

การพัฒนากระบวนการเตรียมสารสกัดสมุนไพรไทย ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Development of Extraction Process for Preparing High Anti-oxidant Extracts from Thai Herbs

ชนัญ ผลประไพ* และศรัณยู อุันทวี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Chanan Phonprapai* and Saranyou Oontawee

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Received: January 27, 2019; Accepted: April 2, 2019

บทคัดย่อ

กลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรังเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตก่อนวัยอันควรของประชากรไทย มีผู้ป่วยจำนวนมากที่มีสาเหตุการเกิดโรคมารจากอนุมูลอิสระ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษากระบวนการเตรียมสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการสกัดสมุนไพรไทย ได้แก่ แก่นฝาง ผลสมอไทย ผลสมอพิเภก ผลมะขามป้อม และลำต้นบอระเพ็ด ด้วยวิธีการแช่ในเอทานอล เพื่อคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดแก่นฝางและสารสกัดผลมะขามป้อมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดสมุนไพรชนิดอื่น เมื่อสกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท เพื่อคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม พบว่าเอทานอลยังคงเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมเนื่องจากทำให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง และมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูง แม้ว่าการสกัดด้วยเอทานอลจะทำให้มีผลได้การสกัดน้อยกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล อย่างไรก็ตาม เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษต่ำและมีราคาถูก จึงมีความเหมาะสมต่อการสกัดสารออกฤทธิ์จากแก่นฝางและผลมะขามป้อมด้วยวิธีการแช่ ทั้งในระดับชุมชนและระดับอุตสาหกรรม

คำสำคัญ : ฝาง; มะขามป้อม; สมุนไพรไทย; ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ; โรคไม่ติดต่อเรื้อรัง

Abstract

Non-communicable diseases (NCDs) are the major causes of premature mortality in Thailand, which their abnormalities are primarily caused by free radicals. Thus, this research aimed to develop the extraction process for preparing high antioxidant extracts from Thai herbs. To screen the potent herbal plants, i.e. Sappanwood heartwood (SH), Indian gooseberry fruit (IG), Chebulic myrobalan fruit

(CM), Belliric myrobalan fruit (BM) and heart-leaved moonseed stem (HM), were extracted by macerating in ethanol. The results revealed that SH extract and IG extract exhibited high potential for antioxidant activity with high total phenolic content (TPC) among other extracts. After the selected herbs were macerated in various solvents including methanol (MeOH), ethanol (EtOH) and ethyl acetate (EtOAc), the results showed that the most suitable solvent was EtOH due to the obtained extracts expressed high antioxidant activity, high TPC and high total flavonoid content (TFC). Although extraction of SH and IG by using EtOH gave the extraction yield lower than that by MeOH, this solvent is known to be low toxic and low cost. These reasons make EtOH more suitable for extracting SH and IG in community and industrial scales.

Keywords: Sappanwood; Indian gooseberry; anti-oxidant activity; non-communicable disease

1. คำนำ

กลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (non-communicable disease, NCD) เป็นสาเหตุหลักสำหรับการเสียชีวิตของประชากรไทยในทศวรรษที่ผ่านมา โดยมีสัดส่วนการเสียชีวิตจากกลุ่มโรคเหล่านี้ประมาณร้อยละ 75 ของการเสียชีวิตทั้งหมด และจากสถิติยังพบว่าเป็นการเสียชีวิตก่อนวันอันควรถึงร้อยละ 55 ซึ่งมีสาเหตุการเสียชีวิตมาจากโรคหลอดเลือดสมอง โรคหัวใจขาดเลือด และโรคเบาหวาน เป็นต้น (กรมควบคุมโรค, 2560) การเกิดโรคเหล่านี้ส่วนใหญ่มีสาเหตุจากภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) และการอักเสบ (inflammation) (Camps and García-Heredia, 2014) เป็นที่ทราบกันดีว่าอนุมูลอิสระ (free radical) หรืออนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species, ROS) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) เป็นสาเหตุหลักของการเกิดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลในเซลล์ (Camps and García-Heredia, 2014) หากว่าในร่างกายมีอนุมูลอิสระมากเกินไปจนความสามารถของกลไกการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์แล้ว โมเลกุลอนุมูลอิสระอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดีเอ็นเอ และเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนและไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และส่งผลให้เกิดโรคที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ โรคชรา โรคมะเร็ง

โรคความจำเสื่อม เป็นต้น (Ames et al., 1993)

ตำรับยาแพทย์แผนไทย (Thai traditional medicine) และตำรับยาอายุรเวท (Ayurvedic medicine) นั้นใช้พืชสมุนไพรที่หลากหลายประกอบขึ้นเป็นตำรับยาเพื่อการรักษาโรค โดยพืชสมุนไพรที่มีความน่าสนใจ ได้แก่ ผาง (*Caesalpinia sappan*) มีการใช้ส่วนแก่น (Sappanwood heartwood, SH) มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) มีการใช้ส่วนผล (Indian gooseberry fruit, IG) สมอไทย (*Terminalia chebula*) มีการใช้ส่วนผล (Chebulic myrobalan fruit, CM) สมอพิเภก (*Terminalia bellirica*) มีการใช้ส่วนผล (Belliric myrobalan fruit, BM) และบอระเพ็ด (*Tinospora cordifolia*) มีการใช้ส่วนลำต้น (heart-leaved moonseed stem, HM) เป็นต้น โดยในท้องตลาดมีผลิตภัณฑ์น้ำสมุนไพรสกัดจากผลมะขามป้อม ผลสมอพิเภก และผลสมอไทย จำหน่ายกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งตำรับสมุนไพรนี้มีชื่อว่า “ตรีผลา” (Triphala) ที่แปลว่าผลไม้ 3 ชนิด จากการศึกษาศาสตร์ทางเภสัชวิทยาของตรีผลาพบว่าตรีผลามีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory activity) เป็นยาระบาย (laxative effect) กระตุ้นความอยากอาหาร (appetite stimulation) ลดน้ำตาลในกระแสเลือด (hypoglycemic activity) ต้านการอักเสบ (anti-

inflammatory activity) ต้านแบคทีเรีย (anti-bacterial activity) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) และ ต้านมะเร็ง (anti-neoplastic activity) เป็นต้น (Peterson และคณะ, 2017)

นอกจากตรีผลาแล้ว ยังมีสมุนไพรชนิดอื่นที่กล่าวถึงข้างต้นที่มีการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เช่นกัน โดย Naik Bukke และคณะ (2018) ได้เปรียบเทียบความสามารถในการทำละลายเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ มะเร็งปอด (A-549) ของสารสกัดใบและแก่นของฝางเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เมทานอล (methanol) คลอโรฟอร์ม (chloroform) และน้ำ จากการศึกษาพบว่าสารบราซิลลินเอ (Brazilin A) ที่ได้จากแก่นฝางสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมดังกล่าว และในปีเดียวกัน Hwang และ Shim (2018) พบว่าสารสกัดฝางสามารถลดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์เคราตินocytes ของมนุษย์ (human epidermal keratinocyte) ที่เกิดการกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่นช่วง 320-400 นาโนเมตร เนื่องจากสารสกัดฝางมีความสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส 7 นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ บราซิลลินมีความใกล้เคียงกับเอนไซม์กลูตาไทโอน เปอร์ออกซิเดส 7 ด้วยเหตุนี้ สารสกัดฝางจึงมีความ สามารถในการลดอาการเสียหายของผิวหนังจากการถูกแสงแดด ส่วนการศึกษาฤทธิ์การป้องกันการเกิดแผลจากกรดในกระเพาะอาหารของสารสกัดแก่นฝางโดย Chellappan และคณะ (2017) รายงานว่าสารสกัดแก่นฝางสามารถป้องกันการเกิดแผลจากกรดในกระเพาะอาหารของหนูทดลอง เนื่องจากกลไกการปกป้องเซลล์และการต้านอนุมูลอิสระ

สำหรับการศึกษาศาสตร์สาคัดมะขามป้อม Pandey และคณะ (2019) ได้ทดสอบความสามารถของสารสาคัดมะขามป้อมต่อการลดการสะสมของ

โครเมียม (chromium) ในเมล็ดข้าว ซึ่งผลปรากฏว่าสารสาคัดมะขามป้อมสามารถยับยั้งการนำโครเมียมเข้าสู่เซลล์โดยการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาสารสาคัดผลสมอไทยของ Lee และคณะ (2017) พบว่าแทนนินชนิดย่อยได้ (hydrolyzable tannin) ที่สกัดได้จากผลสมอไทยซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส (α -glucosidase) ได้แก่ 4-O-(2",4"-di-O-galloyl- β -L-rhamnosyl) ellagic acid และ 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-4-O-cinnamoyl- β -D-glucose โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งร้อยละ 50 (inhibitory concentration, IC_{50}) เท่ากับ 2.9 และ 6.4 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนสมอพิเภกมีการศึกษาศาสตร์สาคัดสมอพิเภกที่ใช้ตัวทำละลายเป็นเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับตับ โดย Chen และคณะ (2015) ได้รายงานวาศาสตร์สาคัดสมอพิเภกที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทสามารถลดการเกิดพังผืดในตับ (hepatic fibrosis) โดยการยับยั้งการสังเคราะห์คอลลาเจน (collagen) และยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดของ hepatic stellate cell (HSC-T6) และยังพบว่าสารสาคัดนี้ช่วยทำให้เกิดการตายของเซลล์ตับชนิดนี้ ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำให้เกิดพังผืดในตับสำหรับการใช้ประโยชน์จากบอระเพ็ดนั้น Selvam และคณะ (2017) ศึกษาการใช้ใบบอระเพ็ดสดเป็นตัวรีดิวส์ (reducing agent) และตัวควบคุมการเกิดอนุภาค (capping agent) ในการสังเคราะห์ silver nanoparticle ผลปรากฏว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้สามารถต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียได้สูงกว่าสารสกัดจากใบบอระเพ็ด ซึ่งเป็นแนวโน้มที่ดีในการพัฒนาอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้ไปสู่ผลิตภัณฑ์ด้านชีวการแพทย์ต่อไป ส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloid) ที่สกัดได้จากลำต้นและรากของบอระเพ็ด พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านเบาหวาน ต้านไวรัส ต้านการ

อักษะ เป็นตัน (Tiwari และคณะ, 2018)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นนำพืชสมุนไพรเหล่านั้นมาสกัดด้วยกระบวนการสกัดที่เหมาะสม เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงพร้อมทั้งมีปริมาณสารออกฤทธิ์อยู่ในระดับที่สูงด้วย เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยา ทั้งนี้ชิ้นส่วนของพืชสมุนไพรไทยที่ผู้วิจัยสนใจ ได้แก่ แก่นฝาง ผลมะขามป้อม ผลสมอไทย ผลสมอพิเภก และลำต้นบอระเพ็ด

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กระบวนการสกัดผงพืชสมุนไพร

2.1.1 การเตรียมผงพืชสมุนไพร

นำชิ้นส่วนพืชสมุนไพรไทยแห้ง ได้แก่ แก่นฝาง ผลมะขามป้อม ผลสมอไทย ผลสมอพิเภก และลำต้นบอระเพ็ด มาบดด้วยเครื่องปั่นผลไม้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ได้ผงสมุนไพรละเอียด แล้วนำผงที่ได้มาร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 600 ไมโครเมตร หรือ 30 เมช (mesh) นำผงสมุนไพรละเอียดที่ร่อนได้ไปเก็บที่อุณหภูมิห้องให้แห้งแสงและอากาศเพื่อรอการนำไปใช้ในการสกัดต่อไป

2.1.2 การสกัดด้วยวิธีการแช่

การสกัดผงพืชสมุนไพรด้วยวิธีการแช่ (maceration) ผู้วิจัยได้นำผงพืชสมุนไพรมาผสมกับตัวทำละลายที่ใช้ด้วยสัดส่วนโดยมวลผงพืชต่อปริมาตรตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 10 จากนั้นบรรจุลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปวางไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเพื่อนำกากที่แยกได้ไปสกัดต่ออีก 1 รอบ ด้วยสภาวะและกระบวนการสกัดเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 รอบ มารวมกันแล้วนำไประเหยแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำสารสกัดหยาบแห้งที่ได้มาใส่ในโถดูดความ

ชื้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บในหลอดแก้วที่บดแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์คุณลักษณะของสารสกัดสมุนไพรในลำดับต่อไป

2.2 การวิเคราะห์คุณลักษณะของสารสกัดสมุนไพร

2.2.1 ผลได้จากการสกัดผงพืชสมุนไพร

หลังจากได้สารสกัดหยาบแห้งแล้ว สารสกัดหยาบแห้งที่ได้จะเก็บในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อปรับระดับความชื้น จากนั้นจึงนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วนำน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ (W_E) และน้ำหนักผงพืชที่ใช้ (W_P) มาคำนวณผลได้ของการสกัด (extraction yield, EY) ดังสมการ $EY (\% w/w) = (W_E \div W_P) \times 100$ ทั้งนี้ สารสกัดหยาบแห้งที่ได้นั้นจะนำไปเก็บให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองถัดไป

2.2.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ผู้วิจัยได้ใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic content, TPC) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ที่ดัดแปลงมาจาก ศรีณยุ อุณหวิ และคณะ (2561) โดยในการเตรียมสารละลายสารสกัดตัวอย่างได้ทำการละลายสารสกัดตัวอย่างด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.98 และปรับความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองผ่านตัวกรองเซลลูโลสอะซิเตท ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บในหลอดแก้วที่บดแสง นำสารสกัดที่เตรียมได้มาเจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) จนได้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายอยู่ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 ในการเตรียมกรดแกลลิกที่ใช้เป็นสารมาตรฐานได้เตรียมโดยกระบวนการข้างต้นเช่นกัน จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยเจือจางสารสกัดแบบ

อนุกรม 2 เท่า (2-fold serial dilution) ด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 ในไมโครเพลท (microplate) เพื่อให้ได้สารสกัด 7 ความเข้มข้น (ตั้งแต่ 1.0 ถึง 0.015625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่มีปริมาตร 50 ไมโครลิตร อยู่ในหลุมโดยเรียงความเข้มข้นมากไปน้อยจากหลุม H ไปจนถึงหลุม B เจือจาง 3 ซ้ำต่อ 1 ความเข้มข้น แล้วจึงเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปในหลุม เขย่าเป็นเวลา 1 นาที แล้วบ่มต่อเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) เข้มข้นร้อยละ 7.5 ลงไป 75 ไมโครลิตร และนำไปเขย่าเป็นเวลา 1 นาที ก่อนเก็บที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader, SUNRISE™, Tecan Trading AG, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร และนำค่าความชันของสารสกัด (S_E) ที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่าการดูดกลืนแสงมาเปรียบเทียบกับค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (S_{GA}) เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (gallic acid equivalent, GAE) โดยใช้สมการดังนี้

$$\text{TPC (mg GAE/g extract)} = (S_E \div S_{GA}) \times 1000$$

2.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid content, TFC) ผู้วิจัยได้ใช้วิธี aluminium complexation ที่ดัดแปลงมาจาก Pekal และ Pyrzynska (2014) ซึ่งมี 2 วิธีการ ได้แก่ วิธีที่ใช้ควอร์เซทิน (quercetin) เป็นฟลาโวนอยด์มาตรฐาน และวิธีที่ใช้คาเทชิน (catechin) เป็นฟลาโวนอยด์มาตรฐาน ก่อนการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมได้นำสารสกัดตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ มาละลายในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ

99.98 ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านตัวกรองเซลลูโลสอะซิเตทขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บในหลอดแก้วที่บดแสง จากนั้นนำสารสกัดที่เตรียมไว้มาเจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน ได้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาเจือจางอีก 10 เท่าด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 จนได้เป็นสารสกัดที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 ส่วนสารมาตรฐานเคออสทินและสารมาตรฐานคาเทชินได้ถูกเตรียมด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้นเช่นกัน แต่จะมีการเตรียมให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.98 และเจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 นำสารละลายที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้ง 2 วิธี

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมวิธีที่ 1 ที่มีการใช้เคออสทินเป็นฟลาโวนอยด์มาตรฐาน ซึ่งได้เจือจางสารสกัดแบบอนุกรม 2 เท่า ในไมโครเพลทด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 ให้ได้สารสกัด 4 ความเข้มข้น (0.05, 0.025, 0.0125 และ 0.00625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ที่มีปริมาตร 80 ไมโครลิตร เตรียม 3 ซ้ำต่อ 1 ความเข้มข้น จากนั้นเติมเอทานอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ (aluminum chloride, AlCl_3) เข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วเขย่าในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader, SUNRISE™, Tecan Trading AG, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ส่วนสารมาตรฐานเคออสทินนั้นได้ถูกเตรียมเป็น 7 ความเข้มข้น

(0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.003125, 0.0015625 และ 0.00078125 มิลลิโมลาร์) และมีการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับสารสกัดตัวอย่าง

ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมวิธีที่ 2 ที่มีการใช้คาเทชินเป็นฟลาโวนอยด์มาตรฐาน ซึ่งได้เจือจางสารสกัดแบบอนุกรม 2 เท่า ในไมโครเพลทด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 ให้ได้สารสกัด 4 ความเข้มข้น (0.05, 0.025, 0.0125 และ 0.00625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ที่มีปริมาตร 80 ไมโครลิตร เตรียม 3 ซ้ำต่อ 1 ความเข้มข้น เช่นเดียวกันกับวิธีที่ 1 แต่จะมีการเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ (sodium nitrite, NaNO_2) เข้มข้นร้อยละ 3.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม แล้วเขย่าในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายยอลูมิเนียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วเขย่าในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมแล้วเขย่าในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader, SUNRISE™, Tecan Trading AG, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ส่วนสารมาตรฐานคาเทชินนั้นได้เตรียมเป็น 7 ความเข้มข้น (0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.003125, 0.0015625 และ 0.00078125 มิลลิโมลาร์) และมีการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับสารสกัดตัวอย่าง

สำหรับการคำนวณค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากวิธีที่ 1 จะนำค่าความชันของสารสกัด (S_E) ที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่าการดูดกลืนแสงมาเปรียบเทียบกับค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารมาตรฐานเคอควิทิน (S_{QE}) เพื่อคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเทียบเท่าเคอควิทิน (quercetin equivalent, QE) โดยใช้สมการ

$\text{TFC1 (mM QE/g extract)} = (S_E \div S_{QE}) \times 1000$ และในการคำนวณค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากวิธีที่ 2 จะนำค่าความชันของสารสกัด (S_E) ที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่าการดูดกลืนแสงมาเปรียบเทียบกับค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารมาตรฐานคาเทชิน (S_{CE}) เพื่อคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเทียบเท่าคาเทชิน (catechin equivalent, CE) ด้วยสมการ $\text{TFC2 (mM CE/g extract)} = (S_E / S_{CE}) \times 1000$

2.2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ผู้วิจัยได้ใช้วิธี DPPH assay ที่ดัดแปลงมาจาก ศรีณยุ อุณหวิ และคณะ (2561) ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant activity) โดยละลายสารสกัดตัวอย่างด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.98 ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิตร แล้วกรองโดยฉีดผ่านตัวกรองเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate) ที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร แล้วเก็บในหลอดแก้วทึบแสง นำสารสกัดที่ได้มาเจือจาง 10 เท่า ด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.98 ให้ได้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ด้วยวิธี DPPH assay โดยมีการเจือจางสารสกัดแบบอนุกรม 2 เท่า ด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.98 ให้ได้ 7 ความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในไมโครเพลท (micro plate) จากหลุม H ไปจนถึงหลุม B ในไมโครเพลท (4 ซ้ำต่อ 1 ความเข้มข้น) ซึ่งได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ถึง 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นจึงเติมสารละลายอนุมูลอิสระดีฟีนิเอซ (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) ความเข้มข้น 0.12 มิลลิโมลาร์ ลงไป 100 ไมโครลิตร เป็นการเจือ

จาง 2 เท่า ทำให้สารละลายอนุมูลอิสระมีความเข้มข้นเป็น 0.06 มิลลิโมลาร์ ส่วนตัวควบคุมซึ่งอยู่ในหลุมในซ้ำที่ 4 ของแต่ละความเข้มข้น จะเติมตัวทำละลายของดีพีพีเอช (เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.98) แทนการเติมสารละลายดีพีพีเอช ส่วนตัวควบคุมดีพีพีเอช จะเติมตัวทำละลายของสารสกัด (เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.98) ลงไปแทนการเติมสารละลายสารสกัดตัวอย่าง แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader, SUNRISE™, Tecan Trading AG, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด (OD_E) ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม (OD_C) และค่าการดูดกลืนแสงของดีพีพีเอช (OD_{DPPH}) ที่อ่านได้มาคำนวณค่าการทำลายอนุมูลอิสระ (radical scavenging, RD) ด้วยสมการ $RD (\%) = \{[OD_{DPPH} - (OD_E - OD_C)] \div OD_{DPPH}\} \times 100$

นำค่าการทำลายอนุมูลอิสระที่คำนวณได้ไปคำนวณค่าความเข้มข้นในการยับยั้งร้อยละ 50 (inhibitory concentration, IC_{50}) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสกัดและค่าการทำลายอนุมูลอิสระ (dose-response analysis) ใช้การวิเคราะห์การถดถอยแบบโลจิสติก 4 ตัวแปร (four-parameter logistic regression) ในการวิเคราะห์ข้อมูลเหล่านี้ด้วยโปรแกรม RStudio Version 1.0.143 (R Core Team, 2017) จะมีการเตรียมข้อมูลเพื่อนำเข้าโปรแกรมโดยจะนำค่าความเข้มข้น (Conc) และค่าการทำลายอนุมูลอิสระ (RD) ทั้ง 3 ซ้ำ มาเรียงเป็น 2 สดมภ์ ในไฟล์นามสกุล .txt ในรูปแบบ tab delimited จากนั้นนำข้อมูลเข้าสู่โปรแกรมด้วยฟังก์ชัน (function) `dat<-read.table("file name.txt", header = T)` เพื่อเก็บข้อมูลในวัตถุ (object) dat จากนั้นจะนำวัตถุ dat เข้าสู่สภาพแวดล้อมการทำงานของโปรแกรมด้วย

ฟังก์ชัน `attach(dat)` แล้วดึงคลัง MASS และคลัง drc มาใช้งานในโปรแกรมด้วยฟังก์ชัน `library(MASS)` และ `library(drc)` ตามลำดับ ลำดับถัดมานำวัตถุ dat มาวิเคราะห์การถดถอยแบบโลจิสติก 4 ตัวแปร แล้วเก็บในวัตถุ `model1` ด้วยฟังก์ชัน `model1<-drm(RD~Conc, fct=LL.4 (names=c("Slope", "Lower", "Upper", "ED50")), data=dat)` และแสดงค่าความเข้มข้นในการยับยั้งร้อยละ 50 ด้วยฟังก์ชัน `ED(model1, 50, type = "absolute")` (Ritz et al., 2015) งานวิจัยนี้ได้ใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid, AA) และกรดแกลลิก (gallic acid, GA) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกับสารสกัดตัวอย่าง โดยในการประมวลผลฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระนั้น สารสกัดที่มีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งร้อยละ 50 ต่ำกว่า เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า

2.3 การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระนั้น ได้ออกแบบการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ซึ่งปัจจัยในการทดลองมี 1 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของพืชสมุนไพร โดยมี 5 ระดับ ได้แก่ ผงแก่นฝาง ผงผลสมอไทย ผงผลสมอพิเภก ผงผลมะขามป้อม และผงลำต้นบอระเพ็ด รวมเป็น 5 ทรีทเมนต์ โดยทรีทเมนต์เหล่านี้กระทำกับผงพืชสมุนไพร (หน่วยทดลอง) จำนวน 3 ซ้ำ การทดลองนี้มีปัจจัยควบคุม คือ ผงพืชสมุนไพรขนาดต่ำกว่า 600 ไมครอน การสกัดด้วยวิธีการแช่ตัวทำละลายที่ใช้ คือ เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.98 สัดส่วนระหว่างผงพืชสมุนไพรกับตัวทำละลาย 1 ต่อ 10 และกระบวนการทำแห้งสารสกัดที่ 45 องศาเซลเซียส

การวัดผลการทดลอง สารสกัดหยาบแห้ง

จะวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ได้วิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีเมนต์โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) ด้วยวิธีการทดสอบ Tukey's honestly significant difference (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยพืชสมุนไพรที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูง (มีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งร้อยละ 50 ที่ต่ำ) จะเลือกเป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อนำไปศึกษาในการทดลองต่อไป

2.4 การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการแช่นั้น ได้ออกแบบการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลเต็มรูปแบบ (full factorial design) โดยปัจจัยในการทดลองนี้มี 2 ปัจจัย ได้แก่ (ก) ชนิดของพืชสมุนไพร มี 2 ระดับ คือ ผงแก่นฝาง และผงผลมะขามป้อม และ (ข) ชนิดของตัวทำละลาย มี 3 ระดับ คือ เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท รวมเป็น 6 ทรีทเมนต์ โดยทรีทเมนต์เหล่านี้กระทำกับผงพืชสมุนไพร (หน่วยทดลอง) จำนวน 3 ซ้ำ (การทำซ้ำ) จึงทำให้มีการใช้หน่วยทดลองจำนวน 18 หน่วยทดลอง การทดลองนี้มีปัจจัยควบคุม คือ ผงพืชสมุนไพรขนาดต่ำกว่า 600 ไมครอน การสกัดด้วยวิธีการแช่ สัดส่วนระหว่างผงพืชสมุนไพรกับตัวทำละลาย 1 ต่อ 10 และกระบวนการทำแห้งสารสกัดที่ 45 องศาเซลเซียส

การวัดผลการทดลอง สารสกัดหยาบแห้งจะนำมาวิเคราะห์ผลได้ของการสกัด ปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยในแต่ละทรีเมนต์ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวด้วยวิธีการทดสอบ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งตัวทำละลายที่ทำให้มีผลได้ของการสกัดสูง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูง มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูง และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง จะเลือกให้เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดพืชสมุนไพรที่ได้รับการคัดเลือกด้วยวิธีการแช่ เพื่อใช้ในการเตรียมสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสำหรับการใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยาต่อไป

3. ผลการวิจัย

3.1 การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

3.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) ของสารสกัดแก่นฝาง (SH) สารสกัดผลมะขามป้อม (IG) สารสกัดผลสมอไทย (CM) สารสกัดผลสมอพิเภก (BM) และสารสกัดลำต้นบอระเพ็ด (HM) มีค่า 699.68 ± 34.02 , 369.42 ± 5.39 , 232.46 ± 3.67 , 355.09 ± 2.64 และ 55.64 ± 1.29 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าสารสกัดแก่นฝางมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนสารสกัดผลมะขามป้อมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากเป็นลำดับถัดมาแต่ไม่แตกต่างจากสารสกัดผลสมอพิเภกในทางสถิติ โดยงานวิจัยของ Chalise และคณะ (2010) ที่ศึกษาผลไม้ป่าในประเทศเนปาล จำนวน 15 ชนิด รายงานว่าผลสมอพิเภก ผลสมอไทยและผลมะขามป้อมมีศักยภาพในการต้านอนุมูล

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) และค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดแก่นฝาง (SH) สารสกัดผลมะขามป้อม (IG) สารสกัดผลสมอไทย (CM) สารสกัดผลสมอพิเภก (BM) และสารสกัดลำต้นบอระเพ็ด (HM)

Active agent	TPC (mg GAE/g extract)	IC_{50} (μ g/mL)
SH	699.68 $\pm$ 34.02 ^{δ}	5.13 $\pm$ 0.75 ^{$\beta\gamma$}
IG	369.42 $\pm$ 5.39 ^{γ}	5.18 $\pm$ 0.69 ^{$\beta\gamma$}
CM	232.46 $\pm$ 3.66 ^{β}	7.67 $\pm$ 0.87 ^{δ}
BM	355.09 $\pm$ 2.63 ^{γ}	5.79 $\pm$ 0.63 ^{$\beta\gamma$}
HM	55.64 $\pm$ 1.29 ^{α}	> 50.00
AA	-	3.85 $\pm$ 0.78 ^{β}
GA	-	1.56 $\pm$ 0.26 ^{α}

The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Differences of α , β , γ and δ labeling represent significant difference at 95 % confidence interval ($p \leq 0.05$).

อิสระพร้อมทั้งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมสูง นอกจากนี้การวิเคราะห์สารสกัดพืชสมุนไพรเดี่ยวของสมุนไพรในตำรับยาหอมอินทจักรโดย Tuekaew และคณะ (2014) แสดงให้เห็นว่าผลสมอไทยและแก่นฝางมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงและมีสหสัมพันธ์ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่สูง ตามการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation analysis)

3.1.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดแก่นฝาง (SH) สารสกัดผลมะขามป้อม (IG)

สารสกัดผลสมอไทย (CM) สารสกัดผลสมอพิเภก (BM) และสารสกัดลำต้นบอระเพ็ด (HM) มีค่า 5.13 $\pm$ 0.75, 5.18 $\pm$ 0.69, 7.67 $\pm$ 0.87, 5.79 $\pm$ 0.63 และมากกว่า 50.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (AA) และกรดแกลลิก (GA) มีค่า 3.85 $\pm$ 0.78 และ 1.57 $\pm$ 0.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าสารสกัดแก่นฝางมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเนื่องจากมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ต่ำที่สุด ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าวข้างต้น โดยสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงจะมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ต่ำ (Li *et al.*, 2009) เมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยกัน ถึงแม้ว่าสารสกัดแก่นฝางจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดผลสมอไทยอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตาม สารสกัดแก่นฝางมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่มีความแตกต่างจากสารสกัดผลมะขามป้อมและสารสกัดผลสมอพิเภกในทางสถิติ ส่วนสารสกัดลำต้นบอระเพ็ดนั้นมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำที่สุด โดยที่สารสกัดนี้ไม่สามารถทำลายอนุมูลอิสระได้มากกว่าร้อยละ 50 แม้จะใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วก็ตาม ทั้งนี้จากการวิจัยของ Ilaiyaraja และ Khanum (2011) พบว่าการสกัดลำต้นบอระเพ็ดด้วยเอทิลอะซิเตท ทำให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์การทำลายอนุมูลดีฟิฟิเอชมากที่สุด เมื่อเทียบกับการใช้น้ำ เมทานอล อะซิโตน คลอโรฟอร์ม และเฮกเซนเป็นตัวทำละลายในการสกัด สำหรับการเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแก่นฝางกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน พบว่าสารสกัดแก่นฝางมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่ากรด

แอสคอร์บิกแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกรดแกลลิกนั้นมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารออกฤทธิ์ทั้งหมด

3.1.3 การคัดเลือกสารสกัดที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

ผลของการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแก่นฝาง สารสกัดผลมะขามป้อม สารสกัดผลสมอไทย สารสกัดผลสมอพิเภก และสารสกัดลำต้นบอระเพ็ด พบว่าสารสกัดแก่นฝางและสารสกัดผลมะขามป้อมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดใน 2 อันดับแรก สารสกัดแก่นฝางและสารสกัดผลมะขามป้อมจึงเป็นสารสกัดที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับที่สูง ดังนั้นแก่นฝางและมะขามป้อมจึงได้รับการคัดเลือกเพื่อนำไปใช้ในการทดลองถัดไป ซึ่งเป็นการคัดเลือกตัวทำลายที่เหมาะสมในการสกัดพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

3.2 การคัดเลือกตัวทำลายที่เหมาะสมในการสกัดพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

3.2.1 ผลได้ของการสกัด

การวิเคราะห์ผลได้ของการสกัดด้วยการชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบแห้ง พบว่าผลได้ของการสกัด (EY) ของสารสกัดแก่นฝางที่สกัดด้วยเมทานอล (SH-MeOH) สกัดด้วยเอทานอล (SH-EtOH) และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (SH-EtOAc) มีค่าร้อยละโดยน้ำหนักเป็น 3.29 ± 0.05 , 2.10 ± 0.06 และ 0.9 ± 0.11 ตามลำดับ และผลได้ของการสกัดของสารสกัดผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเมทานอล (IG-MeOH) สกัดด้วยเอทานอล (IG-EtOH) และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (IG-EtOAc) มีค่าร้อยละโดย

น้ำหนักเป็น 7.3 ± 0.2 , 3.62 ± 0.06 และ 0.57 ± 0.03 ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นว่าสารสกัดผลมะขามป้อมมีผลได้ของการสกัดมากกว่าสารสกัดแก่นฝางอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และตัวทำลายที่ให้ปริมาณการสกัดสูงสุดทั้งผลมะขามป้อมและแก่นฝาง ได้แก่ เมทานอล ดังตารางที่ 2

3.2.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) ของสารสกัดแก่นฝางที่สกัดด้วยเมทานอล (SH-MeOH) สกัดด้วยเอทานอล (SH-EtOH) และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (SH-EtOAc) มีค่า 769.80 ± 57.63 , 854.12 ± 41.01 และ 750.49 ± 55.71 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) ของสารสกัดผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเมทานอล (IG-MeOH) สกัดด้วยเอทานอล (IG-EtOH) และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (IG-EtOAc) มีค่าเป็น 471.78 ± 19.53 , 598.33 ± 14.66 และ 269.82 ± 12.10 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 ทั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดแก่นฝางที่ใช้เอทานอลในการสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนสารสกัดผลมะขามป้อมที่ใช้เอทานอลในการสกัด พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากเป็นลำดับถัดมา ในขณะที่การใช้เอทิลอะซิเตทสกัดแก่นฝางและผลมะขามป้อม พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่ได้จะมีค่าต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธีที่ 1 aluminium complexation ที่ใช้เคอซีทิน (quercetin) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TFC) ของสารสกัด

ตารางที่ 2 ผลได้ของการสกัด (EY) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC) และค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดแก่นฝาง (SH) และสารสกัดผลมะขามป้อม (IG)

Active agent	EY (% w/w)	TPC (mg GAE/g)	TFC1 (mM QE/g)	TFC2 (mM CE/g)	IC_{50} (μ g/mL)
SH-MeOH	3.29 $\pm$ 0.05 ^{α}	769.80 $\pm$ 57.63 ^{α}	180.98 $\pm$ 10.22 ^{α}	852.91 $\pm$ 73.80 ^{α}	3.69 $\pm$ 0.17 ^{$\alpha\beta$}
SH-EtOH	2.10 $\pm$.06 ^{β}	854.12 $\pm$ 41.01 ^{α}	170.21 $\pm$ 14.20 ^{α}	843.87 $\pm$ 46.35 ^{α}	3.40 $\pm$ 0.42 ^{$\alpha\beta\gamma$}
SH-EtOAc	0.97 $\pm$ 0.11 ^{γ}	750.49 $\pm$ 55.71 ^{α}	79.16 $\pm$ 7.39 ^{β}	797.08 $\pm$ 9.49 ^{α}	3.80 $\pm$ 0.59 ^{$\alpha\beta$}
IG-MeOH	7.03 $\pm$ 0.21 ^{δ}	471.78 $\pm$ 19.53 ^{β}	44.53 $\pm$ 0.90 ^{γ}	51.30 $\pm$ 8.95 ^{β}	2.72 $\pm$ 0.45 ^{$\beta\gamma$}
IG-EtOH	3.62 $\pm$ 0.06 ^{ϵ}	598.33 $\pm$ 14.66 ^{γ}	276.08 $\pm$ 6.79 ^{δ}	102.75 $\pm$ 18.37 ^{β}	2.35 $\pm$ 0.22 ^{γ}
IG-EtOAc	0.57 $\pm$ 0.03 ^{ω}	269.82 $\pm$ 12.10 ^{δ}	152.66 $\pm$ 16.63 ^{α}	81.70 $\pm$ 15.90 ^{β}	4.44 $\pm$ 0.79 ^{δ}
AA	-	-	-	-	2.97 $\pm$ 0.21 ^{$\beta\gamma$}

The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Differences of ^{α} , ^{β} , ^{γ} , ^{δ} , ^{ϵ} and ^{ω} labeling represent significant difference at 95 % confidence interval ($p \leq 0.05$).

สกัดแก่นฝาง (SH) ที่สกัดด้วยเมทานอล (MeOH) เอทานอล (EtOH) และเอทิลอะซิเตท (EtOAc) มีค่า 180.98 $\pm$ 10.22, 170.21 $\pm$ 14.20 และ 79.16 $\pm$ 7.39 มิลลิโมลาร์เทียบเท่าเคอควิโนนต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ส่วนสารสกัดผลมะขามป้อม (IG) ที่สกัดด้วย เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตทมีค่า 44.53 $\pm$ 0.90, 276.08 $\pm$ 6.79 และ 152.66 $\pm$ 16.63 มิลลิโมลาร์เทียบเท่าเคอควิโนนต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 ซึ่งจะเห็นว่าสารสกัดผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนสารสกัดแก่นฝางที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากเป็นลำดับถัดมา แต่ไม่แตกต่างจากสารสกัดผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนสารสกัดผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเมทานอลนั้น พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธีที่ 2 aluminium complexation ที่ใช้คาเทชิน (catechin) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC) ของสารสกัด

แก่นฝางที่สกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตทมีค่า 852.91 $\pm$ 73.80, 843.87 $\pm$ 46.35 และ 797.08 $\pm$ 9.49 มิลลิโมลาร์เทียบเท่าคาเทชินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ส่วนสารสกัดผลมะขามป้อมที่สกัดด้วย เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตทมีค่า 51.30 $\pm$ 8.95, 102.75 $\pm$ 18.37 และ 81.70 $\pm$ 15.90 มิลลิโมลาร์เทียบเท่าคาเทชินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 ซึ่งจะเห็นว่าสารสกัดแก่นฝางที่สกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตทมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงใกล้เคียงกัน และยังมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าสารสกัดผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตทอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทานอลนั้นมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดผลมะขามป้อมด้วยกันเอง

3.2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดแก่นฝาง (SH) ที่สกัดด้วยเมทานอล (MeOH)

เอทานอล (EtOH) และเอทิลอะซิเตท (EtOAc) มีค่า 3.69 ± 0.17 , 3.40 ± 0.42 และ 3.80 ± 0.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดผลมะขามป้อม (IG) ที่สกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตทมีค่า 2.72 ± 0.45 , 2.35 ± 0.22 และ 4.44 ± 0.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (AA) มีค่า 2.97 ± 0.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าสารสกัดผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดผลมะขามป้อมด้วยกันที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทิลอะซิเตท และยังพบอีกว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลมีฤทธิ์สูงกว่ากรดแอสคอร์บิก ขณะที่สารสกัดแก่นฝางที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน โดยแก่นฝางที่สกัดด้วยเอทานอลจะให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในกลุ่มสารสกัดแก่นฝางด้วยกัน ทั้งนี้ยังพบอีกว่าสารสกัดแก่นฝางจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

3.2.5 การคัดเลือกตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมในการสกัดแก่นฝางและผลมะขามป้อม

ผลของการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแก่นฝาง และสารสกัดผลมะขามป้อม พบว่าการสกัดแก่นฝางและผลมะขามป้อมด้วยการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดด้วยวิธีการแช่ ทำให้ได้สารสกัดที่มีผลได้การสกัดสูง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูง มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูง และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งมีความเหมาะสมต่อกระบวนการเตรียมสารสกัดแก่นฝางและสารสกัด

ผลมะขามป้อมที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อการใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต ถึงแม้ว่าการสกัดแก่นฝางและผลมะขามป้อมด้วยเมทานอลจะทำให้สารสกัดมีผลได้การสกัดสูงที่สุดก็ตาม แต่การใช้เอทานอลในการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรในระดับอุตสาหกรรมหรือระดับชุมชนสามารถดำเนินการได้สะดวกและปลอดภัยมากกว่าการใช้เมทานอล ซึ่งหากเข้าไปสู่กระแสเลือดแล้วจะถูกเอนไซม์ที่ตับออกซิไดซ์เปลี่ยนไปเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) ที่เป็นอันตรายต่อดวงตาและอาจทำให้ตาบอดได้ (Kurtas และคณะ, 2017) และการสกัดผลมะขามป้อมด้วยเอทานอลทำให้สารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ส่วนการสกัดแก่นฝางด้วยเอทานอลนั้นทำให้สารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงและมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงอยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับการใช้เมทานอลในการสกัด

4. สรุป

การคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยการสกัดพืชสมุนไพรด้วยวิธีการแช่ร่วมกับการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายแสดงให้เห็นว่าสารสกัดแก่นฝางและสารสกัดผลมะขามป้อมมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดผลสมอไทย สารสกัดผลสมอพิเภก และสารสกัดลำต้นบอระเพ็ด เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงถึง 699.68 ± 27.77 และ 369.42 ± 4.40 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงเนื่องจากมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ต่ำถึง 5.13 ± 0.62 และ 5.18 ± 0.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำพืช

สมุนไพรทั้ง 2 ชนิด นี้ไปสกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท เพื่อคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการเตรียมสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งผลปรากฏว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายเหมาะสมต่อกระบวนการเตรียมสารสกัดแก่นฝางและสารสกัดผลมะขามป้อมที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษต่ำ ราคาถูก จึงมีความเหมาะสมต่อสกัดสารออกฤทธิ์จากแก่นฝางและผลมะขามป้อมในระดับอุตสาหกรรมและระดับชุมชน เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรและเพิ่มความหลากหลายในการใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาฤทธิ์ในเชิงลึกที่เกี่ยวกับโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2561 สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

6. รายการอ้างอิง

กรมควบคุมโรค, 2560, แผนยุทธศาสตร์การป้องกันและควบคุมโรคไม่ติดต่อระดับชาติ 5 ปี (พ.ศ. 2560-2564), บริษัท อีโมชั่น อาร์ต จำกัด, กรุงเทพฯ.

ศรัณยู อุ่นทวี, คุณัญญา เครือจันทร์, สุวสา เกษียร, ชนัญ ผลประไพ และอรุณพร อีฐรัตน์, 2561, การกักเก็บสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามและสารสกัดผลสมอไทยด้วยไนโอโซมเพื่อการประยุกต์ใช้ในเวชสำอาง, Thai J. Sci. Technol. 7(2): 134-145.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M.,

1993, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90: 7915-7922.

Camps, J. and García-Heredia, A., 2014. Introduction: Oxidation and Inflammation, a Molecular Link between non-Communicable Diseases, pp. 1-4, In Camps, J. (Ed.), Oxidative Stress and Inflammation in Non-communicable Diseases: Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics, Springer International Publishing, Cham.

Chalise, J.P., Acharya, K., Gurung, N., Bhusal, R.P., Gurung, R., Skalko-Basnet, N. and Basnet, P., 2010, Antioxidant activity and polyphenol content in edible wild fruits from Nepal, Int. J. Food Sci. Nutr. 61: 425-432.

Chellappan, D.R., Purushothaman, A.K. and Brindha, P., 2017, Gastroprotective potential of hydro-alcoholic extract of Pattanga (*Caesalpinia sappan* Linn.), J. Ethnopharmacol. 197: 294-305.

Chen, Y.X., Tong, J., Ge, L.L., Ma, B.X., He, J.S. and Wang, Y.W., 2015, Ethyl acetate fraction of *Terminalia bellirica* fruit inhibits rat hepatic stellate cell proliferation and induces apoptosis, Ind. Crops Prod. 76: 364-373.

Hörandl, E. and Hadacek, F., 2013, The oxidative damage initiation hypothesis for meiosis, Plant Reprod. 26: 351-367.

Hwang, H.S. and Shim, J.H., 2018, Brazilin and *Caesalpinia sappan* L. extract protect epidermal keratinocytes from oxidative stress by inducing the expression of GPX7, Chin. J. Nat. Med. 16: 203-209.

- Ilaiyaraja, N. and Khanum, F., 2011, Antioxidant potential of *Tinospora cordifolia* extracts and their protective effect on oxidation of biomolecules, *Phcog. J.* 3: 56-62.
- Kurtas, O., Yavuz Imre, K., Ozer, E., Can, M., Birincioglu, I., Butun, C., Kirci, G.S., Yildirim, A., Kiyak, S. and Yilmaz, R., 2017, The evaluation of deaths due to methyl alcohol intoxication, *Biomed. Res.* 28: 3680-3687.
- Lee, D.Y., Kim, H.W., Yang, H. and Sung, S.H., 2017, Hydrolyzable tannins from the fruits of *Terminalia chebula* Retz and their α -glucosidase inhibitory activities, *Phytochemistry* 137: 109-116.
- Li, X., Wu, X. and Huang, L., 2009, Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggui), *Molecules* 14: 5349-5361.
- Naik Bukke, A., Nazneen Hadi, F., Babu, K.S. and shankar, P.C., 2018, *In vitro* studies data on anticancer activity of *Caesalpinia sappan* L. heartwood and leaf extracts on MCF7 and A549 cell lines, *Data Brief.* 19: 868-877.
- Pandey, A.K., Gautam, A., Pandey, P. and Dubey, R.S., 2019, Alleviation of chromium toxicity in rice seedling using *Phyllanthus emblica* aqueous extract in relation to metal uptake and modulation of antioxidative defense, *S. Afr. J. Bot.* 121: 306-316.
- Pękal, A. and Pyrzynska, K., 2014, Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay, *Food Anal. Methods* 7: 1776-1782.
- Peterson, C.T., Denniston, K. and Chopra, D., 2017, Therapeutic uses of Triphala in Ayurvedic medicine, *J. Altern. Complement Med.* 23: 607-614.
- R Core Team, 2017, R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C. and Gerhard, D., 2015, Dose-response analysis using R, *PLoS ONE* 10(12): e0146021.
- Selvam, K., Sudhakar, C., Govarthanan, M., Thiyagarajan, P., Sengottaiyan, A., Senthilkumar, B. and Selvankumar, T., 2017, Eco-friendly biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Tinospora cordifolia* (Thunb.) Miers and evaluate its antibacterial, antioxidant potential, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 10: 6-12.
- Tang, X., Luo, Y.X., Chen, H.Z. and Liu, D.P., 2014, Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases, *Front. Physiol.* 5: 1-17.
- Tiwari, P., Nayak, P., Prusty, S.K. and Sahu, P.K., 2018, Phytochemistry and pharmacology of *Tinospora cordifolia*: A review, *Sys. Rev. Pharm.* 9: 70-78.
- Tuekaew, J., Siriwatanametanon, N., Wongkrajang, Y., Tamsiririrkkul, R. and Jantan, I., 2014, Evaluation of the antioxidant activities of Ya-hom Intajak, a Thai herbal formulation, and its component plants, *Trop. J. Pharm. Res.* 13: 1477-1485.