

การควบคุมคุณภาพและการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาหม้อห้ำรากล

ยุพาภรณ์ วิเชียร*, นวพร พิมรรัตน์, กริยาภา หลายรุ่งเรือง

วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี คณะสาธารณสุขศาสตร์และสหเวชศาสตร์ สถาบันพระบรมราชชนก

กระทรวงสาธารณสุข ตำบลไม้เค็ด อำเภอเมืองปราจีนบุรี จังหวัดปราจีนบุรี 25230

* ผู้รับผิดชอบบทความ: yupaporn@acttm.ac.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ยาหม้อห้ำรากลเป็นตำรับยาที่ใช้เพื่อระบาย ถ่ายพิษไข้ แก้ไข้ที่มีพิษจืด จากตำราแพทย์ตำบล เล่ม 3 โดยที่ผ่านมายังไม่เคยมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับตำรับยาหม้อห้ำรากลมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมคุณภาพของสมุนไพร ตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกรวม ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมี และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาหม้อห้ำรากล

วิธีการศึกษา: สกัดยาหม้อห้ำรากลด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ 70% เอทานอล และ 95% เอทานอล ควบคุมคุณภาพสมุนไพรโดยการหาปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS

ผลการศึกษา: พบสารพฤษเคมีกลุ่มอัลคาลอยด์ เทอร์ปีนอยด์ แอนทราควิโนน และแทนนิน และยาหม้อห้ำรากลที่สกัดด้วย 70% เอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด คือ 180.92 ± 3.46 มิลลิกรัมแกลลิก/กรัมสารสกัด รวมถึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ($EC_{50} = 7.28 \pm 0.72$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ วิธี FRAP (306.81 ± 1.57 มิลลิกรัมโทรลอคซ์/กรัมสารสกัด และ 486.64 ± 2.49 มิลลิกรัมเฟอร์รัสซัลเฟต/กรัมสารสกัด) ดีที่สุดเช่นกัน ส่วนสารสกัดยาหม้อห้ำรากลด้วยน้ำนั้นออกฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้ดีที่สุด ($EC_{50} = 19.84 \pm 4.85$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยโครมาโตกราฟีแบบผิวบางพบสารทั้งหมด 17 แถบ

อภิปรายผล: สารสกัดยาหม้อห้ำรากลด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของ ABTS ที่ละลายได้ดีในน้ำ ส่วนสารสกัดยาหม้อห้ำรากลด้วย 70% เอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของ DPPH ที่ละลายได้ดีในเอทานอล

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: ยาหม้อห้ำรากลที่ต้มกับน้ำซึ่งเป็นการเลียนแบบวิธีการทำยาแบบดั้งเดิมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และในอนาคตมีความจำเป็นในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชอื่น ๆ รวมไปถึงศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีที่ระบุรายละเอียดเพิ่มเติม เพื่อพัฒนาไปสู่การใช้ในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

คำสำคัญ: ยาหม้อห้ำรากล, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สมุนไพร, เอกลักษณ์ทางเคมี, ควบคุมคุณภาพ

Quality Control and Antioxidant Activities of *Ya Mor Harak* Herbal Formula

Yupaporn Wichian*, Navaporn Pimrat and Kriyapa Lairungruang

Abhaibhubejhr College of Thai Traditional Medicine Prachinburi, Faculty of Public Health and Allied Health Sciences, Praboromarajchanok Institute, Ministry of Public Health, Mai Khet, Mueang Prachinburi, Prachinburi 25230, Thailand

*Corresponding Author: yupaporn@acttm.ac.th

Abstract

Introductions and Objectives: *Ya Mor Harak* (YMH), a herbal formula, is used for purgative and anti-pyretic purposes according to a Subdistrict Traditional Medicine Textbook (*Tamra Phaet Tambon*, Vol. 3). In the past, there were no studies on the YMH formula. Therefore, the aims of this study were to identify indicators or markers for quality control of herbs, including phytochemical screening, total phenolic content, chemical identity and antioxidant activities of YMH extracts.

Methods: The YMH extraction was undertaken using three solvents: deionized water (A YMH), 70% ethanol (70E YMH) and 95% ethanol (95E YMH). The YMH quality control measures included the analyses for moisture, total ash and acid insoluble ash, as well as YMH extract's phytochemical screening, chemical identification (using thin layer chromatography, TLC) and antioxidant activity quantification using DPPH, FRAP and ABTS assays.

Results: Alkaloids, terpenoids, anthraquinones and tannins were found in the YMH formula. Its 70E extract had the highest total phenolic content at 180.92 ± 3.46 mg GAE/g extract and showed the highest antioxidant activities with the DPPH assay at EC_{50} 7.28 ± 0.72 μ g/mL and the FRAP assay at 306.81 ± 1.57 mg Trolox/g extract and 486.64 ± 2.49 mg Fe^{2+} /g extract. And the A YMH extract showed the highest elimination of free radical ABTS⁺⁺ (EC_{50} = 19.84 ± 4.85 μ g/mL), while the chemical identification using TLC found 17 bands on the TLC plate.

Discussion: Aqueous YMH extract showed the best antioxidant activity using the ABTS assay, which was consistent with the ABTS' water-soluble property. The 70E YMH extract had the best antioxidant activity with the DPPH assay, which was consistent with the DPPH' ethanol-soluble property.

Conclusion and Recommendation: A YMH decoction with water imitating the traditional method has antioxidant activities. In the future, other pharmacological activities and specified chemical identification should be studied for further development of YMH for patient treatments.

Key words: *Ya Mor Harak*, antioxidant activity, herb, chemical fingerprints, quality control

บทนำและวัตถุประสงค์

ตำรับยาหม้อห้ารากลเป็นตำรับยาที่อยู่ในตำราแพทย์ตำบลดเล่ม 3 เรียบเรียงโดย มหาเสวกตรี พระยาแพทย์พงศาวิสุทธาธิบดี (สุน สุนทรเวช) เมื่อปี พ.ศ. 2471^[1] ตำรับประกอบด้วยสมุนไพร 21 ชนิด ได้แก่ รากคนทา 1 บาท รากชิงช้า 1 บาท รากเถาวัลหญาาง 1 บาท รากเห้ายายม่อม 1 บาท รากมะเดื่อชุมพร 1 บาท จันทน์แดง 1 บาท จันทน์เทศ 1 บาท แผลกหอม 1

บาท ดอกบุนนาค 1 บาท ผลสมอไทย 2 บาท ผลสมอเทศ 2 บาท ผลสมอพิเภก 2 บาท มะขามป้อม 2 บาท เกสรบัวหลวง 2 สลึง ผลกระดอม 2 สลึง แก่นสน 1 สลึง โกฏหัวบัว 1 สลึง ก้านสะเดา 33 ก้าน บอระเพ็ด 7 องคุลี ฝักราชพฤกษ์ 3 ฝัก ใบมะกา 1 กำมือ โดยใช้ยาในรูปแบบยาต้มเพื่อรับประทาน และมีฤทธิ์ในการถ่ายพิษไข้และระบาย ในลำดับใช้ตอนที่มิพิษจัด โดยตำรับนั้นมีสรรพคุณแก้ไข้พิษที่จับเชื่อมซึม แลร้อนใน

กระหายน้ำ กระวนกระวาย ละเมอเพ้อผก ไม่มีสติ แก่พิษภายในให้ตกสิ้น มิให้เกิดเป็นพิษกาฬขึ้นได้ โดยวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี มีแนวทางที่จะนำตำรับยาหม้อห้อมตำราเก่ามาใช้รักษาผู้ป่วยที่มีอาการไข้พิษรวมไปถึงผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019

การทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมาพบว่า ไม่เคยมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับตำรับยาหม้อห้อมตำราเก่ามาก่อนทั้งในระดับหลอดทดลอง สัตว์ทดลอง และการวิจัยในมนุษย์ แต่พบว่ามีการศึกษาวิจัยสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ โดยพบว่ามียุทธศาสตร์ด้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ลดไข้^[2-6] ดังนั้นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของตำรับนี้ เช่น การควบคุมคุณภาพสมุนไพร (การหาปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด) ปริมาณฟีนอลิกรวม การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี รวมไปถึงการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการใช้รักษาผู้ป่วย การศึกษาวิจัยและพัฒนา

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมคุณภาพสมุนไพรโดยการหาปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณฟีนอลิกรวม ตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น เอกลักษณ์ทางเคมีของตำรับยาหม้อห้อมตำรา และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตำรับยาหม้อห้อมตำรา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในพัฒนาตำรับยาและใช้รักษาผู้ป่วยต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental designs) โดยมีการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร (การหาปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด) การตรวจหาสารพิษเคมีเบื้องต้น

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chromatography: TLC) และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาหม้อห้อมตำรา

1. วัสดุ

1.1 เครื่องมือ

Rotary evaporator (Senco, India), Lyophilizer (Martin Christ, Germany), Microplate reader (Thermo Scientific, USA), Moisture analysis (A & D Company, Japan) และ Muffle furnace (JSR, Korea)

1.2 สารเคมี

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl: DPPH (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India), Ferrous Sulphate: FeSO_4 (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India), Iron (III) chloride: FeCl_3 (Sigma Aldrich, USA), Butylated hydroxytoluene: BHT (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India), Gallic acid (3,4,5-trihydroxy benzoic acid) (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India), Folin & Ciocalteu's phenol (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India), Sodium carbonate anhydrous: Na_2CO_3 (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India), 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine: TPTZ (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India), Sodium acetate trihydrate (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India), 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid): ABTS (EMD Millipore Corp., USA), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid)

(Sigma Aldrich, USA) และ Potassium persulfate: $K_2S_2O_8$ (Sigma Aldrich, Germany)

1.3 การเตรียมสมุนไพรและสกัด

สมุนไพรแห้งทั้ง 21 ชนิดเก็บในช่วงเดือนมีนาคม 2565 โดยก้านสะเดา ใบมะกา บอระเพ็ด ผักถูน เก็บจากจังหวัดปราจีนบุรี และสมุนไพรอื่น ๆ อีก 17 ชนิด จัดซื้อจากบริษัท เข้มกวง เฮิร์บ แอนด์ สไปซ์ จำกัด โดยมีรายละเอียดชื่อวิทยาศาสตร์ (Table 1) และเตรียมสมุนไพรโดยนำมาทำความสะอาด หั่นอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และบดหยาบด้วยเครื่องบดสมุนไพร จากนั้นผสมเป็นตำรับตามสัดส่วน (Table 1)

การสกัดแบ่งเป็น 3 วิธีคือ 1) สกัดด้วยน้ำ (decoction) เนื่องจากอ้างตามวิธีการต้มดื่มตามตำรา

ระบุไว้ โดยนำสมุนไพร 500 กรัม เติมน้ำ 3 ลิตร ต้มเคี่ยวให้เหลือน้ำ 1/3 ส่วน และทำซ้ำ 3 รอบ ระเหยแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer 2) สกัดด้วย 70% เอทานอลสมุนไพร 1,000 กรัม หมักด้วย 70% เอทานอล 5 ลิตร 3) สกัดด้วย 95% เอทานอลสมุนไพร 1,000 กรัม หมักด้วย 95% เอทานอล 5 ลิตร ซึ่งวิธีที่ 2 และ 3 ทำการหมักทั้งหมด 3 รอบ เป็นเวลารอบละ 3 วัน นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จึงนำไปคำนวณปริมาณร้อยละของผลผลิต (%yield)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การควบคุมคุณภาพสมุนไพร

2.1.1 การหาปริมาณความชื้น

ใส่ถาดเปล่า เพื่อปรับน้ำหนักถาดให้เป็น

Table 1 List of Scientific name, Family, Thai name, Parts of used, and Proportion of YMH

Scientific name	Family	Thai name	Parts of used	Proportion (%)
<i>Tiliacora triandra</i>	MENISPERMACEAE	YA NANG	root	3.77
<i>Clerodendrum indicum</i>	LAMIACEAE	CHING CHI	root	3.77
<i>Ficus racemose</i>	MORACEAE	MA DUEA CHUM PHON	root	3.77
<i>Capparis micranatha</i>	CAPPARACEAE	THAO YAI MOM	root	3.77
<i>Harrisonia perforata</i>	SIMAROUACEAE	KHON THA	root	3.77
<i>Pterocarpus santalinus</i>	FABACEAE	CHAN DAENG	heartwood	3.77
<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	MYRISTICACEAE	CHAN THET	heartwood	3.77
<i>Chrysopogon zizanioides</i>	POACEAE	YA FAEK HOM	root	3.77
<i>Meaua ferrea</i>	CLUSIACEAE	BUN NAK	flower	3.77
<i>Terminalia chebula</i>	COMBRETACEAE	SAMO THAI	fruit	7.55
<i>Terminalia arjuna</i>	COMBRETACEAE	SAMO THET	fruit	7.55
<i>Terminalia bellirica</i>	COMBRETACEAE	SAMO PHIPHEK	fruit	7.55
<i>Phyllanthus emblica</i>	EUPHORBIACEAE	MAKHAM POM	fruit	7.55
<i>Gymnopetalum chinense</i>	CUCURBITACEAE	KRA DOM	fruit	1.89
<i>Pinus kesiya</i>	PINACEAE	SON SAM BAI	heartwood	0.94
<i>Ligusticum sinense</i>	APIACEAE	KOT HUA BUA	rhizome	0.94
<i>Nelumbo nucifera</i>	NELUMBONACEAE	BUA LUANG	pollen	1.89
<i>Azadirachta indica</i>	MELIACEAE	SA DAO	petiole	3.14
<i>Tinospora crispa</i>	MENISPERMACEAE	BO RA PHET	vine	1.60
<i>Cassia fistula</i>	LEGUMINOSAE	KHUN	meat in the pod	22.64
<i>Bridelia ovata</i>	PHYLLANTHACEAE	MA KA	leaf	2.83

ศูนย์โดยใช้เครื่อง electronic moisture analyzer ตั้งค่าอุณหภูมิที่ 105 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อย ๆ เกลี่ยผงสมุนไพรแห้ง จำนวน 5 กรัม ให้ผิวหน้ามีความสม่ำเสมอ เมื่อปิดฝาเครื่องจะเริ่มทำงานและบันทึกค่าที่แสดงผล^[7]

2.1.2 การหาปริมาณเถ้ารวม

ชั่งผงสมุนไพร 5 กรัม ใส่ใน crucible นำไปเผาด้วย hot plate นาน 6 ชั่วโมง นำไปใส่ในเตาเผาเถ้าที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส จนผงสมุนไพรกลายเป็นเถ้าขาว และนำไปชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่คำนวณหาร้อยละของเถ้ารวม^[7]

2.1.3 เถ้าที่ไม่ละลายในกรด

นำเถ้าที่ได้จากการหาปริมาณเถ้ารวมต้มด้วย 10% hydrochloric acid (HCl) 25 มิลลิลิตร

เป็นเวลา 5 นาที กรองด้วยกระดาษกรองไรซ์เถ้า No.42 ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยน้ำร้อนจากนั้นนำกระดาษกรองและกากไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส ในเตาเผาเถ้า เเผาให้ได้น้ำหนักคงที่และคำนวณร้อยละปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด^[7]

2.1.4 การหาร้อยละปริมาณสารสกัด

ชั่งสมุนไพร 5 กรัม แล้วเติม เอทานอล 95% หรือ chloroform water ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงใน flask ปิดฝาให้สนิท จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 18 ชั่วโมง เพื่อให้ครบ 24 ชั่วโมง กรองปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นำมาชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาร้อยละปริมาณสารสกัด^[7]

$$\text{ร้อยละปริมาณสารสกัด (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัด (กรัม)} \times 5}{\text{น้ำหนักผงสมุนไพรเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

2.2 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบพิษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening) คือ การทดสอบหาคุณสมบัติของสารพิษเคมีที่อยู่ในตำรับยาหม้อหุงข้าว โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือการตกตะกอน ประกอบด้วยสารพิษเคมี 6 กลุ่ม ได้แก่ อัลคาลอยด์ เทอร์ปีนอยด์ ซาโปนิน คูมาริน แอนทราควิโนน และแทนนิน^[8]

2.2.1 อัลคาลอยด์

สารสกัด 70% เอทานอลและ 95% เอทานอลละลายด้วย 5% HCl ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ทำการทดสอบกับน้ำยาทดสอบดังนี้ scheibler's reagent, sonnenschein's reagent, tannic acid, meyer's reagent, valser's reagent, wagner's reagent และ hager's reagent สังเกตการเกิดตะกอนและสีของตะกอน

2.2.2 เทอร์ปีนอยด์

นำผงสมุนไพร 2 กรัม, สารสกัด 70% เอทานอล 1 กรัม และ สารสกัด 95% เอทานอล 1 กรัม ละลายด้วย chloroform (CHCl₃) 10 มิลลิลิตร กรองเอาส่วนใสใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติมกรด sulfuric acid (H₂SO₄) 2.5 มิลลิลิตร สังเกตรอยต่อของชั้นสาร

2.2.3 ซาโปนิน

นำผงสมุนไพร 2 กรัม, สารสกัด 70% เอทานอล 1 กรัม และ สารสกัด 95% เอทานอล 1 กรัม ใส่ใน flask เติมน้ำร้อน 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น เขย่าแรงๆ กรองสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ อย่างน้อย 10 วินาที ในหลอดทดลอง สังเกตฟองมีลักษณะหกเหลี่ยม หยด HCl 1-2 หยด สังเกตฟอง

2.2.4 ไชยานอนดิกไกลโคไซด์

นำผงสมุนไพร 2 กรัม, สารสกัด 70% เอทานอล 1 กรัม และ สารสกัด 95% เอทานอล 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองเติมน้ำให้พอขึ้น หยด CHCl_3 1-2 หยด ปิดปากหลอดทดลองด้วยจุก cork ที่แขวนกระดาษกรองหีบ sodium picrate นำหลอดทดลองตั้งใน water bath สังเกตการเปลี่ยนสีของกระดาษกรองเป็นสีส้มแดง

2.2.5 คูมาริน

นำผงสมุนไพร 2 กรัม, สารสกัด 70% เอทานอล 1 กรัม และ สารสกัด 95% เอทานอล 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง หยด CHCl_3 10 หยดแขวนกระดาษกรองกับจุก cork นำหลอดทดลองตั้งใน water bath เป็นเวลา 5 นาที หยด 10% sodium hydroxide (NaOH) ลงบนกระดาษกรอง เป่าให้แห้ง นำกระดาษกรองไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร สังเกตการเรืองแสง

2.2.6 แอนทราควิโนน

นำผงสมุนไพร 2 กรัม, สารสกัด 70% เอทานอล 1 กรัม และ สารสกัด 95% เอทานอล 1 กรัม ต้มใน 10% H_2SO_4 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที กรองและนำสารละลายที่ได้ใส่กรวยแยก 10 มิลลิลิตร สกัดด้วย CHCl_3 10 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น ดูดชั้น CHCl_3 ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำ 20% NaOH 5-10 หยด สังเกตการเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู

2.2.7 แทนนิน

นำสารสกัด 70% เอทานอลและ 95% เอทานอล ละลายด้วย 5% HCl ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 10

มิลลิลิตร เติมน้ำ 10% sodium chloride 3-4 หยด กรองสารละลาย นำสารละลายที่ได้ทำการทดสอบด้วยสารดังนี้ 1% gelatin, 10% FeCl_3 , bromine water, lime water สังเกตการตกตะกอน

2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content)

เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยทำการปิเปตสารสกัดลง 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วจึงเติมน้ำสารละลาย 20% Na_2CO_3 หลุมละ 80 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร^[9] คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมโดยเปรียบเทียบกับกราฟสารมาตรฐานของ gallic acid

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยทำการปิเปตสารสกัด 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมน้ำสารละลาย DPPH 0.4 มิลลิโมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร^[10] เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) ด้วยสมการด้านล่าง แล้วจึงนำค่า % inhibition ไปคำนวณหาค่า EC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}} \times 100$$

$\text{OD}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย

$\text{OD}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง (สารสกัดยาหม้อห่อหุ้มและสารมาตรฐาน)

2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP assay

เตรียม FRAP reagent โดยการผสม acetate buffer 300 มิลลิโมลาร์, TPTZ 40 มิลลิโมลาร์ และ FeCl_3 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 และเตรียมสารสกัดยาหม้อห่อหุ้มที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงใน 96-well plate หลุมละ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำ FRAP reagent เขย่าในอ่างน้ำ water bath 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ก่อนนำมาเติมลงใน 96-well plate หลุมละ 180 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร คำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยาหม้อห่อหุ้มโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox และ FeSO_4 ^[11]

2.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay

เตรียมสาร ABTS โดยผสม ABTS ความ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

$\text{OD}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย

$\text{OD}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง (สารสกัดยาหม้อห่อหุ้มและสารมาตรฐาน)

2.5 การทดสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC)

เตรียมสารสกัดยาหม้อห่อหุ้มที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ hexane:acetone: CHCl_3 อัตราส่วน 2.00:0.25:7.75 ระยะทางการเคลื่อนที่ของวัฏภาค 11 เซนติเมตร อ่านค่าภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และพ่นด้วย 0.5% anisaldehyde

เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และ potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นห่อฟอยด์แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำสาร ABTS ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ซึ่งค่าระหว่าง 0.68 - 0.72

เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยทำการปิเปตสารสกัด 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate และเติมน้ำกลั่น ABTS 180 ไมโครลิตร ลงไปผสม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox และ นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition)^[12] ด้วยสมการด้านล่าง แล้วจึงนำค่า %inhibition ไปคำนวณหา EC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism

hyde ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การควบคุมคุณภาพ การวิเคราะห์หาปริมาณ ฟีนอลิกรวม และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้น มีการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยผลที่ได้เป็นการหาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Error of Mean: SEM) (Mean $\pm$ SEM)

ผลการศึกษา

1. ปริมาณร้อยละของผลผลิต (%yield) ของสารสกัดตำรับยาหม้อห้ำรากล

สารสกัดตำรับยาหม้อห้ำรากลด้วย 3 วิธี มีลักษณะของสารสกัด ดังนี้ ยาหม้อห้ำรากลที่สกัดด้วยน้ำ (A YMH) มีลักษณะแห้ง เบา สีน้ำตาลดำ, 70%

เอทานอล (70E YMH) มีสีน้ำตาลเข้มหนืดข้นมาก และ 95% เอทานอล (95E YMH) สีน้ำตาลเข้มหนืดข้น (หนืดข้นน้อยกว่า 70E YMH) (Figure 1) และมีปริมาณร้อยละของผลผลิต คือ 18.92, 30.05 และ 15.48 ตามลำดับ

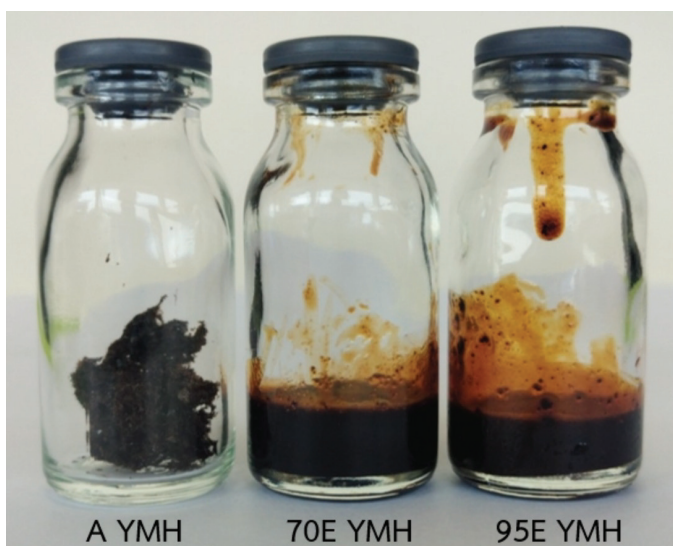


Figure 1 Ya Mor Harak extracts

2. ผลการควบคุมคุณภาพสมุนไพร

การควบคุมคุณภาพสมุนไพร มีทั้งหมด 4 วิธี ได้แก่ ปริมาณความชื้น (moisture analysis) ปริมาณเถ้ารวม (total ash) ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash) ปริมาณสารสกัด (extractive values) ซึ่งได้ผลการควบคุมคุณภาพสมุนไพรตำรับยาหม้อห้ำรากลดังนี้ ปริมาณความชื้น เท่ากับร้อยละ 11.53 ± 0.21 ปริมาณเถ้ารวม เท่ากับร้อยละ 2.00 ± 0.07 ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด เท่ากับร้อยละ 0.27 ± 0.01 และปริมาณสารสกัดตำรับยาหม้อห้ำรากลด้วยการ

หมักกับ 95% เอทานอล และ chloroform water พบว่าได้ร้อยละปริมาณสารสกัดเท่ากับ 4.85 และ 18.33 ตามลำดับ

3. การทดสอบหาสารพิษเคมีของตำรับยาหม้อห้ำรากล

จากการทดสอบหาสารพิษเคมีเบื้องต้นของตำรับยาหม้อห้ำรากลพบสารพิษเคมีกลุ่มอัลคาลอยด์ เทอร์ปีนอยด์ แอนทราควิโนน และแทนนิน (Table 2)

Table 2 Phytochemical screening of YMH extracts.

Phytochemical screening	Powder of YMH	70E YMH	95E YMH
1. Alkaloids			
1.1) Scheibler's reagent	NT	+	+
1.2) Sonnenschein's reagent	NT	+	+
1.3) Tannic acid	NT	-	-
1.4) Meyer's reagent	NT	-	-
1.5) Valser's reagent	NT	-	-
1.6) Wagner's reagent	NT	+	+
1.7) Hager's reagent	NT	+	+
2. Terpenoids	+	+	+
3. Saponins	-	-	-
4. Coumarins	+	-	+
5. Anthraquinones	-	+	+
6. Tannin			
6.1) Gelatin	NT	+	+
6.2) Gelatin salt	NT	+	+
6.3) FeCl ₃	NT	+	+
6.4) Bromine water	NT	+	+
6.5) Lime water	NT	+	+
7. Cyanotic glycosides	-	-	-

+ = Positive, - = Negative, NT = Not tested

4. ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยาหม้อห้ำราก (Total phenolic content)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยาหม้อห้ำราก ซึ่งเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก (gallic acid) โดยกรดแกลลิกมีค่าสมการเส้นตรงคือ $y = 0.0043x + 0.068$ และ $R^2 = 0.9994$ (Figure 1(A)) ผลการศึกษาพบว่าตำรับยาหม้อห้ำรากที่สกัดด้วย 70% เอทานอล (70E YMH) มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด คือ 180.92 ± 3.46 มิลลิกรัมแกลลิก/กรัมสารสกัด ส่วนตำรับยาหม้อห้ำรากที่สกัดด้วย 95% เอทานอล (95E YMH) และน้ำ (A YMH) มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ $154.05 \pm$

2.33 และ 136.89 ± 1.68 มิลลิกรัมแกลลิก/กรัมสารสกัด ตามลำดับ

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี

DPPH assay

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัด 70E YMH มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (EC_{50}) เท่ากับ 7.28 ± 0.72 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัด A YMH และ 95E YMH มีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.62 ± 0.34 และ 8.80 ± 0.87 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และยังพบว่าสารสกัดตำรับยาหม้อห้ำรากที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด

มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐาน คือ BHT ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 12.24 ± 1.41 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี

FRAP assay

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิด คือ

Trolox และ $FeSO_4$ ซึ่งมีค่าสมการของสารมาตรฐาน และ R^2 (Figure 2) (B) และ 2 (C) โดยพบว่าสารสกัด 70E YMH มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ดีที่สุด คือ 306.81 ± 1.57 มิลลิกรัม ไทโรลออกซ์/กรัมสารสกัด และ 486.64 ± 2.49 มิลลิกรัม เฟอร์รัสซัลเฟต/กรัมสารสกัด (Table 3)

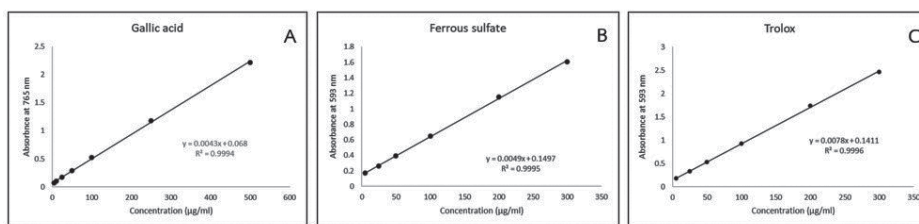


Figure 2 Standard curve of (A) gallic acid (B) Ferrous sulfate (C) Trolox

Table 3 Summary determination of total phenolic content and antioxidant activities of YMH extracts ($n=3 \pm SEM$).

Extract	Total phenolic content (mg GAE/g extract)	DPPH EC_{50} ($\mu g/ml$)	ABTS EC_{50} ($\mu g/ml$)	FRAP	
				(mg Trolox/g extract)	(mg $FeSO_4$ /g extract)
A YMH	136.89 ± 1.68	7.62 ± 0.34	19.84 ± 4.85	292.86 ± 3.03	464.43 ± 4.83
70E YMH	180.92 ± 3.46	7.28 ± 0.72	21.50 ± 4.35	306.81 ± 1.57	486.64 ± 2.49
95E YMH	154.05 ± 2.33	8.80 ± 0.87	20.28 ± 3.88	232.05 ± 2.64	367.63 ± 4.20
BHT	-	12.24 ± 1.41	-	193.09 ± 0.97	305.61 ± 1.55
Trolox	-	-	47.77 ± 6.11	-	-

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี

ABTS assay

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay พบว่าสารสกัด A YMH มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยค่า EC_{50} เท่ากับ 19.84 ± 4.85 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และรองลงมาคือสารสกัด 95E YMH และสารสกัด 70E YMH ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 20.28 ± 3.88 และ 21.50 ± 4.35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และยังพบว่าสารสกัดตำรับยา

หม้อหุงข้าวที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ดีกว่าสารมาตรฐาน คือ Trolox ซึ่ง Trolox มีค่า EC_{50} เท่ากับ 47.77 ± 6.11 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

8. การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี

โครมาโตกราฟีแบบผิวนาง (TLC)

ผลของสารสกัดยาหม้อหุงข้าวทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่นำมาตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวนาง (Figure 3, Table 4)

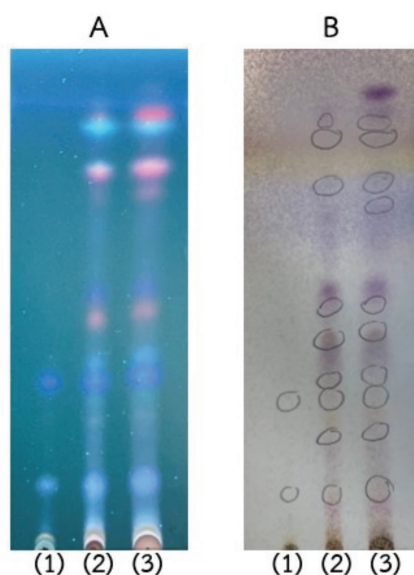


Figure 3 Thin-Layer Chromatogram of YMH extracts (1) aqueous of YMH (2) 70% EtOH of YMH (3) 95% EtOH of YMH, A: detection under UV light (365 nm), B: detection with 0.5% anisaldehyde

Table 4 hR_f values of components in YMH extracts.

Spot	hR _f value	UV 365 nm			0.5% Anisaldehyde		
		A YMH	70E YMH	95E YMH	A YMH	70E YMH	95E YMH
1	10	-	-	-	-	pink	pink
2	11	light blue	light blue	light blue	-	-	-
3	23	-	opaque white	opaque white	-	-	-
4	30	dark blue	dark blue	dark blue	-	-	-
5	34	-	opaque blue	opaque blue	-	-	-
6	39	-	-	-	-	light violet	light violet
7	42	-	light red	light red	-	pinkish purple	pinkish purple
8	49	-	purple	purple	-	-	-
9	51	-	-	-	-	violet	violet
10	61	-	-	-	-	light violet	light violet
11	65	-	-	-	-	light violet	-
12	68	-	-	light red	-	-	-
13	72	-	pink	pink	-	-	-
14	81	-	blue	blue	-	-	-
15	84	-	red	red	-	-	-
16	86	-	-	-	-	-	violet
17	90	-	-	-	-	-	dark purple

A YMH = Aqueous extract of YMH, 70E YMH = 70% ethanol extract of YMH, 95E YMH = 95% ethanol extract of YMH

อภิปรายผล

การตรวจพบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ แอนทราควิโนน และแทนนิน สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งพบว่าสารพฤษเคมีเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระร่วมด้วย แต่ไม่พบซาโปนิน ซึ่งแตกต่างจากวิจัยในอดีต^[13-20] ซึ่งสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายจากสภาวะความเป็นกรด ต่างความร้อนในระหว่างขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ หรือเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์บางชนิดของส่วนประกอบในตำรับสมุนไพรได้

ตามกฎ like dissolves like แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเอทานอลมีความเป็นขั้วที่ใกล้เคียงกับสารฟีนอลิกมากกว่าน้ำ ผลการทดลองจึงแสดงให้เห็นว่ายาหม้อห้ำรากที่สกัดด้วย 70% เอทานอลและ 95% เอทานอลมีปริมาณของฟีนอลิกรวมสูงกว่ายาหม้อห้ำรากที่สกัดด้วยน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ ที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดใบย่านางและใบทองกวาว (จัดอยู่ในวงศ์ FABACEAE เช่นเดียวกับจันทน์แดง) ด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมที่สูงกว่าที่สกัดด้วยน้ำ^[21]

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ DPPH พบว่าสารสกัดยาหม้อห้ำรากทั้ง 3 ตัวอย่างมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐาน ซึ่งการทดสอบด้วยวิธี DPPH เป็นการวัดความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมจากสารสกัดยาหม้อห้ำรากไปยังสาร DPPH และ 70E YMH ที่สกัดด้วย 70% เอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของ DPPH ที่ละลายได้ดีในเอทานอล^[22] และนอกจากนั้นการวิจัยของสมุนไพรเดี่ยวที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดของผักกูดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันดีกว่าสารสกัดขี้เหล็ก^[23]

ซึ่งตำรับยาหม้อห้ำรากนั้นมีผักกูดเป็นส่วนประกอบมากที่สุดถึงร้อยละ 22.64 ซึ่งผลการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของสารสกัดยาหม้อห้ำรากด้วยวิธี DPPH และ FRAP นั้นก็พบว่าการสกัดด้วย 70% เอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งดีกว่าการสกัดด้วยน้ำเช่นกัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ ABTS พบว่าสารสกัดยาหม้อห้ำรากทั้ง 3 ตัวอย่างมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐาน A YMH ที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของ ABTS ที่ละลายได้ดีในน้ำ^[22,24] ซึ่งวิธีการสกัดโดยการต้มกับน้ำที่เป็นการเลียนแบบวิธีการทำยาแบบดั้งเดิมนั้น^[1] เป็นสิ่งที่ช่วยสนับสนุนการใช้ยาตามวิธีการของโบราณว่ายาหม้อห้ำรากที่ใช้วิธีการต้มต้มนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้

สำหรับการทดสอบหาเอกลักษณ์ทางเคมีนั้นพบสารทั้งหมด 17 แฉะนั้น แต่ยังไม่มีการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ดังนั้นในอนาคตควรมีการหาสารมาตรฐานเพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบ รวมถึงควรมีระบบที่ใช้ในการทดสอบหาเอกลักษณ์ทางเคมีมากกว่า 1 ระบบ และควรเลือกใช้ spray reagent เพิ่มเติมที่มีความจำเพาะกับกลุ่มสารพฤษเคมีของตำรับยาหม้อห้ำราก เพื่อการควบคุมคุณภาพของตำรับยาหม้อห้ำราก ต่อไป

ข้อสรุป

จากผลการทดลองสรุปได้ว่ายาหม้อห้ำรากมีสารพฤษเคมีกลุ่มอัลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ แอนทราควิโนน และแทนนิน ซึ่งสอดคล้องกับสรรพคุณตามตำรับยาในคัมภีร์ อาทิ ฤทธิ์ในการเป็นยาระบาย ลดใช้ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งพบว่าสารสกัดยาหม้อห้ำรากด้วยน้ำและเอทานอลนั้นมีฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระที่ให้ผลดี สำหรับการสกัดด้วยการต้มที่เป็นวิธีการดั้งเดิมหรือเป็นการเตรียมยาที่ใช้สำหรับรักษาผู้ป่วยจริงนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ดัชนี ถือว่าเป็นหนึ่งสิ่งที่ใช้ยืนยันคุณภาพว่าการที่ผู้ป่วยใช้ยาตำรับดังกล่าวในรูปแบบยาต้มเพื่อการรักษา นั้น ยาที่รับประทานมีสารที่จะช่วยเป็นยาระบายหรือลดไข้ และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย ส่วนยาหม้อห้อมที่สกัดด้วย 70% เอทานอล (70E YMH) มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด คือ 180.92 ± 3.46 มิลลิกรัมแกลลิก/กรัมสารสกัด รวมถึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ดีที่สุดเช่นกัน ซึ่งการศึกษาในรายละเอียดของการออกฤทธิ์ทางเภสัชอื่น ๆ ของยา เช่น ฤทธิ์ลดไข้ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ การต้านเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส รวมไปถึงการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีที่ระบุรายละเอียด ชนิด และปริมาณของสารที่เป็นองค์ประกอบของยาหม้อห้อมที่นั้นก็จะเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องศึกษาวิจัยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย ขอขอบคุณวิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุขกาญจนาภิเษก ที่อนุเคราะห์เครื่องระเหยแห้ง lyophilizer และโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร ที่อนุเคราะห์การใช้เครื่อง rotary evaporator

References

1. Phrayaphad Pongsa Wisutthatipphadee (Sun Sun-torawech). Phadtumbon III (fever). 1927. (in Thai)
2. Soradech S, Kusolkumbot P, & Thubthimthed S. De-

- velopment and characterization of microemulsions containing Tiliacora triandra Diels as an active ingredient for antioxidant and melanogenesis stimulating activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2018;8(3):046-054.
3. Nutmakul T. Phytochemical and pharmacological activity of Tiliacora triandra (Colebr.) Diels. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*. 2021;43(5).
 4. Yadav RK, Nandy BC, Maity S, Sarkar S, Saha S. Phytochemistry, pharmacology, toxicology, and clinical trial of Ficus racemosa. *Pharmacognosy Reviews*. 2015;9(17):73.
 5. Dechayont B, Phuaklee P, Chunthong-Orn J, Juckmeta T, Prajuabjinda O, Jiraratsatit K. Antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activities of Mahanintangtong and its constituent herbs, a formula used in Thai traditional medicine for treating pharyngitis. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021;21(1):1-12.
 6. Jaiwal K, Thakur T, Mishra N, & Kumar A. Pharmacological approach of Terminalia arjuna: A review. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. 2021;1-15.
 7. Department of Medicine Science, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia 2020 volume I. Office of National Buddhism Press: Bangkok; 2020. (in Thai)
 8. Soonthornchareonnon, N. Medicines and natural products Vols 1. 3rd ed. Bangkok: Sangtian Printing LTD; 2001.116-128.
 9. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 2004;85(2):231-7.
 10. Liyana-Pathirana CM, Shahidi F. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(7):2433-40.
 11. Thaipong, K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006;19(6-7):669-75.
 12. Oyedemi SO, Bradley G, Afolayan AJ. In-vitro and -vivo antioxidant activities of aqueous extract of *Strychnos henningsii* Gilg. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010;4(2):70-8.

13. Buachoon N. Phytochemical screening antioxidant activities α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of *Nelumbo nucifera* Gaerth. Rajamangala University of Technology Krungthep Journal. 2020;14(1):125-36. (in Thai)
14. Choudhary RA, Manivannan E, Chandrashekar R, Ravi I, Sivasankari V, Arul AK. Phytochemical analysis of ethanolic extract of fruits of *Terminalia chebula* and its medicinal use in human. Phytochemical Analysis. 2021;2:43-54.
15. Devi PN, Kaleeswari S, Poonkothai M. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of fruit extracts of *Terminalia bellerica*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;6(5): 639-42.
16. Grover M, Behl T, Virmani T. Phytochemical screening, antioxidant assay and cytotoxic profile for different extracts of *Chrysopogon zizanioides* roots. Chemistry & Biodiversity. 2021;18(8):e2100012.
17. Narakornwit W, Sukwattanasinit T, Wangwattana B, Srisopon S, Burana-osot J, Sotanaphun U. Discrimination of botanical origin of Chan-thet, Chan-hom, Chan-chamot, Chan-khao and Chan-thana using chemical test and thin-layer chromatography. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal. 2018;13(3):142-9.
18. Noysang C, Pummarin T. Evaluation of phytochemicals and pharmacological activities of Ben-Cha-Lo-Ka-Wi-Chian remedy. Applied Mechanics and Materials. 2019;891:52-9.
19. Poofery J, Sripanidkulchai B, Banjerdpongchai R. Extracts of *Bridelia ovata* and *Croton oblongifolius* induce apoptosis in human MDA MB 231 breast cancer cells via oxidative stress and mitochondrial pathways. International Journal of Oncology. 2020;56(4):969-85.
20. Sapkota BK, Khadayat K, Sharma K Raut BK, Aryal D, Thapa BB, Parajuli N. Phytochemical analysis and antioxidant and antidiabetic activities of extracts from *Bergenia ciliata*, *Mimosa pudica*, and *Phyllanthus emblica*. Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. 2022;2022:1-11.
21. Phoomyai P, Supha C. The Solvent that affect the agents antioxidant and total phenolic compounds from the herbal plants. The 2nd Kamphaeng Phet Rajabhat University National Conference. 2022;627-35. (in Thai)
22. Hou WC, Lee MH, Chen HJ, Liang WL, Han CH, Liu YW, Lin YH. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001;49(10):4956-60.
23. Mwangi RW, Macharia JM, Wagara IN, Bence RL. The medicinal properties of *Cassia fistula* L: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2021;144:1-9.
24. Phansawan B. Free radical, oxidations and antioxidant activity determination. Thai Science and Technology Journal. 2013;21(3):275-86. (in Thai)