1420-1429.