

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์
ของตำรับยาสุขไสยาสน์

THE STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY, TOTAL PHENOLIC AND TOTAL
FLAVONOID CONTENT IN YA-SUK-SI-YAT

นำพล แปนเมือง¹, ภัทธานิชช์ คำแผ่นจิริโรจน์¹, สุวิมล ดอบุต², พัทธนันท์ พิณราช³
และ ลลิตา วรโยธา^{3,*}

Nampon Panmueang¹, Bhattaranitch Khampaenjiraroj¹, Suwimol Dobut²,
Pattanan Pinnarach³ and Lalita Worayotha^{3,*}

¹ สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

² สาขาวิชาการจัดการสุขภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี วิทยาลัยบัณฑิตเอเชีย

³ กลุ่มงานการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลเรณูนคร

¹ Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University.

² Department of Health Science Management, College of Asian Scholars.

³ Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, Renu Nakhon Hospital.

Received: 13 October 2024

Revised: 22 December 2024

Accepted: 24 December 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบตำรับยาสุขไสยาสน์ โดยนำมาสกัดผ่านตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำและเอทานอลร้อยละ 95 จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS Assay โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดตรงลงมาคือ สารสกัดหยาบในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.67 ± 0.32 และ 4.60 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี ABTS Assay พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์

* Corresponding author: ลลิตา วรโยธา

E-mail: Lalita41999@gmail.com

ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดรองลงมาคือสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.56 ± 0.02 และ 5.23 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสาร L-ascorbic acid และ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ในสารสกัดหยาบตำรับยาสุขไสยาสน์พบว่าตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบในตัวทำละลายด้วยน้ำ เท่ากับ 47.66 ± 5.57 และ 41.52 ± 5.54 กรัมแกดลิกต่อ 100 กรัมของสารสกัด ตามลำดับ และผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid content) เมื่อเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน Quercetin พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 มีปริมาณสารประกอบ ฟลาโวนอยด์สูงสุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบในตัวทำละลายน้ำเท่ากับ 4.56 ± 0.46 และ 3.69 ± 0.12 กรัมควอซิตินต่อ 100 กรัมของสารสกัด ตามลำดับ

คำสำคัญ: ยาสุขไสยาสน์, สารต้านอนุมูลอิสระ, ฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์

Abstract

The purpose of this research was to study the antioxidant activity, total phenolic content and total Flavonoid content from YA-SUK-SI-YA, using two solvents: 95% ethanol and DI water found that analyzing the antioxidant using the DPPH and ABTS^{•+}, analyzing the antioxidant properties using the DPPH assay, found that DI water exhibited the highest potency followed by 95% Ethanol, with IC_{50} values of 1.67 ± 0.32 and 4.60 ± 0.02 mg/ml, respectively. When tested using the ABTS^{•+} assay, it was found that the aqueous extract had the best activity, followed by 95% Ethanol with IC_{50} values of 2.56 ± 0.02 และ 5.23 ± 0.02 mg/ml, respectively. When compared to L-ascorbic acid and Trolox as standard solutions. The analysis of the total phenolic content in the crude extract of the YA-SUK-SI-YA found that 95% Ethanol exhibited the highest

potency followed by DI water, with values of 47.66 ± 5.57 and 41.52 ± 5.54 g gallic acid equivalent (GAE) per 100 gram of extract, respectively. Total flavonoid content when compared to quercetin standard solution, the result showed that 95% ethanol exhibited had the highest potency followed by DI water, with values of 4.56 ± 0.46 and 3.69 ± 0.12 g quercetin equivalent (QE) per 100 gram of extract.

Keywords: YA-SUK-SI-YA, Antioxidant, Phenolic, Flavonoid.

บทนำ

การใช้สมุนไพรกับคนไทย มีความสอดคล้องกันนับตั้งแต่สมัยโบราณกาล มีการนำสมุนไพรมาบริโภคและใช้เป็นยารักษาอาการหรือโรคต่างๆ อันเกิดจากสาเหตุหลายปัจจัย โดยการเกิดโรคทางแพทย์แผนไทย แบ่งการเกิดโรคตามคัมภีร์สมุฏฐานวินิจฉัย ได้แก่ การเกิดโรคจากธาตุสมุฏฐาน อุตสมุฏฐาน กาลสมุฏฐาน และประเทศสมุฏฐาน อันเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเจ็บป่วยซึ่งปัจจัยเหล่านี้ ส่งผลต่อธาตุในร่างกายของมนุษย์คือ ธาตุทั้ง 4 ประกอบด้วย ธาตุดิน ธาตุน้ำ ธาตุลม ธาตุไฟ ทำให้ร่างกายเสียสมดุลจึงเป็นผลให้เกิดการเจ็บป่วยต่างๆ (ตำราคัมภีร์สมุฏฐานวินิจฉัยและการวินิจฉัย, 2542) สังคมไทยในปัจจุบัน ก้าวเข้าสู่ยุคแห่งเทคโนโลยี มีความทันสมัยทางด้านเศรษฐกิจ การค้า การคมนาคม ยังเกิดการพัฒนามากขึ้น ทำให้โลกเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้การดำรงชีวิตของมนุษย์ต้องเปลี่ยนแปลงให้ทันต่อวิวัฒนาการของโลก ทำให้มนุษย์ในปัจจุบันเกิดการใช้ชีวิตที่เร่งรีบ ทำงานหนัก การพักผ่อนมีน้อยลง ความเครียดในสังคมมากขึ้น เกิดเป็นอาการของโรคนอนไม่หลับ หรือบางครั้งอาจนำไปสู่อาการซึมเศร้าได้ อนุมูลอิสระส่งผลทำให้เซลล์ในร่างกายเสื่อมลง (Adwas et al., 2019)

ผู้วิจัยเห็นความสำคัญและให้ความสนใจในการศึกษาดำรับยาสมุนไพรสมุนไพรที่เป็นตำรับยาในสมัยสมเด็จพระนารายณ์มหาราช มีการแต่งตำราพระโอสถขึ้นโดยหมอหลวงเป็นตำรับยารักษา 44 มีส่วนประกอบของสมุนไพรทั้งหมด 12 ชนิด โดยส่วนประกอบหลักเป็นใบกล้วย 12 ส่วน และส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ การบูร 1 ส่วน ช่วยบำรุงหัวใจ ใบสะเดา 2 ส่วน แก้วพิชโลหิต ช่วยเจริญอาหาร หัสศุณเทศ 3 ช่วยแก้หืดไอ ขับลม ส่วน สมุลแว้ง 4 ส่วน แก้วมวงเวียน แก้วพิชกำเดา เทียนดำ 5 ส่วน บำรุงโลหิต โกฎกระดุก 6 ส่วน แก้วมในกองเสมหะ

บำรุงกระดูก ลูกจันทน์ 7 ส่วน บำรุงกำลัง แก้ไข้ บำรุงธาตุ บุนนาค 8 ส่วนแก้ลมกองละเอียด ชุกาลัง พริกไทย 9 ส่วนเพิ่มการอยากอาหาร หลังน้ำย่อย ชิงแห้ง 10 ส่วนกระตุ้นความอยากอาหาร ดีปลี 11 ส่วน แก้อาการนอนไม่หลับ และอาการปวดกล้ามเนื้อ รวมทั้งสิ้น 78 ส่วน แก่สรรพโรคทั้งปวงหายสิ้น มีกำลังกินข้าวได้ นอนเป็นสุข (สำนักงานคุ้มครองภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย, 2544) เห็นได้ว่าตำรับยาสุขไสยาสน์เป็นตำรับยาทางการแพทย์แผนไทยที่มีส่วนประกอบจากสมุนไพรหลากหลายชนิดและมีส่วนผสมของกัญชา 12 ส่วน ด้วยตำรายามีส่วนประกอบของกัญชา ที่ให้สารสำคัญ 2 ชนิดคือ THC และ CBD ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทและพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free Radicals) โดยการชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันให้มีอัตราลดลง และกำจัดออกซิเจนและไอออนโลหะที่เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกจากระบบ (Martin-Santos et al., 2012) ตำรับยาสุขไสยาสน์เป็นตำรับยาที่ต้องควบคุมการใช้เพื่อให้ป้องกันอันตรายในการใช้ยา จึงต้องให้ผู้ที่มีความเชี่ยวชาญ ผู้ที่มีใบอนุญาตเภสัชกรรมไทย เภสัชกร แพทย์ หรือแพทย์แผนไทยที่สามารถจ่ายตำรับยานี้เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าตำรับยาสุขไสยาสน์มีสรรพคุณช่วยบรรเทาอาการคลื่นไส้อาเจียน เบื่ออาหารจากเคมีบำบัด โรคลมชัก แก้อาการในกลุ่มนอนไม่หลับซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการนำตำรับยาสุขไสยาสน์มาทดสอบเชิงคลินิกในกลุ่มอาการของคนนอนไม่หลับเรื้อรังซึ่งส่งผลเสียต่อร่างกายก่อให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งผลทดสอบพบว่ายาสุขไสยาสน์มีประสิทธิภาพทำให้การนอนหลับดีขึ้น (ณัชชา เต็งเต็มวงศ์, 2564) จากการศึกษาพบว่าสมุนไพรจำพวกเปลือก แก่น ราก เปลือก ใบ ผล และดอก ในตำรับยาสมุนไพรมีองค์ประกอบของสารกลุ่มโพลีฟีนอล และฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระในร่างกายโดยทำหน้าที่ยับยั้งอนุมูลอิสระและป้องกันไม่เกิดการทำลายภายในเซลล์ (Okuda and Ito., 2011) แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของสารในตำรับยาสมุนไพรมีผลต่อการรักษาและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาข้อมูลสรรพคุณและจากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องและการศึกษาข้อมูลทางสรรพคุณทางการแพทย์แผนไทย ยังมีการรายงานผลการวิจัยที่พบน้อยมากที่เกี่ยวข้องกับตำรับยาสุขไสยาสน์

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในตำรับยาสุขไสยาสน์โรงพยาบาลเรณูนคร เพื่อให้เป็นประโยชน์และข้อมูลสนับสนุนต่อการพัฒนาตำรับยาเภสัชกรรมไทยในการใช้รักษาโรคทางการแพทย์ไทยและสามารถพัฒนาตำรับยาไปใช้ในรูปแบบอื่นๆ รวมถึงผลิตภัณฑ์ทางสุขภาพ เช่น อาหารเสริมและเวชสำอาง

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

1.1 สารเคมี

DPPH (Sigma-Aldrich, Denmark), Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, USA), ABTS (Sigma – Aldrich, Germany), Potassium per sulfate (Ajax finechem, Australia), Methanol HPLC grade (Rci labscan, Thailand)

1.2 เครื่องมือ

Horizontal Shaker (HS50, IKA, USA), Centrifuge (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Germany), Rotary evaporator (Buchi R-100, Switzerland), Freeze dryer (Alpha 1-4, Christ, Switzerland), Hot air oven (Steriliser SN30, Germany), Desiccator cabinet (Wandefu, Japan), Micro plate Reader (EZ Read 400, Biochrom, UK), Plate shaker (shaker ST3, Elmi, UK), HPLC (Themo Dionex UV/Vis Ultimate 3000, Themo, USA)

1.3 ตำรับยาสมุนไพร

ตำรับยาสมุนไพรขนาด 500 มิลลิกรัม ในรูปแบบแคปซูล ประกอบด้วยใบ กัญชา การบูร ใบสะเดา หัสคุณเทศ สมุลแว้ง เทียนดำ โกฐกระดูก ลูกจันทน์ บุนนาค พริกไทย ขิงแห้ง และดีปลี

2.วิธีการสกัด



รูปที่ 1 ตำรับยาสมุนไพร

นำตำรับยาสมุนไพรมาสับเป็นชิ้นประมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดลูกอมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร สกัดด้วยน้ำกลั่น และเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 : 10) ปิดปากขวดให้สนิท จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Horizontal Shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยแรง 150 รอบ/นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปกรองเพื่อแยกเศษกากและของเหลวออกจากกัน นำส่วนของเหลวเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำเข้าเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer เก็บผงแห้งที่ได้ในขวดสีชาและเก็บในตู้ควบคุมความชื้นเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบตำรับยาสมุนไพร

3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Activity

ชั่งสาร DPPH 7.9 มิลลิกรัม (ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์) ในตัวทำละลาย เมทานอล AR Grad ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตร (Volumetric flask) เก็บไว้ในที่มืดไม่ให้โดนแสงโดยใช้แผ่นอลูมิเนียม ฟลอยด์หุ้มไว้ จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยใช้สาร Trolox และ สาร L-ascorbic acid ในความเข้มข้น 0–1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย DPPH ปริมาตร 2.90 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันรวมปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำมาเก็บในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายมาตรฐาน Trolox และ L-ascorbic acid กับค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) จะได้กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารละลายมาตรฐานและสารสกัดหยาบตำรับยาสมุนไพร โดยหาค่า IC_{50} จากการสร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง ค่า % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัด ดังสมการที่ 1 โดยใช้สมการเส้นตรง ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ (บุหรณ์พันธุ์สุวรรณค์, 2556)

$$y = ax + b \quad (1)$$

y = ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูล DPPH (% inhibition)

x = ความเข้มข้นของสารสกัด

a = จุดตัดแกน y (intercept)

b = ความชัน (slope)

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี ABTS Cation Radical Scavenging Activity

ชั่งสาร ABTS 9.6 มิลลิกรัมละลายน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และ Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) 37.84 มิลลิกรัมละลายน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วผสมกันในอัตราส่วน 1:1 มาผสมให้เข้ากันจากนั้นบ่มในที่มืดด้วยอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาให้นำออกมาแล้วเจือจางด้วยน้ำ DI ประมาณ 20 เท่า แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ให้ได้ค่า 0.7–1.0 จะได้สาร $ABTS^{+•}$ ที่มีความเสถียร จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้สาร Trolox และ สาร L-ascorbic acid ในความเข้มข้น 0–1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย $ABTS^{+•}$ ปริมาตร 2.90 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันรวมปริมาตร 3 มิลลิลิตรแล้วนำมาเก็บในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายมาตรฐาน Trolox และ L-ascorbic acid กับค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) จะได้กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ การต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารละลายมาตรฐานและสารสกัดหยาบตำรับยาสมุนไพร โดยหาค่า IC_{50} จากการสร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง ค่า % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดดังสมการที่ 2 โดยใช้สมการเส้นตรง ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ (บุหรณ์ พันธุ์สุวรรณ, 2556)

$$y = ax + b \quad (2)$$

y = ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูล ABTS (% inhibition)

x = ความเข้มข้นของสารสกัด

a = จุดตัดแกน y (intercept)

b = ความชัน (slope)

3.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ใช้เทคนิค Folin–Ciocalteu ได้จากค่า Calibration curve ของ สารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.0032 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น นำสารสกัดหยาบแล้วเติมสาร Folin–Ciocalteu reagent ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้อง 4 นาที แล้วเติมสาร Sodium carbonate ลงไปผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer แล้วนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ทำการทดสอบตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน 3 ครั้ง คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเฉลี่ยในรูปของมิลลิกรัมของ Gallic acid equivalent (มิลลิกรัมต่อกรัมแกลลิก) โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ (Ainsworth & Gillespie, 2007) การคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

3.4 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid content)

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม อาศัยการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลาย โดยสารประกอบฟลาโวนอยด์ ได้จากค่า Calibration curve ของ สารละลายมาตรฐาน Quercetin ความเข้มข้น 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.0032 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน Methanol นำสารสกัดหยาบแล้วเติมสาร Aluminum Trichloride reagent ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer แล้วนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Quercetin ทำการทดสอบตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน 3 ครั้ง คำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเฉลี่ยในรูปของมิลลิกรัมของ Quercetin equivalent (มิลลิกรัมต่อกรัมเคอควิซีน) โดยดัดแปลงวิธีมาจาก (Atanassova et al., 2011)

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้จากการศึกษาปริมาณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยความแปรปรวน One–Way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey multiple comparisons ที่ค่า $P\text{-value} < 0.05$

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ในงานวิจัยได้ทำการสกัดตำรับยาสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ น้ำกลั่น และเอทานอลร้อยละ 95 โดยวิธีการแช่หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลของน้ำหนักและร้อยละ น้ำหนักสุทธิ (Percentage of yield) ของสารสกัดพบว่าเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ร้อยละ 95 ให้ค่าผลผลิตร้อยละ (% yield) เท่ากับ 9.94 มีสีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะเหนียวข้นหนืดซึ่งเป็นการสกัดผ่าน rotary evaporator โดยอาศัยหลักการระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไปในรูปแบบก๊าซและจะถูกทำให้เย็นลงในคอนเดนเซอร์เป็นของเหลว ส่วนการสกัดด้วยน้ำกลั่นให้ค่าผลผลิตร้อยละ (% yield) เท่ากับ 7.92 มีสีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะแห้ง ไม่ข้นหนืด ซึ่งเป็นการสกัดผ่าน Freeze dryer ด้วยหลักการแช่เยือกแข็ง โดยเปลี่ยนน้ำในตัวอย่างเป็นของเหลวในรูปผลึกน้ำแข็งที่อยู่สถานะของแข็งหลังจากนั้นทำการลดความดันให้ต่ำกว่าจุดรวมสามจุดเพื่อผลึกน้ำแข็งเกิดการระเหิดและได้สารสกัดที่ได้เป็นผงแห้ง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ozsoy และคณะในปี 2009 ถ้าสกัดด้วยน้ำจะได้สารสกัดลักษณะแห้งมีสีน้ำตาลส่วนการสกัดด้วยเมทานอลและเอทิลอะซิเตต ได้สารสกัดลักษณะกึ่งแข็ง เหนียวข้น มีสีเข้ม แสดงดังตารางที่ 1 (Ozsoy et al., 2009)

ตารางที่ 1 ผลการสกัดตำรับยาสมุนไพร

ตัวทำละลาย	ค่าผลผลิตร้อยละ (% yield)	ลักษณะสารสกัด	รูปภาพ
เอทานอลร้อยละ 95	9.94	มีสีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะเหนียวหนืด	
น้ำ	7.92	มีสีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะแห้ง ไม่ข้นหนืด	

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบตำรับยาสมุนไพรสมุนไพรด้วยวิธี DPPH และ ABTS⁺

สารสกัด	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ		
	ตัวทำละลาย	ABTS ⁺	DPPH
		(IC ₅₀ mg/ml)	(IC ₅₀ mg/ml)
ตำรับยาสมุนไพร	น้ำ	2.56 ± 0.02*	1.67 ± 0.32*
	เอทานอลร้อยละ 95	5.23 ± 0.02*	4.60 ± 0.02*
ascorbic acid		0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.03
Trolox		0.21 ± 0.05	0.22 ± 0.05

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, * ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อที่ $P\text{-value} < 0.05$

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบตำรับยาสมุนไพรสมุนไพรด้วยวิธี ABTS assay พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์ดีที่สุดรองลงมาคือสารสกัดในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2.56 ± 0.02 และ 5.23 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนละลายมาตรฐาน Trolox และ L-ascorbic acid มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.21 ± 0.05 และ 0.23 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของตำรับเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS assay มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแต่น้อยกว่าสารละลายมาตรฐาน Trolox และ L-ascorbic acid ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P\text{-value} < 0.05$ แสดงดังตารางที่ 2 ส่วนผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดในตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดรองลงมาคือสารสกัดตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.67 ± 0.32 และ 4.60 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนละลายมาตรฐาน Trolox และ L-ascorbic acid ค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.22 ± 0.05 และ 0.21 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของตำรับยาเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแต่น้อยกว่าสารละลายมาตรฐาน Trolox และ L-ascorbic acid ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P\text{-value} < 0.05$ แสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดหยาบตำรับยาสมุนไพรสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากเป็นยาตำรับที่มีสมุนไพรหลายชนิดซึ่งได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะในปี 2018 พบว่าตำรับยาสมุนไพรที่ประกอบด้วยสมุนไพรหลายชนิดช่วยด้านการอักเสบและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

โดยสาร ฟลาโวนอยด์ ลิกแนน ฟีนิลโพรพานอยด์ คูมาริน และ เทอร์พีนอยด์ ซึ่งสามารถยับยั้งการอักเสบได้ (Li et al., 2018) ส่วนใบสะเดาเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ถึงร้อยละ 55.9 (นกน้อย ชูคงคา, 2554) เมื่อนำหัสคุณเทศมาสกัดด้วยเมทานอลพบว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ถึงร้อยละ 48.9 เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับปานกลางต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (Arung et al., 2009) ส่วนสมุลแว้งสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay (Gogoi et al., 2023) เพียนดำเมื่อนำน้ำมันสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay และ DPPH assay พบว่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Dinagaran et al., 2016) นอกจากนี้ยังพบการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดพริกไทยและตีปลีด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ด้วยวิธี DPPH assay พริกไทย มีค่าเท่ากับ EC_{50} เท่ากับ 26.28 ± 1.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและตีปลีมีค่า EC_{50} เท่ากับ 58.41 ± 2.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการใช้น้ำสกัดในพริกไทย มีค่ามากกว่าตีปลี 78.52 ± 3.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (กุลิสรา อุ่นเจริญ และ วัลภา สีสานันทกุล, 2565) และใบกัญชาเมื่อนำมาสกัดด้วยน้ำและเฮกเซนพบว่ามียูฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Stasiłowicz-Krzemien., 2023) และความเข้มข้นต่ำสุดจากการทดลอง 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับวิตามินซีเท่ากับ 53.57 ± 0.06 และ 54.58 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สุมิตา นิยมเดชา, 2564) แสดงให้เห็นว่าในตำรับยาสุขไสยาสน์นั้นมีสมุนไพรมากหลายชนิดล้วนแต่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อทดสอบทั้งวิธี DPPH assay และ ABTS assay

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม กรัมแกลริกต่อ 100 กรัมสารสกัด
ตำรับยาสุขไสยาสน์	น้ำ	41.52 ± 5.54
	เอทานอลร้อยละ 95	47.66 ± 5.57

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin–Ciocalteu ของสารสกัดหยาบตำรับยาสมุนไพรสมุนไพร พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ 47.66 ± 5.57 รองลงมาคือสารสกัดหยาบในตัวทำละลายด้วยน้ำ เท่ากับ 41.52 ± 5.54 กรัมแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัด ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม กรัมแควอซิตินต่อ 100 กรัมสารสกัด
ตำรับยาสมุนไพร	น้ำ	3.69 ± 0.12
	เอทานอลร้อยละ 95	4.56 ± 0.46

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminum Trichloride พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบในตัวทำละลายน้ำเท่ากับ 4.56 ± 0.46 และ 3.69 ± 0.12 กรัมแควอซิตินต่อ 100 กรัมสารสกัด ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน Quercetin ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งได้สอดคล้องกับงานวิจัยของสุชาติ มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ ในปี 2558 ได้นำลูกจันทน์ ดอกบุนนาค เทียนดำ โกฐกระดุก มาสกัดด้วยเอทานอล ให้สารสกัดจากสมุนไพรดังกล่าวมีสารกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ปริมาณ 471.917 ppm 229.625 ppm 171.292 ppm และ 92.333 ppm ตามลำดับ (สุชาติ มานอก และ ปวีณา ลิ้มเจริญ, 2558)

ในงานวิจัยนี้ได้นำตำรับยาสมุนไพรมาทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์พบว่าตำรับยาสมุนไพรในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากในตำรับยามีสมุนไพรหลายชนิดและมีหลายส่วนประกอบจากสมุนไพร ซึ่งได้สอดคล้องกับงานวิจัยของศิริภรณ์และคณะในปี 2561 ได้ศึกษาภูมิปัญญาพื้นบ้านในการใช้สมุนไพรจำนวน 27 ชนิด มีการนำส่วนเปลือกของสมุนไพรมาใช้ในการรักษาถึงร้อยละ 37.03 รองลงมาคือส่วนราก ร้อยละ 22.22 และทั้งต้นร้อยละ 14.81 (ศิริภรณ์ มหาโคตร และคณะ, 2561) ซึ่งในงานวิจัยนี้

ศึกษาในตำรับยาสมุนไพรกลุ่มสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ โดยทำหน้าที่การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอนและหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของกรรณิการ์ พุ่มทอง และคณะในปี 2562 ศึกษาสะเดาซึ่งเป็นสมุนไพรในตำรับยาสมุนไพรกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลในระดับที่สูง โดยนำสะเดามาสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีค่าเท่ากับ 137.53 ± 0.02 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิกรัม (กรรณิการ์ พุ่มทอง และคณะ, 2562) และได้สอดคล้องกับงานวิจัยของชารินทร์และคณะในปี 2565 ได้นำขิงนำมาสกัดด้วยเอทานอลแสดงผลของสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีค่าเท่ากับ 10.75 ± 5.13 กรัมแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัด และมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม 5.12 ± 0.96 กรัม เควอซิตินต่อ 100 กรัมสารสกัด (ชารินทร์ แจ้งกลาง และคณะ, 2565)

สรุปผลการวิจัย

ตำรับยาสมุนไพรเป็นกลุ่มยาที่ใช้อาหารในกลุ่มนอนไม่หลับ ประกอบด้วยสมุนไพรหลายชนิด เมื่อนำมาสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Assay และวิธี DPPH assay พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และกลุ่มสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และคาดว่าจะสามารถนำไปประยุกต์หรือพัฒนาในรูปแบบยาอื่นๆ ได้ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและกลุ่มสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ จึงจำเป็นต้องทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างอื่นร่วมด้วยและความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ นักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนผู้ที่มีความเกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ได้ให้คำแนะนำและเทคนิคต่างๆ และกลุ่มงานการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือกโรงพยาบาลเรณูนคร จังหวัดนครพนมที่อนุเคราะห์ตำรับยาสมุนไพรเพื่อใช้ในการวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กรรณิการ์ พุ่มทอง, จินตนา จุลทรศน์, พิชชานันท์ เขียวทองอินทร์ และ ศรัณย์ ฉวีรักษ์. (2562). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกในสมุนไพรรักษาและตำรับยาพื้นบ้านเพื่อลดภาวะของแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน. *วารสารวิจัยสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี*, 8(1), 8-16.
- กุลิสรา อุ่นเจริญ และ วัลลภา ลีตานันทกุล. (2565). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสารสกัดตำรับประสมขมิ้นอ้อยและสมุนไพรรักษาในตำรับ. *วารสารสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดขอนแก่น*. 4(2), 226-238.
- ชารินทร์ แจ้กลาง, ศุภรัตน์ ดวนใหญ่, วรกานต์ โสมิ, สิริภา ทมตะขบ และ ภัสศรี แสงสาย. (2565). การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิก ปริมาณสารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดสมุนไพรรักษา. *วารสารหมอยาไทยวิจัย*. 8(1), 93-106.
- ดำรงคำภีร์สมภูฐานวินิจฉัยและการวินิจฉัย. (2542). *สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างสุขภาพ*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์สุขภาพการพิมพ์.
- ณัชชา เต็งเต็มวงศ์. (2564). ประสิทธิภาพและความปลอดภัยของตำรับยาสมุนไพรรักษาโรคในโรคนอนไม่หลับเรื้อรัง : การศึกษาย้อนหลังเบื้องต้นในโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร์. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, 19(2), 331-343.
- นกน้อย ชูคงคา, ธัญวรัตน์ พานแก้ว, ณัฏญญา พลเสน และ ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย. (2554). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน 3 ชนิด. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 42(3), 339-342.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. (2556). อนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21(3), 275-286.
- ศิริภรณ์ มหาโคตร, สุจารี พนมเขต, บรรลือ สังข์ทอง, วิจิต ประกายหาญ และ กฤษณ์ พงษ์พิรุฬห์. (2561). ภูมิปัญญาพื้นบ้านการใช้สมุนไพรรักษาโรคแผลเปื่อยในช่องปาก : กรณีศึกษาจังหวัดกาฬสินธุ์. น. 104-112. ใน: การประชุมวิชาการนำเสนอประสบการณ์และงานวิจัยการแพทย์ทางเลือกในระบบบริการสุขภาพ ครั้งที่ 1. วันที่ 6-8 มิถุนายน 2561. กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, นนทบุรี.

- สุชาดา มานอก และ ปวีณา ลิ้มเจริญ. (2558). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร. *วารสารก้าวหน้าทางโลกวิทยาศาสตร์*. 15(1), 106-117.
- สุมิตา นิยมเดชา. (2564). การศึกษาสารพฤกษเคมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และวิธีการแยกสารสำคัญในกัญชาเพื่องานทางนิติวิทยาศาสตร์. (วิทยานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศิลปากร).
- สำนักงานคุ้มครองภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย. (2544). *กรมการพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. คัมภีร์ธาตุพระนารายณ์ฉบับใบลาน (ตำรับพระโอสถพระนารายณ์)*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก ในพระบรมราชูปถัมภ์ กรุงเทพฯ.
- Adwas, A. A., Elsayed, A., Azab, A. E., & Quwaydir, F. A. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 6(1), 43-47.
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
- Arung, E. T., Kusuma, I. W., Purwatiningsih, S., Roh, S. S., Yang, C. H., Jeon, S., & Kondo, R. (2009). Antioxidant activity and cytotoxicity of the traditional Indonesian medicine Tahongai (*Kleinhovia hospita* L.) extract. *Journal of acupuncture and meridian studies*, 2(4), 306-308.
- Atanassova, M., Georgieva, S., & Ivancheva, K. (2011). Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 46(1), 81-88.
- Dinakaran, S., Sridhar, S., & Eganathan, P. (2016). Chemical composition and antioxidant activities of black seed oil (*Nigella sativa* L.). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(11), 4473.

- Gogoi, B., Bordoloi, M., & Sharma, H. K. (2023). Ethnomedicinal, phytochemistry, pharmacological, and clinical uses, of *Cinnamomum bejolghota* (Buch.-Ham.) Sweet. *Journal of Herbal Medicine*, 100721.
- Li, Y. R., Fu, C. S., Yang, W. J., Wang, X. L., Feng, D., Wang, X. N., & Shen, T. (2018). Investigation of constituents from *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl and evaluation of their anti-inflammatory properties in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of ethnopharmacology*, 221, 37-47.
- Martin-Santos, R., Crippa, J. A., Batalla, A., Bhattacharyya, S., Atakan, Z., Borgwardt, S., Allen, P., Seal, M., Langohr, K., Farré, M., Zuardi, A. W., & McGuire, P. K. (2012). Cute effects of a single, oral dose of d9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. *Current pharmaceutical design*, 18(32), 4966-4979.
- Ozsoy, N., Yilmaz, T., Kurt, O., Can, A., & Yanardag, R. (2009). *In vitro* antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. *Food chemistry*, 116(4), 867-872.
- Okuda, T., & Ito, H. (2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16(3), 2191-2217.
- Stasiłowicz-Krzemien, A., Sip, S., Szulc, P., Walkowiak, J., & Cielecka-Piontek, J. (2023). The antioxidant and neuroprotective potential of leaves and inflorescences extracts of selected hemp varieties obtained with scCO₂. *Antioxidants*, 12(10), 1827.