

ปริมาณสารฟีนอลิกและฟเลโวนอยด์และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตำรับยา ซานไป่ทังและสมุนไพรรในตำรับ

สิทธิโชค วาดพิมาย*, ภาวัต ธนวิระสิน*, อลินธิภัส กัญจนบุรินทร์*, Quang Thai Le[†], กัญญภัทร เล^{*‡}

* สำนักวิชาการแพทย์บูรณาการ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง เลขที่ 333 หมู่ 1 ตำบลท่าสูด อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย 57100

[†] คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ 155 หมู่ 2 ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100

[‡] ผู้รับผิดชอบบทความ: kanyaphat.api@mfu.ac.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ตำรับยา “ซานไป่ทัง” (San-Bai-Tang) เป็นตำรับยาจีนโบราณที่มีประวัติการใช้ดั้งเดิมในรูปแบบยารับประทานเพื่อปรับสมดุลและเลือด บำรุงม้าม และเสริมสร้างสุขภาพผิวพรรณให้แลดูสดใสกระจ่างใสจากภายใน ประกอบด้วยตัวยาสมุนไพรร 4 ชนิด ได้แก่ ใปู้ (Atractylodes macrocephala Koidz.), ใป้อ (Paeonia lactiflora Pall.), ฝูหลิง (Poria cocos (Schw.) Wolf) และกันเฉ่า (Glycyrrhiza uralensis Fisch.) ที่ผ่านการศึกษาเกี่ยวกับยาดังนี้ส่วนใหญ่มุ่งเน้นด้านสรรพคุณทางยาเพื่อการรักษาโรค การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณลักษณะทางพฤกษเคมีและศักยภาพการต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดตำรับยาซานไป่ทังและสมุนไพรรเดี่ยวองค์ประกอบเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน เพื่อประเมินศักยภาพในการพัฒนาเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เวชสำอางสมุนไพรร (herbal cosmeceuticals) โดยประเมินปริมาณสารฟีนอลิกรวม (total phenolic content: TPC) ปริมาณสารฟเลโวนอยด์รวม (total flavonoid content: TFC) และประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันผ่าน 2 กลไก คือ ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH assay) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (FRAP assay)

วิธีศึกษา: สกัดสมุนไพรรเดี่ยวแต่ละชนิดและตำรับยาซานไป่ทังด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ สกัดด้วยน้ำด้วยวิธีต้ม (decoction) และสกัดด้วยเอทานอล 95% ด้วยการแช่สกัดร่วมกับการเขย่า (agitated maceration) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกรวม (TPC) และปริมาณสารกลุ่มฟเลโวนอยด์รวม (TFC), ประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันผ่าน 2 กลไก คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) โดยใช้สาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH assay) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยวด้วยการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (ferric reducing antioxidant power, FRAP assay)

ผลการศึกษา: สารสกัดด้วยเอทานอล 95% ของตำรับยาซานไป่ทังมีปริมาณ TPC และ TFC สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำประมาณ 2 เท่า (TPC: 52.60 ± 3.48 vs 28.11 ± 1.31 mg GAE/g extract; TFC: 47.16 ± 1.77 vs 20.41 ± 1.06 mg QE/g extract ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพบว่า สารสกัดด้วยน้ำของตำรับยาและสมุนไพรรเดี่ยวเกือบทุกชนิดกลับแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 95% ในทั้งสองกลไกการทดสอบ (ค่า DPPH ของตำรับสารสกัดน้ำเท่ากับ 297.18 ± 1.03 mg TE/g extract vs สารสกัดเอทานอล 217.40 ± 2.47 mg TE/g extract; ค่า FRAP ของตำรับสารสกัดน้ำเท่ากับ 154.33 ± 4.68 mg TE/g extract vs สารสกัดเอทานอล 127.05 ± 1.45 mg TE/g extract) โดยเฉพาะสารสกัดด้วยน้ำของฝูหลิง ซึ่งมีปริมาณ TPC 8.12 ± 0.65 mg GAE/g และ TFC 2.44 ± 0.40 mg QE/g ซึ่งต่ำมาก แต่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับสูง โดยมีค่า DPPH 305.33 ± 0.85 mg

TE/g และค่า FRAP 215.35 ± 4.84 mg TE/g สอดคล้องกับสารสกัดด้วยน้ำของโป๊วที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุดในทุกการทดสอบ บ่งชี้ถึงบทบาทสำคัญของสารออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันซึ่งละลายน้ำที่ไม่ใช่สารกลุ่มฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์ เช่น พอลิแซ็กคาไรด์กลุ่มบีตา-กลูแคน ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยน้ำ

อภิปรายผล: แม้สารสกัดด้วยเอทานอล 95% ของตำรับยาซานไป่ทังและสมุนไพรร่วมมีปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) และฟลาโวนอยด์รวม (TFC) สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำประมาณ 2 เท่า แต่ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้งวิธี DPPH และ FRAP กลับพบว่าสารสกัดด้วยน้ำแสดงประสิทธิภาพสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ สะท้อนว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันไม่ได้ผันแปรตามปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์เพียงอย่างเดียว แต่ได้รับอิทธิพลจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดละลายน้ำกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่สารฟีนอลิก เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ในฝูหลิงและโป๊วจูมโน-เทอร์พีนไกลโคไซด์ในโป๊สและไทรเทอร์พีนแซโพนินในกันเฉ่า ซึ่งละลายได้ดีในน้ำและสามารถให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ การผสมผสานสมุนไพรร่วมในตำรับจึงเกิดการส่งเสริมฤทธิ์กันของสารต้านออกซิเดชันหลายชนิด ผลการศึกษานี้จึงสนับสนุนศักยภาพของตำรับยาซานไป่ทังในการพัฒนาเป็นส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์เวชสำอางสมุนไพรร่วม โดยควรใช้ตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบในการสกัดตำรับยามากกว่าการใช้เอทานอลความเข้มข้นสูงเป็นตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว

ข้อสรุป: ตำรับยาซานไป่ทังมีศักยภาพสูงในการเป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันทางธรรมชาติ โดยสารสกัดด้วยน้ำแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 95% อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีปัจจัยหลักมาจากบทบาทของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดละลายน้ำที่ไม่ใช่สารกลุ่มฟีนอลิก ข้อค้นพบนี้เป็นพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์สำคัญในการเลือกใช้ระบบตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ เพื่อยุติการพัฒนาตำรับยาซานไป่ทังเป็นส่วนประกอบที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์เวชสำอางสมุนไพรร่วมเพื่อการดูแลผิวพรรณอย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ตำรับยาสมุนไพรร่วมจีน, สารต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลิก, เวชสำอางสมุนไพรร่วม

Total Phenolic and Flavonoid Content and Antioxidant Activities of “SAN–BAI–TANG” Formula and Its Herbal Components

Sittichoke Vadphimai*, Pawat Thanavachirasin*, Alinthiphat Kanchanaburin*, Quang Thai Le†, Kanyaphat Le*‡

* School of Integrative Medicine, Mae Fah Luang University, Tha Sut Subdistrict, Mueang District, Chiang Rai 57100, Thailand

† Faculty of Agro-industry, Chiang Mai University, Mae Hia Subdistrict, Mueang District, Chiang Mai 50100, Thailand

‡ Corresponding author: kanyaphat.api@mfu.ac.th

Abstract

Introduction and Objectives: “San–Bai–Tang” is a traditional Chinese medicine (TCM) polyherbal formulation historically administered orally to harmonize Qi and Blood, tonify the spleen, and improve skin complexion from within. It consists of four medicinal herbs in equal ratios: Baizhu (*Atractylodes macrocephala* Koidz.), Baishao (*Paeonia lactiflora* Pall.), Fuling (*Poria cocos* (Schw.) Wolf), and Gancao (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.). This study aimed to evaluate the phytochemical composition and antioxidant capacities of extracts of San–Bai–Tang and its individual herbal components, using solvents with different polarities to assess their potential use as active ingredients in herbal cosmeceuticals. Evaluations included total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and antioxidant capacities via DPPH radical scavenging assay and ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay.

Methods: Individual herbs and the San-Bai-Tang formula were extracted using two extraction systems, i.e., water decoction and agitated maceration in 95% ethanol. The resulting extracts were analyzed for total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC). Antioxidant activity was evaluated using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays.

Results: The 95% ethanol extract of the San-Bai-Tang formula contained higher TPC and TFC content (52.60 ± 3.48 mg GAE/g and 47.16 ± 1.77 mg QE/g, respectively) compared to its water extract (28.11 ± 1.31 mg GAE/g and 20.41 ± 1.06 mg QE/g, respectively). In contrast, water extracts of both San-Bai-Tang formula and individual herbs exhibited significantly higher antioxidant capacities in both DPPH and FRAP assays than their corresponding 95% ethanol extracts. For the formula, the water extract showed DPPH and FRAP values of 297.18 ± 1.03 and 154.33 ± 4.68 mg TE/g extract, whereas the ethanol extract showed 217.40 ± 2.47 and 127.05 ± 1.45 mg TE/g extract, respectively. Notably, water extract of Fuling possessed low TPC (8.12 ± 0.65 mg GAE/g) and TFC (2.44 ± 0.40 mg QE/g), yet demonstrated high DPPH (305.33 ± 0.85 mg TE/g) and FRAP (215.35 ± 4.84 mg TE/g) activities, while water extract of Baizhu demonstrated the highest overall antioxidant capacities. These findings highlight the significant contribution of non-phenolic/non-flavonoid water-soluble bioactive compounds, such as β -glucan polysaccharides, to the antioxidant potential of the decoction.

Discussion: Although the 95% ethanol extracts of the San-Bai-Tang formula and its individual herbal components contained approximately two-fold higher total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) than their corresponding water extract, antioxidant evaluations via both DPPH and FRAP assays revealed that the water extracts exhibited significantly superior activities. This reflects that antioxidant capacity does not rely solely on phenolic or flavonoid compounds but is strongly driven by other water-soluble non-phenolic bioactives—such as polysaccharides in Fuling and Baizhu, monoterpene glycosides in Baishao, and triterpene saponins in Gancao—which readily dissolve in water and efficiently donate electrons or hydrogen atoms to neutralize free radicals. The polyherbal combination within the formula thus fosters synergistic effects among these diverse antioxidant constituents. Consequently, these findings support the potential of San-Bai-Tang remedy as an antioxidant active ingredient for the formulation of herbal cosmeceuticals, suggesting that water-containing solvent systems are more appropriate for extraction than high-concentration ethanol alone.

Conclusion: The San-Bai-Tang formula demonstrates strong potential as a natural source of antioxidants. Although 95% ethanol yields higher total phenolic and flavonoid content, hot water extraction exhibits significantly superior antioxidant capacities, driven primarily by water-soluble non-phenolic bioactives. These findings provide a scientific rationale for selecting water-containing solvent systems when formulating San-Bai-Tang into active ingredients for herbal cosmeceuticals.

Keywords: antioxidant, herbal cosmeceuticals, phenolic compounds, polyherbal

บทนำและวัตถุประสงค์

อนุมูลอิสระและความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ผิวหนัง การทำลายโครงสร้างคอลลาเจนและอีลาสติน รวมถึงการเกิดริ้วรอยก่อนวัย^[1-2] ในอดีตมนุษย์รู้จักนำวัตถุดิบจากธรรมชาติมาใช้ในการบำรุงและปกป้องผิวพรรณปัจจุบัน

อุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว โดยมุ่งเน้นการนำสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมาใช้เป็นส่วนผสมสำคัญ^[1,3]

อย่างไรก็ตาม พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ.2558 กำหนดว่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ทำความสะอาด หรือบำรุงผิวภายนอกเท่านั้น ไม่สามารถกล่าวอ้าง

สรรพคุณเกินขอบเขตเกี่ยวกับการบำบัดรักษาโรคหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางสรีรวิทยาได้^[4] ดังนั้นหากต้องการศึกษาวิจัยเพื่อต่อยอดสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่สามารถระบุค่ากล่าวอ้างทางสุขภาพ (health claim) ในการส่งเสริมสุขภาพผิวพรรณบนหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ชัดเจน ควรพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ “เวชสำอางสมุนไพร” (herbal cosmetics) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพ ภายใต้พระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ.2562^[5] โดยใช้สารสกัดสมุนไพรที่มีสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive phytochemicals) เป็นส่วนประกอบ เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารฟลโวนอยด์ พอลิแซ็กคาไรด์ และเทอร์ปีนอยด์ ซึ่งช่วยปกป้องเซลล์ผิวจากความเสียหายอันเกิดจากอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ^[2,6]

ศาสตร์การแพทย์แผนจีน (Traditional Chinese Medicine: TCM) เป็นแหล่งภูมิปัญญาโบราณที่มีการใช้สมุนไพรเพื่อดูแลสุขภาพและผิวพรรณมาอย่างยาวนาน^[6] หนึ่งในตำรับยาที่มีชื่อเสียงคือ “ซานไป่ทัง” (San-Bai-Tang: 三白汤) ซึ่งได้รับการบันทึกครั้งแรกในตำรา “อีเสวียรูเหมิน” (Yixue Rumen: 医学入门) เขียนโดย Li Chan ในสมัยราชวงศ์หมิง (ค.ศ.1575)^[7] ตำรับยานี้ประกอบด้วยสมุนไพรจีน 4 ชนิด ในอัตราส่วนน้ำหนักเท่ากัน (1 : 1 : 1 : 1) ได้แก่

ไป่จู (Baizhu) - ส่วนราก/เหง้าของ *Atractylodes macrocephala* Koidz.^[8]

ไป่เส้า (Baishao) - รากของ *Paeonia lactiflora* Pall.^[9]

ฝูหลิง (Fuling) - ปีกไยรา (sclerotium) แห่งของเชื้อรา *Poria cocos* (Schw.) Wolf^[10]

กันเฉ่า (Gancao) - รากและเหง้าอบแห้งของพืชในสกุล *Glycyrrhiza* 3 ชนิด ได้แก่ *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *Glycyrrhiza inflata* Batalin, หรือ *Glycyrrhiza glabra* L. ตามเภสัชตำรับของสาธารณรัฐประชาชนจีน (Pharmacopoeia of the People's Republic of China: PPRC 2020)^[11-12]

ตามตำรา “อีเสวียรูเหมิน” ตั้งเดิมระบุว่า ตำรับยาซานไป่ทังใช้ในรูปแบบยารับประทานโดยนำมาต้มกับน้ำ (decoction) มีสรรพคุณหลักในการแก้อาการความชื้นคั่งค้างในร่างกาย บำรุงม้าม เสริมชี (Qi) และบำรุงเลือด^[7] ในทางการแพทย์แผนจีน ผิวพรรณภายนอกเป็นสิ่งที่สะท้อนความสมดุลของอวัยวะภายใน และระบบเลือดลม (“รูปนอกเกิดจากภายใน”) เมื่อระบบม้ามและชีทำงานสมบูรณ์ เลือดลมไหลเวียนดี ผิวพรรณจึงผุดผ่อง นุ่มชุ่มชื้น และลดความหมองคล้ำ^[7]

จากรายงานการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับตำรับยาซานไป่ทังและสมุนไพรองค์ประกอบ พบการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่สำคัญหลายประการ โดย Ye และคณะ (2010) ได้คัดกรองตำรับยาสมุนไพรจีนเพื่อประเมินฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 30% ของตำรับยาซานไป่ทังที่มีความเข้มข้น 1 mg/mL สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 67.1 ± 1.3 ^[13] ต่อมา Xiao และคณะ (2022) ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลายพิมพ์นิ้วมือทางเคมี (HPLC fingerprint) กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดน้ำต้มตำรับยาซานไป่ทัง (spectrum-effect relationship) และยืนยันถึงกลุ่มสารสำคัญหลักที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระภายในตำรับ^[14]

สำหรับสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพใน

สมุนไพรแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบของตำรับชานไป๋ทั้ง มีดังนี้

ไป๋จู๋ ประกอบด้วยสารกลุ่มเซสควิเทอร์พีนอยด์ (sesquiterpenoids) เช่น atractylenolide I, II, III, พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดละลายน้ำ (atractylodes macrocephala polysaccharides: AMPs) รวมถึงสารประกอบฟีนอลิกและเฟลโวนอยด์^[8]

ไป๋เส้า มีสารสำคัญหลักในกลุ่มมอโนเทอร์พีนไกลโคไซด์ (monoterpene glycosides) โดยเฉพาะ paeoniflorin และ albiflorin รวมถึงสารกลุ่ม galloyl glucoses และสารประกอบฟีนอลิก^[9]

ฝูหลิง มีสารสำคัญหลักคือพอลิแซ็กคาไรด์กลุ่ม β -glucan โดยเฉพาะ pachyman ร่วมกับกรดไตรเทอร์พีนกลุ่มลาโนสเทน (lanostane-type triterpenes) เช่น pachymic acid^[10]

กั้นเฉ้า ประกอบด้วยสารไตรเทอร์พีนแซโพนินคือ glycyrrhizin (glycyrrhizic acid) และสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ที่เป็นเอกลักษณ์ เช่น liquiritin, isoliquiritigenin และ liquiritigenin^[12]

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้น แม้จะมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและสารสำคัญของตำรับยาชานไป๋ทั้งอยู่บ้าง แต่ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เชิงเปรียบเทียบเกี่ยวกับประสิทธิภาพการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชั่ว ระหว่างการต้มด้วยน้ำและการใช้เอทานอลความเข้มข้นสูง รวมถึงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารเฟลโวนอยด์รวม กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันผ่านกลไกที่หลากหลายของตำรับยานี้ ยังมีค่อนข้างจำกัด ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินและเปรียบเทียบสารสกัดตำรับยา

ชานไป๋ทั้งและสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบที่

เตรียมโดยการต้มด้วยน้ำ (water decoction) และการแช่สกัดด้วยเอทานอล 95% (agitated maceration in 95% ethanol) ในส่วนของปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) ปริมาณสารเฟลโวนอยด์รวม (TFC) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันผ่าน 2 กลไก คือ การกำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH assay) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (FRAP assay) ข้อมูลที่ได้จะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญในการสนับสนุนการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาตำรับยาชานไป๋ทั้งเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เวชสำอางสมุนไพรต่อไป

ระเบียบวิธีการศึกษา

2.1 สารเคมีและรีเอเจนต์

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), Folin-Ciocalteu reagent, dimethyl sulfoxide (DMSO), gallic acid, tyrosinase (lyophilized powder) และ 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) จัดซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich (สหรัฐอเมริกา) กรดไฮโดรคลอริกและกรดแอซิติกจัดซื้อจากบริษัท HiMedia (ประเทศอินเดีย) ส่วนโซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมแอซิเตต โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เพอร์ริกคลอไรด์ อะลูมิเนียมคลอไรด์ และโซเดียมไนไตรต์จัดซื้อจาก KemAus (ออสเตรเลีย)

2.2 การเตรียมตัวอย่าง

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย

สมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ ไป๋จู๋ (*Baizhu* - *Atractylodes macrocephala* Koidz.) ใช้ส่วนราก, ไป๋เส้า (*Baishao* - *Paeonia lactiflora* Pall.) ใช้ส่วนรากหรือเหง้า, ฟูลิง (*Fuling* - *Poria cocos* (Schw.) Wolf) ใช้ส่วนก้อนเชื้อราใต้ดิน และ กันเฉ่า (*Gancao* - *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) ใช้ส่วนราก ได้รับการสนับสนุนจากห้องปฏิบัติการการแพทย์แผนจีนสำนักวิชาการแพทย์บูรณาการ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย โดยสมุนไพรจีนทั้งหมดได้ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดพืช (botanical authentication) โดยผู้เชี่ยวชาญด้านการแพทย์แผนจีนของสำนักวิชาการแพทย์บูรณาการแล้ว จากนั้นนำสมุนไพรแห้งแต่ละชนิดไปบดเป็นผงแยกกันโดยเครื่องบดสมุนไพร (Panasonic, Japan) และกำหนดขนาดอนุภาคโดยใช้ชุดตะแกรงร่อนขนาด 1 - 2 มิลลิเมตร (C-Tech, China) ส่วนการเตรียม “ตำรับยาชานไป๋ทั้ง” นั้น ทำโดยนำผงสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1 จากนั้นนำผงสมุนไพรทั้งหมดที่เตรียมเสร็จแล้วไปเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทและติดฉลากก่อนนำไปเตรียมเป็นสารสกัดต่อไป

การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำ ทำโดยการต้มสมุนไพรและยาตำรับที่เตรียมไว้แล้วในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง ในอัตราส่วนน้ำ 10 มิลลิลิตรต่อสมุนไพรผง 1 กรัม จากนั้นทำให้ส่วนผสมเย็นลงและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ $2,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที แยกน้ำออก แล้วทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง (freeze drying) จากนั้นนำสารสกัดด้วยน้ำที่ได้มาบดในโกร่งเพื่อให้เป็นผงเนื้อเดียวกันและเก็บในที่แห้งเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป^[15]

การเตรียมสารสกัดด้วยเอทานอล นำสมุนไพรและยาตำรับที่เตรียมไว้แล้วแช่ในเอทานอล 95% ใน

อัตราส่วนเอทานอล 10 มิลลิลิตรต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม และนำไปแช่ยาเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรองสารสกัดผ่านผ้าขาวบาง และระเหยเอทานอลออกโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator; Eylea, USA) นำสารสกัดที่ได้ไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -4°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป^[16]

การเตรียมสารละลายของสารสกัดเพื่อใช้ในการทดสอบ ก่อนการทดสอบปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) เฟลวอนอยด์รวม (TFC) รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัด ต้องเตรียมสารละลายจากสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรเดี่ยวและยาตำรับด้วยการละลายในน้ำกลั่น ส่วนสารสกัดด้วยเอทานอลนำมาละลายในเอทานอล 95% โดยให้สารละลายมีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml)

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (total phenolic content, TPC)

นำวิธีการของ Atun และคณะ^[17] มาประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม โดยเริ่มจากการสร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid calibration curve) ด้วยการเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับรีเอเจนต์ Folin-Ciocalteu 1 มิลลิลิตรและสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรรวมเป็น 7 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ผสมให้เข้ากันและบ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Biochrom,

England) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นเพื่อคำนวณหาสมการเส้นตรง (linear regression equation) ในรูปแบบ $y = ax + b$ (เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm, x คือ ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), a คือ ความชันของกราฟ และ b คือ จุดตัดแกน y)

สำหรับการศึกษาตัวอย่าง นำสารละลายของสารสกัดด้วยน้ำและด้วยเอทานอลของสมุนไพรวัวและยาตำรับความเข้มข้น 10 mg/mL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนและสภาวะเดียวกันข้างต้น แต่ละตัวอย่างทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสง (y) ที่วัดได้ไปแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นเทียบเท่ากรดแกลลิก (x) จากนั้นจึงนำมาคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิก รวม แสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g extract)

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณเฟลโวนอยด์รวม (total flavonoid content, TFC)

ใช้วิธี Aluminum chloride colorimetric assay ตาม Lee และคณะ^[18] โดยใช้เคออสิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากการสร้าง กราฟมาตรฐานของเคออสิติน (Quercetin calibration curve) ด้วยการเตรียมสารละลายมาตรฐานเคออสิติน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐาน แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมกับ น้ำปราศจากไอออน 1.25 มิลลิลิตร และสารละลาย โซเดียมไนไตรต์ 5% ปริมาตร 0.075 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วรอ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย อะลูมิเนียมคลอไรด์ 10% w/v ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร

ตั้งทิ้งไว้ 6 นาทีจึงเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 M ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 3 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Biochrom, England) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นเพื่อคำนวณหาสมการเส้นตรง (linear regression equation) ในรูปแบบ $y = ax + b$ (เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm, x คือ ความเข้มข้นของเคออสิติน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), a คือ ความชันของกราฟ และ b คือ จุดตัดแกน y)

สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง นำสารละลายสารสกัด (10 mg/mL) ปริมาตร 0.25 mL มาทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนและสภาวะเดียวกันข้างต้น แต่ละตัวอย่างทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสง (y) ที่วัดได้ไปแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นเทียบเท่าเคออสิติน (x) จากนั้นจึงนำมาคำนวณหาปริมาณสารเฟลโวนอยด์รวม แสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคออสิตินต่อกรัมสารสกัด (mg QE/g extract)

2.5 การคำนวณ Molar ratio ของ TFC : TPC

เพื่อเปรียบเทียบว่าปริมาณสารเฟลโวนอยด์ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกชนิดหนึ่งมีสัดส่วนคิดเป็นร้อยละของปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกรวม ทำโดยเปลี่ยนค่าของ TFC และ TPC ให้เป็นหน่วยเดียวกันเป็น molar equivalent หรือ $\mu\text{mol/g extract}$ ด้วยการหารค่าเฉลี่ยของ TFC ด้วย molecular weight ของ quercetin (302.24 g/mol) และหารค่าเฉลี่ยของ TPC ด้วย molecular weight ของ gallic acid (170.12 g/mol) จากนั้นจึงนำมาคำนวณเป็น molar ratio โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{TFC Molar} = \frac{\text{mg OE/g extract}}{302.24 \text{ g/mol}} \times 1,000 = \mu\text{mol OE/g extract}$$

$$\text{TPC Molar} = \frac{\text{mg GAE/g extract}}{170.12 \text{ g/mol}} \times 1,000 = \mu\text{mol GAE/g extract}$$

$$\text{Molar ratio of TFC/TPC (\%)} = \frac{\text{TFC } (\mu\text{mol OE/g extract})}{\text{TPC } (\mu\text{mol GAE/g extract})} \times 100$$

2.6 การทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

การทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระตามวิธีของ Sanjukta และคณะ^[19] โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากการสร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox (Trolox calibration curve) ด้วยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.1 mL ผสมกับสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH ในเมทานอล ความเข้มข้น 0.3 mM ปริมาตร 0.1 mL ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปป้อนในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Biochrom, England) คำนวณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ (% DPPH radical scavenging) ของแต่ละความเข้มข้น แล้วนำไปสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นของ Trolox เพื่อคำนวณหาสมการเส้นตรง (linear regression equation) ในรูปแบบ $y = ax + b$ (เมื่อ y คือ ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH หรือค่าความต่างของการดูดกลืนแสง, x คือ ความเข้มข้นของ Trolox (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), a คือ ความชันของกราฟ

และ b คือ จุดตัดแกน y)

สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง นำสารละลายสารสกัด (10 mg/mL) ปริมาตร 0.1 mL มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ตามขั้นตอนและสภาวะเดียวกันข้างต้น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm นำผลที่ได้ไปแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นเทียบเท่า Trolox (x) จากนั้นจึงนำมาคำนวณหาฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ แสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ Trolox ต่อกรัมสารสกัด (mg TE/g extract) แต่ละตัวอย่างทดสอบทำซ้ำ 3 ครั้ง การลดลงของการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของอนุมูลอิสระ DPPH ที่ถูกกำจัด

2.7 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไออน (FRAP)

การทดสอบความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยวของสารสกัดตัวอย่าง ตามวิธีของ Benzie และ Strain^[20] โดยการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารเชิงซ้อน ferric-tripyridyltriazine ให้เป็น ferrous tripyridyltriazine ที่มีสีน้ำเงิน โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน

เริ่มจากการสร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox (Trolox calibration curve) ด้วยการเตรียมสารละลาย

มาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 mL กับรีเอเจนต์ FRAP (ประกอบด้วย 300 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl และ 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ในอัตราส่วน 10:1:1) ปริมาตร 3.0 mL ผสมให้เข้ากัน นำไปป้อนที่อุณหภูมิจึง 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Biochrom, England) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นของ Trolox เพื่อคำนวณหาสมการเส้นตรง (linear regression equation) ในรูปแบบ $y = ax + b$ (เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm, x คือ ความเข้มข้นของ Trolox (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), a คือ ความชันของกราฟ และ b คือ จุดตัดแกน y)

สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง นำสารละลายสารสกัด (10 mg/mL) ปริมาตร 0.1 mL มาผสมกับสารละลาย FRAP ปริมาตร 3.0 mL ปั่นและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm แต่ละตัวอย่างทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ตามขั้นตอนและสภาวะเดียวกันข้างต้น นำค่าการดูดกลืนแสง (y) ที่วัดได้ไปแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นเทียบเท่า Trolox (x) จากนั้นจึงนำมาคำนวณหาความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน แสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ Trolox ต่อกรัมสารสกัด (mg TE/g extract)

2.8 การนำเสนอข้อมูลและการประมวลผล

เนื่องจากตัวอย่างสมุนไพรแต่ละชนิดในการ

ศึกษานี้ได้รับการจัดเตรียมจากแหล่งอ้างอิงเดียวเพื่อการคัดกรองเบื้องต้น ข้อมูลทั้งหมดจึงแสดงค่าเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) จากการทดลองซ้ำทางเทคนิค 3 ครั้ง ($n = 3$) จึงวิเคราะห์และอธิบายความแตกต่างเชิงปริมาณ โดยหลีกเลี่ยงการสรุปผลทางสถิติที่เกินขอบเขตของจำนวนตัวอย่าง

ผลการศึกษา

3.1 ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) และสารฟลโวนอยด์รวม (TFC)

จาก Table 1 แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยยาชานไปทั้งและสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบด้วยเอทานอล 95% ให้ปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลโวนอยด์สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำอย่างชัดเจนในทุกตัวอย่าง

สำหรับสารสกัดด้วยเอทานอล 95% ไปจุ่มมีปริมาณ TPC สูงที่สุด ($63.16 \pm 2.78 \text{ mg GAE/g extract}$) รองลงมาคือตำรับยาชานไปทั้ง ($52.60 \pm 3.48 \text{ mg GAE/g extract}$) และกันเฝ้า ($31.91 \pm 4.50 \text{ mg GAE/g extract}$) ในทำนองเดียวกัน ปริมาณ TFC ในสารสกัดเอทานอล 95% พบว่าไปจุ่มมีค่าสูงที่สุด ($54.69 \pm 0.20 \text{ mg OE/g extract}$) รองลงมาคือตำรับยาชานไปทั้ง ($47.16 \pm 1.77 \text{ mg OE/g extract}$) ขณะที่ผู้หลิงมีปริมาณ TPC และ TFC ต่ำที่สุดในทั้งสองตัวทำละลาย เมื่อคำนวณร้อยละของสัดส่วนโมลาร์ของสารฟลโวนอยด์รวมต่อสารฟีนอลิกรวม (%TFC/TPC molar ratio) พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 95% เกือบทุกตัว (ยกเว้นผู้หลิงซึ่งเป็นตัวยาคจากเชื้อรา) มีปริมาณสารกลุ่มฟลโวนอยด์ประมาณครึ่งหนึ่งของสารฟีนอลิกรวม (48.7 - 52.8%)

Table 1 Total phenolic contents (TPC), total flavonoid contents (TFC), and %TFC/TPC molar ratios of water extract and 95% ethanolic extract of San–Bai–Tang remedy and its herbal components

	Baizhu		Baishao		Fuling		Gancao		San–Bai–Tang	
	TPC	TFC	TPC	TFC	TPC	TFC	TPC	TFC	TPC	TFC
Water	31.05	27.01	5.33	4.18	8.12	2.44	22.05	15.57	28.11	20.41
extract*	± 0.30	± 0.82	± 0.87	± 0.38	± 0.65	± 0.40	± 0.90	± 0.43	± 1.31	± 1.06
Content in	182.52	89.37	31.33	13.83	47.73	8.07	129.61	51.52	165.24	67.53
$\mu\text{mol/g ext}^{\#}$										
%TFC/TPC	47.9%		44.1%		16.9%		39.8%		40.9%	
molar ratio										
Ethanol	63.16	54.69	18.34	15.65	10.87	2.95	31.91	29.94	52.60	47.16
extract*	± 2.78	± 0.20	± 2.01	± 1.36	± 1.86	± 0.14	± 4.50	± 0.61	± 3.48	± 1.77
Content in	371.27	180.95	107.81	51.78	63.90	9.76	187.57	99.06	309.19	156.03
$\mu\text{mol/g ext}^{\#}$										
%TFC/TPC	48.7%		48.0%		15.3%		52.8%		50.5%	
molar ratio										

* TPC and TFC were expressed as mg GAE/ g extract and mg QE/g extract, respectively. Data are shown as mean ± SD of 3 replicates

TPC and TFC were expressed as μmol GAE/g extract and μmol QE/g extract, respectively

3.2ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (DPPH และ FRAP assays)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใน Table 2 แสดงแนวโน้มที่ตรงกันข้ามกับปริมาณ TPC และ TFC กล่าวคือ สารสกัดด้วยน้ำของตำรับยาซานไป่ทั้งและสมุนไพรเดี่ยวทุกตัว แสดงค่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้งวิธี DPPH และ FRAP สูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 95%

สารสกัดด้วยน้ำของตำรับยาซานไป่ทั้งมีค่า DPPH เท่ากับ 297.18 ± 1.03 mg TE/g extract และค่า FRAP เท่ากับ 154.33 ± 4.68 mg TE/g extract ซึ่งสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 95% (DPPH =

217.40 ± 2.47 mg TE/g; FRAP = 127.05 ± 1.45 mg TE/g)

สารสกัดด้วยน้ำของโป๊จูแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุดในทั้งสองวิธีทดสอบ (DPPH = 516.24 ± 0.81 mg TE/g; FRAP = 355.04 ± 3.00 mg TE/g) และข้อสังเกตสำคัญคือ สารสกัดด้วยน้ำของฝูหลิง ซึ่งแม้จะมี TPC และ TFC ต่ำมาก (8.12 และ 2.44 mg/g ตามลำดับ) แต่กลับมีค่า DPPH และค่า FRAP สูงถึง 305.33 ± 0.85 mg TE/g และ 215.35 ± 4.84 mg TE/g ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่า DPPH และ FRAP ของสารสกัดด้วยเอทานอล 95% มากกว่า 2 เท่า

Table 2 DPPH radical scavenging and FRAP reducing activities as mg TE/g extract of water extract and 95% ethanolic extract of San-Bai-Tang remedy and its herbal components

	Baizhu		Baishao		Fuling		Gancao		San-Bai-Tang	
	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP
Water	516.24	355.04	150.25	108.28	305.33	215.35	203.13	155.71	297.18	154.33
extract	± 0.81	± 3.00	± 1.99	± 1.80	± 0.85	± 4.84	± 1.50	± 5.31	± 1.03	± 4.68
Ethanol	326.70	220.12	80.62	91.23	115.37	86.05	183.87	114.95	217.40	127.05
extract	± 1.51	± 5.23	± 2.89	± 0.09	± 1.27	± 2.36	± 1.37	± 4.40	± 2.47	± 1.45

Data are shown as mean ± SD of 3 replicates

อภิปรายผล

การประเมินศักยภาพของสารสกัดตำรับยาซานไป่ทังและสมุนไพรวงศ์ประกอบเพื่อการพัฒนาเป็นส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์เวชสำอางสมุนไพร (herbal cosmeceuticals) จำเป็นต้องพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพของตัวทำละลาย ปริมาณสารพฤกษเคมี และกลไกการต้านออกซิเดชันที่หลากหลาย^[1-3] จากผลการศึกษาทางพฤกษเคมีชี้ให้เห็นว่า ตัวทำละลายเอทานอล 95% มีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) และสารฟีนอลิกรวม (TFC) สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำประมาณ 2 เท่า ทั้งในตำรับยาซานไป่ทังและสมุนไพรวงศ์เดี่ยวทุกชนิด โดยสารสกัดเอทานอล 95% ของตำรับ มีปริมาณ TPC เท่ากับ 52.60 ± 3.48 mg GAE/g extract และ TFC เท่ากับ 47.16 ± 1.77 mg QE/g extract ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณ TPC เท่ากับ 28.11 ± 1.31 mg GAE/g extract และ TFC เท่ากับ 20.41 ± 1.06 mg QE/g extract ซึ่งความแตกต่างนี้อธิบายได้จากคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวทำละลาย โดยเอทานอล 95% มีค่าความเป็นขั้วปานกลาง (medium polarity) จึงซึมผ่านผนังเซลล์พืชและละลายสารกลุ่มฟีนอลิก

และฟีนอลิกที่มีโครงสร้างกิ่งมีขั้วถึงไม่มีขั้วได้ดีกว่า^[15-16,23] ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสารกลุ่มฟีนอลิกประมาณครึ่งหนึ่งที่สกัดออกมาด้วยเอทานอล 95% เป็นสารกลุ่มฟีนอลิก

แม้ว่าสารสกัดเอทานอล 95% จะมีสารกลุ่ม TPC และ TFC ในปริมาณสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ แต่การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้งวิธี DPPH (การกำจัดอนุมูลอิสระ)^[21] และ FRAP (การส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยวเพื่อรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+})^[20] กลับพบปรากฏการณ์ย้อนศร (inverted correlation) อย่างชัดเจนโดยสารสกัดด้วยน้ำของตำรับยาและสมุนไพรวงศ์เดี่ยวทุกชนิดแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดเอทานอล 95% อย่างมีนัยสำคัญ โดยในส่วนของตำรับยาสารสกัดน้ำมีค่า DPPH เท่ากับ 297.18 ± 1.03 mg TE/g extract และ FRAP เท่ากับ 154.33 ± 4.68 mg TE/g extract สูงกว่าสารสกัดเอทานอล 95% (DPPH = 217.40 ± 2.47 mg TE/g; FRAP = 127.05 ± 1.45 mg TE/g) ผลลัพธ์นี้สะท้อนว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณสารฟีนอลิกหรือสารฟีนอลิกเพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นที่ละลายน้ำที่ไม่ใช่ฟีนอลิกซึ่งละลายออกมาได้ดีในการสกัดด้วยการต้มในน้ำ^[24]

สอดคล้องกับการศึกษาสายน้ำมือทางเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตำรับซานโปทั้ง^[14] เมื่อพิจารณาสมุนไพรวัดเดี่ยว พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของโปจู (*Atractylodes macrocephala*) แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุด (DPPH = 516.24 ± 0.81 mg TE/g; FRAP = 355.04 ± 3.00 mg TE/g) น่าจะเนื่องจากน้ำร้อนสามารถสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดละลายน้ำ (AMPs) ออกมาในปริมาณสูง^[6] ซึ่งสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระและมี ferric reducing power สูง^[22] ในทำนองเดียวกัน สารสกัดด้วยน้ำของฟู่หลิง (*Poria cocos*) แม้จะมี TPC และ TFC ต่ำมาก แต่ให้ค่า DPPH และ FRAP สูงกว่าสารสกัดเอทานอลเกิน 2 เท่า ส่วนหนึ่งน่าจะเนื่องจากสารสำคัญคือพอลิแซ็กคาไรด์กลุ่ม β -glucan (pachyman) ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีผลต่อความสามารถในการรีดิวซ์ที่วัดด้วย FRAP assay^[10] ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของโปเสา (*Paeonia lactiflora*) และกันเฉา (*Glycyrrhiza uralensis*) มีรายงานว่า มีสารกลุ่มมอโนเทอร์พีนไกลโคไซด์ (paeoniflorin, albiflorin)^[9] แซโพนิน (glycyrrhizin) และเฟลโวนอยด์-ไกลโคไซด์ (liquiritin)^[12] ซึ่งมีโครงสร้างที่ช่วยส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยวให้อนุมูลอิสระทำให้เป็นโมเลกุลที่เสถียรขึ้น^[9,12]

เมื่อประเมินศักยภาพเชิงการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเวชสำอาง สมุนไพรทั้ง 4 ชนิดในตำรับซานโปทั้งได้รับการบรรจุอยู่ในตำรับยาแผนจีนดั้งเดิม^[7] และได้รับการรับรองในเภสัชตำรับจีน^[11] อีกทั้งมีรายงานการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง^[6] โดยกันเฉาช่วยให้ผิวกระจ่างใสและลดการอักเสบเนื่องจากฤทธิ์ของสาร liquiritin, isoliquiritigenin และ glycyrrhizin^[12-13] โปเสาช่วยปรับสีผิวให้

สม่ำเสมอและปกป้องผิวจากความเครียดออกซิเดชันจากสาร paeoniflorin และ albiflorin^[9] ฟู่หลิงช่วยลดการระคายเคืองและต้านการอักเสบผ่านสาร pachyman และกรดไพรเทอร์พีน^[10] ขณะที่โปจูปกป้องเซลล์ผิวจากอนุมูลอิสระด้วย AMPs และ atractylenolides^[8,22] การรวมสมุนไพรรวมทั้งสี่ตามตำรับดั้งเดิม^[7] อาจช่วยให้เกิดการเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ของสารต้านออกซิเดชันหลายชนิด^[25] ทำให้สารสกัดน้ำของตำรับยา ยังคงรักษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระในระดับสูง

อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากประเมินเฉพาะตัวทำละลายสูงสุดชั่วสองชนิด (น้ำร้อนและเอทานอล 95%) อีกทั้งการประเมินฤทธิ์จำกัดเฉพาะการทดสอบทางเคมีในหลอดทดลอง (*in vitro* chemical assays) และใช้วัตถุดิบสมุนไพรรวมจากแหล่งจัดหาเดียว ดังนั้น เพื่อพัฒนาตำรับยาซานโปทั้งสู่ผลิตภัณฑ์เวชสำอางสมุนไพรรายได้กฎหมายและพระราชบัญญัติที่เกี่ยวข้อง^[4-5] การวิจัยในอนาคตควรศึกษาโดยใช้ตัวอย่างสมุนไพรรวมจำนวนมากขึ้นจากหลายแหล่ง และใช้ตัวทำละลายผสม เช่น เอทานอล 50% (50% v/v ethanol) เพื่อสกัดทั้งสารกึ่งมีขั้วและสารมีขั้วสูงออกมาพร้อมกัน^[15-17] รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (cell-based reactive oxygen species (ROS) assays.) ประเมินฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของผิว เช่น collagenase, elastase, และ hyaluronidase รวมถึงการแยกสารบริสุทธิ์กลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ (AMPs และ pachyman) จากโปจูและฟู่หลิงเพื่อใช้เป็นสารออกฤทธิ์หลักในสูตรตำรับต่อไป^[8,10,22]

ข้อสรุป

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า ตำรับยาจีนโบราณ “ซานไป่ทัง” และสมุนไพรองค์ประกอบทั้ง 4 ชนิด (ไป๋จู๋ ไป๋เส้า ผู่หลิง และกันเฉ่า) มีศักยภาพสูงในการนำมาพัฒนาเป็นส่วนประกอบออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทางธรรมชาติสำหรับผลิตภัณฑ์เวชสำอางสมุนไพร (herbal cosmeceuticals)

ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า แม้การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% จะให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) และฟเลโวนอยด์รวม (TFC) สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำประมาณ 2 เท่า แต่สารสกัดด้วยน้ำ (water decoction) ของตำรับยาและสมุนไพรเดี่ยวส่วนใหญ่กลับมีประสิทธิผลในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) สูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 95% อย่างมีนัยสำคัญ

ข้อค้นพบนี้ชี้ให้เห็นว่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตำรับยาซานไป่ทังไม่ได้ผันแปรตามปริมาณสารฟีนอลิกหรือฟเลโวนอยด์เพียงอย่างเดียว แต่เป็นผลมาจากบทบาทของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ละลายน้ำได้ที่ไม่ใช่สารฟีนอลิก (non-phenolic water-soluble bioactives) ซึ่งถูกสกัดออกมาได้ดีด้วยน้ำร้อน โดยเฉพาะพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดละลายน้ำ (AMPs) ในไป๋จู๋ พอลิแซ็กคาไรด์กลุ่ม β -glucan (pachyman) ในผู่หลิง มอโนเทอร์พีนไกลโคไซด์ในไป๋เส้า และเทอร์เทอร์พีนแซโพนินในกันเฉ่า ซึ่งสามารถให้ห่อหุ้มไฮโดรเจนและถ่ายทอดอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ การนำสมุนไพรทั้งสี่ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมารวมกันในตำรับตามภูมิปัญญาดั้งเดิมยังอาจช่วยเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ได้อีกด้วย

ผลจากการศึกษานี้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับเตรียมสารสกัดที่จะใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ที่จะพัฒนาขึ้น โดยพบว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบในการสกัด (hydroalcoholic extraction) มีความเหมาะสมมากกว่าการใช้เอทานอลความเข้มข้นสูงเพียงอย่างเดียว (alcoholic extraction) และในอนาคตควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมทั้งการประเมินฤทธิ์ในระดับเซลล์ผิวหนัง การทดสอบความปลอดภัย และการวิจัยและพัฒนาสูตรตำรับเวชสำอางสมุนไพรดูแลผิวพรรณต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงสำหรับการสนับสนุนด้านเงินทุน และห้องปฏิบัติการของศูนย์นวัตกรรมสมุนไพรครบวงจรสำหรับการสนับสนุนด้านเครื่องมือการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Ashawat MS, Banchhor M, Saraf S, Saraf S. Herbal cosmetics: trends in skin care formulation. *Pharmacogn Rev.* 2009;3(5):82-89.
2. Hoang HT, Moon JY, Lee YC. Natural antioxidants from plant extracts in skincare cosmetics: recent applications, challenges and perspectives. *Cosmetics.* 2021;8(4):106.
3. Ribeiro AS, Estanqueiro M, Oliveira MB, Lobo JS. Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. *Cosmetics.* 2015;2(2):48-65.
4. Cosmetic Act B.E. 2558 (2015). Published in Government Gazette, Vol. 132, Part 86A. (2015 Sep 8). (in Thai)
5. Herbal Product Act B.E. 2562 (2019). Published in Government Gazette, Vol. 136, Part 56A. (2019 Apr 30). (in Thai)
6. Wang KH, Lin RD, Hsu FL, Huang YH, Chang HC, Huang CY, Lee MH. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *J Ethnopharmacol.* 2006;106(3):353-59.

7. Li C. Yixue Rumen (Introduction to Medicine). Beijing: People's Medical Publishing House; 2006 (in Chinese).
8. Luo W, Zhang K, Wang Y, Ye M, Zhang Y, Xu W, Chen L, Li H. The rhizome of *Atractylodes macrocephala* Koidz.: A comprehensive review on the traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Chem Biodivers. 2025;22(1):e202401879.
9. Tan YQ, Chen HW, Li J, Wu Q. *Paeonia lactiflora* Pall.: A review of its phytochemistry, pharmacology, and clinical applications. Front Pharmacol. 2020;11:561587.
10. Ríos JL. Chemical constituents and pharmacological properties of *Poria cocos*. Planta Med. 2011;77(7):681-91.
11. Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2020. Beijing: China Medical Science Press; 2020 (in Chinese).
12. Yang R, Wang LQ, Yuan BC, Liu Y. The traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. J Ethnopharmacol. 2017;209:301-16.
13. Ye Y, Chou GX, Mu DD, Wang H, Chu JH, Leung AK, Fong W, Yu ZL. Screening of Chinese herbal medicines for anti-tyrosinase activity in a cell free system and B16 cells. J Ethnopharmacol. 2010;129(3):387-90.
14. Xiao Y, Shan X, Wang H, Hong B, Ge Z, Ma J, LiY, Zhao Y, Ma G, Zhang C. Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprint and antioxidant of "San-Bai Decoction" extracts. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2022;1208:123380.
15. Cieniak C, Walshe-Roussel B, Liu R, Muhammad A, Saleem A, Haddad PS, Cuerrier A, Foster Brian C, Arnason John T. Phytochemical comparison of the water and ethanol leaf extracts of the cree medicinal plant, *Sarracenia purpurea* L. (Sarraceniaceae). J Pharm Pharm Sci. 2015;18(4):484-93.
16. Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules. 2009;14(6):2167-80.
17. Atun S, Pertiwi KR, Oolbiah M, Safa S. Phytochemical analysis both of water and ethanol extract from some herbs combinations, nanoemulsion formulation, and antioxidant effects. Open Access Maced J Med Sci. 2022;10(A):95-100.
18. Lee CI, Lee CL, Hwang JF, Lee YH, Wang JJ. Monascus-fermented red mold rice exhibits cytotoxic effect and induces apoptosis on human breast cancer cells. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(3):1269-78.
19. Sanjukta S, Rai AK, Muhammed A, Jeyaram K, Talukdar NC. Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. J Funct Foods. 2015;14:650-58.
20. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996;239(1):70-6.
21. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT. 1995;28(1):25-30.
22. Qu L, Xu J, Cheng Z, Zhang X, Zhou B, Wang C, et al. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* Koidz. Int J Biol Macromol. 2020;159:1016-24.
23. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010;15(10):7313-52.
24. Wong SP, Leong LP, Koh JH. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chem. 2006;99(4):775-83.
25. Zhou X, Seto SW, Chang D, Kiat H, Razmovski-Naumovski V, Chan K, Bensoussan A. Synergistic effects of Chinese herbal medicine: a comprehensive review of methodology and current research. Front Pharmacol. 2016;7:201.