Published Online: 6 OCT 2022

การศึกษาอิทธิพลของการเตรียมกระชายขาวด้วยความร้อนต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS Assay ในห้องปฏิบัติการ

Effect of Heat Exposure on Antioxidant Activity of Fingerroot: An in Vitro Study Using ABTS Assay

ฉัตร โรจน์บวรวิทยา
อีเมล: 6352003256@lamduan.mfu.ac.th
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ดร. อาริญา สาริกะภูติ
อีเมล: yuiariya@gmail.com
สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นฤนันท์ วุฒิสินธุ์
อีเมล: wnarunan@mfu.ac.th
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง: อนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสื่อมของร่างกาย ทำให้เกิดความชราและโรคต่าง ๆ ตามมา ซึ่งเราไม่สามารถหลีกเลี่ยงการเกิดอนุมูลอิสระได้ แต่การเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระให้แก่ร่างกายจะช่วยชะลอความเสื่อมนี้ได้ สมุนไพรไทยหลายชนิด รวมทั้งกระชายขาว เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ

วัตถุประสงค์: การศึกษาครั้งนี้มุ่งตอบคำถามวิจัยที่ว่า “การเตรียมกระชายขาวด้วยการใช้ความร้อนมีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรนี้อย่างไร”

วิธีการ: ผู้วิจัยได้ออกแบบและดำเนินการวิจัยในห้องปฏิบัติการ โดยใช้กระชายขาว 5 ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มทดสอบ ตัวแปรทำนายของงานวิจัยนี้คือวิธีการเตรียมกระชายขาว ได้แก่ กลุ่มที่ 1 สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง กลุ่มที่ 2 สกัดด้วยน้ำต้มเดือด และกลุ่มที่ 3 อบด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนนำไปสกัดด้วยน้ำต้มเดือด ตัวแปรตามที่สนใจคือ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกระชายด้วยวิธี ABTS assay ตัวสถิติที่เหมาะสมถูกใช้ในการคำนวณนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการศึกษา: วิธีการเตรียมกระชายเป็นตัวแปรที่ทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกระชายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพิจารณาจาก % radical scavenging (กลุ่มที่ 1-3:

5.59±0.05, 27.94±0.71, และ 69.94±1.44 ตามลำดับ; P < 0.0001 ทดสอบด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว) และ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC; กลุ่มที่ 1-3: 1.96±0.02, 9.79±0.25, และ 24.49±0.5; ตามลำดับ; P < 0.0001 ทดสอบด้วยตัวสถิติเดียวกัน)

สรุปผลการศึกษา: ผลการศึกษาชี้ว่า การอบกระชายขาวก่อนนำไปสกัดด้วยน้ำต้มเดือดจะได้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

คำสำคัญ: กระชายขาว, การเตรียมด้วยความร้อน, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ, ABTS Assay

Abstract

Background: Free radicals linked to physical deterioration in humans are not completely preventable, but their effects can be counterbalanced by antioxidants. Fingerroot is one of the Thai herbals with antioxidants.

Objective: The aim of this study was to answer the research question: "How does heat exposure influence the antioxidant activity of fingerroot?"

Methods: The investigator designed and implemented an in vitro experimental study design using five samples in each experiment group. The primary predictor variable was antioxidant extraction methods (fresh fingerroot extracted with room-temperature water [group 1] vs. with boiling water [group 2] vs. with boiling water after being baked at 60 °C for six hours [group 3]). The main outcome variable was antioxidant activity as assessed by the ABTS assay. Appropriate statistics were computed at α = 95%.

Results: The antioxidant extraction (i.e., heat exposure) method was a significant predictor for percent radical scavenging (group 1, 2, and 3: 5.59±0.05% vs. 27.94±0.71% vs. 69.94±1.44%; one-way ANOVA: P < 0.0001) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC; group 1, 2, and 3: 1.96±0.02 vs. 9.79±0.25 vs. 24.49±0.5%; one-way ANOVA: P < 0.001).

Conclusions: The results of this study suggest that the fingerroot should be baked before boiling to achieve the highest antioxidant activity.

Keywords: Fingerroot, Heat Exposure, Antioxidant Activity, ABTS Assay

บทนำ/หลักการและเหตุผล (Introduction)

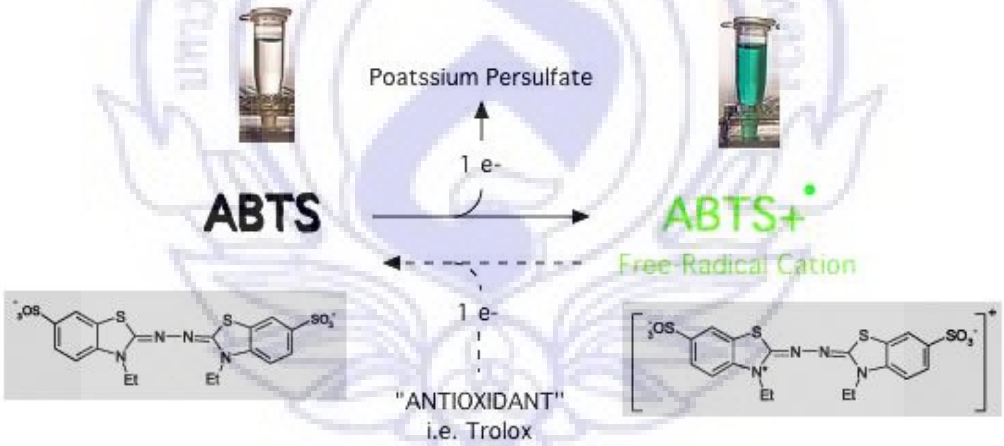
อนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสื่อมของร่างกายทำให้เกิดความชราและโรคต่าง ๆ ตามมา ซึ่งเราไม่สามารถหลีกเลี่ยงการเกิดอนุมูลอิสระได้ แต่การเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระให้แก่ร่างกายจะช่วยลดการเกิดภาวะ oxidative stress และชะลอความเสื่อมนี้ได้

กระชายขาวเป็นสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสาร Boesenbergin A (Isa et al., 2012) แต่ยังไม่มีการศึกษาว่าการให้ความร้อนนั้นจะทำให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในกระชายเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร และการรับประทานในรูปแบบใดจะให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่ากัน จึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้

วิธีทดสอบ ABTS Assay

ABTS assay หรือ ABTS radical cation decolorization assay เป็นวิธีการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสาร ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับสารอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกของ ABTS ($ABTS^{\bullet+}$) (Shahidi & Zhong, 2015)

ABTS assay จะวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถฟอกสีอนุมูลอิสระของ ABTS ในเฟสที่เป็นน้ำได้ต่างกัน เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (อนุพันธ์วิตามินอีที่ละลายน้ำ) $ABTS^{\bullet+}$ จะถูกสร้างขึ้นโดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารออกซิไดซ์ที่มีความแรงกับเกลือของ ABTS จากนั้นจะเกิดเป็นสารอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งเป็นสารที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน ดังภาพที่ 1



ที่มา Boligon (2014)

ภาพที่ 1 การเกิดปฏิกิริยาของ ABTS

$ABTS^{\bullet+}$ ดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่สูง สาร $ABTS^{\bullet+}$ จึงต้องถูกเจือจางด้วยสารฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ก่อนนำ ABTS ไปทำปฏิกิริยากับสาร Trolox หรือสารตัวอย่าง ซึ่งจะทำให้สีเขียวนั้นจางลง

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะสามารถหาได้จากการวัดค่าสีที่จางลง จากนั้นนำไปคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

คำนวณหาค่า % ABTS radical cation scavenging activity ดังภาพที่ 2

% ABTS radical cation scavenging activity= (A control- A measure) / A control x 100

ที่มา มะลิวรรณ อมตธงไชย (2559)

ภาพที่ 2 การคำนวณหาค่า % ABTS radical cation scavenging activity

โดย A control เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม และ A measure เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (มะลิวรรณ อมตธงไชย, 2559)

แล้วนำค่า % ABTS radical cation scavenging activity มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน โดยทั่วไปจะวัดผลที่ได้ในรูปของ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

ผลกระทบของการได้รับความร้อนต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ในปี 2006 มีการศึกษาการทำแห้งขิงโดยการอบลมร้อน ซึ่งทำให้ขิงมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าตัวอย่างสด เนื่องจากการได้รับความร้อนเป็นตัวกระตุ้นให้เกิด shogaol (สารประกอบเคมีที่เป็นส่วนประกอบของขิงและทำให้ขิงมีกลิ่น มีความเผ็ด และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ) และ zingerone (สารที่ให้รสชาติเผ็ดชนิดหนึ่งของขิง และมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน) ทำให้ได้ปริมาณสารดังกล่าวมากกว่าในตัวอย่างสด (Puengphian & Sirichote, 2006)

ในปี 2011 มีการศึกษาผลของการทำแห้งกระชายเหลืองที่มีต่อความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดยทำแห้งกระชายเหลืองที่ 3 สภาวะ ได้แก่ ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 และ 6 ชั่วโมง นำไปทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่ากระชายเหลืองที่ผ่านการทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีคุณสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชันมากที่สุด รองลงมาเป็นการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และการทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ตามลำดับ (กวิน สุขสิงห์ และวรรณี จิรภาคย์กุล, 2554)

ทั้งนี้ ในปี 2015 มีการศึกษาพบว่าพืชผักบางชนิด เมื่อผ่านการอบจะทำให้สูญเสียความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไป 30-50 % ในทางกลับกันก็มีพืชผักบางชนิดที่เมื่อได้รับความ

ร้อนแล้วนั้น กลับช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ เนื่องมาจากเกิดการรวมตัวกันของสารประกอบต่าง ๆ เกิดเป็นสารใหม่ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (พัชรี สิริตระกูลศักดิ์และสกุลกานต์ สิมลา, 2558)

ในปี 2021 มีการศึกษาผลของวิธีการปรุงอาหารกับคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในข่า โดยศึกษาการให้ความร้อนข่าด้วยการอบที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับข่าที่ผ่านการต้มเดือด แล้วนำไปสกัดด้วย 70 % เอทานอล ทำการวิเคราะห์หาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay และ FRAP assay พบว่าการปรุงอาหารเพิ่มฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระถึง 1.52-2.73 เท่า เมื่อเทียบกับตัวอย่างสด โดยตัวอย่างที่ผ่านการอบร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดข่าที่ผ่านการอบร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สารสกัดข่าที่ผ่านการต้มเดือด และสารสกัดข่าสดตามลำดับ (Ruangsawang & Niamsup, 2021)

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory research) มีตัวแปรต้นคือเหง้ากระชายแบบสด และเหง้ากระชายแบบอบ มีตัวแปรตามคือระดับของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

วัตถุดิบ

เหง้ากระชายขาว สายพันธุ์ *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. อายุ 1 ปี จากรอยทางบ้านสวน เกษตรอินทรีย์ฟาร์ม อ.สวี จ.ชุมพร

อุปกรณ์

1. โกร่งสำหรับบด
2. เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (TE1502S, Sartorius)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง balance (TB-214, Denver instrument)
4. หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Z326K, Hermle)
6. Microcentrifuge
7. ขวดรูปชมพู่
8. ขวดวัดปริมาตร ขนาด25mL 100mL และ1,000mL
9. บีกเกอร์ ปริมาตร 100 ml
10. กระบอกตวง ปริมาตร 50 ml

11. เครื่องดูดจ่ายสารละลายไมโครปิเปต Pipette (Research plus, Eppendorf)
12. ทิปปิเปต
13. Syringe filter (0.45 μm PTFE)
14. แผ่นอะลูมิเนียม
15. Hot air oven (UFE600, Memmert)
16. Hot plate stirrer (LMS-100, Daihan Labtech)
17. Vortex mixer (VM-10, Daihan Scientific)
18. Microplate reader (Epoch, Biotek)
19. Magnetic bar

สารเคมี

1. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
2. Sodium dihydrogen phosphate dihydrate $NaH_2PO_4{\cdot}2H_2O$ (Ajax finechem)
3. Sodium dihydrogen phosphate NaH_2PO_4 (Ajax finechem)
4. ABTS; 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (sigma aldrich)
5. Potassium persulphate $K_2S_2O_8$ (Ajax finechem)
6. Trolox; (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (sigma aldrich)

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างกระชายขาว

นำส่วนเหง้าของกระชายขาวมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ล้างน้ำสุดท้ายด้วยน้ำปราศจากไอออน ทิ้งให้สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหั่นส่วนของเหง้ากระชายให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ สม่ำเสมอกัน นำชิ้นส่วนที่ได้มาบดละเอียดด้วยโกร่ง แล้วเก็บไว้ในถุงซิปล๊อคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารสกัดจากกระชายขาว

นำกระชายขาวที่ได้จากการเตรียม แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยชั่งตัวอย่างกระชายขาวแต่ละกลุ่มเป็นจำนวน 5 กรัม กลุ่มแรกเป็นกระชายขาวแบบสด กลุ่มที่สองเป็นกระชายขาวอบลมร้อนด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (กวิน สุขสิงห์ และวรรณี จิรภาคย์กุล, 2554)

นำตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มมาสกัดด้วยตัวทำละลาย

กลุ่มแรกกระชายสด แบ่งเป็น 2 ส่วน

ส่วนแรก สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องในอัตราส่วน 1:10 W/V (พิชญา ฤทธิ์เจริญ, 2560) เป็นเวลา 10 นาที (Ruangsawang & Niamsup, 2021) กรองเอากากออก

ส่วนที่สอง สกัดด้วยน้ำต้มเดือดในอัตราส่วน 1:10 W/V เป็นเวลา 10 นาที (Ruangsawang & Niamsup, 2021) โดยทำการต้มให้เดือดบน hotplate stirrer (อุณหภูมิประมาณ 92 องศาเซลเซียส) แล้วจึงใส่ตัวอย่างกระชายขาวลงไป จับเวลา 10 นาที โดยมีการกวนตัวอย่างด้วย magnetic bar ขณะจับเวลา กรองเอากากออก

กลุ่มที่สองกระชายอบ

สกัดด้วยน้ำต้มเดือดในอัตราส่วน 1:10 W/V เป็นเวลา 10 นาที (Ruangsawang & Niamsup, 2021) โดยทำการต้มให้เดือดบน hotplate stirrer (อุณหภูมิประมาณ 92 องศาเซลเซียส) แล้วจึงใส่ตัวอย่างกระชายขาวลงไป จับเวลา 10 นาที โดยมีการกวนตัวอย่างด้วย magnetic bar ขณะจับเวลา กรองเอากากออก

ในขั้นตอนการกรองของทั้ง 3 กลุ่ม ได้นำตัวอย่างกรองเอากากออก โดยผ่านการกรองหยาบด้วยสำลี จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g นาน 5 นาที แล้วจึงกรองด้วย syringe filter (0.45 µm PTFE) เก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำส่วนใสไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ต่อไป

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจากวิธีของ Thaipong et al. (2006)

ในวิธีของ Thaipong et al. ในปี 2006 วิธีการทำ ABTS assay ได้ถูกดัดแปลงจาก Arnao et al. (2001) เล็กน้อย สารอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จะถูกเตรียมจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mM กับสารละลาย potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 mM ในปริมาณที่เท่ากัน เก็บสารผสมในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 ชั่วโมง

จากนั้นสารละลายจะถูกเจือจางโดยการผสมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ 1 ml กับ 50mM Phosphate buffer pH 7.0 ปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงผ่าน spectrophotometer ไม่เกิน 1.000 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงแต่ละครั้ง สารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ จะถูกเตรียมใหม่

กราฟมาตรฐานจะเป็นเส้นตรงของค่าการดูดกลืนแสงของสาร Trolox จากความเข้มข้น 5 ถึง 150 µM ผลที่ได้จะแสดงออกในหน่วย mg Trolox equivalents (TE) /ml sample (Thaipong et al., 2006)

วิธีทดสอบ ABTS Assay

นำตัวอย่าง 10 μL เติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ 190 μL ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สารผสมแต่ละตัวจะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ microplate reader (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้สาร Trolox เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Trolox

กิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จะถูกแสดงออกตาม Trolox equivalent และรายงานผลเป็น % ABTS radical scavenging และ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (mg TEAC/ml sample)

ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จะถูกคำนวณได้ตามสมการ:

$$\% \text{ ABTS radical scavenging} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

โดย A_0 เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม และ A_1 เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมที่มีตัวอย่าง

ค่า % ABTS radical scavenging และค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ที่มากจะบ่งชี้ถึงการมีกิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ที่สูง

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สกัดสารตัวอย่างกระชายทั้ง 3 กลุ่ม นำมาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแต่ละตัวอย่าง อย่างละ 5 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S) เพื่อแสดงค่าที่ได้ในรูปของค่าเฉลี่ย ± S เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยข้อมูลทั้ง 3 กลุ่ม ซึ่งเป็นอิสระต่อกัน

ใช้ one-way ANOVA ภายใต้เงื่อนไขว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution) และความแปรปรวนของข้อมูลทั้ง 3 กลุ่มเท่ากัน โดยทำการทดสอบความเท่ากันของความแปรปรวนด้วย Levene's Test

กรณีที่ความแปรปรวนเท่ากัน เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (multiple comparison) ด้วย Least significance difference test (LSD)

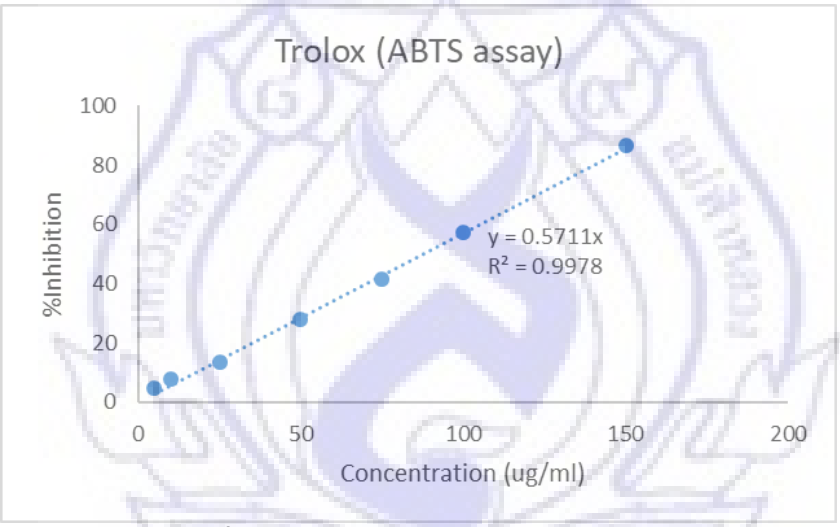
ผลวิจัย (Results)

กราฟมาตรฐาน Trolox โดยใช้ ABTS assay

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของ Trolox และ % inhibition ที่นำมาใช้สร้างกราฟมาตรฐาน Trolox

ความเข้มข้นของ Trolox (µg/ml)	**5**	**10**	**25**	**50**	**75**	**100**	**150**
ตัวอย่างที่ 1	5.874	8.047	13.620	29.113	42.098	57.089	88.408
ตัวอย่างที่ 2	4.536	8.047	13.286	26.772	40.760	57.256	86.068
ตัวอย่างที่ 3	5.038	7.546	13.286	27.608	41.095	56.253	85.399
ตัวอย่างที่ 4	5.038	6.877	13.453	27.441	41.596	58.426	86.904
ตัวอย่างที่ 5	4.369	7.880	14.456	28.444	41.596	56.754	85.566
% Inhibition (Mean ± S)	**4.971 ± 0.586**	**7.679 ± 0.493**	**13.620 ± 0.487**	**27.876 ± 0.913**	**41.429 ± 0.515**	**57.156 ± 0.807**	**86.469 ± 1.232**

นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน X) กับ % Inhibition (แกน y) แทนค่าในสมการถดถอย (Regression) y = bx + a โดยจะได้ % Inhibition = 0.5711 (ความเข้มข้น) + 0 ซึ่งกราฟมาตรฐาน Trolox ของการศึกษานี้เป็นดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐาน Trolox โดยใช้ ABTS assay

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในกระชายสด และกระชายอบ ด้วยวิธี ABTS Assay

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในกระชายสด และกระชายอบ ด้วยวิธี ABTS assay

ค่าที่วัด	% Radical scavenging (%)			TEAC (mg/ml)		
กลุ่มของการทดสอบ	**กระชายสดสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง**	**กระชายสดสกัดด้วยน้ำต้มเดือด**	**กระชายอบสกัดด้วยน้ำต้มเดือด**	**กระชายสดสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง**	**กระชายสดสกัดด้วยน้ำต้มเดือด**	**กระชายอบสกัดด้วยน้ำต้มเดือด**
ตัวอย่างที่ 1	5.618	28.438	71.749	1.967	9.959	25.127
ตัวอย่างที่ 2	5.633	27.943	69.605	1.973	9.786	24.376
ตัวอย่างที่ 3	5.618	26.789	70.430	1.967	9.382	24.665
ตัวอย่างที่ 4	5.510	27.943	70.100	1.930	9.786	24.549
ตัวอย่างที่ 5	5.587	28.603	67.792	1.956	10.017	23.741
ค่าเฉลี่ย	5.593	27.943	69.935	1.959	9.786	24.491
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	**0.049**	**0.709**	**1.437**	**0.017**	**0.248**	**0.503**

การวิเคราะห์ค่า % ABTS radical scavenging และ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

จากการวิเคราะห์ one-way ANOVA ค่า F ที่ได้ มี P-value น้อยกว่า 0.05 แปลผลได้ว่ามีค่าเฉลี่ยอย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกัน ผลแสดงดังตารางที่ 3 และตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ค่า % radical scavenging ของตัวอย่างกระชายทั้ง 3 กลุ่ม

กลุ่มตัวอย่าง	**จำนวนตัวอย่าง**	**ค่าเฉลี่ย**	**ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน**	**P-value**
กระชายสดสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง	5	5.593^{a}	0.049	<0.001
กระชายสดสกัดด้วยน้ำต้มเดือด	5	27.943^{b}	0.709	
กระชายอบสกัดด้วยน้ำต้มเดือด	5	69.935^{c}	1.437	

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงคู่ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4 ค่า TEAC ของตัวอย่างกระชายทั้ง 3 กลุ่ม

กลุ่มตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	P-value
กระชายสดสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง	5	1.959[a]	0.017	<0.001
กระชายสดสกัดด้วยน้ำต้มเดือด	5	9.786[b]	0.248	
กระชายอบสกัดด้วยน้ำต้มเดือด	5	24.491[c]	0.503	

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงคู่ที่แตกต่างกัน

ซึ่งจากการทดสอบพบว่ามีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญของข้อมูลทุกคู่ ทำให้สรุปได้ว่า ค่า % radical scavenging และค่า TEAC ของตัวอย่างกระชายทั้ง 3 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า % radical scavenging ของกระชายอบสกัดด้วยน้ำต้มเดือด (69.935±1.437 %) มากกว่ากระชายสดสกัดด้วยน้ำต้มเดือด (27.943±0.709 %) และกระชายสดสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง (5.593±0.049 %) ตามลำดับ และค่า TEAC ของกระชายอบสกัดด้วยน้ำต้มเดือด (24.491±0.503 mg/ml) มากกว่ากระชายสดสกัดด้วยน้ำต้มเดือด (9.786±0.248 mg/ml) และกระชายสดสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง (1.959±0.017 mg/ml) ตามลำดับ

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ (Discussion and Suggestion)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ทำให้ทราบว่ากระชายขาวมีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบดังนี้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม Flavanones ได้แก่ Pinostrobin, Pinocembrin, Alpinetin, 5,7-dimethoxyflavanone และ Sakuranetin สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม Flavones ได้แก่ Dimethoxyflavone, 3’,4’,5,7-tetramethoxyflavone สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม Chalcones ได้แก่ 2’,6’-dihydroxy-4’-methoxychalcone, Cardamonin, Panduratin A, Panduratin B, Boesenbergin A, Boesenbergin B, Rubranine, 4-Hydroxypanduratin A และสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม Diterpenes คือ Pimaric acid (ธนศักดิ์ แซ่เลี่ยว และคณะ, 2551)

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายขาวทั้ง 3 กลุ่ม ผลที่ได้ทั้งค่า % ABTS radical scavenging และ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) มีความสอดคล้องกัน โดยในกลุ่มกระชายอบสกัดด้วยน้ำต้มเดือดให้ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่มของกระชายสดสกัดด้วยน้ำต้มเดือด และกลุ่มกระชายสดสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง ตามลำดับ

แสดงให้เห็นว่า ผลจากการให้ความร้อนโดยการอบลมร้อนให้แห้งก่อนทำการสกัดด้วยน้ำต้มเดือดนั้น เป็นปัจจัยที่ทำให้กระชายมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการอบร้อน

เป็นการรีดให้เกิดไอน้ำระเหยจากตัวอย่าง ทำให้เกิดความเข้มข้นของสารประกอบมากขึ้น อีกทั้งยังอาจเกิดจากการสลายโครงสร้างของผนังเซลล์ ส่งผลให้สารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระถูกปลดปล่อยออกมามากขึ้น และอาจมีการรวมตัวของสารประกอบต่าง ๆ เกิดเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น (พัชรี สิริตระกูลศักดิ์ และสกุลกานต์ สิมลา, 2558)

ผลจากการศึกษานี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทำแห้งขิงด้วยการอบร้อน ซึ่งทำให้ขิงมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าในตัวอย่างสด (Puengphian & Sirichote, 2006)

นอกจากนี้ยังมีความสอดคล้องกับการศึกษาผลของวิธีการปรุงร้อนข่าที่มีต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยการทดสอบสารสกัดข่าที่ผ่านการอบร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดข่าที่ผ่านการอบร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สารสกัดข่าที่ผ่านการต้มเดือด และสารสกัดข่าสดตามลำดับ (Ruangsawang & Niamsup, 2021)

ซึ่งทั้งขิงและข่าเป็นพืชวงศ์เดียวกับกระชายขาว จึงอนุมานได้ว่าพืชในวงศ์นี้มีคุณสมบัติการเพิ่มหรือลดของสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อได้รับความร้อนเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำผลการทดสอบที่ได้ไปปรับใช้เป็นแนวทางในการรับประทานกระชายขาวได้ว่า เมื่อกระชายสดได้รับความร้อนโดยการอบแล้วนำมาสกัดด้วยน้ำต้มเดือด เช่น ในลักษณะของการทำชานั้น จะทำให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาจะเป็นการนำกระชายสดไปผ่านการสกัดด้วยน้ำต้มเดือด เช่น การทำน้ำกระชายโดยผ่านการต้มแล้วกรองเอากากออกไป และการนำกระชายสดสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง ดังเช่นการรับประทานกระชายสด หรือน้ำคั้นกระชายที่ไม่ผ่านการต้ม ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของกระชายขาวเพิ่มเติม เช่น การเก็บตัวอย่างกระชายขาวจากพื้นที่หรือภูมิภาคที่แตกต่างกัน ซึ่งจะมีปัจจัยแวดล้อมที่แตกต่างกันจากลักษณะทางภูมิศาสตร์และภูมิอากาศสภาพดิน สภาพน้ำ รวมถึงการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูกาลต่างกัน ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลต่อการให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่มากน้อยต่างกัน

2. ศึกษาวิธีการสกัดและชนิดของตัวทำละลายเพิ่มเติม เพื่อให้ได้วิธีการสกัดและชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม

3. ศึกษาถึงอันตรกิริยาของกระชายขาวกับยาแผนต่าง ๆ และการเกิดพิษต่อผู้รับประทานก่อนการนำกระชายขาวหรือสารสกัดกระชายขาวไปใช้เพื่อหวังผลในการสร้างเสริมสุขภาพจากการมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เพื่อให้มีความปลอดภัยในการบริโภค

รายการอ้างอิง

กวิน สุขสิงห์ และวรรณี จิรภาคย์กุล. (2554). *ผลของการทำแห้งต่อปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์และสมบัติต้านออกซิเดชันในกระชายเหลือง.* รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. (หน้า 641-648). สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

ธนศักดิ์ แซ่เลี่ยว, ศศิธร จันทนวรางกูร และวรรณี จิรภาคย์กุล. (2551). *ผลของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันของกระชายเหลือง (Boesenbergia pandurata).* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. (หน้า 538-545). สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 21*(3), 275-286.

พัชรี สิริตระกูลศักดิ์ และสกุลกานต์ สิมลา. (2558). ผลของกรรมวิธีการประกอบอาหารต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในดอกชมจันทร์. *วารสารแก่นเกษตร, 43*(1), 875-80.

พิชญา ฤทธิ์เจริญ (2560). *การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายเหลือง กระชายแดง และ กระชายดำ*. การค้นคว้าอิสระวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

มะลิวรรณ อมตธงไชย (2553). วิธีวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมอย่างรวดเร็ว. *วารสารวิชาการ ม.อบ., 12*(2), 49-59.

สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดสุรินทร์. (2564). *กระชาย สรรพคุณและประโยชน์ของกระชายเหลือง.* https://www.opsmoac.go.th/surin-local_wisdom-preview-422891791854

สำนักงานความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ กรมป่าไม้. (2564). *กระชาย.* http://biodiversity.forest.go.th/index.php?option=com_dofplant&id=156&view=showone&Itemid=132

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). (2564). *ฐานข้อมูลงานวิจัยกระชาย.* http://agknowledge.arda.or.th/boesenbergiarotunda/?page_id=887

Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry 73,* 239–244.

Boligon, A. A., Machado, M. M., & Athayde, M. L. (2014). Technical evaluation of antioxidant activity. *Medicinal Chemistry, 4*(7), 517-522. https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000188

Chaiyasit K., Tokaew W., & Boonsiri K. (2021). Medicinal plants and the communication on precautionary use of herbs during COVID-19 outbreak in Thailand. *Bioactive Compounds in Health and Disease 2021, 4*(8), 180-188. https://www.doi.org/10.31989/bchd.v4i8.825

David, M. P., Patrícia, V., José, A. P., & Paula, B. A. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules, 14*(6), 2202-2211. https://doi.org/10.3390/molecules14062202

Durmaz, G. (2012). Freeze-dried ABTS+ method: A ready-to-use radical powder to assess antioxidant capacity of vegetable oils. *Food Chemistry, 113*, 1658–1663. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.064

Fan, X., Tao, X., Baiyi, L., & Ruihai, L. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers, 1*(1), 60-69. https://doi.org/10.1002/fft2.10

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(6), 1841-1856. https://doi.org/10.1021/jf030723c

Irina Georgiana, M., & Constantin, A. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(3380), 3380-3380. https://doi.org/10.3390/ijms22073380

Isa, N. M., Abdelwahab, S. I., Mohan, S., Abdul, A. B., Sukari, M. A., Taha, M. M. E., . . . Mustafa, M. R. (2012). In vitro anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of boesenbergin A, a chalcone isolated from Boesenbergia rotunda (L.) (fingerroot). *Brazilian Journal of Medical & Biological Research, 45*(6), 524-530.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science, 84*(4), 407-412. https://doi.org/10.1042/cs0840407

Puengphian, C., & Sirichote, A. (2008). [6]-gingerol content and bioactive properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe) extracts from supercritical CO2 extraction. *Asian Journal of Food and Agro-Industry, 1*(1), 29-36.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine, 26*(9), 1231-1237. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Ruangsawang, S., & Niamsup, H. (2021). *Antioxidant activity of galangal: Effects of cooking methods.* 7th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology, (1-7).

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods, 18,* 757-781. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis, 19*(6), 669-675. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003