

ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ของตำรับจันทน์ทั้งห้า

Effects of Extraction Methods on Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of
Chan-Tang-Ha Recipe

วรินทร์ โอนอ่อน ฉัตรชนก นุกุลกิจ ทันทิกา แก้วสูงเนิน นัฐธิมา เพิ่มผล และ ยลดา ศรีเศรษฐ์*

Warin Ohn-on Chatchanok Nukulkit Thanthika Kaewsoongnern Natthicha Poemphon and Yollada Sriset*

สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร

Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Natural Resources,

Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakhon Campus

*E-mail: yollada.sr@rmuti.ac.th

Received: Jul 20, 2022

Revised: Aug 10, 2022

Accepted: Aug 14, 2022

บทคัดย่อ

ตำรับจันทน์ทั้งห้าประกอบด้วยแก่นไม้สมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ จันทน์แดง จันทน์ขาว จันทน์เทศ จันทน์ชะมด และจันทนา ทางารแพทย์แผนไทยถูกใช้เป็นยาแก้ไข้ แก้ร้อนใน และบำรุงตับปอดหัวใจ อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับจันทน์ทั้งห้ายังมีไม่มาก การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับจันทน์ทั้งห้า ในการศึกษาใช้วิธีการสกัด 3 วิธี คือ การแช่ในตัวทำละลาย การชง และการต้มเดือด โดยทั้ง 3 วิธี ใช้ น้ำเป็นตัวทำละลาย การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมใช้วิธี Folin-Ciocalteu ส่วนการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี ABTS และ DPPH ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกันมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วงเท่ากับ 10.28-29.24 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดแห้ง โดยสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าด้วยการแช่ในตัวทำละลายมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด นอกจากนี้สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{••} และ DPPH[•] สูง โดยมีค่า half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) อยู่ในช่วงเท่ากับ 0.35-0.49 และ 0.11-0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับกรดแอสคอร์บิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ดังนั้นสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าด้วยวิธีการสกัดโดยการแช่ในตัวทำละลาย การชง และการต้มเดือดจึงแสดงคุณสมบัติที่ดีในการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ตำรับจันทน์ทั้งห้า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การแช่ในตัวทำละลาย การชง การต้มเดือด

Abstract

Chan-Tang-Ha recipe consists of 5 types of heartwoods including Chan-Daeng (*Dracaena loureiroi* Gagnep.), Chan-Khao (*Santalum album* L.), Chan-Thet (*Myristica fragrans* Houtt.), Chan-Chamod (*Mansonia gagei* J.R.Drumm. ex Prain), and Chan-Tana (*Tarenna hoaensis* Pitard.). It has been used in Thai traditional medicine as a medication for fever relief, treatment of mouth ulcer, and maintenance of liver, lung, and heart. However, its antioxidant activity has not been extensively studied. The present study aimed to investigate effects of extraction methods on total phenolic content and antioxidant activity of Chan-Tang-Ha recipe. In this study, 3 extraction methods were used including maceration, infusion, and decoction. For all of the methods, water was used as a solvent. To determine total phenolic content, Folin-Ciocalteu method was used. Antioxidant activity was analyzed by ABTS and DPPH assays. The results demonstrated that Chan-Tang-Ha extracts from different extraction methods had total phenolic

contents in the range of 10.28-29.24 mg of gallic acid equivalent per g of dry extract. The maceration extract of Chan-Tang-Ha showed the highest content of total phenolics. Moreover, Chan-Tang-Ha extracts from different extraction methods exhibited high ABTS^{•+} and DPPH[•] radical scavenging activities with the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values in the range of 0.35-0.49 and 0.11-0.13 mg/mL, respectively. Their antioxidant activities were equivalent to those of the standard antioxidant ascorbic acid. Therefore, the maceration, infusion, and decoction extracts of Chan-Tang-Ha possess decent free radical scavenging property and have the potential to be developed into antioxidant health supplements in the future.

Keywords: Chan-Tang-Ha recipe, Total phenolic content, Antioxidant activity, Maceration, Infusion, Decoction

1. บทนำ

อนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (Unpaired electrons) จึงเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียร อนุมูลอิสระส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปออกซิเจนว่องไว (Reactive oxygen species, ROS) การเกิดอนุมูลอิสระมีสาเหตุจากทั้งภายในและภายนอกร่างกาย เช่น กระบวนการหายใจระดับเซลล์ของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) กระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) กระบวนการฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว หรือจากการได้รับสารแปลกปลอม รังสี และยา ตลอดจนแสงแดดและความร้อน [1] อนุมูลอิสระมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาโดยการไปดึงอิเล็กตรอนจากอะตอมหรือโมเลกุลอื่นมาไว้ให้เป็นผู้ หรือให้อิเล็กตรอนโดดเดี่ยวแก่อะตอมหรือโมเลกุลอื่นเพื่อทำให้มีความเสถียร ก่อให้เกิดปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ (Chain reaction) และมีการเกิดขึ้นของอนุมูลอิสระชนิดอื่นต่อไป ทำให้มีการสะสมอนุมูลอิสระมากขึ้นจนเกินความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายที่จะกำจัดออกได้หมด นำไปสู่การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ส่งผลให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุล เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก นำไปสู่ความเสียหายต่อเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพและพัฒนาให้เกิดโรคร้ายแรงในมนุษย์ เช่น โรคสมองและระบบประสาท โรคหัวใจและหลอดเลือด มะเร็ง และเบาหวาน เป็นต้น [1], [2] ดังนั้นแนวทางในการยับยั้งหรือลดอนุมูลอิสระโดยใช้สมุนไพรที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระจึงมีความน่าสนใจและเป็นไปได้ที่จะช่วยปกป้องร่างกายจากอนุมูลอิสระได้ และการศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรจึงเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาในการรักษาโรคในมนุษย์อย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพรได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจาก

ธรรมชาติ มีรายงานการวิจัยพบว่าสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (Phenolics) เป็นสารที่พบได้มากในพืชพรรณ นานาชนิดไม่ว่าจะเป็นสมุนไพร ผัก และผลไม้ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่สำคัญ [3], [4]

หลักการดูแลสุขภาพทางกายและการแพทย์แผนไทยมีรูปแบบการรักษาโรคแบบองค์รวมเพื่อปรับสมดุลของธาตุทั้ง 4 ธาตุในร่างกาย ได้แก่ ธาตุดิน ธาตุน้ำ ธาตุลม และธาตุไฟ จึงเน้นการใช้ตำรับยาสมุนไพรที่ประกอบด้วยสมุนไพรหลายชนิดที่น่าจะช่วยเสริมฤทธิ์ให้มีประสิทธิภาพการรักษาโรคได้ดียิ่งขึ้น และทำให้ตำรับยาออกฤทธิ์รักษาโรคได้หลากหลาย ดังเช่น ตำรับหรือพิภักัดจันทน์ทั้งห้าเป็นการจำกัดจำนวนแก่นไม้จันทน์ 5 ชนิด ประกอบด้วย จันทน์แดง (*Dracaena loureiroi* Gagnep.) จันทน์ขาว (*Santalum album* L.) จันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) จันทน์ชะมด (*Mansonia gagei* J.R.Drumm. ex Prain) และจันทนา (*Tarenna hoaensis* Pitard.) ในทางการแพทย์แผนไทยตำรับจันทน์ทั้งห้าถูกใช้แก้ไข้เพื่อโลหิตและดี แก้อ่อนในกระหายน้ำ บำรุงตับปอดหัวใจ บำรุงธาตุ และแก้พยาธิบาดแผล [5] การศึกษาท่อน้ำใต้รายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรแต่ละชนิดที่อยู่ในตำรับยานี้ พบว่า จันทน์แดงมีฤทธิ์ในการสมานแผล ฤทธิ์ต้านการเกิดลิ่มเลือด และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย [6]-[8] จันทน์ขาวมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อแบคทีเรีย [9] จันทน์เทศมีฤทธิ์แก้ปวด ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ [10] จันทน์ชะมดช่วยปกป้องระบบประสาท และต้านเชื้อจุลินทรีย์ [11]-[13] และจันทนามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [14] จากข้อมูลข้างต้น เห็นได้ว่าสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับจันทน์ทั้งห้ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดี และอาจมีผลเสริมกันในการเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์รักษาโรคของตำรับจันทน์ทั้งห้าได้ ยิ่งไปกว่านั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยังมีความสอดคล้องกับสรรพคุณทางการแพทย์แผนไทยของตำรับจันทน์ทั้งห้าที่ช่วยบำรุงธาตุและบำรุงอวัยวะในร่างกาย ซึ่งสารที่มีบทบาทในการ

ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) จะช่วยลดสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ในมนุษย์ และปรับสมดุลร่างกายเพื่อป้องกันโรค อย่างไรก็ตามการรับประทานทั้งห้ายังมีการศึกษาน้อยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้เทคนิคการสกัดสารจากสมุนไพรเป็นขั้นตอนที่สำคัญเพื่อให้ได้สารหลักที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ละวิธีการสกัดอาจทำให้ปริมาณสารสำคัญที่ไม่เท่ากันและฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระดับหลอดทดลองของตำรับจันทน์ทั้งห้า โดยใช้เทคนิคการสกัด 3 วิธี ได้แก่ การแช่ในตัวทำละลายน้ำ (Maceration) การชง (Infusion) และการต้มเคี่ยว (Decoction) ผู้วิจัยหวังว่าผลจากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการเลือกวิธีการสกัดที่จะนำไปสู่การพัฒนาตำรับจันทน์ทั้งห้าเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระต่อไป

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. สารเคมี

สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) และเอบีทีเอส (2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid; ABTS) จากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) ดีพีพีเอช (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) โฟลีนซิโอแคลเตอูเรเจนต์ (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) และสารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้เป็นเกรตสำหรับการวิเคราะห์

2.2. การเตรียมผงยาตำรับจันทน์ทั้งห้า

สมุนไพรแห้ง ได้แก่ แก่นจันทน์แดง แก่นจันทน์ขาว แก่นจันทน์ชะมด แก่นจันทน์เทศ และแก่นจันทนา ได้จากร้านจำหน่ายเครื่องยาสมุนไพร อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2565 และตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องยาสมุนไพรด้วยการดูเอกลักษณ์ภายนอกโดยผู้เชี่ยวชาญทางด้านสมุนไพรและมีใบประกอบวิชาชีพการแพทย์แผนไทยด้านเภสัชกรรมไทยที่สาขาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร นำแก่นสมุนไพรมาบดหยาบ จากนั้นชั่งผงสมุนไพรแต่ละชนิดปริมาณ 20 กรัม แล้วผสมผงสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดในอัตราส่วนเท่ากันจะได้ผงยาตำรับจันทน์ทั้งห้า

2.3. การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำผงยาตำรับจันทน์ทั้งห้าปริมาณ 100 กรัม มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 ต่อ 10) โดยใช้วิธีการสกัด 3 วิธี ดังนี้ 1) การแช่ในตัวทำละลาย โดยนำผงยาตำรับจันทน์ทั้งห้าแช่ในน้ำเป็นเวลา 3 วัน 2) การชง โดยนำผงยาตำรับจันทน์ทั้งห้าแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และ 3) การต้มเคี่ยว โดยนำผงยาตำรับจันทน์ทั้งห้าต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการกรองแยกสารสกัดที่ได้จากการสกัดในแต่ละวิธีแล้วนำส่วนที่กรองได้ไปทำให้แห้งโดยการอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณสารสกัดน้ำที่ได้ต่อน้ำหนักพืชแห้ง (%Yield)

2.4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ชั่งสารสกัด 50 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเปิดสารสกัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ 96 well plate ที่มี Folin-Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟฟีนอลิกรวมมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดแห้ง (mg of gallic acid equivalent per g of dry extract; mg GAE/g dry extract) [15]

2.5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปิดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ 96 well plate ก่อนผสมกับรีแอคชันมิกเจอร์ (Reaction mixture) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) ความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ ที่ถูกตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง (รีแอคชันมิกเจอร์นี้ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่น

จนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.70 ± 0.02 ที่ 700 นาโนเมตร) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 6 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน ($0.0125-0.1$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระให้ลดลงได้ 50% (The half maximal inhibitory concentration; IC_{50}) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) ดังสมการที่ 1

$$\%Inhibition = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

โดยที่

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาสร้างกราฟลอการิทึมเพื่อคำนวณหา IC_{50} [15]

2.6. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เตรียมสารสกัดความเข้มข้น $0.1-10$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ 96 well plate จากนั้นปิเปตสารละลาย DPPH ในเอทานอลความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน ($0.001-0.625$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกรายงานเป็นค่า IC_{50} ซึ่งมีวิธีการคำนวณเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดังกล่าวไว้ข้างต้น [16]

2.7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) ($n=3$) นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ร่วมกับการวิเคราะห์ Tukey's *post-hoc* test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p\text{-value} < 0.05$ ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical package for the social science) version 26.0

3. ผลการวิจัย

3.1. ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้า

การสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าด้วยน้ำโดยวิธีสกัดที่ต่างกัน 3 วิธี พบว่า สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าโดยการแช่ในตัวทำละลาย มีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาล น้ำหนักสารสกัดหยาบเท่ากับ 1.68 กรัม คิดเป็น %Yield เท่ากับ 8.36% ขณะที่สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าโดยการขงมีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาล น้ำหนักสารสกัดหยาบเท่ากับ 6.21 กรัม คิดเป็น %Yield เท่ากับ 30.90% และสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าโดยการต้มเดือด มีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืด สีน้ำตาล น้ำหนักสารสกัดหยาบเท่ากับ 4.81 กรัม คิดเป็น %Yield เท่ากับ 23.93% (Table 1)

3.2. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าที่สกัดโดยวิธีการที่ต่างกัน

สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าโดยการแช่ในตัวทำละลาย มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (29.24 ± 1.26 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดแห้ง) รองลงมา คือ สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าโดยการต้มเดือด (26.47 ± 0.68 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดแห้ง) และสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าโดยการขง (10.28 ± 0.96 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดแห้ง) ตามลำดับ โดยการขงทำให้สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมแตกต่างจากการแช่ในตัวทำละลาย และการต้มเดือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2)

3.3. การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ของสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าที่สกัดโดยวิธีการที่ต่างกัน

สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าโดยการแช่ในตัวทำละลาย และการขงออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.35 ± 0.02 และ 0.35 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมา คือสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าโดยการต้มเดือด (IC_{50} เท่ากับ 0.49 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Table 3) (Figure 1) แต่สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันทั้ง 3 วิธีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกัน และสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้ไม่แตกต่างกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (IC_{50} เท่ากับ 0.04 ± 0.00) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3)

3.4. การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดตำรับ จันทน์ทั้งห้าที่สกัดโดยวิธีการที่แตกต่างกัน

สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าโดยการต้มเดือดมีค่า IC₅₀ น้อยที่สุด (0.11±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีที่สุด รองลงมา คือสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าโดยการแช่ในตัวทำละลาย และการชง โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.13±0.01 และ 0.13±0.03

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 3) (Figure 1) แต่สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันทั้ง 3 วิธีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกัน และสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ไม่แตกต่างกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (IC₅₀ เท่ากับ 0.12±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3)

Table 1 Physical characteristics of the Chan-Tang-Ha extracts from different extraction methods

Extract	Extraction methods	Physical characteristics	Weight of extract (g)	%Yield
Chan-Tang-Ha	Maceration	Black viscous liquid	1.68	8.36
Chan-Tang-Ha	Infusion	Brown viscous liquid	6.21	30.90
Chan-Tang-Ha	Decoction	Brown viscous liquid	4.81	23.93

Table 2 Total phenolic contents of the Chan-Tang-Ha extract from different extraction methods

Extract	Extraction methods	Total phenolic contents* (mg GAE/g dry extract)
Chan-Tang-Ha	Maceration	29.24±1.26 ^a
Chan-Tang-Ha	Infusion	10.28±0.96 ^b
Chan-Tang-Ha	Decoction	26.47±0.68 ^a

*The results are expressed as mean ± SD (n=3).

Mean values with different superscript letters in a column are significantly different at the significance level of 0.05.

Table 3 The IC₅₀ values of the Chan-Tang-Ha extracts from different extraction methods

Extract	Extraction methods	IC ₅₀ (mg/mL)*	
		ABTS ^{•+}	DPPH [•]
Chan-Tang-Ha	Maceration	0.35±0.02 ^a	0.13±0.01 ^b
Chan-Tang-Ha	Infusion	0.35±0.00 ^a	0.13±0.03 ^b
Chan-Tang-Ha	Decoction	0.49±0.02 ^a	0.11±0.03 ^b
Standard antioxidant (Ascorbic acid)		0.04±0.00 ^a	0.12±0.00 ^b

*The results are expressed as mean ± SD (n=3)

Mean values with the same superscript letter (a or b) in a column are not significantly different at the significance level of 0.05.

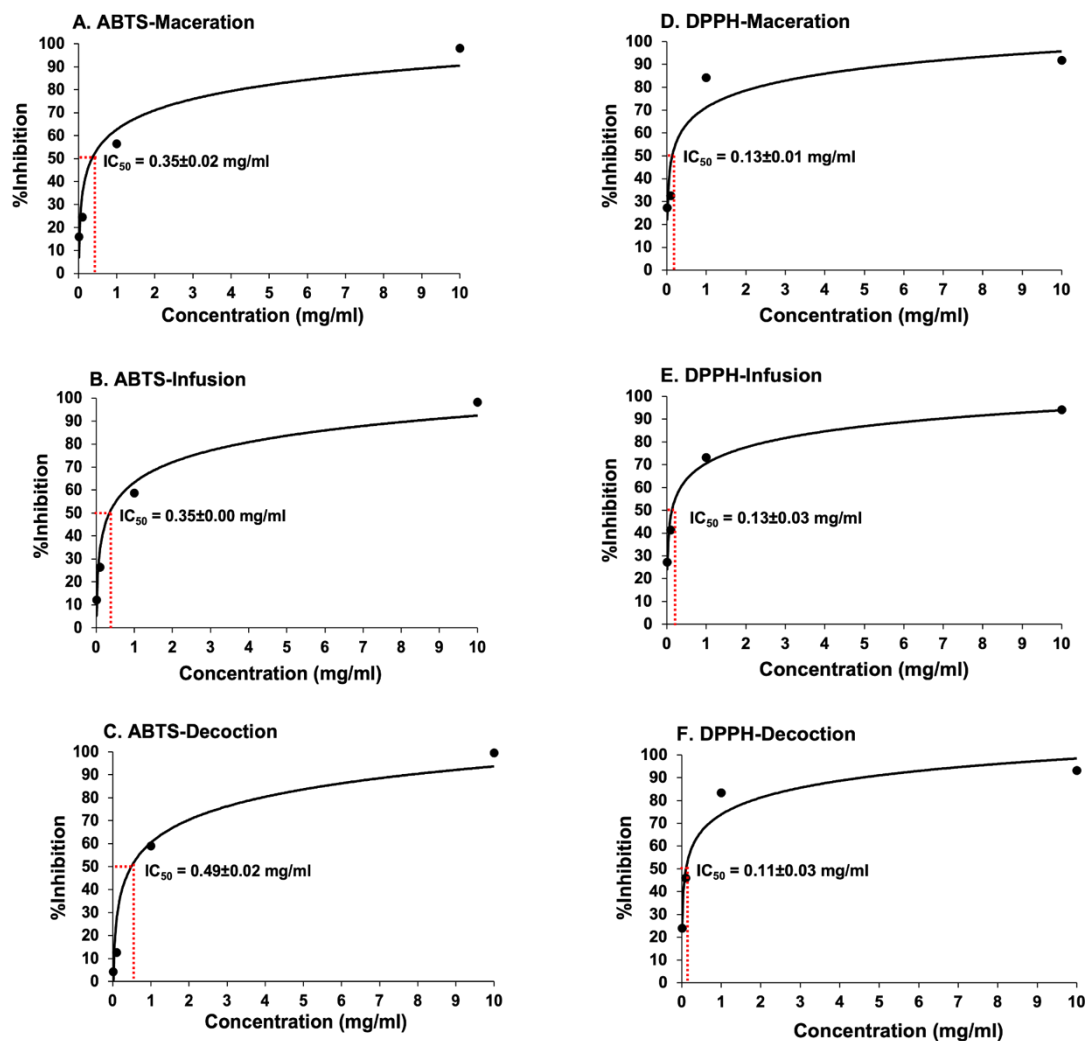


Figure 1 The IC_{50} values of the Chan-Tang-Ha extracts for ABTS and DPPH radical scavenging activities
 (A)-(C) The IC_{50} values of maceration, infusion, and decoction extracts, respectively, for ABTS radical scavenging activity
 (D)-(F) The IC_{50} values of maceration, infusion, and decoction extracts, respectively, for DPPH radical scavenging activity

4. อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้ได้ศึกษาผลของวิธีการสกัดด้วย จันทน์ทั้งห้า ได้แก่ การแช่ในตัวทำละลาย การขง และการต้ม เตือดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ รูปแบบการสกัดที่นำมาศึกษานี้เป็น วิธีการสกัดเช่นเดียวกับการเตรียมยาในทางการแพทย์แผนไทย และแต่ละวิธีสกัดมีความแตกต่างกันคือ การแช่ในตัวทำละลาย เป็นวิธีการสกัดสมุนไพรที่ไม่ใช้ความร้อน วิธีการนี้สามารถ เลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ได้หลากหลายชนิดเพื่อให้ เหมาะสมกับคุณสมบัติของสารสำคัญในสมุนไพรที่ต้องการ สกัดและใช้ระยะเวลาในการสกัด 3-7 วัน ส่วนการขง เป็น วิธีการสกัดสมุนไพรที่ใช้ความร้อนทางอ้อมโดยการแช่สมุนไพร ในน้ำเดือดนาน 5-15 นาที และการต้มเดือดเป็นการสกัดที่ใช้ ความร้อนโดยตรงโดยนำสมุนไพรต้มในน้ำเดือดนาน 15-30 นาที [17] จะเห็นได้ว่าการสกัดแต่ละรูปแบบใช้ระยะเวลาและ มีวิธีการนำสารสำคัญออกจากสมุนไพรให้อยู่ในชั้นของตัวทำ ละลายที่แตกต่างกัน จึงส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการศึกษานี้

จากการวิเคราะห์ %Yield พบว่า ตำรับจันทน์ทั้งห้าที่ ถูกสกัดด้วยวิธีการขงและการต้มเดือดมี %Yield ใกล้เคียงกัน และสูงกว่าการแช่ในตัวทำละลาย ความร้อนในการสกัดจึง น่าจะมีผลต่อ %Yield ของสารสกัดหยาบ ซึ่งความร้อนจะทำให้ ตัวทำละลายเกิดการเดือดและมีไอรระเหยเข้าไปถึง สารประกอบทางเคมีที่อยู่ในพืชทำให้สามารถสกัดสารออกมา ได้มากกว่าการสกัดที่ไม่ใช้ความร้อน ดังนั้นวิธีการสกัดที่ใช้ ความร้อน (การขงและการต้มเดือด) จึงให้ %Yield ของสาร สกัดหยาบสูงกว่าวิธีการสกัดที่ไม่ใช้ความร้อน (การแช่ในตัวทำ ละลาย) [18]

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป เนื่องจากสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก ประกอบด้วยอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซีนและมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ จึงสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ ด้วยกลไกการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมทำให้อนุมูล อิสระอยู่ในรูปที่มีความเสถียร และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูป แอคทีฟได้ [19] ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจึงเป็นตัว บ่งชี้ได้ถึงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร อีกทั้งสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด ส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบมีขั้วละลายน้ำได้ [20] การศึกษานี้จึง เลือกใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลที่มี ขั้วสูง และยังสอดคล้องกับวิธีการเตรียมยาในทางการแพทย์

แผนไทยซึ่งส่วนใหญ่จะใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย [5] การศึกษา ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมพบว่าสารสกัดตำรับจันทน์ ทั้งห้าในแต่ละวิธีการสกัดมีสารประกอบฟีนอลิกรวมที่แตกต่าง กันอยู่ในช่วง 10.28-29.24 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ กรัมของสารสกัดแห้ง ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของ สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าด้วยการแช่ในตัวทำละลายและการ ต้มเดือดมีค่ามากที่ใกล้เคียงกันเนื่องจากการแช่เป็นการให้ ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปละลายสารสำคัญในสมุนไพร ออกมา ใช้ระยะเวลานานหลายวัน ส่วนความร้อนโดยตรงจาก การต้มเดือดจะดึงสารสำคัญในพืชออกมาอยู่ในตัวทำละลาย ใช้เวลาในการสกัดนาน 15 นาทีขึ้นไป [17] ขณะที่การขงเป็น การสกัดสารสำคัญด้วยการแช่สมุนไพรในน้ำเดือด ใช้ระยะเวลา ช่วงสั้น ๆ ไม่เกิน 15 นาที [17] การขงจึงทำให้สารประกอบ ฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้ามีปริมาณน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยการแช่ในตัวทำละลายและการต้ม เดือด

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH โดยวิธี ABTS เป็นการทดสอบความสามารถของสาร สกัดในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ส่วนวิธี DPPH เป็น การทดสอบความสามารถของสารสกัดในการให้ไฮโดรเจน อะตอมแก่อนุมูลอิสระ [21] จากการศึกษาครั้งนี้ได้พิจารณาจาก ค่า IC₅₀ ของสารสกัดที่มีค่าน้อยจะมีความสามารถในการต้าน อนุมูลอิสระสูง พบว่าสารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าด้วยวิธีการ แช่ในตัวทำละลายการขง และการต้มเดือดมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูล อิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] ได้ดี ซึ่งมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 0.35- 0.49 และ 0.11-0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษาก่อนหน้านี้ได้ศึกษาสารสกัดส่วนน้ำของตำรับจันทน์ ทั้งห้า โดยใช้วิธีการต้มเคี่ยวให้เหลือ 1 ใน 3 ส่วน พบว่า สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 82.68 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสาร สกัดแห้ง [14] ซึ่งมีค่าแตกต่างกันกับการศึกษานี้ เนื่องจาก ใช้วิธีการสกัดที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของการศึกษานี้มีความสอดคล้องและมีค่า IC₅₀ ใกล้เคียงกับ การศึกษาก่อนหน้าพบว่า สารสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าสามารถ ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.82 และ 0.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ [14] ดังนั้น วิธีการสกัดตำรับจันทน์ทั้งห้าด้วยการแช่ในตัวทำละลาย การขง และการต้มเดือดจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมทำให้ได้สารสกัด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี

5. บทสรุป

การแก้ไขตัวทำลาย การชง และการดื่มเดือดเป็นวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารจันทน์ทั้งห้า เนื่องจากสารสกัดจันทน์ทั้งห้าในแต่ละวิธีการสกัดสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺ และ DPPH[•] ได้สูงและมีฤทธิ์เทียบเท่ากับกรดแอสคอร์บิกซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน แม้ว่าวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธีนี้จะสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกรวมได้น้อย ซึ่งสารสกัดจันทน์ทั้งห้าอาจพบสารประกอบทางเคมีอื่น ๆ จากสมุนไพรแต่ละชนิดที่เข้าเป็นตำรับยาของจันทน์ทั้งห้า เช่น ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และอัลคาลอยด์ เป็นต้น ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบนั้นอาจจะมาจากสารประกอบทางเคมีหลายชนิด ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ในการสกัดสารจากตำรับจันทน์ทั้งห้าสำหรับใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ ต่อไป และนำไปสู่การพัฒนาที่ใช้รักษาโรคหรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ทำให้ทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของตำรับจันทน์ทั้งห้า ซึ่งอาจจะยังไม่สามารถอธิบายกลไกการต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งหมด จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงลึกมากขึ้นเกี่ยวกับกลไกการต้านอนุมูลอิสระของตำรับจันทน์ทั้งห้า เช่น วิธีดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical scavenging assay) และวิธีดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical scavenging assay) เป็นต้น

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร สำหรับความเอื้อเฟื้อในการให้บริการเครื่องมือวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้

7. References

[1] Preiser, J.C. 2012. Oxidative stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 36(2): 147-154.
[2] Adwas, A.A. and et al. 2019. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*. 6(1): 43-47.

[3] Birben, E. and et al. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 5: 9-19.
[4] Cosme, P. and et al. 2020. Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Antioxidants*. 9(12): 1-20.
[5] Wuttidhammaved, W. 2007. *The Rattanakosin Pharmacy Ancient Book*. Bangkok: Silpa Siam Packaging and Printing. (in Thai)
[6] Liu, H. and et al. 2013. Evaluation of the wound healing potential of resina draconis (*Dracaena cochinchinensis*) in animal models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013: 1-10.
[7] Xin, N. and et al. 2011. Dragon's Blood extract has antithrombotic properties, affecting platelet aggregation functions and anticoagulation activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 135(2): 510-514.
[8] Fan, J.Y. and et al. 2014. A systematic review of the botanical, phytochemical and pharmacological profile of *Dracaena cochinchinensis*, a plant source of the ethnomedicine "dragon's blood". *Molecules*. 19(7): 10650-10669.
[9] Sindhu, R.K. and et al. 2010. *Santalum album* LINN: a review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. *International Journal of PharmTech Research*. 2(1): 914-919.
[10] Ha, M.T. and et al. 2020. Phytochemical and pharmacological properties of *Myristica fragrans* Houtt.: An updated review. *Archives of Pharmacal Research*. 43(11): 1067-1092.
[11] Tiew, P. and et al. 2002. Four new sesquiterpenoid derivatives from the heartwood of *Mansonia gagei*. *Journal of Natural Products*. 65(9): 1332-1335.

- [12] Tiew, P. and et al. 2003. Antifungal, antioxidant and larvicidal activities of compounds isolated from the heartwood of *Mansonia gagei*. **Phytotherapy Research**. 17(2): 190-193.
- [13] Changwong, N. and et al. 2012. Acetyl- and butyryl- cholinesterase inhibitory activities of mansorins and mansonones. **Phytotherapy Research**. 26(3): 392-396.
- [14] Kacharin, H. and et al. 2021. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water extracted Jan Tung Ha. In: **Proceedings of the 52nd National Graduate Research Conference**, 28 May 2021. Chon Buri, Thailand. (in Thai)
- [15] Sriset, Y. and et al. 2021. In vitro antioxidant potential of *Mallotus repandus* (Willd.) Muell. Arg stem extract and its active constituent bergenin. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 43(1): 24-30.
- [16] Chairgulprasert, V. and et al. 2021. Preliminary phytochemical screening and antioxidant activity of Robusta coffee blossom. **Thammasat International Journal of Science and Technology**. 22(1): 1-8.
- [17] Sopittummakhun, K. and Rattanasinganchan, P. 2017. Extraction and determination of antioxidant activity in herbal plant. **Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal**. 3: 86-94. (in Thai)
- [18] Aspe, E. and Fernandez, K. 2011. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Industrial Crops and Products**. 34(1): 838-844.
- [19] Zeb, A. 2020. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. **Journal of Food Biochemistry**. 44(9): 1-22.
- [20] Halee, A. and Rattanapun, B. 2016. Effects of solvent type and concentration of citric acid on the extraction of antioxidants from Hom Nin Rice. **KMUTT Research and Development Journal**. 39(3): 353-364. (in Thai)
- [21] Prior, R. L. and et al. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53(10): 4290-4302.