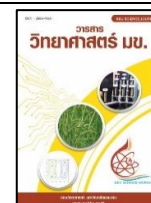




KKU SCIENCE JOURNAL

Journal Home Page : <https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/KKUSciJ>

Published by the Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand



ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม และรอยพิมพ์โครมาโตกราฟิกของสารสกัดสมุนไพรตำรับยาปายหูเขียนตาน

Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and Chromatographic Fingerprints of the Herbal Extracts of Baihu Xiantan

ศรমন สุทิน¹ ชัชวาลย์ ช่างทำ^{1*} กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ¹ สุรีย์พร หอมวิเศษวงศา¹ เสาวลักษณ์ มีศิลป์²
และ ชาญชัย สาดแสงจันทร์³

Soramon Sutin¹, Chatchawan Changtam^{1*}, Kittipat Sopitthummakhun¹,

Sureeporn Homvisasevongsa¹, Saowaluck Meesin² and Charnchai Sadsangchan³

¹สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ 10540

²คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ 10540

³คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ 10540

¹Division of Physical Science, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakarn, 10540, Thailand

²Faculty of Chinese Medicine, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakarn, 10540, Thailand

³Faculty of Pharmacy, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakarn, 10540, Thailand

บทคัดย่อ

ตำรับยาปายหูเขียนตาน เป็นตำรับยาสมุนไพรจีน มีสรรพคุณเสริมพลังลมปราณ เสริมปอด และม้าม ให้แข็งแรง บำรุงอิน มีสมุนไพรรวม 12 ชนิด มีการพัฒนายานี้ใช้เฉพาะในหัวเฉียวสหคลินิก คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติเท่านั้น ซึ่งยังไม่ได้มีการศึกษาวิจัยที่มากพอ จึงนำยานี้มาศึกษาวิจัยเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงการหาปริมาณฟีนอลิกรวม หารอยพิมพ์โครมาโตกราฟิกและปริมาณสารสำคัญบางชนิดในตำรับ โดยนำสมุนไพรในตำรับยาปายหูเขียนตานแต่ละชนิด มาสกัดด้วยตัวทำละลายสามชนิดคือ เอทิลเอซิเทต เอทานอล และน้ำ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS หาปริมาณรวมฟีนอลิก และหารอยพิมพ์โครมาโตกราฟิกด้วย TLC และหาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPTLC ผลงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากชั้นเอทิลเอซิเทต เอทานอล และน้ำ พบสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดด้วยวิธี DPPH คือ กานเฒ่า เหลียนเฉียว และจินหยินฮัว มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 49.60 ± 3.32 39.39 ± 0.94 และ 33.33 ± 2.10 µg/ml ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากวิธี ABTS พบว่าสารสกัดกานเฒ่าจากชั้นเอทิลเอซิเทตและชั้นเอทานอล มีค่าการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ที่ IC₅₀ เท่ากับ 11.87 ± 0.07 และ 30.68 ± 4.01 µg/ml ตามลำดับ ส่วนชั้นน้ำ พบว่าจินหยินฮัว มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 35.58 ± 0.41 µg/ml ส่วนสารสกัดปายหูเขียนตานชั้นเอทานอลแสดงฤทธิ์ดีที่สุดที่ค่า IC₅₀ เท่ากับ 87.98 ± 2.50 µg/ml การหาปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก พบสารสกัดเหลียนเฉียว ชั้นเอทานอลมีปริมาณมากที่สุดอยู่ที่ 90.51 ± 1.59 mg GAE per gram dry

*Corresponding Author, E-mail: chatchawan.ch11@gmail.com, chatchawan.cha@hcu.ac.th

Received date: 25 June 2025 | Revised date: 17 August 2025 | Accepted date: 22 September 2025

doi: 10.14456/kkuscij.2026.4

material สารสกัดชั้นเอทิลเอซิเตตและเอทานอลนำมาทำรอยพิมพ์ด้วย TLC และหาปริมาณสารสำคัญบางชนิดในสมุนไพรหลักของตำรับ พบสาร Astragaloside II จากสารสกัดหวงฉี ที่ชั้นเอทิลเอซิเตตและเอทานอลร้อยละ 0.87 และ 2.95 และสาร 5-Hydroxymethylfurfural จากสารสกัดตั้งเซียม พบในชั้นเอทิลเอซิเตตและเอทานอลใกล้เคียงกันคือ ร้อยละ 1.58 และ 1.65 ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นส่วนหนึ่งในการกำหนดมาตรฐานยาและการขอขึ้นทะเบียนตำรับและพัฒนาการรักษาโรคต่อไป

ABSTRACT

The Baihu Xiandan formulation is a traditional Chinese herbal medicine renowned for its properties in tonifying Qi, strengthening the lungs and spleen, and nourishing Yin. This complex formula comprises 12 distinct medicinal herbs. Currently, the development and application of this specific formulation are exclusive to Hua Chiew Polyclinic, part of the Faculty of Traditional Chinese Medicine at Huachiew Chalermprakiet University. It is important to note that the formula lacks sufficient comprehensive research and study to date. This study aims to investigate the formula's antioxidant activity, determine the total phenolic content, establish a chromatographic fingerprint, and quantify certain key compounds within the formula. To achieve this, each individual herb in the Bai Hu Xian Dan formula was extracted using three different solvents: ethyl acetate, ethanol, and water. Subsequently, the obtained extracts were subjected to antioxidant activity testing using both the DPPH and ABTS assays. The total phenolic content was also quantified. Furthermore, TLC fingerprinting was performed, and specific marker compounds were quantified using HPTLC technique. Results indicates that among the ethyl acetate, ethanol, and aqueous extracts, the following showed the best antioxidant activity using the DPPH method: Gancao, Lianqiao, and Jinyinhua. Their respective IC_{50} values were $49.60 \pm 3.32 \mu\text{g/ml}$, $39.39 \pm 0.94 \mu\text{g/ml}$, and $33.33 \pm 2.10 \mu\text{g/ml}$. For ABTS antioxidant activity, the ethyl acetate and ethanol extracts of Gancao demonstrated the strongest activity, with IC_{50} values of $11.87 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ and $30.68 \pm 4.01 \mu\text{g/ml}$, respectively. Among the aqueous extracts, Jinyinhua showed the best antioxidant activity, with an IC_{50} of $35.58 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$. Furthermore, the ethanol extract of the Bai Hu Xian Dan formula itself exhibited the best overall activity, with an IC_{50} of $87.98 \pm 2.50 \mu\text{g/ml}$. Regarding total phenolic content, the ethanol extract of Lianqiao had the highest amount, measuring $90.51 \pm 1.59 \text{ mg GAE per gram of dry material}$. Ethyl acetate and ethanol extracts underwent TLC fingerprinting and quantification of chemical marker from the primary herbs in the formulation. Astragaloside II was found in the Huangqi extract at concentrations of 0.87% in the ethyl acetate fraction and 2.95% in the ethanol fraction. Additionally, 5-Hydroxymethylfurfural was found in the Dangsam extracts, with similar percentages in the ethyl acetate and ethanol extracts, at 1.58% and 1.65%, respectively. These data can be utilized as a basis for establishing quality control standards, supporting drug registration, and facilitating the further development of therapeutic agents.

คำสำคัญ:ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม รอยพิมพ์โครมาโตกราฟี ยวี่ผิงเฟิงसान ตำรับยาป่ายหูเซียนตาน

Keywords: Antioxidant Activity, Total Phenolic Content, Chromatographic Fingerprints, Yu Ping Feng San, Baihu Xiandan

บทนำ

ยาป้ายหูเขียนตาน แปลเป็นไทยว่า แคปซูลเสือขาว เป็นยาสมุนไพรจีนที่พัฒนามาจาก ยาในตำรับ “ยี่ฉิงเฟิงसान” ซึ่งเป็นยาในตำรับสมุนไพรจีนที่มีการใช้มานานกว่า 2,000 ปี โดยมีตัวยา สามชนิดคือ หวงฉี ป้ายจู และฝางเฟิง วิธีใช้โดยการบดเป็นผง รับประทานกับน้ำอุ่น หรือใช้เป็นยาต้ม มีสรรพคุณ คือ ใช้รักษาผู้ที่ร่างกายอ่อนแอ ภูมิคุ้มกันต่ำ เป็นหวัดง่าย แพ้อากาศ หน้าซิดขาว ลื่นซิดมีฝ้าขาว (กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, 2554) ในปี พ.ศ. 2562 เกิดโรคโควิด-19 คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จึงได้นำตำรับนี้มาพัฒนาเนื่องจากตำรับเดิมตัวยาไม่สามารถต้านเชื้อไวรัสโคโรนาได้ จึงเพิ่มสมุนไพรอีก 9 ชนิด คือ ตั่งเซียม ไทจีเซิน หานาซาเซิน จินหยินฮัว เหลียนเซียว ชูเย่ ฮัวเซียง เสินฉู่ และกานฉ่าว รวม 12 ชนิด และผลิตเป็นยาแคปซูล มีสรรพคุณ คือ เสริมพลังลมปราณ เสริมปอดและม้ามให้แข็งแรง บำรุงยีน เสริมสร้างธาตุน้ำ ขับลมและพิษร้อน และจำหน่ายให้กับผู้ป่วยในคลินิกการแพทย์แผนจีน แต่ยาตำรับใหม่นี้ยังไม่ได้มีการจำหน่ายทั่วไป เนื่องจากยังไม่ได้มีการศึกษาในด้านต่าง ๆ ทั้งด้านฤทธิ์ทางชีวภาพ มาตรฐานของยาและสารสำคัญ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งที่เป็นปัจจัยก่อโรค และการทำรอยพิมพ์โครมาโตกราฟี รวมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสมุนไพรบางชนิดเพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการผลิตต่อไป

สมุนไพรในตำรับยาป้ายหูเขียนตาน ประกอบด้วยสมุนไพรจีนทั้งหมด 12 ชนิด แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามสัดส่วนที่ใช้ คือ กลุ่มที่ 1 มี 3 ชนิด ๆ ละ 11% (รวม 33%) ได้แก่ หวงฉี (*Astragalus membranaceus* Fisch. ex Bunge) ใช้ส่วนรากแห้ง มีรสหวาน ช่วยบำรุงซี่ ระวังเหงื่อ ขับปัสสาวะ ลดอาการบวม และพบว่ามียฤทธิ์ในการรักษาและป้องกันโรคโควิด-19 (Law et al., 2020) มีสารสำคัญหลายชนิด เช่น Astragaloside II Astragaloside III และ Astragaloside IV แสดงฤทธิ์ในการต้านไวรัสไข้เลือดออก (Indu et al., 2021) ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Huang et al., 2013) ไทจีเซิน (*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax) ใช้รากแห้ง มีรสขมเล็กน้อย มีฤทธิ์เป็นกลาง และออกฤทธิ์ต่อเส้นลมปราณม้ามและปอดเป็นหลัก (Pan et al., 2021) มีสารออกฤทธิ์มากกว่า 289 ชนิด เช่น ไซคลิกเปปไทด์ โพลีแซคคาไรด์ ซาโปนิน อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ นิวคลีโอไซด์ และกรดอะมิโน เป็นต้น (Lei et al., 2025) เสินฉู่ หรือเรียกว่า Medicated Leaven (ML จัดเป็น "หัวเชื้อยา" (medicated leaven) ที่ผลิตขึ้นผ่านกระบวนการหมักแบ่งสาหร่ายหรือรำข้าวสาลีร่วมกับสมุนไพรและจุลินทรีย์เฉพาะ มีสรรพคุณส่งเสริมสุขภาพทางเดินอาหาร โดยเชื่อว่าช่วยเสริมสร้างการทำงานของม้ามและกระเพาะอาหาร กระตุ้นการย่อยอาหาร และบรรเทาอาการไม่สบายต่าง ๆ เช่น ท้องอืดอาหารไม่ย่อย (Fu et al., 2020) มีสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน กรดอินทรีย์ ลิพิด กรดอะมิโนและอนุพันธ์ ลิกแนนและคูมาริน นิวคลีโอไซด์และอนุพันธ์ และอัลคาลอยด์ (Jung et al., 2024)

กลุ่มที่ 2 มี 8 ชนิด ๆ ละ 7.70% (รวม 61.6%) ได้แก่ เหลียนเฉียว หรือ เหลียนเซียว (*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl) ส่วนที่ใช้คือ ผลแห้ง มีฤทธิ์เย็นเล็กน้อย สรรพคุณลดร้อนจัดพิษ ลดบวมสลายก้อน กระจายขับลมร้อน ใช้ในการรักษาฝีอักเสบต่าง ๆ สารประกอบทางเคมีหลักหลายกลุ่ม ได้แก่ ลิกแนน ฟีนอลเอทานอยด์ไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ สารประกอบเหล่านี้มีส่วนสำคัญในฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่พบทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง (Peng et al., 2020) ฝางเฟิง (*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk) ใช้ส่วน ราก มีรสเผ็ดและหวาน อุ่นเล็กน้อย เข้าสู่เส้นลมปราณกระเพาะปัสสาวะ ตับ และม้าม กระจายลมเพื่อขับกระจายสาเหตุก่อโรคที่ส่วนนอกของร่างกาย ใช้ในการรักษาอาการปวดข้อและภูมิแพ้ โดยมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ด้านการอักเสบ แก้ปวด ปรับภูมิคุ้มกัน และต้านอนุมูลอิสระ สารสำคัญหลักที่พบ ได้แก่ ฟูโรคูมาริน ฟูราโนโครโมน โพลีอะเซทิลิน ไฮเปอร์โรไซด์ เทอร์ปีนโครโมน คูมาริน และฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะโพลีแซคคาไรด์ (A-SPS) และสารกลุ่มโครโมนและคูมารินถูกเน้นว่าเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ (Yang et al., 2020) ตั่งเซียม (*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf) ใช้ส่วนราก มีรสหวาน ฤทธิ์กลาง ออกฤทธิ์ตามเส้นลมปราณของปอด และม้าม ช่วยบำรุงกำลัง บำรุงเลือด แก้อาการอ่อนเพลีย และเสริมการทำงานของปอด มีสารสำคัญที่มีผลต่อการป้องกันและรักษาโรคโควิด-19 เช่น *Codonopsis pilosula*

polysaccharide (Zhang *et al.*, 2021) และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Yani *et al.*, 2025) และสารกลุ่มอื่นอีกจำนวนมาก ได้แก่ Saccharides Polyacetylenes Polyenes Flavonoids Alkaloids Lignans Terpenoids และ Organic acids (Chu *et al.*, 2024) ชูเย่ (*Perilla frutescens* (L.) Britton) ใช้ใบแห้ง มีฤทธิ์อุ่น เข้าสู่เส้นลมปราณปอด และม้าม สรรพคุณ ขจัดลมเย็น รักษาอาการที่มีสาเหตุจากสิ่งก่อโรคนอก ช่วยเสริมการไหลเวียนของเลือดไปด้วยสารพฤกษเคมีที่หลากหลาย และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน ไตรเทอร์พีน ไฟโตสเตอรอล กรดไขมัน และโทโคฟีรอล (Adam *et al.*, 2024) หนานซาเซิน (*Adenophora triphylla* (Thunb.) A.DC.) ใช้รากแห้ง มีรสหวาน ฤทธิ์ เย็นเล็กน้อย เข้าสู่เส้นลมปราณปอด และกระเพาะอาหาร ช่วยเสริมสร้างอิน ลดความร้อนในปอดและกระเพาะอาหาร สลาย เสมหะ และบำรุงซี่ มีสารพฤกษเคมีหลากหลายชนิดที่เชื่อว่ามีส่วนช่วยในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่าง ๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ ไตรเทอร์พีนอยด์ Cycloartenyl acetate β -sitosterol Taraxerone Lupenone Octacosanoic acid และ Praeruptorin A (Yan *et al.*, 2025) ป้ายจู (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) ส่วนที่ใช้คือลำต้นใต้ดินแห้ง รส หวานปนขม ฤทธิ์อุ่น เข้าสู่เส้นลมปราณม้าม และกระเพาะอาหาร ช่วยเสริมการทำงานของม้ามและบำรุงซี่ มีสารสำคัญหลาย ชนิดที่แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่าง ๆ (Cheng *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2012) อั่วเซียง (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) ใช้ส่วนเหนือดินที่แห้ง มีรสขม ฤทธิ์อุ่นเล็กน้อย ช่วยแก้ไอ เจียน และมีสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหย แสดงฤทธิ์ทาง ชีวภาพต่าง ๆ มากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ฆ่าแมลง เป็นต้น (Galovičová *et al.*, 2022) และสารกลุ่ม โพลีแซคคาไรด์ แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Zhao *et al.*, 2022) จินหยินฮัว (*Lonicera japonica* Thunb.) ใช้ ดอกตูม มีรสหวาน ฤทธิ์เย็น มีสรรพคุณลดร้อน ขจัดพิษ กระจายขับลมร้อน ใช้ในการรักษาฝีอักเสบต่าง ๆ พบสารสำคัญ หลายชนิดแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและไวรัส เช่น Essential oils Flavones Saponins Iridoids Chlorogenic acid Luteolin และ Luteolin-7-O-glucoside (Hsua *et al.*, 2016)

กลุ่มที่ 3 มี 1 ชนิดอยู่ในตำรับ 3.80% คือ กานฉാവ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC.) ใช้รากและลำต้นใต้ ดิน มีรสหวาน ฤทธิ์สมดุล เข้าสู่เส้นลมปราณปอด หัวใจ ม้าม และกระเพาะอาหาร ช่วยบำรุงลมปราณ เสริมความแข็งแรง ของม้าม ขับเสมหะ แก้ไอ แก้ปวด มีรายงานว่ามีสารสำคัญที่พบในรากของกานฉാവ กลุ่มฟลาโวนอยด์หลายชนิดแสดง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบได้ดี เช่น 5-(1,1-Dimethylallyl)-3,4,40-trihydroxy-2-methoxychalcone Licochalcone B Licochalcone A Echinatin Glycoumarin และ Glyurallin B (Nomura *et al.*, 2002)

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสารที่ทำลายสารชีวโมเลกุล ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด โปรตีน ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เซลล์เมมเบรน เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เป็นต้น ทำให้เซลล์ต่าง ๆ เหล่านี้ตาย หรือเสียหาย จึงก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ตามมา เช่น โรคชรา (aging) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคมะเร็ง (cancer) โรคภูมิแพ้ (allergies) โรคข้ออักเสบ (arthritis) ความผิดปกติของปอดและ ระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เป็นต้น (บุหรณ์, 2556) งานวิจัยนี้ จึงสนใจนำสารสกัดตำรับยาป้ายจูเขียนตานแต่ละชนิดและตำรับรวมมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นข้อมูลในการ พัฒนายาต่อไป ถึงแม้ว่าจะมีงานวิจัยสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิดมาบ้างแล้ว แต่เมื่อนำสมุนไพรแต่ละชนิดมาทำเป็นตำรับ ยาป้ายจูเขียนตาน ยังไม่ได้มีการศึกษาวิจัยในด้านฤทธิ์ทางชีวภาพ และการหาปริมาณสารสำคัญเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ในการ ตั้งมาตรฐานยา และการพัฒนายาต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมและการสกัดสมุนไพร

สมุนไพรเดี่ยวและตำรับทั้ง 13 ชนิด ซื้อจากบริษัท กุญแจอิมพอร์ต จำกัด กรุงเทพมหานคร และส่งไปผลิตเป็นผงละเอียดและอัดเป็นแคปซูลที่บริษัท หมอนพพร กรุ๊ป จำกัด นำสมุนไพรทั้ง 13 ชนิด มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ เอทานอล และน้ำ การสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และเอทานอล เริ่มจากนำสมุนไพรแต่ละชนิดมาชั่งและเติมตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:10 แช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองแยกกากและนำส่วนสารสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ได้สารสกัดหยาบเข้มข้นซึ่งหาปริมาณน้ำหนักและเก็บในตู้เย็น การสกัดสมุนไพรด้วยน้ำ ใช้สมุนไพร 1 ส่วนเติมน้ำ 2 ส่วน และต้มน้ำจนน้ำลดลงครึ่งหนึ่งแล้วต้มต่อด้วยไฟอ่อนอีก 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนสารละลาย แล้วนำมารองอีกครั้งได้สารสกัดเข้มข้น นำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C และนำไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dried) ซึ่งปริมาณส่วนสกัดหยาบที่ได้ และเก็บในตู้เย็นเพื่อเตรียมทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS scavenging assay ของสารสกัดปาล์มยูเซียนทานที่สกัดในตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ เอทานอล และน้ำ เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT) โดยดัดแปลงมาจากวิธีของกิตติพัฒน์และคณะ (2563)

วิธีการวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH scavenging assay

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของสารสกัดสมุนไพรที่เตรียมจากการแช่ในตัวทำละลาย เอทิลแอลกอฮอล์ เอทานอล และน้ำด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ละลายใน DMSO (dimethyl sulfoxide) หรือ absolute ethanol ทั้งนี้ขึ้นกับความสามารถในการละลายของสารสกัดแต่ละชนิด การเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เพื่อวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระนั้น เตรียมสารละลายความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ละลายใน absolute ethanol โดยจะต้องเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้ง ก่อนที่จะทำการทดสอบ สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT ที่ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าการต้านอนุมูลอิสระกับสารสกัดสมุนไพร เตรียมด้วยการละลายใน absolute ethanol ใช้ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BHT ในช่วง 2 - 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบด้วยวิธีนี้จะบ่งบ่งปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับสารสกัดสมุนไพร ใช้ช่วงความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรระหว่าง 0.0125 - 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เพื่อคำนวณค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS scavenging assay

วิธีการเตรียมสารสกัดสมุนไพร ใช้วิธีเดียวกับที่ใช้วัดค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH scavenging assay วิธีการเตรียมสารละลาย ABTS สำหรับทดสอบค่าการต้านอนุมูลอิสระ เตรียมด้วยการผสมสารละลาย 10 mM ABTS และ 2.45 mM potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) สัดส่วน 1:0.5 โดยปริมาตร บ่มทิ้งไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS เพื่อนำไปทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรต่อไป สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT ใช้ค่าความเข้มข้นในช่วง 5 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบด้วยวิธีนี้จะบ่งบ่งปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย ABTS กับสารสกัดสมุนไพร ใช้ช่วงความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรระหว่าง 0.0125 - 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เพื่อคำนวณค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการคำนวณค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วยการคำนวณเป็นค่าร้อยละของการยับยั้ง (percent inhibition)

การคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ตามสมการที่ 1

$$\% \text{ inhibition} = \{ \text{Abs}_{\text{Cont.}} - \text{Abs}_{\text{Sample}} / \text{Abs}_{\text{Cont.}} \} \times 100 \quad (1)$$

กำหนดให้ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) ตามสมการที่ 1 โดยค่า “Abs_{Cont.}” คือ ค่าการดูดกลืนคลีนแสงของตัวแปรควบคุมที่ไม่ได้เติมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (BHT) หรือ สารสกัดสมุนไพรมะนาวความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร สำหรับวิธีทดสอบด้วย DPPH หรือ 734 นาโนเมตร สำหรับวิธีทดสอบ ABTS และ “Abs_{Sample}” คือ ค่าการดูดกลืนคลีนแสงของปฏิกิริยาทดสอบที่เติมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (BHT) หรือ สารสกัดสมุนไพรมะนาวความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร สำหรับวิธีทดสอบด้วย DPPH หรือ 734 นาโนเมตร สำหรับวิธีทดสอบ ABTS การรายงานค่าการต้านทานอนุมูลอิสระ จะรายงานโดยใช้ค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ผลการยับยั้งให้อนุมูลอิสระเหลืออยู่ร้อยละ 50 (inhibitory concentration at 50% หรือ IC₅₀)

3. การหาปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก โดยดัดแปลงมาจากวิธีของกิตติพัฒน์และคณะ (2563)

การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic contents, TPC) ของสารสกัดสมุนไพรมะนาวซึ่งสกัดในตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตต เอทานอล และน้ำ ด้วยวิธีการใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu และคำนวณหาค่า TPC ด้วยการสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิกของ gallic acid ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานฟีนอลิกสำหรับการวัดหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดสมุนไพรมะนาวที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน สารละลาย Folin-Ciocalteu บ่มทำปฏิกิริยากับสารทดสอบ (สารมาตรฐาน gallic acid หรือ สารสกัดสมุนไพรมะนาว) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม 1 M Sodium carbonate (Na₂CO₃) และ ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 มล. ด้วยการเติม methanol บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifugation โดยใช้ความเร็วที่ 6,000 rpm 5 นาที แยกส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร การรายงานค่าปริมาณรวมของสารฟีนอลิก รายงานงานหน่วยวัด mg GAE per gram dry material (DM คือ น้ำหนักแห้งของสมุนไพรมะนาวที่นำไปสกัดในตัวทำละลาย)

4. การหารอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดสมุนไพรมะนาวด้วยยาป้ายหูเขียนตาน

ซึ่งส่วนสกัดชั้นเอทานอลและเอทิลอะซิเตต ทั้ง 13 ชนิด ปริมาณชนิดละ 5 - 10 mg ละลายด้วยเมทานอลปริมาณ 0.5 ml โหลดสารแต่ละชนิดลงบนแผ่น TLC silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 10 cm ที่ความเข้มข้น 4 µl โดยใช้ไมโครปิเปต จากนั้นนำแผ่น TLC ไปส่องในแหล่งที่บรรจุตัวทำละลาย CH₂Cl₂:CH₃OH (30:3) นำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้ UV cabinet ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm บันทึกภาพและสเปกตรัมด้วย Anisaldehyde-H₂SO₄ ให้ความร้อนที่ 100°C เป็นเวลา 1 นาที บันทึกภาพและหา R_f

5. หาปริมาณสารบ่งชี้ (chemical marker) 5-Hydroxymethylfurfural ในสมุนไพรมะนาวตั้งเข็ม และ Astragaloside II ในสมุนไพรมะนาวและยาป้ายหูเขียนตาน ด้วยเทคนิค HPTLC

คัดเลือกสารสกัดบางชนิดที่ตรวจพบสารสำคัญที่ชัดเจนมาหาปริมาณ โดยใช้สมุนไพรมะนาวหลักหนึ่งชนิดคือหวงฉี เนื่องจาก มีรายงานว่าสารในกลุ่ม Astragaloside ที่อยู่ในสมุนไพรมะนาวหวงฉี มีฤทธิ์ในการรักษาและป้องกันโรคโควิด-19 (Law *et al.*, 2020) รวมถึงฤทธิ์ในการต้านไวรัสไข้เลือดออกด้วย (Indu *et al.*, 2021) และเลือกสมุนไพรมะนาวอีกหนึ่งชนิดคือตั้งเข็ม เนื่องจากสารนี้สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต้านไวรัส โดยเพิ่มระดับ IFN-β ในซีรัม และลดอัตราการเจ็บป่วยและปริมาณไวรัสได้ ซึ่งจากผลการวิจัยระบุว่าสาร HF ไม่เพียงแต่สามารถกระตุ้นการผลิต IFN ประเภท I เท่านั้น แต่ยังสามารถเพิ่มการส่งสัญญาณ IFN-JAK/STAT ได้อีกด้วย ซึ่งนำไปสู่ กลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบใหม่เพื่อต่อต้านการติดเชื้อไวรัส (Zou *et al.*, 2021) จึงเป็นสารที่น่าสนใจนำมาหาปริมาณเป็นสารบ่งชี้ (chemical marker) ในตำรับ โดยซึ่งสารสกัดหวงฉีในชั้นเอทานอล (6A) ปริมาณ 24.9 mg และชั้นเอทิลอะซิเตต (6B) ปริมาณ 24.8 mg สารสกัดยาป้ายหูเขียนตานในชั้นเอทานอล (13A) ปริมาณ 101.4 mg ชั้นเอทิลอะซิเตต (13B) ปริมาณ 100.2 mg นำสารสกัดแต่ละชนิดละลายด้วยเมทานอล 0.5 ml เตรียมสารละลายมาตรฐาน Astragaloside II (≥92%, Sigma Aldrich, China) ความเข้มข้น 1.2 mg ละลายด้วยเมทานอล 0.5 ml และ 5-Hydroxymethylfurfural (98%, Thermo scientific, China) 2 mg ละลายด้วยเมทานอล 1 ml โหลดสารแต่ละชนิดลงบนแผ่น TLC silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 20 cm ที่ความเข้มข้น 4 - 24 µl ด้วยเครื่อง Linomat-5(CAMAG,

Switzerland) จากนั้นนำแผ่น TLC ใส่ลงในแท่ง (TLC chamber) ที่บรรจุตัวทำละลาย $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (30:3.5:3) และ $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (30:1.5) ตรวจวิเคราะห์ปริมาณโดยมีสารมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ วิเคราะห์ปริมาณสารโดยการตรวจวัดความหนาแน่นของสารด้วยเครื่องตรวจวัด CAMAG TLC Scanner-3 ในรูปแบบการสะท้อนและการดูดกลืน (Reflectance absorbance mode) ที่ความยาวคลื่น 219 254 และ 366 nm บันทึกภาพ และสแกนที่ตำแหน่ง Rf ที่เหมาะสม โดยใช้หลอดดิวทีเรียม (Deuterium lamp) และหลอดฮาโลเจน-ทังสเตน (Halogen-Tungsten lamp) เป็นแหล่งกำเนิดรังสี และสเปรย์ด้วย Anisaldehyde- H_2SO_4 ให้ความร้อนที่ 100°C เป็นเวลา 1 นาที บันทึกภาพ วิเคราะห์ปริมาณสารโดยประเมินลักษณะ โคโรนาโตแกรมที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ค่า Rf เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิง พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ที่วิเคราะห์บนแผ่นเดียวกันกับสารละลายของสารสกัด ได้เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสมการ $y = \text{slope}(x) + \text{intercept}$ แล้วคำนวณหาปริมาณของสารสำคัญ โดยโปรแกรม winCATS 1.4.4 software

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การสกัดสมุนไพร

จากการนำสมุนไพรในตำรับปายหูเขียนตานจำนวน 13 ตัวอย่างมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดได้ส่วนสกัดหยาดชั้น เอทิลเอซิเตต เอทานอล และน้ำร้อยละ 0.74 - 7.79 3.70 - 21.93 และ 5.32 - 59.94 ตามลำดับ โดยสารสกัดน้ำได้ปริมาณส่วนสกัดสูงที่สุดรองลงมาคือชั้นเอทานอลและเอทิลเอซิเตต ยกเว้นเหลียงเฉียวพบปริมาณสารสกัดมากในชั้นเอทานอล ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดสมุนไพรในตำรับปายหูเขียนตาน ในชั้นเอทิลเอซิเตต เอทานอล และน้ำ

ลำดับ	สารสกัด	ร้อยละผลผลิตของสารสกัด (% yield)		
		ชั้นเอทิลเอซิเตต (EtOAc)	ชั้นเอทานอล (EtOH)	ชั้นน้ำ (H_2O)
1	เหลียงเฉียว (FS)	7.79	12.09	10.03
2	ฝางเพิง (SD)	7.42	17.11	28.34
3	ตังเซียม (CP)	3.74	21.93	59.94
4	ไต่จีเซิน (PH)	0.74	5.24	9.67
5	ซูเย่ (PF)	2.33	3.70	5.45
6	หวงฉี (AM)	2.08	9.46	19.96
7	เลินฉู่ (ML)	2.47	5.78	23.01
8	กานฉ่าว (GU)	3.79	7.77	37.42
9	หนานซาเซิน(AT)	2.00	3.71	57.16
10	ปายจู (AMK)	1.28	7.32	55.29
11	ฮั่วเซียง (PT)	3.51	4.69	5.32
12	จินหยินฮั่ว (LJ)	5.88	14.44	20.45
13	ปายหูเขียนตาน (SK)	3.79	9.11	46.34

2. ผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากตำรับปายหูเขียนตาน เมื่อพิจารณาจากค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยการเปรียบเทียบค่าทดสอบในแต่ละชั้นตัวทำละลายที่ใช้สกัด ได้แก่ เอทิลเอซิเตต (ตารางที่ 2) เอทานอล (ตารางที่ 3) และน้ำ (ตารางที่ 4) พบว่าสารสกัดที่ได้จากชั้นตัวทำละลายเอทิลเอซิเตต

สารสกัดกานฉ่ำว (GU) มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $49.60 \pm 3.32 \mu\text{g/ml}$ ส่วนของสารสกัดที่ได้จากชิ้นตัวทำละลายเอทานอล สารสกัดเหลียนเฉียว (FS) มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $39.39 \pm 0.94 \mu\text{g/ml}$ และสำหรับสารสกัดที่ได้จากชิ้นตัวทำละลายน้ำ สารสกัดจินหยินฮั่ว (LJ) มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $33.33 \pm 2.10 \mu\text{g/ml}$ ส่วนสารสกัดยาดำรับป่วยหูเซียนตาน (SK) ชิ้นเอทิลเอซิเทต เอทานอล และน้ำ แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 178.670 ± 5.763 155.59 ± 10.79 และ $277.73 \pm 19.78 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับสารสกัดในชิ้นตัวทำละลายแต่ละชนิดได้ดังนี้ สารสกัดจินหยินฮั่ว (LJ) ที่สกัดด้วยการใช้ตัวทำละลายน้ำ มีค่าการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดเหลียนเฉียว (FS) จากชิ้นเอทานอล และสารสกัดกานฉ่ำว (GU) จากชิ้นเอทิลเอซิเทตมีค่า จากผลการทดสอบดังกล่าวให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hsua *et al.* (2016) ซึ่งได้เปรียบเทียบการสกัดสมุนไพรจินหยินฮั่ว (LJ) สามวิธีคือ 1) การสกัดด้วยเอทานอล 2) การสกัดด้วยน้ำ 3) การสกัดด้วยวิธีของไหลยิ่งยวด (supercritical- CO_2 fluid extraction; SFE) พบว่าสารสกัดชิ้นน้ำแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด และพบปริมาณรวมสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ สูงที่สุด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าน้ำสามารถสกัดสารกลุ่มที่เป็นพวกมีขี้ขี้ Phenolic carboxylic acids เช่น Chlorogenic acid Secologanic acid และ Caffeic acid ออกมาได้ดี ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและด้านการออกซิเดชัน กำจัดอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายจากร่างกายทั้งในหลอดทดลอง และในร่างกายด้วย แต่ยังคงมีฤทธิ์ต่ำกว่าสารมาตรฐาน Catechin (IC_{50} $5.6 \pm 1.2 \text{ mg/ml}$) ส่วนสมุนไพรเหลียนเฉียว (FS) มีสารสำคัญคือ Forsythiaside พบได้ทุกส่วนทั้ง รากเปลือก ดอก ใบ ผลและเมล็ด ซึ่งเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี มีค่า EC_{50} ตั้งแต่ $43.05 - 364.75 \mu\text{g/ml}$ (Qu *et al.*, 2008; Jiao *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามสารสกัดทั้งหมดยังมีฤทธิ์ที่ต่ำกว่าสารมาตรฐาน BHT ที่มีค่าเท่ากับ $3.45 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$

3. ผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS^{•+}

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ของสารสกัดจากตำรับป่วยหูเซียนตาน เมื่อพิจารณาจากค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยการเปรียบเทียบค่าทดสอบในแต่ละชิ้นตัวทำละลายที่ใช้สกัด ได้แก่ เอทิลเอซิเทต (ตารางที่ 2) เอทานอล (ตารางที่ 3) และน้ำ (ตารางที่ 4) พบว่าสารสกัดที่ได้จากชิ้นตัวทำละลายเอทิลเอซิเทตและเอทานอล สารสกัดกานฉ่ำว (GU) มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $11.87 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ และ $30.68 \pm 4.01 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วนของสารสกัดที่ได้จากชิ้นตัวทำละลายน้ำ พบว่าจินหยินฮั่ว (LJ) มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $35.58 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$ ส่วนสารสกัดยาดำรับป่วยหูเซียนตาน (SK) ชิ้นเอทิลเอซิเทต เอทานอล และน้ำ แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 633.88 ± 6.89 87.98 ± 2.50 และ $195.25 \pm 0.81 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

จากผลวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fan *et al.* (2014) ได้สกัดกานฉ่ำว ด้วยเมทานอลและน้ำ (5:5; V/V) และหลังจากนั้นนำมาสกัดทำเป็น 4 ส่วน พบว่าส่วนสกัดในชิ้นเอทิลเอซิเทตและบิวทานอล แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งแบบ DPPH ABTS และ Peroxynitrite (ONOO⁻) ได้ดีที่สุด ส่วนชิ้นน้ำแสดงฤทธิ์ได้ต่ำสุด โดยเฉพาะสารสกัดในชิ้นเอทิลเอซิเทต แสดงฤทธิ์ต้าน เพอร์ออกไซด์ (ONOO⁻) ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบสารสกัดกานฉ่ำวชิ้นเอทานอลแสดงค่า IC_{50} ด้วยวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 165.18 ± 6.48 และ $7.46 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และพบปริมาณรวมฟีนอลิกเท่ากับ $111.48 \pm 0.88 \text{ mg quercetin/g}$ (Li *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามเมื่อสมุนไพรมีส่วนผสมอยู่ในรูปของตำรับป่วยหูเซียนตานแล้วพบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงทั้งสามส่วนสกัด โดยในชิ้นเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า IC_{50} ทั้ง DPPH และ ABTS เท่ากับ 155.59 ± 10.79 และ $87.98 \pm 2.50 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ อาจเนื่องด้วยในตำรับยาทางการแพทย์แผนจีนมีตัวยามากชนิดทั้งตัวยหลัก ตัวยเสริม ตัวยช่วย และมีตัวยาลดพิษของสมุนไพรตัวอื่น ๆ ด้วย เช่น ตัวยากานฉ่ำว ซึ่งเป็นตัวยาลดพิษและปรับสมดุลของตำรับ ให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยได้ผสมลงในตำรับในอัตราส่วนที่น้อยที่สุดเพียง 3.8% ของตัวยทั้งหมด

4. ผลการหาปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก

ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ในสารสกัดสมุนไพรดำรับเสือขาว จากการสกัดในตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ และน้ำ ที่ได้จากการคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (รูปที่ 1) ผลการทดสอบพบว่า ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกที่มีค่ามากเป็นลำดับที่ 1 ถึง 3 พบในชั้นตัวทำละลายเอทานอล ได้แก่ สารสกัดเหลียนเฉียว (FS) สารสกัดจินหยินฮั่ว (LJ) และสารสกัดฝางเฟิง (SD) โดยมีปริมาณเท่ากับ 90.51 ± 1.59 86.02 ± 1.22 และ 65.46 ± 1.32 mg GAE per gram dry material ตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ที่พบมากที่สุดสำหรับชั้นตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำ คือ สารสกัดกานเฉ่า (GU) และฝางเฟิง (SD) มีค่าเท่ากับ 39.25 ± 1.52 และ 1.68 ± 0.02 mg GAE per gram dry material ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจพบในแต่ละชั้นสารสกัดของสมุนไพรดำรับเสือขาว ให้ผลที่สอดคล้องกับการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ส่วนสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ของสารสกัดกานเฉ่า (GU) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด 39.25 ± 1.52 mg GAE per gram dry material แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุด IC_{50} เท่ากับ 49.597 ± 3.322 $\mu\text{g/ml}$ ในชั้นเอทานอลสารสกัดเหลียนเฉียว (FS) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด 90.51 ± 1.59 mg GAE per gram dry material แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุด IC_{50} เท่ากับ 39.39 ± 0.94 $\mu\text{g/ml}$ เป็นต้น ส่วนสารสกัดดำรับเสือขาวพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในชั้นเอทานอลมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดในชั้นเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำ คือ 28.53 ± 2.09 mg GAE per gram dry material ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มากที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 155.59 ± 10.79 และ 87.98 ± 2.50 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ดังนั้นจึงอาจใช้ปริมาณรวมฟีนอลิกเป็นเกณฑ์ในการทำมาตรฐานยาป่ายหูเซียนตานต่อไปได้

ตารางที่ 2 ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS*[†] ร้อยละ 50 (Inhibitory concentration at 50% IC_{50}) และปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ในชั้นตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์

ลำดับ	สมุนไพร	สารสกัดในชั้นตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์		
		IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) DPPH assay	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ABTS assay	TPC* (mg GAE per gram dry weight)
1	เหลียนเฉียว (FS)	663.08 ± 85.53	N/A	N/A
2	ฝางเฟิง (SD)	N/A	N/A	8.50 ± 0.23
3	ตั้งเซียม (CP)	588.42 ± 62.38	191.53 ± 0.41	5.60 ± 0.05
4	ไท่จีเซิน (PH)	289.70 ± 62.51	48.21 ± 3.90	1.16 ± 0.05
5	ซูเย่ (PF)	N/A	N/A	N/A
6	หวงฉี (AM)	$1,093.15 \pm 24.15$	198.75 ± 8.48	1.68 ± 0.02
7	เสินฉู่ (ML)	807.81 ± 9.15	87.07 ± 2.60	2.53 ± 0.07
8	กานเฉ่า (GU)	49.60 ± 3.32	11.87 ± 0.70	39.25 ± 1.52
9	หนานซาเซิน (AT)	N/A	N/A	N/A
10	ปายจู (AMK)	N/A	73.36 ± 3.18	3.68 ± 0.13
11	ฮั่วเซียง (PT)	N/A	N/A	N/A
12	จินหยินฮั่ว (LJ)	164.83 ± 10.71	111.58 ± 0.73	23.68 ± 0.91
13	ปายหูเซียนตาน (SK)	178.67 ± 5.76	633.88 ± 6.89	5.26 ± 0.05
	BHT	3.45 ± 0.26	4.11 ± 0.05	

หมายเหตุ: ค่า IC_{50} และ mg GAE per gram DM แสดงค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำสามครั้ง $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

TPC* - Total phenolic content ปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก แสดงในหน่วย mg GAE per gram dry material

N/A - มีปัญหาเรื่องการละลายใน DMSO หรือ เอทานอล ไม่สามารถวัดค่าได้เนื่องจากตกตะกอน หรือมีการแยกชั้นของสารสกัด

ตารางที่ 3 ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS^{•+} ร้อยละ 50 (Inhibitory concentration at 50% IC₅₀) และปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ในชั้นตัวทำละลายเอทานอล

ลำดับ	สมุนไพร	สารสกัดในชั้นตัวทำละลายเอทานอล		
		IC ₅₀ (µg/ml) DPPH assay	IC ₅₀ (µg/ml) ABTS assay	TPC* (mg GAE per gram dry weight)
1	เหลียงเหี่ยว (FS)	39.39 ± 0.94	47.16 ± 0.24	90.51 ± 1.59
2	ฝางเพิง (SD)	N/A	316.49 ± 15.57	65.46 ± 1.32
3	ตั่งเซียม (CP)	N/A	164.34 ± 4.27	22.84 ± 0.39
4	ไต่จีเซิน (PH)	727.13 ± 10.65	387.64 ± 20.31	0.22 ± 0.01
5	ซูเย่ (PF)	226.93 ± 75.64	87.62 ± 2.18	15.41 ± 1.29
6	หวงฉี (AM)	931.45 ± 218.65	518.28 ± 67.82	7.42 ± 0.29
7	เลินฉู่ (ML)	360.09 ± 12.26	123.08 ± 1.63	4.32 ± 0.04
8	กานฉ่าว (GU)	72.70 ± 1.23	30.68 ± 4.01	29.62 ± 0.45
9	หนานซาเซิน (AT)	N/A	631.61 ± 18.79	1.21 ± 0.03
10	ปายจู (AMK)	391.81 ± 19.30	90.97 ± 1.72	2.27 ± 0.05
11	ฮั่วเซียง (PT)	170.43 ± 15.90	148.00 ± 3.35	5.16 ± 0.05
12	จินหยินฮั่ว (LJ)	149.65 ± 40.12	36.98 ± 0.54	86.02 ± 1.22
13	ปายหูเซียนตาน (SK)	155.59 ± 10.79	87.98 ± 2.50	28.53 ± 2.09
	BHT	3.45 ± 0.26	4.11 ± 0.05	

หมายเหตุ: ค่า IC₅₀ และ mg GAE per gram DM แสดงค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำสามครั้ง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

TPC* - Total phenolic content ปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก แสดงในหน่วย mg GAE per gram dry material

N/A - มีปัญหาเรื่องการละลายใน DMSO หรือ เอทานอล ไม่สามารถวัดค่าได้เนื่องจากตกตะกอน หรือมีการแยกชั้นของสารสกัด

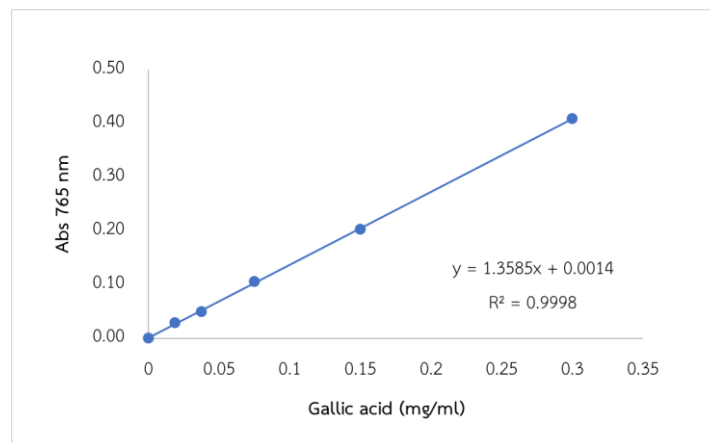
ตารางที่ 4 ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS^{•+} ร้อยละ 50 (Inhibitory concentration at 50% IC₅₀) และปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ในชั้นตัวทำละลายน้ำ

ลำดับ	สมุนไพร	สารสกัดในชั้นตัวทำละลายน้ำ		
		IC ₅₀ (µg /ml) DPPH assay	IC ₅₀ (µg /ml) ABTS assay	TPC* (mg GAE per gram dry weight)
1	เหลียงเหี่ยว (FS)	57.85 ± 4.52	42.02 ± 0.47	0.55 ± 0.01
2	ฝางเพิง (SD)	423.99 ± 8.53	336.66 ± 1.37	1.68 ± 0.02
3	ตั่งเซียม (CP)	528.13 ± 30.89	577.61 ± 2.46	0.21 ± 0.01
4	ไต่จีเซิน (PH)	N/A	N/A	N/A
5	ซูเย่ (PF)	64.65 ± 2.28	69.63 ± 0.24	0.10 ± 0.01
6	หวงฉี (AM)	1367.86 ± 7.37	1545.10 ± 30.68	0.02 ± 0.01
7	เลินฉู่ (ML)	698.93 ± 42.84	518.78 ± 18.47	0.02 ± 0.01
8	กานฉ่าว (GU)	N/A	N/A	N/A
9	หนานซาเซิน (AT)	N/A	N/A	N/A
10	ปายจู (AMK)	917.04 ± 17.65	450.57 ± 3.95	0.09 ± 0.01
11	ฮั่วเซียง (PT)	132.25 ± 8.32	129.98 ± 1.03	0.08 ± 0.01
12	จินหยินฮั่ว (LJ)	33.33 ± 2.10	35.58 ± 0.41	0.61 ± 0.01
13	ปายหูเซียนตาน (SK)	277.73 ± 19.78	195.25 ± 0.81	0.09 ± 0.01
	BHT	3.45 ± 0.26	4.11 ± 0.05	

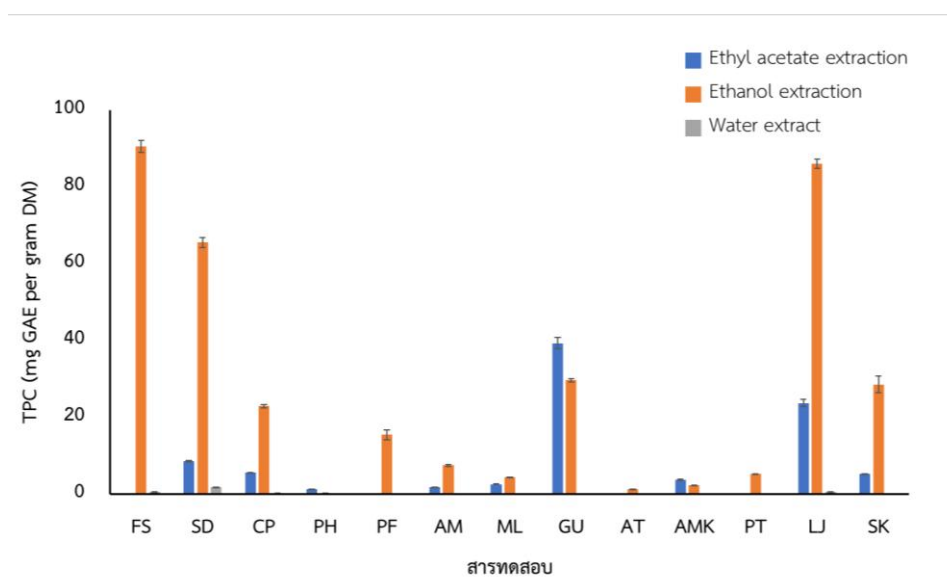
หมายเหตุ: ค่า IC₅₀ และ mg GAE per gram DM แสดงค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำสามครั้ง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

TPC* - Total phenolic content ปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก แสดงในหน่วย mg GAE per gram dry material

N/A - มีปัญหาเรื่องการละลายใน DMSO หรือ เอทานอล ไม่สามารถวัดค่าได้เนื่องจากตกตะกอน หรือมีการแยกชั้นของสารสกัด



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก สำหรับการคำนวณหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก



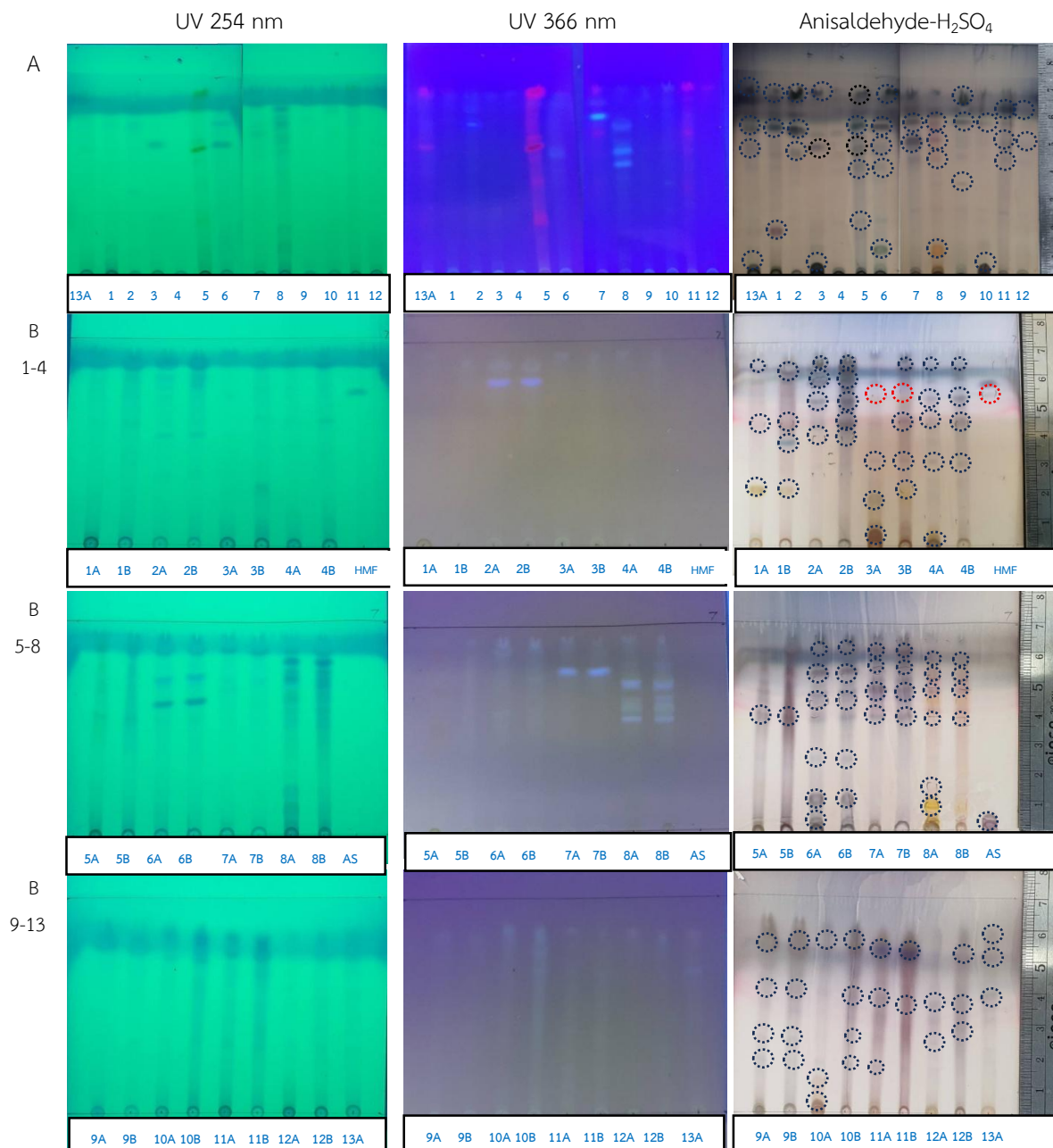
รูปที่ 2 กราฟเปรียบเทียบปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดสมุนไพรตำรับยาหูเขียนตาน ประกอบด้วย เอลิยวเคี้ยว (FS) ฝางเพิง (SD) ตังเซียม (CP) ไทจีเซิน (PH) ชูเย่ (PF) หวงฉี (AM) เสินฉู่ (ML) กานฉ่าว (GU) หนานชา เซิน(AT) ปายจู (AMK) ฮั่วเซียง (PT) จินหยินฮั่ว (LJ) และยาหูเขียนตาน (SK) ที่สกัดได้จากชั้นตัวทำละลายเอทิลเอซิเทต เอทานอล และน้ำ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) (รูปที่ 1) โดยมีการรายงานค่าเป็น Total phenolic content (TPC; mg GAE per gram DM)

5. ผลการหารอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของสมุนไพรตำรับยาหูเขียนตาน

เมื่อนำสารสกัดในชั้นเอทานอลและชั้นเอทิลเอซิเทตมาหารอยพิมพ์ด้วย TLC สารสกัดเอลิยวเคี้ยวหรือเอี้ยวเคี้ยว (FS) ในชั้นเอทานอล (1A) และชั้นเอทิลเอซิเทต (1B) โดยใช้ระบบเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (30:3) พบสารหลายชนิด เช่น ที่ค่า $R_f = 0.31$ ให้สเปกตรัมสีเขียวแกมเหลืองเมื่อป้าย Anisaldehyde- H_2SO_4 โดยในชั้นเอทิลเอซิเทตจะสามารถสกัดสารกลุ่มขั้วน้อยได้ดีกว่า จากรายงานพบสารหลายชนิดในชั้นเมทานอล เช่น Salidroside Pinoselinol monoglucoside และ Phillyrin arctiin aglycone (Wagner *et al.*, 2011) ฝางเพิงหรือฮวงฮอง (SD) พบสารในชั้นเอทานอล (2A) และเอทิลเอซิเทต (2B) พบสารหลายชนิด เช่น ที่ค่า $R_f = 0.56$ ให้ UV256 ซึ่งทั้งสองชั้นตัวทำละลายพบสารคล้ายกัน แต่กลุ่มสารที่ขั้วน้อยในชั้นเอทิลเอซิเทตพบมากกว่า จากรายงานพบสารสกัดชั้นเมทานอลเป็นสารในกลุ่ม Chromons และ Polyacetylene derivatives เช่น 3'-O-Angeloylhamaudol Ledebouriellol Divaricatol sec-O-Glucosylhamaudol

Cimifugin 5-O-Methylvisammioside และ (9Z)-Heptadeca-1,9-diene-4,6-diyn-3-ol (Yokosuka *et al.*, 2017) สารสกัดจากรากตังเซียม (CP) ชั้นเอทานอล (3A) ชั้นเอทิลแอซิเตต (3B) พบสารที่ค่า $R_f = 0.77$ ดูดกลืน UV254 และให้ สีเขียวเข้มเมื่อป้าย Anisaldehyde- H_2SO_4 พบว่าตรงกับสารมาตรฐาน 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) โดยชั้นเอทานอล จะพบสารที่จุดเริ่มต้นด้วย จากรายงานสารสกัดชั้นเมทานอล พบสาร Tangshenoside I Dehydrodiconiferylalcohol Tetradeca-4,12-dien-8,10-diin-1,6,7-triol-6-O- β -D-glucoside Tetradeca-4,12-dien-8,10-diin-1,6,7-triol และ 5-Hydroxymethylfurfural (Wagner *et al.*, 2011) สารสกัดจากรากไต้จิเชิน (PH) ชั้นเอทานอล (4A) และชั้นเอทิลแอซิเตต (4B) พบสารหลายชนิด เช่น ที่ค่า $R_f = 0.63$ ดูดกลืน UV254 และให้สีม่วงน้ำเงินเมื่อป้าย anisaldehyde- H_2SO_4 จากรายงาน ในชั้นเมทานอล พบสารหลายชนิด เช่น Isobutyrylglycine Pesudostellarin A Pseudostellarin B Pseudostellarin D Pseudostellarin E L-Glutamine Sucrose Canthaxanthin Camellenodiol และ Ferulic acid เป็นต้น (Sha *et al.*, 2023) สารสกัดจากใบแห้งชู่เย่ (PF) ชั้นเอทานอล (5A) และชั้นเอทิลแอซิเตต (5B) แสดงสารบน TLC คล้ายกัน ในชั้นเอทานอล ที่ค่า $R_f = 0.67$ และ 0.90 ให้การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร จากรายงานพบว่าชั้นไดคลอโร มีเทนมีสาร β -sitosterol Stigmasterol Oleanolicacid Ursolic acid และชั้นเมทานอลและเอทานอล พบสารกลุ่ม Phenolic acids ได้แก่ Caffeic acid Rosmarinic acid Chlorogenic acid Ferulic acid และสารกลุ่ม Flavonoids เช่น Quercetin Rutoside Luteolin Apigenin (Nina *et al.*, 2014) สารสกัดจากรากหวงฉีหรือปักคี้ (AM) ชั้นเอทานอล (6A) และชั้นเอทิลแอซิเตต (6B) แสดงสารบน TLC คล้ายกันที่ค่า $R_f = 0.07$ 0.16 ให้ anisaldehyde- H_2SO_4 สีเขียวเข้ม ซึ่งที่ค่า $R_f = 0.07$ พบว่าตรงกับสารมาตรฐาน Astragaloside II โดยให้ค่า R_f เท่ากันและสีเหมือนกัน และที่ $R_f = 0.64$ 0.77 ดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ให้ anisaldehyde- H_2SO_4 สีนํ้าเงิน จากรายงานสารสกัดหวงฉีชั้นเมทานอล พบสาร Astragaloside I Astragaloside II Astragaloside III Astragaloside IV Astragaloside V และ Astragaloside VI (Wagner *et al.*, 2011) สารสกัดจากเส้นฉู่หรือชิงคัก (ML) ชั้นเอทานอล (7A) และ ชั้นเอทิลแอซิเตต (7B) แสดงสารบน TLC คล้ายกัน เช่น ที่ค่า $R_f = 0.57$ ให้ Anisaldehyde- H_2SO_4 สีนํ้าเงิน ซึ่งสารส่วนใหญ่มีขั้วน้อย น่าจะเป็นกลุ่มน้ำมันระเหย ง่าย (Fu *et al.*, 2020) สารสกัดจากรากกานฉ่าวหรือชะเอมเทศ (GU) ชั้นเอทานอล (8A) แสดงสารบน TLC พบสารในกลุ่ม มีขั้วที่จุดเริ่มต้น เช่นที่ค่า $R_f = 0.11$ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 nm ให้ Anisaldehyde- H_2SO_4 สีเหลืองส้มและสาร กลุ่มขั้วน้อยจะคล้ายกับสารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต (8B) ซึ่งดูดกลืนแสงได้ทั้งที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm จากรายงาน พบสารหลายชนิด เช่น Glycyrrhizin Glucuronic acid Glycyrrhizic acid Glycyrrhetic acid Isoangustone และ Licoricesaponin (Kim *et al.*, 2007) สารสกัดจากรากหนานซาเชินหรือซาเซียม (AT) ชั้นเอทานอล (9A) และชั้นเอทิลแอซิ เตต (9B) สารแต่ละชนิด ให้ anisaldehyde- H_2SO_4 สีนํ้าเงิน จากงานวิจัยพบสารสำคัญหลายชนิด เช่น Shashenoside I II III Siringinoside Linoleic acid และ Aglycone เป็นต้น (Kuang *et al.*, 1991) และล่าสุด พบสารสำคัญจากรากในส่วน สกัดชั้นเอทานอล เป็นสารใหม่กลุ่ม triterpenoids 7 ชนิด คือ Adeterpenoids A-G (Han *et al.*, 2024) สารสกัดจาก รากป่ายจูหรือแปะตุ๊ก (AMK) ชั้นเอทานอล (10A) พบสารกลุ่มมีขั้วที่จุดเริ่มต้น ส่วนชั้นเอทิลแอซิเตต (10B) พบสารกลุ่มมีขั้ว น้อยหลายชนิด และสารแต่ละชนิด ให้ Anisaldehyde- H_2SO_4 สีนํ้าเงิน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบสารสำคัญหลายชนิด เช่น Atractylenolide III Atractylenolide I และ 14-Acetoxy-12-methylbutyl-2E,8E,10E-trien-4,6-diyn-1-ol (Dong *et al.*, 2008) สารสกัดจากลำต้นเหนือดินของฮั่วเซียงหรือคักเฮีย (PC) ชั้นเอทานอล (11A) และเอทิลแอซิเตต (11B) แสดง สารบน TLC คล้ายกันและให้ Anisaldehyde- H_2SO_4 สีเขียวนํ้าเงิน รายงานที่ผ่านมาพบสารหลายชนิด เช่น Patchoulene sesquiterpenoid glycosides Patchoulane-type sesquiterpenoid Cadinene-type sesquiterpenoid และ Corymbolone (Peng *et al.*, 2022) สารสกัดจากดอกตูมแห้งจินหยินฮั่วหรือโจวฮวย (Lj) ชั้นเอทานอล (12A) และ เอทิลแอซิเตต (12B) แสดงสารบน TLC คล้ายกันและให้ Anisaldehyde- H_2SO_4 สีม่วง จากรายงานพบสารสำคัญหลายชนิด

เช่น สารกลุ่ม Phenolic carboxylic acids ได้แก่ Chlorogenic acid 3,5-Dicaffeoylquinic acid และ 3,5-di-O-caffeoylquinic acid สารกลุ่ม Iridoid glycosides ได้แก่ Loganin Secoxyloganin (Z)-Aldosecologanin และ (E)-Aldosecologanin สารกลุ่ม Flavones ได้แก่ Lonicerin Loniceraflavone Quercetin และสารกลุ่ม Triterpenoid saponins (Wagner *et al.*, 2011) ส่วนสารสกัดจากตำรับเสือขาว (SK) ในชั้นเอทานอล (13A) และเอทิลแอซิเทต (13B) แสดงสารบน TLC คล้ายกันแต่ปริมาณสารกลุ่มมีขั้วพบในชั้นเอทานอลมากกว่า ส่วนส่วนสารที่มีขั้วน้อยพบในชั้นเอทิลแอซิเทตมากกว่า ซึ่งสารแต่ละชนิดจะซ้อนทับกับจำนวนมากเนื่องจากเป็นสารสกัดทั้งหมดที่รวมกันจำนวน 12 ชนิด (รูปที่ 3 และ รูปที่ 4)



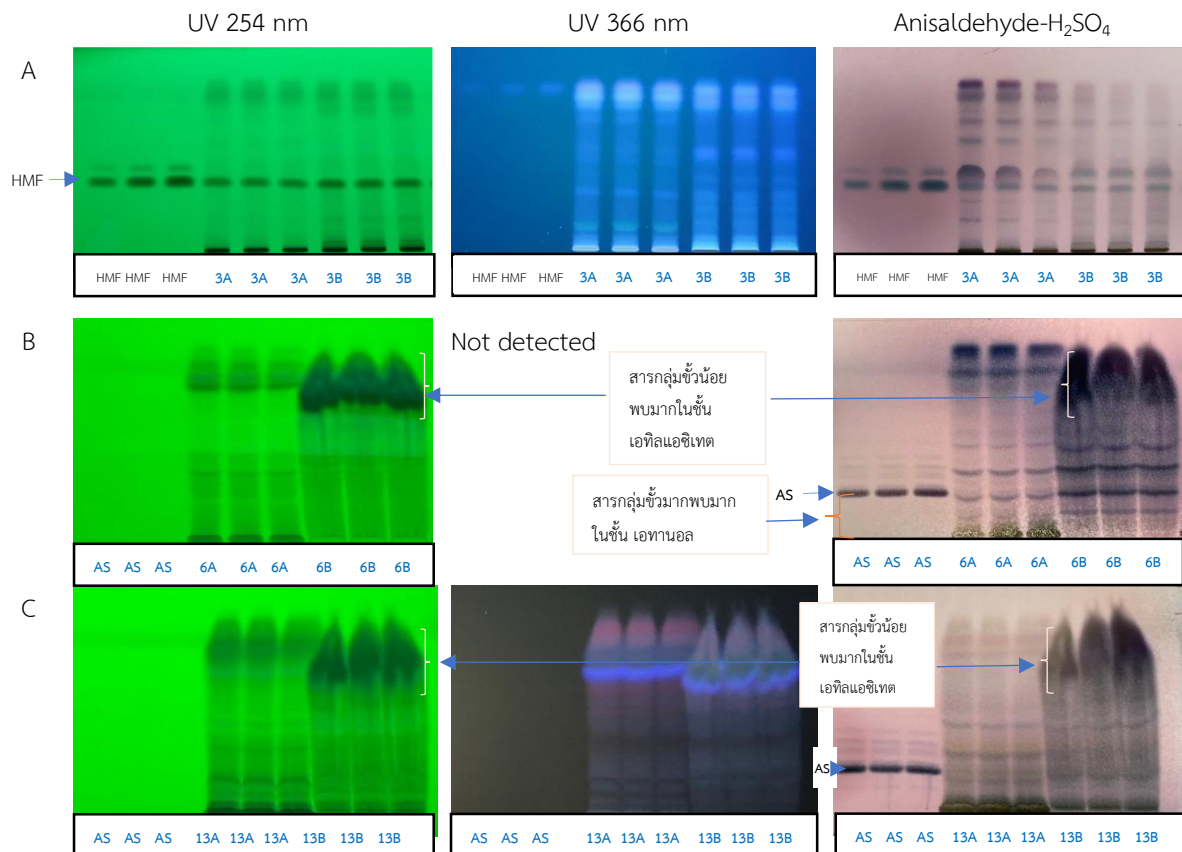
รูปที่ 3 A; TLC สารสกัดสมุนไพรตำรับปายหูเขียนตานชั้นเอทานอล 13 ชนิด; B: TLC เปรียบเทียบสารสกัดสมุนไพรตำรับปายหูเขียนตานชั้นเอทานอล (A) และชั้นเอทิลแอซิเทต (B) ทั้ง 13 ชนิด; โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:CH}_3\text{OH}$ (30:3)

6. ผลการหาปริมาณสารบ่งชี้ 5-Hydroxymethylfurfural ในสมุนไพรตั้งเซียม และ Astragaloside II ในสมุนไพร หวงฉีและยาป้ายหูเซียนตาน ด้วยเทคนิค HPTLC

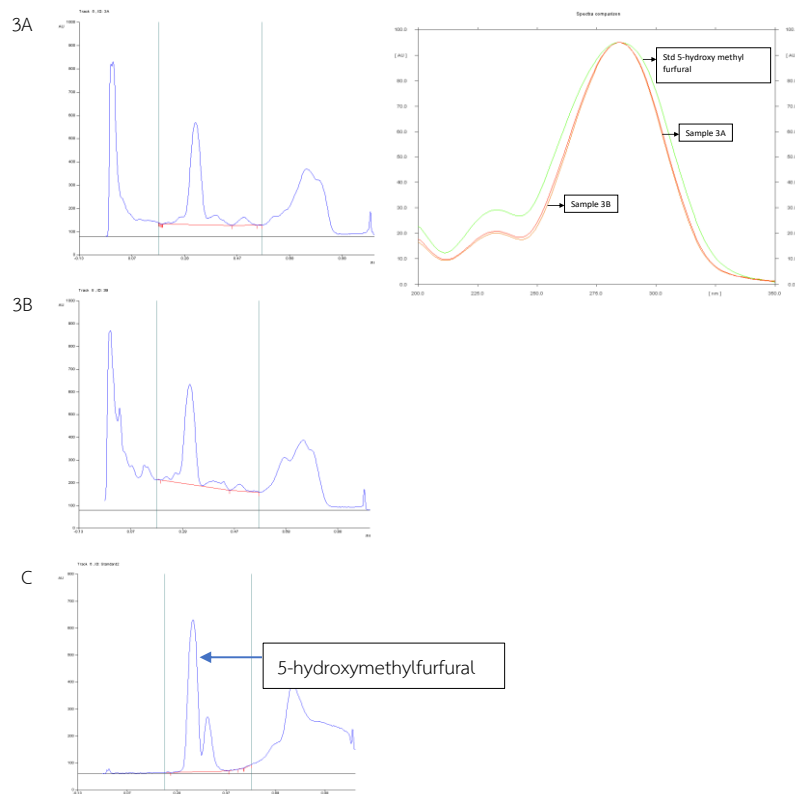
การวิเคราะห์หาสารบ่งชี้ (chemical marker) ในสมุนไพรตั้งเซียม ซึ่งเป็นสมุนไพรรองในตำรับยาป้ายหูเซียนตาน มีอยู่ร้อยละ 7.7 ของส่วนประกอบทั้งหมด จากการนำส่วนสกัดชั้นเอทานอล (3A) และเอทิลแอซิเตต (3B) มาหาปริมาณสาร 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) โดยใช้เทคนิค HPTLC และระบบเฟสเคลื่อนที่เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (30:1.5) พบสาร HMF ที่ค่า $R_f = 0.35$ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 nm ให้ Anisaldehyde- H_2SO_4 สีเขียวเข้ม (รูปที่ 4A) และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยคำนวณจากพื้นที่ใต้พีค (รูปที่ 5) พบปริมาณสาร HMF ในชั้นเอทานอล (3A) และเอทิลแอซิเตต (3B) จำนวน 4.82 และ 4.72 μg จากปริมาณสารเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 24.5 และ 24.9 mg/ml ซึ่งเมื่อเทียบกับปริมาณที่โหลดลงบนแผ่น TLC ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากชั้นเอทานอล (3A) ปริมาณ 12 μl หรือ 294 μg พบปริมาณสาร HMF จำนวน 4.84 μg หรือคิดเป็นร้อยละ 1.65 สารสกัดจากเอทิลแอซิเตต (3B) โหลดลงบนแผ่น TLC ปริมาณ 12 μl หรือ 298.8 μg พบปริมาณสาร HMF จำนวน 4.72 μg หรือคิดเป็นร้อยละ 1.58 ส่วนสารสกัดตำรับยาป้ายหูเซียนตานทั้งชั้นเอทานอล (13A) และชั้นเอทิลแอซิเตต (13B) ไม่สามารถหาได้เนื่องจากเกิดการซ้อนทับกันของสารแต่ละชนิดจึงไม่สามารถหาปริมาณสาร HMF ได้อาจต้องใช้เทคนิคอื่นเช่น HPLC เป็นต้น

การวิเคราะห์หาปริมาณ Astragaloside II ในสารสกัดหวงฉีและตำรับยาป้ายหูเซียนตาน สารสกัดเอทานอล (6A) และเอทิลแอซิเตต (6B) โดยใช้เทคนิค HPTLC และใช้ระบบเฟสเคลื่อนที่เป็น $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (30:3.5:3) พบสาร Astragaloside II ที่ค่า $R_f = 0.2$ ไม่ดูดกลืนแสง 254 และ 366 nm ให้ Anisaldehyde- H_2SO_4 สีเขียวเข้ม (รูปที่ 4B) และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยคำนวณจากพื้นที่ใต้พีค (รูปที่ 6) พบปริมาณสาร Astragaloside II ในชั้นเอทานอล และเอทิลแอซิเตต จำนวน 14.68 และ 8.61 μg ตามลำดับ ในส่วนสารตำรับยาป้ายหูเซียนตาน ชั้นเอทานอล (13A) และเอทิลแอซิเตต (13B) พบ Astragaloside II เจือจางซึ่งไม่สามารถหาปริมาณสาร Astragaloside II ได้เนื่องจากการซ้อนทับกันของสารหลายชนิด (ดังรูปที่ 4C)

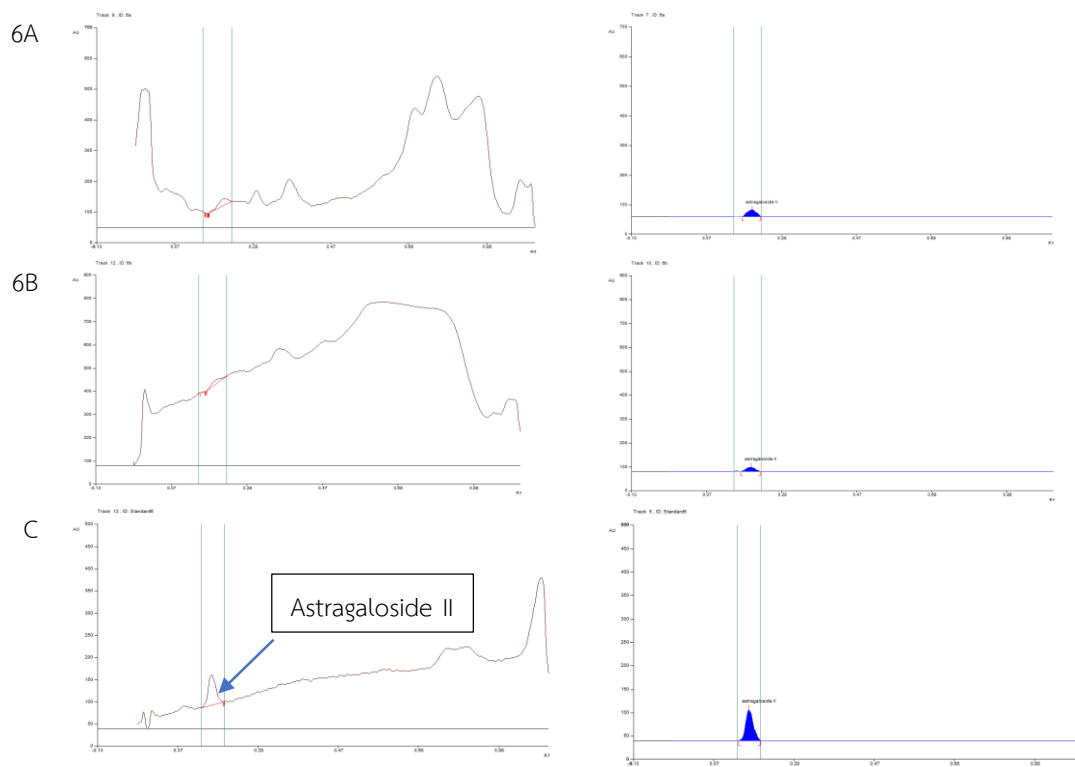
สมุนไพรหวงฉี เป็นสมุนไพรหลักในตำรับยาป้ายหูเซียนตาน จากการนำส่วนสกัดชั้นเอทานอลและเอทิลแอซิเตต พบปริมาณสาร Astragaloside II จำนวน 14.68 และ 8.61 μg ตามลำดับ จากปริมาณสารเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 49.8 และ 49.6 mg/ml ซึ่งเมื่อเทียบกับปริมาณที่โหลดลงบนแผ่น TLC ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากชั้น สารสกัดจากชั้นเอทานอล 10 μL หรือ 498 μg พบปริมาณสาร Astragaloside II จำนวน 14.68 μg หรือคิดเป็นร้อยละ 2.95 ส่วนเอทิลแอซิเตตปริมาณ 20 μL หรือ 992 μg พบปริมาณสาร Astragaloside II จำนวน 8.61 μg หรือคิดเป็นร้อยละ 0.87 จากผลดังกล่าวน่าจะเกิดจากสาร Astragaloside II เป็นโครงสร้างที่มีขั้วมากเนื่องจากมีโมเลกุลของน้ำตาลเกาะ ทำให้สามารถถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วนั้นคือเอทานอลมากกว่าเอทิลแอซิเตต ส่วนสารสกัดในตำรับเสียขาวไม่สามารถหาปริมาณสาร Astragaloside II ได้เนื่องจากมีสารหลายชนิดและเกิดการซ้อนทับกัน ดังนั้นจึงอาจจะต้องใช้เทคนิคอื่นในการวิเคราะห์เพิ่มเติม เช่น HPLC เป็นต้น



รูปที่ 4 A; TLC การหาปริมาณสาร 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) ในสารสกัดตั้งเชื่อมชั้นเอทานอล (3A) และ ชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ (3B) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:CH}_3\text{OH}$ (30:1.5), B: TLC การหาปริมาณสาร Astragaloside II (AS) ในสารสกัดหึ่งชั้นเอทานอล (6A) และชั้น เอทิลแอลกอฮอล์ (6B) และ C: TLC การหาปริมาณสาร Astragaloside II ในสารสกัดตำรับพายหูเขียนตานชั้นเอทานอล (13A) และชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ (13B) เฟสเคลื่อนที่ $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3\text{:CH}_3\text{OH:H}_2\text{O}$ (30:3.5:3)



รูปที่ 5 โครมาโตแกรมของ สารสกัดตั้งเชื่อมชั้นเอทานอล (3A) ชั้นเอทิลแอซิเตด (3B) และสารมาตรฐาน 5-hydroxymethylfurfural (C)



รูปที่ 6 โครมาโตแกรมของสารสกัดหวงฉีชั้นเอทานอล (6A) ชั้นเอทิลแอซิเตด (6B) และสารมาตรฐาน Astragaloside II (C)

สรุปผลการวิจัย

ตำรับยาปายหูเขียนตาน เป็นตำรับยาสมุนไพรจีน มีสรรพคุณเสริมพลังลมปราณ เสริมปอดและม้ามให้แข็งแรง บำรุงยีน มีสมุนไพรรวม 12 ชนิด เมื่อนำสมุนไพรในตำรับยาปายหูเขียนตานแต่ละชนิด มาสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทิลแอลกอฮอล์ เอทานอล และน้ำ จากนั้นนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS หาปริมาณรวมฟีนอลิก และหาลายพิมพ์โครมาโตกราฟี ด้วย TLC และหาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPTLC ผลงานวิจัยพบว่า สารสกัดจากชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ เอทานอล และน้ำ พบสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดด้วยวิธี DPPH คือ กานเฝ้า เหลียนเฉียว และจินหยินฮั่ว ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี ABTS พบว่าสารสกัดกานเฝ้าจากชั้นเอทิลแอลกอฮอล์และชั้นเอทานอล มีค่าการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ส่วนชั้นน้ำ พบว่าจินหยินฮั่ว มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ส่วนสารสกัดปายหูเขียนตานชั้น เอทานอลแสดงฤทธิ์ดีที่สุดแต่ยังแสดงค่าต่ำกว่าตัวยาเดี่ยว การหาปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก พบสารสกัดเหลียนเฉียว ชั้นเอทานอลมีปริมาณมากที่สุดจึงทำให้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงตามไปด้วย สารสกัดทั้งหมดได้นำมาทำเป็น เอกลักษณ์ (fingerprint) ด้วย TLC และหาปริมาณสารสำคัญบางชนิดในสมุนไพรหลักพบสาร Astragaloside II จากสารสกัด หวงฉี จากชั้นเอทานอลมากกว่าชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ เนื่องจากสารชนิดนี้มีขี้ผึ้งมากจึงถูกสกัดออกมาได้ดีกว่า และสาร 5-Hydroxymethylfurfural จากสารสกัดตั้งเข็ม พบในชั้นเอทิลแอลกอฮอล์และเอทานอลมีปริมาณใกล้เคียงกันเนื่องจาก สารชนิดนี้มีขี้ผึ้งปานกลางถึงขี้น้อยจึงสามารถสกัดออกมาได้ทั้งสองตัวทำละลาย อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากหวงฉีและตั้งเข็มมีการแสดงฤทธิ์ที่ไม่ดีเท่าสารสกัดจาก กานเฝ้า เหลียนเฉียว และจินหยินฮั่ว ซึ่งถือเป็นองค์ความรู้ใหม่ ที่สามารถนำไปศึกษาต่อยอด เช่น การปรับสูตรยาใหม่ โดยเพิ่มสัดส่วนของตัวยาเหล่านี้เพิ่มขึ้น ยาตำรับ ปายหูเขียนตานอาจได้ประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีขึ้นได้ รวมถึงการนำไปทดลองเพิ่มเติมในระดับคลินิกด้วย ดังนั้นจากข้อมูล เหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นส่วนหนึ่งในการกำหนดมาตรฐานยาและการขอขึ้นทะเบียนตำรับและพัฒนาการรักษาโรคต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ประจำปีการศึกษา 2564

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. (2554). ตำรับยาจีนที่ใช้บ่อยในประเทศไทย ฉบับสมบูรณ์. กรุงเทพฯ: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 264 - 267.
- กิตติพัฒน์ ไสภิตธรรมคุณ, วรวัฒน์ พรหมเด่น และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กุลชาญ. (2563). คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจากสมุนไพร ไทย. วารสารเทคนิคการแพทย์ 48(3): 7520 - 7530.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21(3): 275 - 286.
- Adam, G., Cojocaru, F.D., Verestiuc, L., Cioanca, O., Vasilache, I.A., Adam, A.M., Mircea, C., Nechita, A., Harabor, V., Huzum, B., Harabor, A. and Hancianu. M. (2024). Assessing the antioxidant properties, in vitro cytotoxicity and antitumoral effects of polyphenol-rich perilla leaves extracts. Antioxidants 13(58): 1 - 23.
- Cheng, M., Min, X., Yu, X. and Zhao, Z. (2023). Bioinformatics study of active substances and disease targets of atracylodes macrocephala based on network pharmacology. International Journal of Frontiers in Medicine. 5(9): 64 - 72. doi: 10.25236/IJFM.2023.050911.

- Chu, R., Zhou, Y., Ye, C., Pan, R. and Tan, X. (2024). Advancements in the investigation of chemical components and pharmacological properties of Codonopsis: A review. *Medicine* 103(26): 1 - 14. doi: 10.1097/MD.00000000000038632.
- Dong, H., Heb, L., Huangc, M. and Dong, Y. (2008). Anti-inflammatory components isolated from *Atractylodes macrocephala* Koidz. *Natural product research* 22(16): 1418 - 1427. doi: 10.1080/14786410801931629.
- Fan, R., Li, N., Jiang, X., Yuan, F. and Gao, Y. (2014). HPLC–DAD–MS/MS identification and HPLC–ABTS+ on line antioxidant activity evaluation of bioactive compounds in liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) extract. *European Food Research and Technology* 240(5): 1035 - 1048 doi: 10.1007/s00217-014-2407.
- Fu, X., Wang, Q., Kuang, H. and Pinghui, J. (2020). Mechanism of Chinese Medicinal-Medicated Leaven for Preventing and Treating Gastrointestinal Tract Diseases. *Digestion* 101(6): 659 - 666.
- Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., úranová, H.D., Štefániková, J., Vukovic, N.L., Vukic, M. and Kačániová, M. (2022). Biological activity of *Pogostemon cablin* essential oil and its potential use for food preservation. *Agronomy* 12(2): 387.
- Han, Z.Y., Wu, J.T., Lin, Y.X., Bi, Y., Naseem, A., Hao, Z.C., Pan, J., Guan, W., Kuang, H.X., Chen, Q.S., Zhang, L.L., Liu, Y., Yang, B.Y. (2024). Seven new triterpenoids from the roots of *Adenophora tetraphylla* (Thub.) Fisch. *Fitoterapia* 175: 105902.
- Hsua, H.F., Hsiao, P.C., Kuo, T.C., Chiang, S.T., Chen, S.L., Chiou, S.J., Linga, X.H., Liang, M.T., Cheng, W.Y., Houng, J.Y. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Lonicera japonica* Thunb. var. *sempervillosa* Hayata flower bud extracts prepared by water, ethanol and supercritical fluid extraction techniques. *Industrial Crops and Products* 89: 543 - 549.
- Huang, W.M., Liang, Y.Q., Tang, L.J., Ding, Y. and Wang, X.H. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory effects of Astragalus polysaccharide on EA.hy926 cells. *Experiment and therapeutic medicine* 6: 199 - 203. doi: 10.3892/etm.2013.1074.
- Indu, P., Arunagirinathan, N., Rameshkumar, M.R., Sangeetha, K., Divyadarshini, A. and Rajarajan, S. (2021). Antiviral activity of astragaloside II, astragaloside III and astragaloside IV compounds against dengue virus: Computational docking and in vitro studies. *Microbial Pathogenesis* 152. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104563.
- Jiao, J., Gai, Q.Y., Luo, M., Wang, W., Gu, C.B., Zhao, C.J., Zu, Y.G., Wei, F.Y. and Fu, Y.J. (2013). Comparison of main bioactive compounds in tea infusions with different seasonal Forsythia suspensa leaves by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and evaluation of antioxidant activity. *Food Research International* 53: 857 - 863. doi: 10.1016/j.foodres.2012.12.018.
- Jung, K.M., Yu, G.R., Kim, D.H., Lim, D.W. and Park, W.H. (2024). Massa Medicata Fermentata, a functional food for improving the metabolic profile via prominent anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *Antioxidants* 13(10): 1271. doi: 10.3390/antiox13101271.

- Kim, J.Y., Park, S.J., Yun, K.J., Cho, Y.W., Park, H.J., Lee, K.T. (2008). Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages. *European Journal of Pharmacology* 584: 175 - 184.
- Kuang, H.X., Shao, C.J., Kasai, R., Ohtani, K., Tian, Z.K., XU, J.D. and Tanaka, O. (1991). Phenolic Glycosides from Roots of *Adenophora tetraphylla* Collected in Heilongjiang, China. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39(9): 2440 - 2442.
- Law, S., Lo, C., HAN, J., Leung, A. W. and Xu, C. (2020). Traditional chinese herb, astragalus: possible for treatment and prevention of COVID-19?. *Herba Polonica* 66(4): 79 - 84.
- Lei, Z., Luan, F., Zou, J., Zhang, X., Zhai, B., Xin, B., Sun, J., Guo, D., Wang, J., Shi, Y. (2025). Traditional uses, phytochemical constituents, pharmacological properties, and quality control of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax. *Journal of Ethnopharmacology* 337(2): 118871. doi: 10.1016/j.jep.2024.118871.
- Li, X., Chen, W., Chen, D. (2013). Protective effect against hydroxylinduced DNA damage and antioxidant activity of Radix Glycyrrhizae (Licorice Root). *Advanced pharmaceutical bulletin* 3(1): 167 - 173. doi: 10.5681/apb.2013.028.
- Li, X., Lin, J., Han, W., Mai, W., Wang, L., Li, Q., Lin, M., Bai, M., Zhang, L. and Chen, D. (2012). Antioxidant ability and mechanism of Rhizoma *Atractylodes macrocephala*. *Molecules* 17: 13457 - 13472.
- Nina, C., Tatiana, S., Camelia, S., Veaceslav, G., Radu, N., Valentin, G. (2014). Biological and phytochemical research on *Perilla Frutescens* VAR. *Purpurascens* (Hayata) H.W.LI in republic of moldova. *Buletinul AȘM. Științele vietii* 2(323): 82 - 90.
- Nomura, T., Fukai, T., and Akiyama, T. (2002). Chemistry of phenolic compounds of licorice (*Glycyrrhiza* species) and their estrogenic and cytotoxic activities. *Pure and Applied Chemistry* 74(7): 1199 - 1206.
- Pan, H., Zhang, Y. and MA, Q.Z. (2021). *Pseudostellaria heterophylla*: Antioxidant activity and its mechanism of action. *Medicinal plant* 12(4): 19 - 23.
- Peng, H., Lu, P., Liu, Y., Liu, C., Gao, Y., Nwafor, E., Zhang, Y. and Liu, Z. (2020). Research progress on chemical composition, pharmacological effects of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl and predictive analysis on Q-marker. *TMR Modern Herbal Medicine* 3(02): 86 - 112.
- Peng, X., Ang, S., Zhang, Y., Fan, F., Wu, M., Liang, P., Wen, Y., Gan, L., Zhang, K., Li, D., and Yue, Ji. (2022). Chemical Constituents With Antiproliferative Activity From *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. *Frontiers in Chemistry* 10: 1 - 11.
- Qu, H., Zhang, Y., Wang, Y., Li, B. and Sun, W. (2008). Antioxidant and antibacterial activity of two compounds (forsythiaside and forsythin) isolated from *Forsythia suspensa*. *Journal of pharmacy and pharmacology* 60: 261 - 266.
- Sha, M., Li, X., Liu, Y., Tian, H., Liang, X., Li, X. and Gao, W. (2023). Comparative chemical characters of *Pseudostellaria heterophylla* from geographical origins of China. *Chinese Herbal Medicines* 15: 439 - 446.

- Wagner, H., Bauer, R., Melchart, D., Xiao, P.G., Staudinger, A. (2011). *Cortex Magnoliae officinalis Houpo* . In: Wagner, H., Bauer, R., Melchart, D., Xiao, PG., Staudinger, A. (eds) *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines*. Vienna: Springer.
- Yan, S., Zhang, S., Liu, Y., Zang, H., Zhang, L. and Liu, D. (2025). Exploring the structural characteristics and antioxidant capacity of pectins from *Adenophora tetraphylla* (Thunb.) Fisch. *Molecules* 30(6): 1301.
- Yang, M., Wang, C.C., Wang, W.L., Xu, J.P., Wang, J., Zhang, C.H. and LI M.H. (2020). *Saposhnikovia divaricate* -An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review. *Chinese journal of integrative medicine* 26(11): 873 - 880.
- Yani, L., Yulong, W., Liming, Y., Yaping, H., Kailing, C., Fei, L. and Reddy N.V. (2025). Phytochemical constituents and pharmacological effects of Dangshen (*Codonopsis pilosula*), an important traditional chinese medicine. *Journal of Plant Science & Research* 12(2): 277.
- Yokosuka, A., Tatsuno, S., Komine, T. and Mimaki, Y. (2017). Chemical Constituents of the Roots and Rhizomes of *Saposhnikovia divaricata* and their Cytotoxic Activity. *Natural Product Communications* 12(2): 255 – 258.
- Zhang, J.L., Li, W.X., Li, Y., Wong, M.S., Wang, Y.J. and Zhang, Y. (2021). Therapeutic options of TCM for organ injuries associated with COVID-19 and the underlying mechanism. *Phytomedicine* 85: 153297.
- Zhao, L., Wang, L., Guo, Z., Zhang, N., Feng, Q. and Li, B. (2022). Polysaccharides from *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.: Characterization and antioxidant activities. *Frontiers in Pharmacology* 13: 1 - 11.
- Zou, H., Wu, T., Wang, Y., Kang, Y., Shan, Q., Xu, L., Jiang, Z., Lin, X., Ye, X.Y., Xie, T. and Zhang, H. (2021). 5-Hydroxymethylfurfural Enhances the Antiviral Immune Response in Macrophages through the Modulation of RIG-I-Mediated Interferon Production and the JAK/STAT Signaling Pathway. *ACS Omega* 6(42): 28019 - 28030. doi: 10.1021/acsomega.1c03862.

