บทความวิจัย (Research Article)

การทดสอบหาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไพล ขมิ้นชัน และขิงที่สกัดด้วยเทคนิควิธีการแช่หมักในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ปภาภัสสร์ ธีระพัฒนวงศ์[1*], วรินทร์ โอนอ่อน[2] และ ศศลักษณ์ แก้วบุตรา[3]

Evaluation of phytochemical compositions, total phenolic contents and antioxidant activities in different solvent maceration techniques of *Zingiber cassumunar* Roxb., *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* Roscoe

Paphaphat Thiraphatthanavong[1*], Warin Ohn-on[2] and Sasalux Kaewbutra[3]

[1] Department of Thai Traditional medicine, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University, Udon Thani 41000

[2] Department of Health and Beauty Science, Faculty of Natural Resources, Sakon Nakhon Campus, Rajamangala University of Technology Isan, Sakon Nakhon 47160

[3] Department of Medical Science, Amnatcharoen Campus, Mahidol University, Amnatcharoen 37000

* Corresponding author : paphaphat.th@udru.ac.th, paphaphat04@gmail.com

Health Science, Science and Technology Reviews. 2023;16(3):53-69.

Received: 25 July 2023; Revised: 19 December 2023; Accepted: 20 December 2023

บทคัดย่อ

สารสำคัญที่สกัดได้จากพืชมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ซึ่งอนุมูลอิสระ (Free Radical) เหล่านี้จะไปกระตุ้นกระบวนการออกซิเดชั่น (Oxidation) ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ในร่างกายและนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ ได้ ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ ไพล (P) ขมิ้นชัน (T) และขิง (G) ที่สกัดด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 4 วิธี ได้แก่ 1) สกัดด้วยน้ำกลั่น (D) 2) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 ºC นาน 10 นาที (B) 3) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% (A-95) และ 4) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% (A-50) จากนั้นนำไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH , ATBS และ NO radical scavenging ผลการวิเคราะห์ พบว่า สารสกัดขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% (GA-50) ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 30.17±1.45 mg GAE/g extract และสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% (TA-95) มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 100.54±0.56 mg QE/g extract ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS พบว่า สารสกัดขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% (GA-50) มีค่า IC_{50} ดีที่สุด เท่ากับ 0.17±0.01 และ 5.19±0.03 mg/ml ตามลำดับ นอกจากนั้น สารสกัดไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Nitric oxide (NO) สูงที่สุด เท่ากับ 50.21±0.65 การทดสอบหาปริมาณสารพฤกษเคมีที่สำคัญโดยวิธี GC-MS ของสาร

[1] สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี จังหวัดอุดรธานี 41000

[2] สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพและความงาม คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร จังหวัดสกลนคร 47160

[3] สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตอำนาจเจริญ จังหวัดอำนาจเจริญ 37000

สกัดทั้ง 3 ชนิดที่สกัดแบบ A-50 พบว่า GA-50, สารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% (TA-50) และ PA-50 พบสารสำคัญจำนวน 15, 9 และ 3 ชนิด ตามลำดับ ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ไพล ขมิ้นชันและขิง มีความสามารถสูงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและวิธีการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าการสกัดด้วยวิธีอื่น

คำสำคัญ : ไพล, ขมิ้นชัน, ขิง, สารพฤกษเคมี, สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Active ingredients from plants extraction have the ability to act as antioxidants. These free radicals will stimulate the oxidation process that affecting the functioning of cells in the body and leading to various diseases. This research aimed to determine total phenolic contents and antioxidant activity in different solvent maceration techniques of *Zingiber cassumunar* Roxb. or Phlai (P), *Curcuma longa* L. or Turmeric (T) and *Zingiber officinale* Roscoe or Ginger (G) by different 4 techniques including 1) aqueous extract (D) 2) boiling at 60ºC for 10 minutes extract (B) 3) 95 percent of ethanol extract (A-95) and 4) 50 percent of ethanol extract (A-50). The phenolic compound contents and the antioxidant activity were investigated by using Folin-Ciocalteu method, Flavonoid Assay, DPPH, ABTS and Nitric oxide (NO) radical scavenging assay. The results shown that GA-50 and TA-95 extract have the most total phenolic compound and flavonoid at 30.17±1.45 mg GAE/g extract and 100.54±0.56 mg QE/g extract, respectively. Moreover, the antioxidant activity by DPPH and ABTS assay shown that GA-50 extract has the best of the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) at 0.17±0.01 and 5.19±0.03 mg/ml, respectively. In addition, PA-50 extraction is highest of percentage of NO inhibition at 50.21±0.65. Then, the extracts of the 3 herbs with 50 percent of ethanol extract were tested for the phytochemicals by GC-MS as it showed the phenolic content and antioxidant activity better than other methods. It was found that GA-50, TA-50 and PA-50 have 15, 9 and 3 active ingredients, respectively. Conclusion, this research has demonstrated that Phlai, Turmeric and Ginger have high antioxidant capacity due to their identifiable properties of phytochemicals and active substances. The 50 percentage of ethanol fermentation extract technique show the higher level of total phenolic contents and the antioxidant activity than other methods.

Keywords: Phlai, Turmeric, Ginger, Phytochemical, Antioxidant

บทนำ

พืชสมุนไพรถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดยเฉพาะในกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (NCDs) ซึ่งเป็นปัญหาด้านสุขภาพที่สำคัญของคนในสังคมปัจจุบัน สาเหตุหลักเกิดจากพฤติกรรมเสี่ยงในการดำเนินชีวิต เช่น การรับประทานอาหารที่ไม่ถูกหลักโภชนาการ ขาดการออกกำลังกาย มีความเครียดสูงจากสภาพสังคมและสิ่งแวดล้อม ปัจจัยเหล่านี้ทำให้เซลล์ในร่างกายมีการสร้างสารอนุมูลอิสระ (Free Radical) มากขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้จะไปกระตุ้นกระบวนการออกซิเดชั่น (Oxidation) ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ในร่างกายและนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ ได้ [1-2] งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า ไพล ขมิ้นชันและขิง จัดเป็นพืชสมุนไพรล้มลุกที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคได้ [3-6] ไพล (Phlai) ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Zingiber cassumunar* Roxb. ส่วนของไพลที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ทางยา คือ ส่วนเหง้า การศึกษาก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นถึงวิธีการสกัดสารสำคัญของไพลด้วย hexane, dichloromethane, acetone, ethanol, methanol, 50 % ethanol และ 75 % ethanol โดยพบว่า วิธีการสกัดด้วย methanol ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในระดับสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 71.45±1.45 mg GAE/g extract รวมทั้งฤทธิ์ในการต้าน

อนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบ DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 36.89±2.53 µg/ml ในขณะที่การสกัดด้วย ethanol มีฤทธิ์รองลงมา โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.89±0.27 µg/ml [7] สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่พบในเหง้าไพล ได้แก่ (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD), เคอร์คิวมิน (curcumin), สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) ได้แก่ cassumunarins กลุ่มสารน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ sabinene, terpinene, terpinen-4-ol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) และเอนไซม์ COX-2 ที่เกี่ยวข้องในขบวนการอักเสบ [7-9] บรรเทาอาการปวด ต้านเชื้อราและแบคทีเรีย ฤทธิ์ชาเฉพาะที่ ฤทธิ์ต้านฮิสตามีน [10] และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [11-12] ขมิ้นชัน (Turmeric) ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Curcuma longa* L. ส่วนของขมิ้นชันที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ทางยา คือ ส่วนเหง้า การศึกษาก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นถึงวิธีการสกัดสารสำคัญในขมิ้นชันด้วยเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ในระดับสูง มีค่าเท่ากับ 15.53±0.53 mg GAE/g extract และ 13.67±1.63 mg QE/g extract ตามลำดับ รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบ DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 123.20±0.06 µg/ml [13] สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่พบในเหง้าขมิ้นชัน ได้แก่ คอร์คิวมิน (curcumin), monodesmethoxycurcumin, bisdesmethoxycurcumin กลุ่มสารน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ เทอร์เมอโรน (turmerone), ซิงจิเบอรีน (zingiberene), borneol, camphene, sabinene, phellandrene ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบของแผลผ่าตัดและโรครูมาตอยด์ ต้านเชื้อจุลชีพ [14] ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนัง [15] รักษาโรคแผลในทางเดินอาหาร ลดอาการแน่น จุกเสียดท้องอืด และขิง (Ginger) ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Zingiber officinale* Roscoe. ส่วนของขิงที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ทางยา คือ ส่วนเหง้าแก่ การศึกษาก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นถึงวิธีการสกัดสารสำคัญในขิงด้วย 95 % เอทานอลและน้ำ พบว่า ขิงที่ถูกนำไปผ่านความร้อนก่อนแล้วนำมาสกัดด้วย 95% เอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในระดับสูง มีค่าเท่ากับ 108.60±1.14 mg GAE/g dry extract รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบ DPPH มีค่า EC_{50} เท่ากับ 11.69±0.16 µg/ml ซึ่งมีค่าสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ [16] สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่พบในเหง้าขิง ได้แก่ สารที่ให้รสเผ็ดร้อน gingerols, shogaols กลุ่มสารน้ำมันหอมระเหยสารประกอบหลัก คือ (-)-zingiberene, (+)-ar-curcumene, (-)-beta-sesquiphellandrene, beta-bisabolene, camphene, alpha-pinene, nerol, geranyl acetate, linalool, borneol และ sesquiphellandrene hydrocarbon เป็นสารที่ให้กลิ่นหอมสรรพคุณช่วยในการผ่อนคลายเพิ่มความจำ ลดความเครียดและบรรเทาอาการปวด นอกจากนั้นสารสำคัญในขิงยังมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสารก่อการอักเสบชนิดต่างๆ รวมทั้งลดระดับของ nitric oxide syntheses (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) และ phospho-NF-KB [17] บรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้ออันเนื่องมาจากการออกกำลังกาย [18] ลดการอักเสบในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม [19] และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [20] โดยมีวิธีการในการสกัดสารสำคัญที่แตกต่างกันออกไป ปัจจุบันการสกัดสารสำคัญจากพืชทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน การหมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช โดยนำตัวอย่างพืชแห้งที่บดละเอียดมาหมักในตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดพืช ตามอัตราส่วนที่ต้องการในภาชนะปิดทิ้งไว้ 12-24 ชั่วโมง หรือมากกว่านั้น โดยประมาณ 2-7 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำไปกรอง วิธีนี้มีข้อดี คือ สารไม่ถูกความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาค่อนข้างนาน จึงมีการคิดค้นวิธีการเพื่อประหยัดเวลาในการสกัดสารสำคัญ โดยการเพิ่มความเร็วในการสกัดจากการเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนของการสกัด แต่วิธีการนี้ต้องพึงระวังในเรื่องของการสลายตัวของสารสำคัญจากอุณหภูมิที่สูงขึ้น ผลของการวิจัยก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดพืชมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสำคัญที่ได้ โดยพบว่า ที่อุณหภูมิ 60 ºC มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดสารสำคัญในพืช [21] และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเกินกว่า 80 ºC มีผลทำให้สารสำคัญลดลง [21-22] ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญขององค์ประกอบทางพฤกษเคมี สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ ไพล (P) ขมิ้นชัน (T) และขิง (G) ที่สกัดด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 4 วิธี ได้แก่ 1) สกัดด้วยน้ำกลั่น (D) 2) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60ºC นาน 10 นาที (B) 3) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% (A-95) และ 4) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% (A-50)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างพืช (Plant material preparation)

นำสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) จากพื้นที่อำเภอน้ำโสม จังหวัดอุดรธานี และขิง *(Zingiber officinale* Roscoe.) จากพื้นที่อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ ที่เก็บเกี่ยวช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2565 โดยมีหมายเลขตัวอย่างอ้างอิงพันธุ์พืชที่ใช้วิจัย (voucher specimens) คือ 25652001, 25652002, 25652003 ตามลำดับ เก็บไว้ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี มาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ โดยเครื่องหันสไลด์ หลังจากนั้นนำไปอบแห้งในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสมุนไพรแห้งที่ได้ไปปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำไปสกัดด้วย 4 วิธี ได้แก่ 1) สกัดด้วยน้ำกลั่น (D) ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน 2) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (B) 3) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% (A-95) ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน 4) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50) ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน ในภาชนะทึบแสงและมีฝาปิด โดยใช้อัตราส่วน 1:10 (weight: volume) เมื่อครบเวลาตามขั้นตอน นำสารสกัดน้ำที่ได้มากรองแยกส่วนของน้ำและกากออกจากกันโดยใช้ผ้าขาวบางและกระดาษกรองเบอร์ 4 นำเฉพาะส่วนสารสกัดที่เป็นของเหลวนำไประเหยตัวทำละลายออกเพื่อทำให้มีความเข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) และทำให้แห้งด้วยความร้อน (hot air drying) ที่อุณหภูมิ 60 °C สารสกัดที่ได้จะเก็บใส่ภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิดและป้องกันไม่ให้โดนแสงเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำมาใช้

การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content)

ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน [23] ที่ความเข้มข้น 25 50, 100, 200 และ 400 ไมโครลิตร เริ่มจากหยอดสารสกัดปริมาณ 20 ไมโครลิตร ตามด้วย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น ปริมาณ 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที หลังจากนั้น เติม 20 % sodium carbonate ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และบ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง โดยแต่ละตัวอย่างสารสกัดจะทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) หลังจากบ่มครบเวลาจะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยรายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg GAE/g extract)

การคำนวณสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic compounds)

สร้างกราฟมาตรฐาน ของ Gallic acid และคำนวณปริมาณ total phenolic ในสารละลายตัวอย่างด้วยการแทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐาน

$$(y = ax + b)$$

โดยที่ x = ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดตัวอย่าง

y = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารสกัดตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content)

ด้วยวิธี Aluminum chloride method โดยใช้เควอซิทิน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากหยอดสารสกัดปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 2 % $AlCl_3$ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที โดยแต่ละตัวอย่างสารสกัดจะทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) หลังจากบ่มครบเวลาจะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยรายงานผลเป็นหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg QE/g extract)

การคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ (Flavonoids content)

สร้างกราฟมาตรฐานของ Quercetin และคำนวณปริมาณ flavonoids content ในสารละลายตัวอย่างด้วยการแทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐาน

$$(y = ax + b)$$

โดยที่ x = ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดตัวอย่าง

y = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารสกัดตัวอย่าง

การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธีคือ

วิธีที่ 1 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH) โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน [24] เตรียมสารมาตรฐานและสารสกัดในตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยอดสาร 1 mM DPPH บ่มในที่มืดและที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที โดยแต่ละตัวอย่างสารสกัดจะทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) หลังจากบ่มครบเวลาจะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานโดยรายงานผลเป็นค่า IC_{50} หน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การคำนวณ % DPPH scavenging

นำค่าที่ได้มาคำนวณ ตามสูตร ดังต่อไปนี้

$$\% \text{ DPPH scavenging} = [(A_c - A_t)/A_c] \times 100$$

เมื่อ A_c = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของ control

A_t = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารสกัดตัวอย่าง

นำค่าที่ได้มา Plot graph เพื่อหาสมการเส้นตรง y = ax + b

คำนวณหาค่า IC_{50} โดยแทนค่า 50 ที่ y ในสมการเส้นตรง จะได้ค่า IC_{50} ของสารตัวอย่าง

วิธีที่ 2 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) โดยใช้สารโทรลอกซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน ดัดแปลงจาก [25] เริ่มจากเตรียมสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดในตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยอดสาร ABTS ปริมาณ150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยแต่ละตัวอย่างสารสกัดจะทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) หลังจากนั้นจะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานโดยรายงานผลเป็น IC_{50} หน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การคำนวณ Calculation of % inhibition of ABTS

นำค่าที่ได้มาคำนวณ ตามสูตร ดังต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition of ABTS} = [(A_c - A_t)/A_c] \times 100$$

เมื่อ A_c = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของ control

A_t = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารสกัดตัวอย่าง

นำค่าที่ได้มา Plot graph เพื่อหาสมการเส้นตรง y = ax + b

คำนวณหาค่า IC_{50} โดยแทนค่า 50 ที่ y ในสมการเส้นตรง จะได้ค่า IC_{50} ของสาร

วิธีที่ 3 Nitric oxide (NO) radical scavenging assay ดัดแปลงตามวิธีของ [26] โดยใช้เควอซิทิน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากนำสารละลาย Sodium nitroprusside (SNP) 10 mM ที่ละลายใน Phosphate buffer saline (pH 7.4) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร มาหยอดสารสกัดปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมลงไป วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Griess (1%Sulfanilamide: 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer โดยแต่ละตัวอย่างสารสกัดจะทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) รายงานผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% Inhibition)

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Nitric oxide (% Inhibition of NO)

นำค่าที่ได้มาคำนวณ ตามสูตร ดังต่อไปนี้

$$\% \text{ NO inhibition} = [(A_c - A_t)/A_c] \times 100$$

เมื่อ A_c = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของ control

A_t = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารสกัดตัวอย่าง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสแปกโทรมิเตอร์

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด ไพล ขมิ้นชัน และขิง จากวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดโดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปคโทรสโกปี (Chromatography-mass spectrometry; GC-MS) รุ่น PerkinElmer Headspace Therbo matrix 40 auto-sampler (Clarus 690, Perkin Elmer, Waltham, MA USA) คอลัมน์ Elite-5MS column ขนาดความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ใช้แก๊สฮีเลียม (He) เป็น carrier gas ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณที่ฉีด 2 ไมโครลิตร ฉีดตัวอย่างแบบ split ration 10:1 และใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้ อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้น 60 °C นาน 5 นาที โดยเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร็ว 4 °C ต่อนาทีจนถึงอุณหภูมิ 280 °C อุณหภูมิคงที่นาน 13 นาที ส่วนของ MS detection ตั้งค่าอุณหภูมิที่ 200 °C ในระบบ Electron Impact Ionization (EI) จากนั้นบันทึกผลเป็นโครมาโทแกรมและประเมินผลโดยเปรียบเทียบค่า Retention time, Peak area และ Mass spectrum ขององค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดตัวอย่างที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐานที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูลอ้างอิงในโปรแกรมของ the US National Institute of Standard and Technology (NIST 2017X)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่าที่ได้แสดงในรูปแบบ Mean±SEM วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มโดยวิธี Bonferroni tests ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Statistic (Version 16.0)

ผลการศึกษา

จากการนำสมุนไพรสดทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ไพล (P) ขมิ้นชัน (T) และขิง (G) มาผ่านกระบวนการทำให้แห้งและสกัดด้วยวิธีการที่แตกต่างกันทั้ง 4 วิธี ได้แก่ 1) สกัดด้วยน้ำกลั่น (D) 2) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (B) 3) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (A-95) และ 4) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50) พบว่า เปอร์เซ็นต์ Yield ที่ได้หลังจากการทำแห้งของไพลมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 25.57 รองลงมา คือ ขมิ้นชันและขิง มีค่าเท่ากับ 12.81 และ 11.70 ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ Yield ของสารสกัดหยาบขิงที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (PD) มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 3.43±0.12 และสารสกัดหยาบขิงที่สกัดด้วยด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (GA-95) มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 1.43±0.06 ดังแสดงในตาราง 1 และ 2 ตามลำดับ

ตาราง 1 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ yield สมุนไพรแห้ง (dried sample)

Sample	% yield สมุนไพรแห้ง
ไพล (P)	25.57
ขมิ้นชัน (T)	12.81
ขิง (G)	11.70

ตาราง 2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ yield สารสกัดหยาบ (crude extract)
ค่าที่ได้แสดงในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SEM)

Sample	% yield สารสกัดหยาบ
PD	2.66±0.08
PB	3.10±0.05
PA-95	2.23±0.15
PA-50	3.07±0.06
TD	2.35±0.07
TB	2.58±0.10
TA-95	2.60±0.06
TA-50	2.53±0.09
GD	3.43±0.12
GB	2.24±0.05
GA-95	1.43±0.06
GA-50	3.04±0.04

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค ($y=0.0044x+0.0160$, $R^2=0.9841$) พบว่า ขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) ขิงที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (GD) และขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (GA-95) ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดสามลำดับแรก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 30.17±1.45, 19.20±0.63 และ 13.43±0.66 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในสมุนไพรกลุ่มเดียวกัน พบว่า สารสกัดไพลที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเรียงลำดับสูงที่สุดไปยังปริมาณน้อยที่สุด ได้แก่ ไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (PA-95) สกัดด้วยน้ำกลั่น (PD) และสกัดด้วยน้ำกลั่นน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (PB) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 13.27±1.41, 11.60±0.78, 10.89±0.25 และ 7.39±0.73 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง ตามลำดับ สารสกัดขมิ้นชันที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเรียงลำดับสูงที่สุดไปยังปริมาณน้อยที่สุด ได้แก่ ขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) สกัดด้วยน้ำกลั่น (TD) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (TB) และสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (TA-95) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.87±0.83, 7.56±1.49, 7.04±0.25 และ 5.90±0.25 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง ตามลำดับ สารสกัดขิงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเรียงลำดับสูงที่สุดไปยังปริมาณน้อยที่สุด ได้แก่ ขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) สกัดด้วยน้ำกลั่น (GD) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (GA-95) และสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (GB) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 30.17±1.45, 19.20±0.63, 13.43±0.66 และ 7.34±1.06 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง ตามลำดับ นอกจากนั้น เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50) กับการสกัดด้วยวิธีการอื่นในสมุนไพรกลุ่มเดียวกัน พบว่า ไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) มีปริมาณ TPC มากกว่าไพลที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (PD) และสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (PB) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.001 แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (PA-95) ส่วนขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) มีปริมาณ TPC มากกว่าทุกกลุ่มวิธีการสกัด (TD, TB และ TA-95) อย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติที่ P-value ≤ 0.01, 0.001 และ 0.001 ตามลำดับ ขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) มีค่ามากกว่าทุกกลุ่มวิธีการสกัด (GD, GB และ GA-95) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.001 ดังแสดงในตาราง 3

จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานเควอซิทิน (y=0.0040x +0.0966, R^2 =0.9933) พบว่า ขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (TA-95) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) และสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (TB) ให้ปริมาณ ฟลาโวนอยด์สูงที่สุดสามลำดับแรก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 100.54±0.56, 62.19±0.95 และ 25.77±1.66 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในสมุนไพรกลุ่มเดียวกัน พบว่า สารสกัดไพลที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์เรียงลำดับสูงที่สุดไปยังปริมาณน้อยที่สุด ได้แก่ ไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) สกัดด้วยน้ำกลั่น (PD) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (PA-95) และสกัดด้วยน้ำกลั่นน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (PB) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 13.30±0.60, 9.95±1.45, 7.84±0.21 และ 6.80±2.76 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดขมิ้นชันที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์เรียงลำดับสูงที่สุดไปยังปริมาณน้อยที่สุด ได้แก่ ขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (TA-95) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (TB) และสกัดด้วยน้ำกลั่น (TD) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 100.54±0.56, 62.19±0.95, 25.77±1.66 และ 6.62±2.12 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดขิงที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์เรียงลำดับสูงที่สุดไปยังปริมาณน้อยที่สุด ได้แก่ ขิงที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (GD) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (GB) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) และสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (GA-95) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.75±0.94, 5.58±0.88, 4.46±1.42 และ 3.03±0.08 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง ตามลำดับ นอกจากนั้น เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50) กับการสกัดด้วยวิธีการอื่นในสมุนไพรกลุ่มเดียวกัน พบว่า ไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าทุกกลุ่มวิธีการสกัด (PD, PB และ PA-95) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤ 0.01, 0.001 และ 0.001 ตามลำดับ ขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่ากลุ่มที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (TD) และสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (TB) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤ 0.001 แต่พบว่า มีปริมาณฟลาโวนอยด์น้อยกว่าขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (TA-95) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value≤0.001 ขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มวิธีการสกัด (GD, GB และ GA-95) ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 แสดงค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) และปริมาณฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ของสารสกัดไพล (P) ขมิ้นชัน (T) และขิง (G) ด้วยวิธีการสกัดทั้ง 4 วิธี ค่าที่ได้แสดงในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SEM)

Sample (crude extract)	TPC (mg GAE/g extract)	Flavonoid (mg QE/g extract)
PD	$10.89\pm0.25^{C,aaa}$	$9.95\pm1.45^{B,bbb}$
PB	$7.39\pm0.73^{C,aaa}$	$6.80\pm2.76^{C,bbb}$
PA-95	11.60 ± 0.78^{aaa}	$7.84\pm0.21^{C,bbb}$
PA-50	13.27 ± 1.41^{aaa}	13.30 ± 0.60^{bbb}
TD	$7.56\pm1.49^{B,aaa}$	$6.62\pm2.12^{C,bbb}$
TB	$7.04\pm0.25^{C,aaa}$	$25.77\pm1.66^{C,bbb}$
TA-95	$5.90\pm0.25^{C,aaa}$	$100.54\pm0.56^{C,bbb}$
TA-50	9.87 ± 0.83^{aaa}	62.19±0.95
GD	$19.20\pm0.63^{C,aaa}$	5.75 ± 0.94^{bbb}
GB	$7.34\pm1.06^{C,aaa}$	5.58 ± 0.88^{bbb}
GA-95	$13.43\pm0.66^{C,aaa}$	3.03 ± 0.08^{bbb}
GA-50	30.17±1.45	4.46 ± 1.42^{bbb}

เมื่อกำหนดให้ B = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.01

C = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.001

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสมุนไพรชนิดเดียวกันโดยวิธีการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50)

aaa = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.001

เมื่อเปรียบเทียบกับขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50)

bbb = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.001

เมื่อเปรียบเทียบกับขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH) พบว่า ขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) ขิงที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (GB) และขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (GA-95) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) ดีที่สุดสามลำดับแรก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.17±0.01, 0.63±0.01 และ 0.90±0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในสมุนไพรกลุ่มเดียวกัน พบว่า สารสกัดไพลที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) เรียงลำดับที่ดีที่สุดไปยังที่ดีน้อยที่สุด ได้แก่ ไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (PA-95) สกัดด้วยน้ำกลั่น (PD) สกัดด้วยน้ำกลั่นน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (PB) และสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.17±0.31, 2.26±0.12, 2.78±0.30 และ 2.90±0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดขมิ้นชันที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) เรียงลำดับที่ดีที่สุดไปยังที่ดีน้อยที่สุด ได้แก่ ขมิ้นชันที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (TD) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (TA-95) และสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (TB) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.43±0.06, 3.00±0.29, 4.27±0.09 และ 4.66±0.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดขิงที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) เรียงลำดับที่ดีที่สุดไปยังที่ดีน้อยที่สุด ได้แก่ ขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (GB) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (GA-95) และสกัดด้วยน้ำกลั่น (GD) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.17±.01, 0.63±0.01, 0.90±0.25 และ 1.36±0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50) กับการสกัดด้วยวิธีการอื่นในสมุนไพรกลุ่มเดียวกัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิกซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (STD) ของการทดสอบ DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.01±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าที่ดีกว่าทุกวิธีการสกัดของไพล ขมิ้นชันและขิง ดังแสดงในตาราง 4

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ATBS) พบว่า ขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) ขมิ้นชันที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (TB) และขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (GA-95) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) สูงที่สุดสามลำดับแรก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.19±0.03, 5.34±1.20 และ 5.44±0.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในสมุนไพรกลุ่มเดียวกัน พบว่า สารสกัดไพลที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) เรียงลำดับที่ดีที่สุดไปยังที่ดีน้อยที่สุด ได้แก่ ไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (PA-95) สกัดด้วยน้ำกลั่น (PD) และสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (PB) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 11.07±0.08, 14.25±0.35, 17.19±1.82 และ 24.28±0.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดขมิ้นชันที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) เรียงลำดับที่ดีที่สุดไปยังที่ดีน้อยที่สุด ได้แก่ ขมิ้นชันที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (TB) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (TA-95) สกัดด้วยน้ำกลั่น (TD) และสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.34±1.20, 6.93±3.39, 8.25±0.12 และ 8.32±0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดขิงที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) เรียงลำดับที่ดีที่สุดไปยังที่ดีน้อยที่สุด ได้แก่ ขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (GA-95) สกัดด้วยน้ำกลั่น (GD) และสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (GB) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.19±0.03, 5.44±0.14, 11.66±0.72 และ 11.89±0.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50) กับการสกัดด้วยวิธีการอื่นในสมุนไพรกลุ่มเดียวกัน พบว่า ไพลที่สกัด

ด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) ดีกว่าไพลที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (PB) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.001 ส่วนขมิ้นชัน (TA-50) และขิง (GA-50) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มวิธีการสกัด โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารโทรลอกซ์ ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (STD) ของการทดสอบ ATBS มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.06±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าที่ดีกว่าทุกวิธีการสกัดของไพล ขมิ้นชันและขิง ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 แสดงค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดไพล ขมิ้นชัน (T) และขิง (G) ด้วยวิธีการสกัดทั้ง 4 วิธี ค่าที่ได้แสดงในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SEM)

Sample (crude extract)	**DPPH IC_{50} (mg/ml)**	**ABTS IC_{50} (mg/ml)**
STD	**Ascorbic acid 0.01±0.00**	**Trolox 0.06±0.01**
PD	2.26±0.12	17.19±1.82^{aaa}
PB	2.78±0.30^{a}	24.28±0.46^{C,aaa}
PA-95	2.17±0.31	14.25±0.35^{a}
PA-50	2.90±0.06^{aa}	11.07±0.08
TD	2.43±0.06	8.25±0.12
TB	4.66±0.35^{aaa}	5.34±1.20
TA-95	4.27±0.09^{aaa}	6.93±3.39
TA-50	3.00±0.29^{aaa}	8.32±0.10
GD	1.36±0.39	11.66±0.72
GB	0.63±0.01	11.89±0.42
GA-95	0.90±0.25	5.44±0.14
GA-50	0.17±.01	5.19±0.03

เมื่อกำหนดให้ C = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.001

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสมุนไพรชนิดเดียวกันโดยวิธีการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50)

a = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.05

aa = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.01

aaa = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.001

เมื่อเปรียบเทียบกับขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้ง Nitric oxide (NO) โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด พบว่า ไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) ไพลที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (PD) และขมิ้นชันสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง nitric oxide สูงที่สุดสามลำดับแรก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 50.21±0.65, 47.09±0.46 และ 46.39±0.34 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในสมุนไพรกลุ่มเดียวกัน พบว่า สารสกัดไพลที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Nitric oxide (NO) เรียงลำดับที่สูงที่สุดไปยังที่น้อยที่สุด ได้แก่ ไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) สกัดด้วยน้ำกลั่น (PD) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (PB) และสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (PA-95) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 50.21±0.65, 7.09±0.46, 40.23±2.07 และ 30.60±1.34 ตามลำดับ สารสกัดขมิ้นชันที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Nitric oxide (NO) เรียงลำดับที่สูงที่สุดไปยังที่น้อยที่สุด ได้แก่ ขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (TB) สกัดด้วยน้ำกลั่น (TD) และสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (TA-95) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 46.39±0.34, 44.79±0.04, 29.79±0.45 และ 20.34±2.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดขิงที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Nitric oxide (NO) เรียงลำดับที่สูงที่สุดไปยังที่น้อยที่สุด ได้แก่ ได้แก่ ขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (GA-95) สกัดด้วยน้ำกลั่น

(GD) และสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (GB) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 36.11±0.57, 33.00±0.95, 26.54±1.28 และ 23.22±0.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50) กับการสกัดด้วยวิธีการอื่นในสมุนไพรกลุ่มเดียวกัน พบว่า ไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Nitric oxide (NO) สูงกว่าไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (PA-95) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.05 ขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Nitric oxide (NO) สูงกว่าขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (TA-95) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.01 ส่วนขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มวิธีการสกัด โดยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง nitric oxide ของเควอซิทิน (Quercetin) ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (STD) ของการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 71.57±1.09 ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าทุกวิธีการสกัดของไพล ขมิ้นชันและขิง ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 แสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง nitric oxide (NO) ของสารสกัดไพล (P) ขมิ้นชัน (T) และขิง (G) ด้วยวิธีการสกัดทั้ง 4 วิธี ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ค่าที่ได้แสดงในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SEM)

Sample (crude extract)	% Inhibition of NO
Quercetin (STD)	71.57±1.09
PD	47.09±0.46
PB	40.23±2.07
PA-95	30.60 ± 1.34^{A}
PA-50	50.21±0.65
TD	29.79 ± 0.45^{aa}
TB	44.79±0.04
TA-95	$20.34\pm2.40^{B,aaa}$
TA-50	46.39±0.34
GD	26.54 ± 1.28^{aa}
GB	23.22 ± 0.26^{aaa}
GA-95	33.00 ± 0.95^{a}
GA-50	36.11±0.57

เมื่อกำหนดให้ A = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.05

B = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.01

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสมุนไพรชนิดเดียวกันโดยวิธีการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50)

a = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.05

aa = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.01

aaa = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤0.001

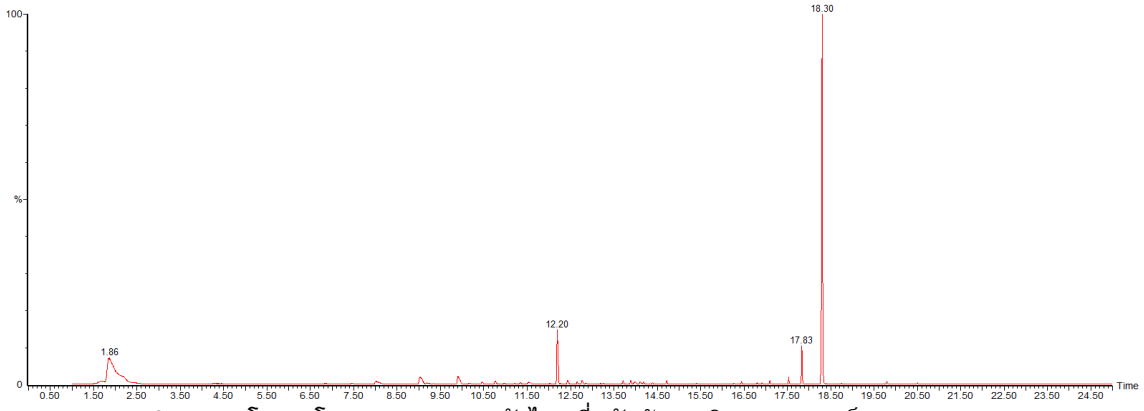
เมื่อเปรียบเทียบกับไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50)

จากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ไพล ขมิ้นชัน และขิง โดยภาพรวมพบว่า วิธีการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50) ให้ปริมาณสารสำคัญและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยวิธีการอื่น ดังนั้น จึงเลือกสารสกัด 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) ขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) และ ขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) มาตรวจสอบหาสารพฤกษเคมีที่สำคัญที่พบในสารสกัดทั้ง 3 ตัวอย่างโดยวิธี Gas Chromatograph Mass Spectrometer

(GC-MS) พบว่า จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดทั้ง 3 ตัวอย่าง พบองค์ประกอบทางเคมีที่จำแนกได้นั้น จะใช้เวลาในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาอยู่ในช่วง 4.00 ถึง 19.19 นาที ดังแสดงในรูป 1-3 จากรูป 1 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดไพลที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า สารสกัด PA-50 มีองค์ประกอบทางเคมีของสารที่พบทั้งหมด 3 ชนิด เวลาที่สารแยกออกมาในช่วง 12.20 ถึง 18.30 นาที โดยชนิดของสารประกอบที่พบปริมาณมากที่สุด 3 ลำดับแรก คือ TRIQUINACENE, 1,4-BIS (METHOXY), GAMMA.-TERPINENE และ (E)-4-(BUT-1-EN-1-YL)-1,2-DIMETHOXYBENZE ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 6 จากรูป 2 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า สารสกัด TA-50 มีองค์ประกอบทางเคมีของสารทั้งหมด 9 ชนิด เวลาที่สารแยกออกมาในช่วง 4.00 ถึง 18.28 นาที โดยชนิดของสารประกอบที่พบปริมาณมากที่สุด 3 ลำดับแรก คือ TRIQUINACENE, 1,4-BIS (METOXY), CYCLOHEXENE, 1-METHYL-4-(1-METHYLETHYLID และ GAMMA.-TERPINENE ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 7 จากรูป 3 แสดงแสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า สารสกัด GA-50 มีองค์ประกอบทางเคมีของสารทั้งหมด 15 ชนิด เวลาที่สารแยกออกมาในอยู่ในช่วงระหว่าง 10.54 ถึง 19.19 นาที โดยชนิดของสารประกอบที่พบปริมาณมากที่สุด 3 ลำดับแรก คือ δ-CURCUMENE, ALPHA.-FARNESENE และ CITRONELLOL ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 6 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดไพลที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

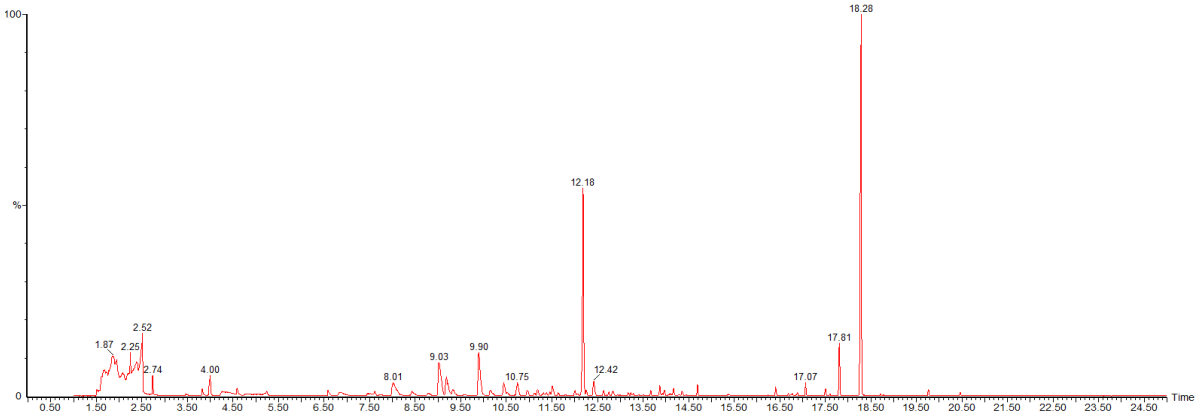
ลำดับ peak	เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (Retention time)	ชนิดของสารประกอบ (Assignment compounds)	สูตรโครงสร้าง (Formula)	% Match	% Area
1	12.20	GAMMA.-TERPINENE	C10H16	83.2	14.64
2	17.83	(E)-4-(BUT-1-EN-1-YL)-1,2-DIMETHOXYBENZE	C12H16O2	98.3	6.98
3	18.30	TRIQUINACENE, 1,4-BIS(METHOXY)	C12H14O2	87.0	78.40



รูป 1 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดไพลที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

ตาราง 7 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

ลำดับ peak	เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (Retention time)	ชนิดของสารประกอบ (Assignment compounds)	สูตรโครงสร้าง (Formula)	% Match	% Area
1	4.00	1,3-PROPANEDIOL, 2-METHYL-, DIPROPANOATE	C10H18O4	78.2	2.74
2	9.03	1,3-CYCLOHEXADIENE, 1-METHYL-4-(1-METHYL)	C10H16	90.7	9.05
3	9.90	GAMMA.-TERPINENE	C10H16	91.3	9.86
4	10.75	2-CARENE	C10H16	78.2	2.68
5	12.18	CYCLOHEXENE, 1-METHYL-4-(1-METHYLETHYLID)	C10H16	83.7	26.55
6	12.42	D-LIMONENE	C10H16	84.4	2.38
7	17.07	CYCLOHEXENE, 3-(1,5-DIMETHYL-4-HEXENYL)-6-METHYLENE	C15H24	89.9	1.25
8	17.81	(E)-4-(BUT-1-EN-1-YL)-1, 2-DIMETHOXYBENZE	C12H16O2	97.6	4.82
9	18.28	TRIQUINACENE, 1,4-BIS(METOXY)	C12H14O2	87.3	40.67

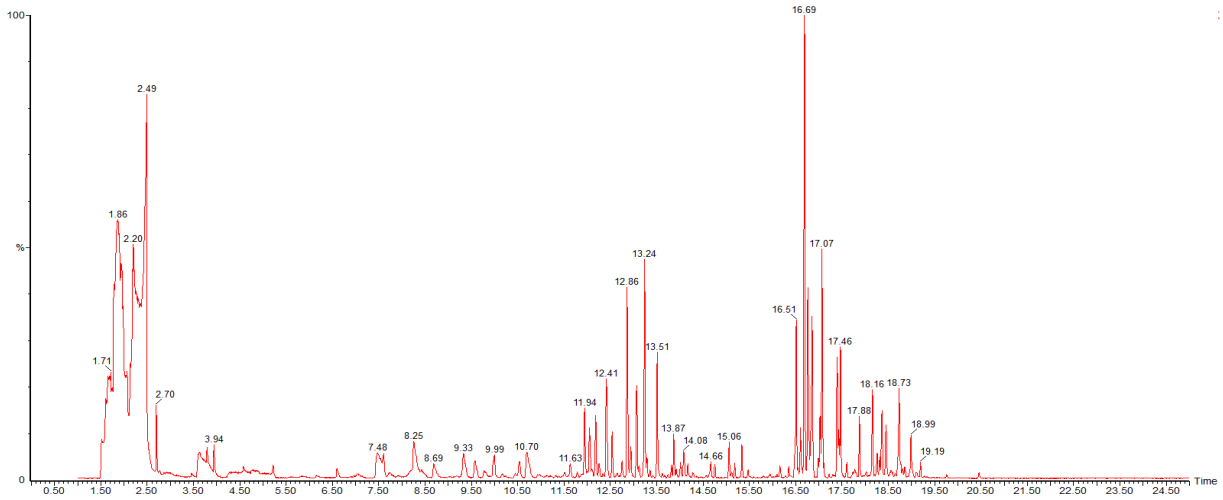


รูป 2 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

ตาราง 8 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

ลำดับ peak	เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (Retention time)	ชนิดของสารประกอบ (Assignment compounds)	สูตรโครงสร้าง (Formula)	% Match	% Area
1	10.54	2-METHYL-2-HYDROXY-DECALIN-4A-CARBOXYIC	C12H18O2	84.9	2.12
2	11.63	(1R,2R,5R)-5-METHYL-2-(PROP-1-EN-2-YL) CYCLOHEXANOL	C10H18O	85.7	1.33
3	11.94	EXO-2-BROMONORBORNANE	C7H11Br	83.8	4.66
4	12.18	CYCLOHEXENE, 1-METHYL-4-(1-METHYLETHENYL)	C10H16	82.5	4.57

ลำดับ peak	เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (Retention time)	ชนิดของสารประกอบ (Assignment compounds)	สูตรโครงสร้าง (Formula)	% Match	% Area
5	12.41	ALPHA.-TERPINEOL	C10H18O	90.1	7.58
6	12.54	DECANAL	C10H20O	79.6	2.99
7	12.86	CITRONELLOL	C10H20O	84.9	12.11
8	15.34	AZULENE, 1,2,3,5,6,7,8,8A-OCTAHYDRO-1,4-DIMETHYL-7-(1-METHYLETHENYL)	C15H24	86.8	2.05
9	16.51	BENZENE, 1-(1,5-DIMETHYL-4-HEXENYL)-4-ME; or α-CURCUMENE)	C15H22	93.6	11.27
10	16.69	1,3-CYCLOHEXADIENE, 5-(1,5-DIMETHYL-4-HEXENYL)-2-METHYL-, or (δ-CURCUMENE)	C15H24	91.16	25.88
11	16.76	ALPHA.-FARNESENE	C15H24	86.5	12.29
12	17.88	(R)-1-METHYL-4-(6-METHYLHEPT-5-EN-2-YL)CYCLOHEXA-1,4-DIENE or (β-CURCUMENE)	C15H24	84.7	3.68
13	18.16	DI-EPI-.ALPHA.-CEDRENE	C15H24	84.0	5.09
14	18.99	AROMADENDRENE	C15H24	79.7	3.49
15	19.19	GERMACRENE D	C15H24	88.2	0.88



รูป 3 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

วิจารณ์

จากผลการวิจัยพบว่า สมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) และขิง *(Zingiber officinale* Roscoe.) เป็นพืชที่มีสารที่มีคุณสมบัติเป็นพฤกษเคมี (Phytochemical) โดยพบว่า สารสกัดขิง (G) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH และ ATBS สูงที่สุด ส่วนสารสกัดขมิ้นชัน (T) มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด และสารสกัดไพล (P) มีความสามารถในการยับยั้ง Nitric oxide (NO) ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบสูงที่สุด เมื่อวิเคราะห์ร่วมกับวิธีการสกัดสารทั้ง 4 วิธี ได้แก่ 1) สกัดด้วยน้ำกลั่น (D) 2) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที (B) 3) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (A-95) และ 4) สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50) พบว่า วิธีการสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดในการทดสอบครั้งนี้ คือ การสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (A-50) โดยพบว่า สารสกัดขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 50 % (IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH และ ATBS สูงที่สุด นอกจากนั้น สารสกัดไพลที่

สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (PA-50) มีความสามารถในการยับยั้ง Nitric oxide (NO) สูงที่สุด มีเพียงปริมาณฟลาโวนอยด์เท่านั้นที่พบว่า สารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % (TA-95) มีปริมาณสูงที่สุดและสูงกว่าการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (TA-50) จากผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่า วิธีการสกัดแบบแช่หมักด้วยเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % (IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH และ ATBS และมีความสามารถในการยับยั้ง Nitric oxide (NO) ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดอื่น อีกทั้งแสดงให้เห็นว่าสารและตัวทำละลายที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้ใช้ตัวทำละลาย คือ น้ำกลั่นและเอทานอล ซึ่งพบว่าสารสำคัญกลุ่มหลักน่าจะเป็นสารกลุ่มที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วและกึ่งมีขั้ว และเมื่อวิเคราะห์ปัจจัยเรื่องผลของอุณหภูมิที่เพิ่มมากขึ้นไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อปริมาณสารสำคัญที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำกลั่น (D) และยังพบว่าสารสกัดขิงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % (GA-50) พบสารพฤกษเคมีที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจำนวนมากที่สุด คือ 19 ชนิด มีองค์ประกอบหลักเป็นสารในกลุ่ม Curcuminoids ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบปริมาณ TPC ระดับสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดขมิ้นชันและไพลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % จำนวน 9 และ 3 ชนิดตามลำดับ มีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่ม Monoterpene ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ [27-29] โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS จากผลงานวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีของการสกัดสารเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการได้มาซึ่งสารสำคัญ ดังนั้น ควรให้ความสำคัญในการพิจารณาเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเพิ่มเติม โดยพิจารณาความแตกต่างกันในด้านคุณสมบัติการละลายทั้งมีขั้ว กึ่งมีขั้ว และไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน (Hexan) อีเทอร์ (Ether) และอะซิโตน (Acetone) โดยคำนึงถึงความคุ้มค่าเป็นพื้นฐาน และควรมีการนำสารที่สกัดต่างรอบ (Independent extraction) มาทดสอบร่วมด้วย เพื่อแสดงให้เห็นว่าในกระบวนการสกัดต่างรอบกันมีความแม่นยำหรือความแปรปรวนมากน้อยเพียงใด ยังคงมีปริมาณสารสำคัญที่ต้องการศึกษาในปริมาณใกล้เคียงเดิมหรือไม่ อีกทั้ง ควรมีนักพฤกษศาสตร์ หรือนักอนุกรมวิธานพืชที่มีความเชี่ยวชาญในการช่วยตรวจสอบและระบุสายพันธุ์ของพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการวิจัยเพื่อประโยชน์ในการควบคุมสายพันธุ์พืชที่อาจส่งผลต่อปริมาณสำคัญที่นำมาใช้เตรียมสารสกัดในการทดสอบในแต่ละครั้ง นอกจากนั้น ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารพฤกษเคมีที่สำคัญที่ได้จากวิธีการสกัดต่างๆ ในขั้นตอน In vitro และ In vivo เช่น การศึกษาใน cell line หรือในสัตว์ทดลอง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปต่อยอดสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพและการวิจัยที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในทางคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กสว.) งบประมาณด้านวิจัยและนวัตกรรมประเภท Fundamental Fund ประจำปีงบประมาณ 2565 มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

เอกสารอ้างอิง

[1] Zheng WZ and Wang SY. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. J Agric Food Chem 2001;49(11):5165-70.

[2] Astley SB. Dietary Antioxidants-Past, Present and Future. Trends Food Sci Technol 2003;14,93-98.

[3] Ratchadaporn T and Yingyong P. Variation of total curcuminoids content, antioxidant activity and genetic diversity in turmeric (*Curcuma longa* L.). collections 2009;43(3):507-18.

[4] Ali G, Hawa ZE J and Asmah R. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Molecules 2010;15(6):4324-33.

[5] Thiraphattanavong P, Wattanathorn J, Muchimapura S, Thukham-mee W, Suriharn, B, Lertrat K. The combined extract of purple waxy corn and ginger prevents cataractogenesis and retinopathy in streptozotocin-diabetic rats. Oxid. Med. Cell. Longev 2014:1-12.

[6] Ah-RH, Hyunyoung K, Donglan P, Chan-HJ and Eun KS. Phytochemicals and Bioactivities of *Zingiber cassumunar* Roxb. Molecules 2021;26(8):1-16.

[7] Thepthong P, Rattakarn K, Ritchaiyaphum N, Intachai S and Chanasit W. Effect of Extraction Solvents on Antioxidant and Antibacterial Activity of Zingiber montanum Rhizomes. ASEAN J. Sci. Tech. Report 2023;26(3):1-9.

[8] Jeenapongsa R, Yoovathaworn K, Sriwatanakul KM, Pongprayoon U, Sriwatanakul K. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from Zingiber cassumunar Roxb. J Ethnopharmacol 2003;87(2-3):143-8.

[9] Tangyuenyongwatana P, Gritsanapan W. Prasaplai: An essential Thai traditional formulation for primary dysmenorrhea treatment. TANG 2014;4(2):10-1.

[10] Chongmelaxme B, Sruamsiri R, Dilokthornsakul P, Dhippayom T, Kongkaew C, Saokaew S, et al. Clinical effects of *Zingiber cassumunar* (Plai): A systematic review. Complementary Therapies in Medicine 2017; 35:70-77.

[11] Bua-in S and Paisooksantivatana Y. Essential oil and antioxidant activity of Cassumunar Ginger (Zingiberaceae: Zingiber montanum (Koenig) Link ex Dietr.) collected from various parts of Thailand. Kasetsart J (Nat Sci) 2009;43:467-75.

[12] Han AR, Kim H, Piao D, Jung CH, Seo EK. Phytochemicals and Bioactivities of Zingiber cassumunar Roxb. Molecules 2021;26(8):2377.

[13] Rahul R, Arrivukkarasan S and Anhuradha S. In Vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of Curcuma longa, Acorus calamus and Camellia sinensis. Food and Nutrition Sciences 2022;13:750-60.

[14] Niamsa N, Sittiwet C. Antimicrobial Activity of *Curcuma longa* aqueous extract. J Pharmacol Toxicol 2009; 4(4):173-77.

[15] Gupta A, Mahajan S, Sharma R. Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. Biotechnology Reports 2015;6:51–55.

[16] Roekruangr N, et al. Comparative Study on Antioxidant Activities and Phytochemical Components of Steamed and Non-Steamed Ginger Extracts. Thammasat Medical Journal 2018;18(4):528-35.

[17] Shim S, Kim S, Choi D-S, Kwon Y-B, Kwon J. Anti-inflammatory effects of [6]-shogaol: Potential roles of HDAC inhibition and HSP70 induction. Food and chemical toxicology 2011;49:2734-40.

[18] Black CD, Herring MP, Hurley DJ, O'Connor PJ. Ginger (*Zingiber officinale*) reduces muscle pain caused by eccentric exercise. J Pain 2010;11(9):894-903.

[19] Naderi Z. Mozaffari-Khosravi H, Dehghan A, Nadjarzadeh A, Husein HF. Effect of ginger powder supplementation on nitric oxide and C-reactive protein in elderly knee osteoarthritis patients: A 12-week double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. Journal of Traditional and Complementary Medicine 2016;6:199-203.

[20] Li F, Nitteranon V, Tang X, Liang J, Zhang G, Parkin KL, et al. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of 1-dehydro-[6]-gingerdione, 6-shogaol, 6-dehydroshogaol and hexahydrocurcumin. Food chemistry 2012;135:332-337.

[21] Maja D, et al. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technol. Biotechnol* 2013;51(1):84-91.

[22] Intan Soraya CS, et al. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. Chem Cent J 2018;11(54):1-11.

[23] Quettier-Deleu C, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol* 2020;72:35-42.

[24] Tai A, et al. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochim Biophys Acta* 2011;1810:170-7.

[25] Marino BA, Antonio C, Manuel A. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chem 2011;73:239-244.

[26] Aktas N, et al. Radical scavenging effect of different marine sponges from Mediterranean coasts. Records of Natural Products 2013;7(2):96-104.

[27] McCarron M, et al. Comparison of the monoterpenes derived from green leaves and fresh rhizomes of *Curcuma longa* L. from India. Flavour and Fragrance Journal 1995;10(6):355-57.

[28] Ahumada R, Timmermann BN and Gang DR. Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in Turmeric (*Curcuma longa*) and Ginger (*Zingiber officinale*): Identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. Phyto chemistry 2006; 67:2017-29.

[29] Poonkuil NL and Raja JD. Drying effects on ultrasonic assisted phenolic yields and retentiveness of antiradical properties of common culinary spices ginger (*zingiber officinale*) and turmeric (*curcuma longo*): hptlc and gc-ms profile for their active ingredients assessment. International Journal of Research 2017;5: 7-23.