การเปรียบเทียบคุณภาพสมุนไพร ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดเปลือกต้นสะเดา ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ตามตำราเภสัชกรรมแผนไทย

Comparison of Herbal Quality, Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of Neem Bark Extracts Harvested at Different Times According to Thai Traditional Pharmaceutical Textbooks

สุทธินันท์ ขันแก้ว[1], นวพร พิมรัตน์[2*], ภาวริน พึ่งสติ[1], อัทธยา ชาครียสกุล[1], ฐิติกานต์ มากสิน[1], ธนภูมิ สุวรรณเรืองศรี[1]
Suttinan Khankaew[1], Navaporn Pimrat[2*], Phawarin phungsati[1], Atthaya Chakreeyasakul[1], Thitikarn Marksin[1], Thanapoom Suwannarueangsri[1]
นักศึกษา สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์[1]
Student of Applied Thai Traditional Medicine [1]
อาจารย์ สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ สถาบันร่วมผลิตคณะการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร มหาวิทยาลัยบูรพา กับวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี สถาบันพระบรมราชชนก[2]
Lecturer of Applied Thai Traditional Medicine under the Cooperation of Faculty of Abhaibhubejhr Thai Traditional Medicine, Burapha University and Abhaibhubejhr Collage of Thai Traditional Medicine Prachinburi, Praboromarajchanok Institute [2]

(Received: November 7, 2024; Revised: April 4, 2025; Accepted: June 25, 2025)

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพสมุนไพรตามมาตรฐานสมุนไพรของ Thai Herbal Pharmacopoeia, ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content), ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 80 % เอทานอล ที่เก็บใน 8 ช่วงเวลาด้วยวิธีการควบคุมคุณภาพ แสดงผลลัพธ์โดย mean ± SD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ one-way ANOVA ($p < 0.05$) ผลการวิจัยพบว่า คุณภาพสมุนไพรในแต่ละช่วงเวลามีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์, ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก N2 (ช่วงเวลา 21.00 - 24.00 น.) มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุดโดยมีค่า 983.41 ± 14.83 mg GAE/g dry extract, ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ พบว่า ทั้ง 8 ช่วงเวลา ปริมาณฟลาโวนอยด์ < 20 mg QE/g of dry extract และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ N1 (ช่วงเวลา 18.00 - 21.00 น.) มีค่า IC_{50} = 3.99 ± 0.55 ug/mL ซึ่งไม่สอดคล้องกับทฤษฎีแพทย์แผนไทยที่กล่าวว่าการเก็บสมุนไพรในช่วงเวลา 12.00 - 15.00 น. (D3) และ 21.00 - 24.00 น. (N2) เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเปลือกสมุนไพร ดังนั้นควรมีการทดสอบฤทธิ์ที่สอดคล้องกับสรรพคุณอื่นๆ เพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: เปลือกต้นสะเดา, เก็บยาตามยาม, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ปริมาณฟีนอลิกรวม, ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

*ผู้ให้การติดต่อ (Corresponding e-mail: navaporn@acttm.ac.th)

Abstract

This study aimed to compare herbal quality according to the Thai Herbal Pharmacopoeia standards, total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity of 80% ethanol extracts collected at eight different times periods using quality control methods. The results were presented as the mean ± SD, and data was analyzed using one-way ANOVA ($p < 0.05$). The study found that:

The quality of the herbs at each time point met the standards. The highest levels of phenolic compounds were found in extracts collected at N2 (21:00 - 24:00), with values of 983.41 ± 14.83 mg GAE/g dry extract. For flavonoid content, all eight time periods showed concentrations of less than 20 mg QE/g dry extract. The highest antioxidant activity was observed in N1 (18:00 - 21:00), with an IC_{50} of 3.99 ± 0.55 µg/mL. These findings were not consistent with traditional Thai medical theory, which states that harvesting herbs during the periods of 12:00 - 15:00 (D3) and 21:00 - 24:00 (N2).

Therefore, further studies should be conducted to evaluate other pharmacological activities consistent with its traditional therapeutic uses.

Keywords: Neem Bark, Harvesting Herbs at The Appropriate Times, Antioxidant Activity, Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีแนวโน้มการใช้ยาสมุนไพรอย่างแพร่หลาย การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพรจึงเป็นส่วนสำคัญในการเพิ่มความเชื่อมั่นให้ผู้บริโภคในการเลือกใช้ยาสมุนไพรเพื่อให้ได้สารสำคัญซึ่งมีฤทธิ์ในการบำบัดรักษาในปริมาณที่สูงที่สุด ควรเริ่มจากการควบคุมตั้งแต่กระบวนการปลูก การดูแล จนกระทั่งในเรื่องของการเก็บเกี่ยว ซึ่งสมุนไพรแต่ละชนิดมีวิธีการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกันตามทฤษฎีการเก็บพืชสมุนไพรทั่วไป การเก็บเกี่ยวที่ถูกต้องตามระยะเวลาจะส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพรที่เราจะนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นการเก็บเกี่ยวสมุนไพรจึงต้องคำนึงถึงอายุเก็บเกี่ยว และช่วงเวลาเก็บเกี่ยวที่พืชให้สารสำคัญสูงที่สุด (นรินทร์ ท้าวแก่นจันท์และคณะ, 2017)

ตามหลักการแพทย์แผนไทย การเก็บเกี่ยวสมุนไพรควรกระทำ “ให้ถูกต้น ถูกส่วน ถูกเวลา” โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น การเก็บตามฤดูกาล ทิศ วัน และยาม ซึ่งถูกบันทึกไว้ในตำราเภสัชกรรมแผนไทย และเชื่อว่าหากเก็บในช่วงเวลาที่เหมาะสมจะได้สารสำคัญในปริมาณที่สูงที่สุด ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการบำบัดรักษาโรค นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษาที่สนับสนุนแนวคิดดังกล่าว เช่น งานวิจัยของ Khan *et al*. (2012) ที่รายงานว่าการเก็บส่วนต่างๆ ของทุเรียนเทศ ได้แก่ เปลือกต้น เปลือกราก ใบ และผล ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สะเดาอินเดีย (Azadirachta indica A. Juss) พืชในวงศ์ Meliaceae เป็นสมุนไพรที่มีการใช้แพร่หลายในประเทศไทย มีสรรพคุณในการต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส เชื้อรา และพยาธิ รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านพลาสโมเดียม Muhammad *et al*. (2020) รายงานว่าสารสกัดเอทานอลจากเปลือกต้นสะเดามีฤทธิ์ต้าน Candida albicans อย่างมีนัยสำคัญ โดยให้ผลใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน fluconazole และยังพบว่าสาระสำคัญในเปลือก เช่น flavonoids และ tannins มีบทบาทในการต้านเชื้อรา ซึ่งได้รับการยืนยันจากการศึกษาหลายชิ้นว่ามีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในเปลือก ได้แก่ กลุ่มแทนนิน ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เช่น salicylic acid, gallocatechin, catechin และ epicatechin (Alzohairy, 2016) ทั้งนี้การศึกษาทางพิษวิทยาโดย Ashafa *et al*. (2012) พบว่า สารสกัดเอทานอลจากเปลือกสะเดาในขนาด 0.6 - 2.0 กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว ไม่ส่งผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีในสัตว์ทดลอง จึงถือว่ามีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง

วารสารวิจัยนวัตกรรมและหลักฐานเชิงประจักษ์ทางสุขภาพ, 4(1), 40-49
Journal of Research Innovation and Evidence Based in Healthcare, 4(1), 40-49 ISSN 3057-0336 (Online)

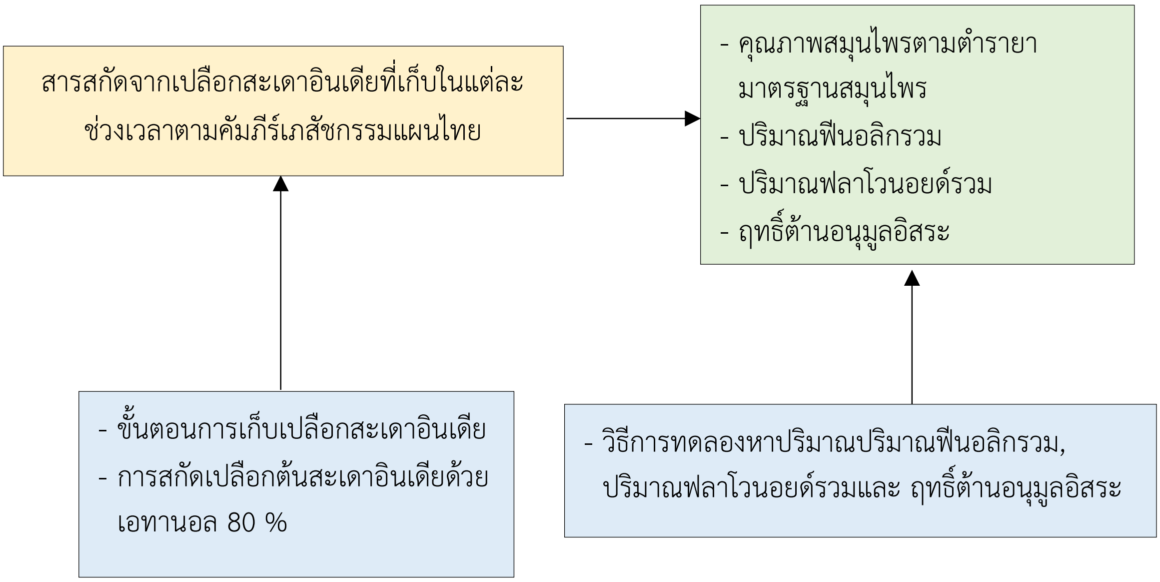
ในปัจจุบันมีการนำเปลือกต้นสะเดามาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายรูปแบบ เช่น การสกัดเป็นยาต้มสมุนไพรรักษาไข้มาลาเรีย การผลิตสารต้านอนุมูลอิสระสำหรับเสริมสุขภาพ การสกัดเป็นยาทาผิวหนังหรือรักษาเชื้อรา และการใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์แปรรูปสมุนไพร เช่น แคปซูลสมุนไพรและเจลล้างมือ โดยอาศัยฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ซึ่งล้วนเป็นการแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเปลือกสะเดาอินเดียในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีคุณภาพและมาตรฐานทางเภสัชกรรม

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเปลือกต้นสะเดานั้นสามารถนำมาสร้างประโยชน์ให้แก่มนุษย์ทั้งในแง่ของการรักษาโรคและการส่งเสริมสุขภาพ ซึ่งกระบวนการเก็บเกี่ยวก็มีอิทธิพลต่อคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพร และจากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบการศึกษาที่มุ่งเน้นเปรียบเทียบการเก็บเปลือกต้นสะเดาตามช่วงเวลาที่แตกต่างกันตามแนวทางแพทย์แผนไทย ซึ่งระบุไว้ในตำราอย่างชัดเจน ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญในการศึกษาการเก็บเกี่ยวสมุนไพรที่สามารถควบคุมแหล่งที่มาให้ได้จากต้นเดียวกัน โดยพิจารณาตามช่วงเวลาเก็บเกี่ยวที่ต่างกันเพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของสมุนไพร ทั้งในด้านปริมาณสารฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปลือกต้นสะเดา ซึ่งจะสามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของสมุนไพรให้มีสารสำคัญสูงสุด และสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพได้อย่างมีประสิทธิผล

วัตถุประสงค์วิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพสมุนไพรตามตำรายามาตรฐานสมุนไพรของเปลือกสะเดาอินเดียที่เก็บในแต่ละช่วงเวลา
2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดด้วยเอทานอล 80 % ของเปลือกสะเดาอินเดียที่เก็บในแต่ละช่วงเวลา
3. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดด้วยเอทานอล 80 % ของเปลือกสะเดาอินเดียที่เก็บในแต่ละช่วงเวลา
4. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดด้วยเอทานอล 80 % ของเปลือกสะเดาอินเดียที่เก็บในแต่ละช่วงเวลา

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ภาพ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัย

1. สารเคมี

Ethanol (EtOH) จากบริษัท C.M.J Anchor Company ประเทศไทย, Deionized water จากบริษัท Milford ประเทศสหรัฐอเมริกา, Hexane จากบริษัทKemaus ประเทศออสเตเรีย, Ethyl acetate, Methanol, Dichloromethane, Butylated hydroxytoluene (BHT) และ Sulfuric acid จากบริษัท Loba chemical ประเทศอินเดีย, Gallic acid และ Folin-ciocalteu reagent จากบริษัท Sisco Research Laboratories ประเทศอินเดีย, 5% Sodium nitrite (NaNO2) และ 10% Aluminum chloride (AlCl3) จากบริษัท LOBA Chemical ประเทศอินเดีย, 1M Sodium hydroxide (NaOH) จากบริษัทFisher chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazy (DPPH) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา, 7% Sodium carbonte (Na2CO3) จากบริษัท Shandong haoyu new meterlal ประเทศจีน

2. การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

สะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica* A. Juss.) อายุ 14 ปี จากสวนพฤกษศาสตร์ของวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี ถูกเก็บเปลือกรอบลำต้นสูงจากพื้น 150 - 200 เซนติเมตร เดือน เมษายน พ.ศ. 2567 ในช่วงเวลาต่างกัน ดังนี้

D1	07.00 - 08.00 น.	N1	19.00 - 20.00 น.
D2	10.00 - 11.00 น.	N2	22.00 - 23.00 น.
D3	13.00 - 14.00 น.	N3	01.00 - 02.00 น.
D4	16.00 - 17.00 น.	N4	04.00 - 05.00 น.

เลขตัวอย่างพรรณไม้ (Voucher specimen) คือ BK085867 พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร นำไปล้างทำความสะอาด จากนั้นอบอุณหภูมิ 65 °c ระยะเวลา 6 ชั่วโมง เก็บในภาชนะที่อุณหภูมิห้อง ตามตำรายาเภสัชกรรมแผนไทย (มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์แผนไทยเดิม, 2559)

3. การควบคุมคุณภาพของสมุนไพร (Department of medical sciences, Ministry of Public Health, 2018)

3.1 การสูญเสียความชื้นหลังการอบแห้ง (Loss on drying)

ชั่งผงเปลือกสะเดา 5 g ใส่ใน Crucible จากนั้นอบอุณหภูมิ 105 °c เป็นเวลา 5 ชั่วโมง รอให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) ชั่งน้ำหนักทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่ คำนวณค่าตามสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักสมุนไพรก่อนอบ}(g) - \text{น้ำหนักสมุนไพรหลังอบ}(g)}{(\text{น้ำหนักสมุนไพรก่อนอบ}(g))} \times 100$$

3.2 สิ่งแปลกปลอม (Foreign matter)

จัดกลุ่มวัตถุดิบเปลือกสะเดา เป็น 4 ส่วน สุ่ม 2 ส่วนที่อยู่ตรงข้ามกันทำซ้ำหลายครั้ง จนได้ปริมาณ 500 g สังเกตสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ สิ่งปฏิกูลจากสัตว์ แมลง เชื้อรา หินดินทราย ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสมุนไพรที่เหลือและสิ่งแปลกปลอมที่พบ คำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละสิ่งแปลกปลอม} = \left(\frac{\text{น้ำหนักสิ่งแปลกปลอม}\ (g)}{\text{น้ำหนักสมุนไพรทั้งหมด}\ (g)}\right)$$

3.3 เถ้าทั้งหมด (Total ash)

ชั่งผงเปลือกสะเดา 2 g ใส่ในถ้วย crucible จากนั้นนำไปเผาในเตาเผาเถ้าที่อุณหภูมิ 450 °c เป็นเวลา 9 ชั่วโมง รอให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ และคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละเถ้าทั้งหมด} = \left(\frac{\text{น้ำหนักเถ้า (g)}}{\text{น้ำหนักสมุนไพรทั้งหมด (g)}}\right) \times 100$$

3.4 สารสกัดที่ละลายในเอทานอล (Ethanol-soluble extractive)

ชั่งผงเปลือกสะเดา 5 g ใส่ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) เติมเอทานอล 100 mL นำไปเขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และแบ่งสารปริมาณ 20 mL ใส่ในชามระเหย (evaporating dish) นำไปวางไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ water bath จนแห้ง แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อน (hot air oven) รอให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่ คำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละปริมาณสารสกัดที่ละลายได้ในเอทานอล} = \left(\frac{\text{น้ำหนักสารสกัด (g)}}{\text{น้ำหนักสมุนไพรทั้งหมด (g)}}\right) \times 100$$

3.5 สารสกัดที่ละลายในน้ำ (Water-soluble extractive)

ชั่งผงเปลือกสะเดา 5 g ใส่ใน ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) เติมน้ำปริมาณ 100 mL นำไปเขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และดูดสารปริมาณ 20 mL ใส่ในชามระเหย (evaporating dish) นำไปวางไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จนแห้ง แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อน (hot air oven) รอให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่ คำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละปริมาณสารสกัดที่ละลายในน้ำ} = \left(\frac{\text{น้ำหนักสารสกัด}}{\text{น้ำหนักสมุนไพรทั้งหมด}}\right) \times 100$$

4. การเตรียมสารสกัด ด้วยวิธี Maceration (Abubakar & Haque, 2020)

ชั่งผงสมุนไพร 15 g ใส่ขวดก้นกลม (duran) ขนาด 250 mL เติม 80% ethanol ให้ท่วมผงยา ปิดปากขวดให้สนิท กรองสารด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ในวันที่ 3, 6 และ 9 และเติม 80% ethanol ให้ท่วมผงยาใหม่อีกครั้ง รวมสกัดเป็นเวลา 9 วัน จากนั้นนำสารสกัดที่กรองได้ทั้งหมดมารวมกันและนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อทำการวิจัยต่อไป คำนวณร้อยละน้ำหนักสารสกัดสมุนไพร ดังนี้

$$\text{ร้อยละ Yield} = \frac{\text{ผงสารสกัดที่แห้งแล้ว (g)}}{\text{น้ำหนักของสมุนไพรเริ่มต้น (g)}} \times 100$$

5. การหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetry (Folin & Ciocalteu, 1927)

สร้างกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้น 1000 - 20 µg/mL ด้วยวิธี 2 fold dilution ที่ความ และเตรียมสารละลายสารสกัดเปลือกสะเดาที่ความเข้มข้น 1 mg/mL นำสารละลายสารมาตรฐานหรือสารสกัดเปลือกสะเดาปริมาตร 20 µL เติมใน 96 well plate เติมสารละลาย Folin-ciocaltou reagent (เจือจาง 10 เท่า) ปริมาตร 100 µL เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 10% Na_2CO_3 ปริมาตร 80 µL เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760

ISSN 3057-0336 (Online)

นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Gallic acid

6. การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total Flavonids Content) โดยวิธี Aluminum Chloride Colorimetric Method (ดัดแปลงจาก Tristantini & Amalia, 2019)

สร้างกราฟมาตรฐานโดยการเตรียมสารละลาย quercetin ที่ความเข้มข้น 1000, 800, 600, 480, 240, 120, 100, 80, 60, 40, 20 µg/mL และสารละลายสารสกัดเปลือกสะเดา ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL นำสารละลายปริมาตร 500 µL เติม 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 75 µL, 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 150 µL, 1M NaOH ปริมาตร 500 µL, EtOH ปริมาตร 275 µL ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำการปิเปตสารละลายใส่ลงใน 96 well plate ปริมาตร 100 µL/wells โดยทำซ้ำ 4 หลุม อ่านค่าความดูดกลืนแสง คลื่นความถี่ 510 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย quercetin

7. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (ดัดแปลงจาก Bondet et al. 1997)

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น $6x10^{-5}$ M จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน tert-butylhydroxytoluene (BHT) และ สารสกัดเปลือกสะเดา ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL เจือจางสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100, 50, 10, 1 µg/mL ใน 96 well plate จากนั้นเติมสารละลาย DPPH 100 µL พักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปอ่านค่าความดูดกลืนแสง v ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน

8. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

การวิจัยนี้จะทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งและวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD) และเปรียบเทียบผลลัพธ์โดยใช้สถิติ one-way anova โปรแกรม SPSS

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบคุณภาพสมุนไพรของเปลือกต้นสะเดาอินเดีย ได้แก่ การสูญเสียความชื้นหลังการอบแห้ง (Loss on drying) มีค่าเฉลี่ยปริมาณความชื้นทั้ง 8 ช่วงเวลา ร้อยละ 6.04 ± 0.55, สิ่งแปลกปลอม (Foreign matter) มีค่าเฉลี่ยปริมาณสิ่งแปลกปลอม ทั้ง 8 ช่วงเวลา ร้อยละ 0, ปริมาณเถ้าทั้งหมด (Total ash) มีค่าเฉลี่ยปริมาณเถ้าทั้งหมด ทั้ง 8 ช่วงเวลา ร้อยละ 5.70 ± 0.94, ปริมาณสารสกัดชั้นน้ำ (Water-soluble extractive) มีค่าเฉลี่ยปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ทั้ง 8 ช่วงเวลา ร้อยละ 10.31 ± 1.43, ปริมาณสารสกัดชั้นเอทานอล (Ethanol-soluble extractive) มีค่าเฉลี่ยปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล ทั้ง 8 ช่วงเวลา ร้อยละ 8.06 ± 1.37 จากผลการทดสอบคุณภาพสมุนไพร สรุปได้ว่าเปลือกต้นสะเดาอินเดียที่เก็บในช่วงเวลาที่แตกต่างกันทั้ง 8 ช่วงเวลามีคุณภาพตรงตามมาตรฐานที่ Thai Herbal Pharmacopoeia กำหนด โดยต้องมีค่า การสูญเสียความชื้นหลังการอบแห้ง (Loss on drying) ไม่เกินร้อยละ 10.0 น้ำหนักต่อน้ำหนัก, สิ่งแปลกปลอม (Foreign matter) ไม่เกินร้อยละ 2.0 น้ำหนักต่อน้ำหนัก, ปริมาณเถ้าทั้งหมด (Total ash) ไม่เกินร้อยละ 12.0 น้ำหนักต่อน้ำหนัก, ปริมาณสารสกัดชั้นน้ำ (Water-soluble extractive) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 5.0 น้ำหนักต่อน้ำหนัก, ปริมาณสารสกัดชั้นเอทานอล (Ethanol-soluble extractive) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 3.0 น้ำหนักต่อน้ำหนัก (Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, 2023).

ปริมาณสารฟีนอลิกรวมมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เฉลี่ยของเส้นโค้งการสอบเทียบสารมาตรฐาน Gallic acid มีค่าเท่ากับ 0.9974 (y = 0.002x + 0.0814) ผลการทดสอบสารสกัด 80% ethanol เปลือกต้นสะเดาที่เก็บ 8 ช่วงเวลา พบว่า สารสกัด N2 (21.00 - 24.00 น) แสดงปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือ 983.41 ± 14.83 mg GAE/g dry extract และพบว่าสารสกัด D3 (12.00 - 15.00 น.) มีปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด เท่ากับ 867.97 ± 23.72 mg GAE/g dry extract ซึ่งแตกต่างจากสารสกัดช่วงเวลาอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .05$)

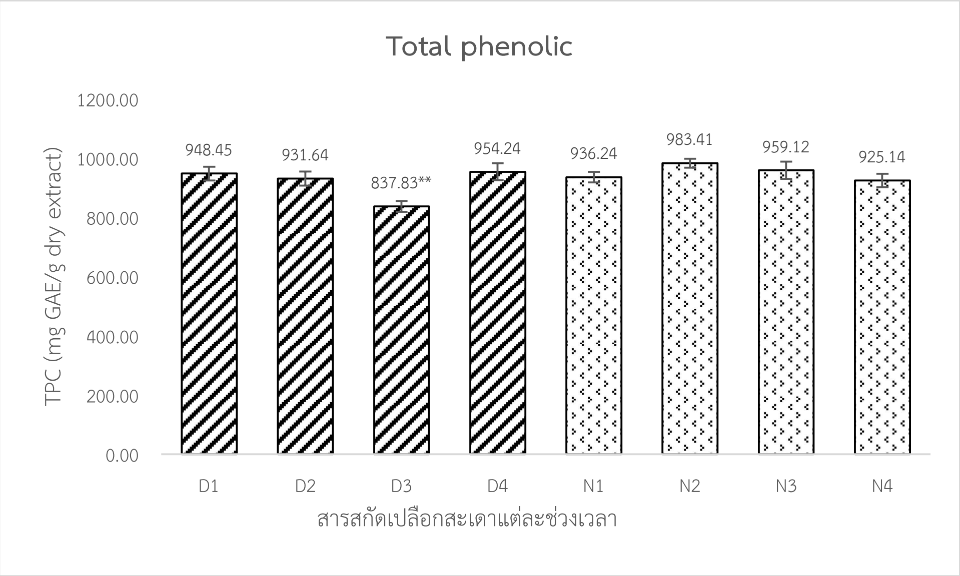
 ISSN 3057-0336 (Online)

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เฉลี่ยของเส้นโค้งการสอบเทียบสารมาตรฐาน quercetin มีค่าเท่ากับ 0.9997 µg/mL (y = 0.0004x + 0.0047) ผลการทดสอบของสารสกัด 80% ethanol เปลือกต้นสะเดาที่เก็บ 8 ช่วงเวลา พบว่าทุกช่วงเวลามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม < 20 mg QE/g of dry extract

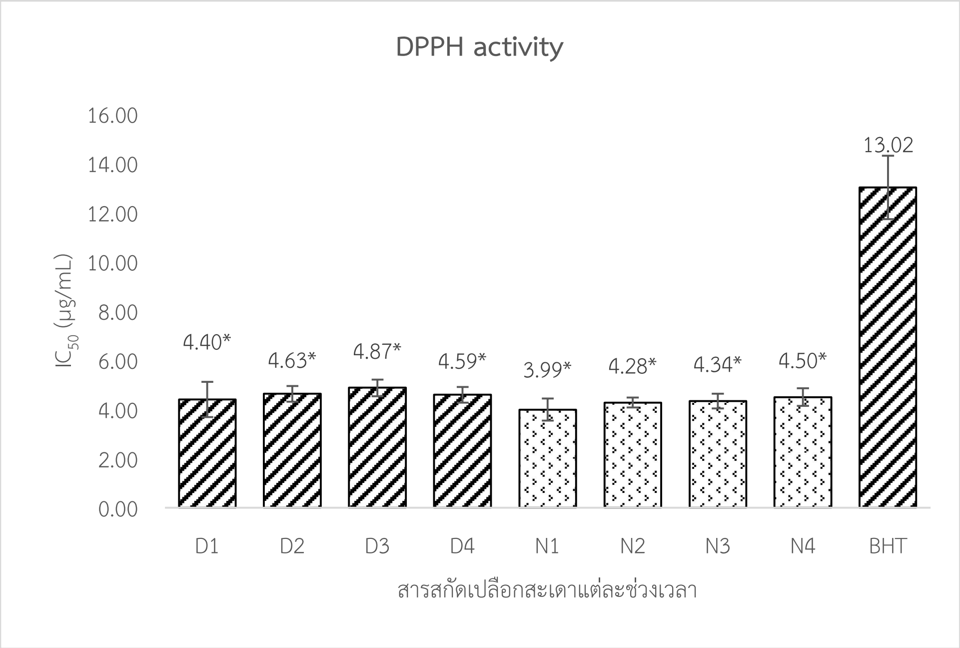
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 80% ethanol เปลือกต้นสะเดา ทั้ง 8 ช่วงเวลามีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.02 µg/mL โดยมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) แต่ระหว่างกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 3.99 ถึง 4.87 µg/mL

ตาราง 1 แสดงผลการทดสอบคุณภาพสมุนไพรของเปลือกต้นสะเดาอินเดีย สรุปได้ว่าเปลือกต้นสะเดาอินเดียที่เก็บในช่วงเวลาที่แตกต่างกันทั้ง 8 ช่วงเวลามีคุณภาพตรงตามมาตรฐานที่ Thai Herbal Pharmacopoeia

หัวข้อ	Loss on drying (ร้อยละ w/w)	Foreign matter (ร้อยละ w/w)	Total ash (ร้อยละ w/w)	ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล (ร้อยละ w/w)	ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (ร้อยละ w/w)	Loss on drying (ร้อยละ w/w)
	ไม่เกิน 10 % w/w	ไม่เกิน 2 % w/w	ไม่เกิน 12 % w/w	มากกว่า 3 % w/w	มากกว่า 5 % w/w	ไม่เกิน 10 % w/w
D1	6.06	0	5.53	8.92	11.81	D1
D2	7.06	0	4.36	6.74	11.37	D2
D3	5.70	0	5.11	6.99	10.56	D3
D4	5.17	0	5.15	7.11	11.90	D4
N1	6.21	0	5.75	9.86	9.58	N1
N2	6.17	0	5.87	8.64	8.94	N2
N3	6.01	0	6.73	8.59	9.29	N3
N4	5.91	0	7.08	7.64	9.05	N4



ภาพ 2 แสดงผลการทดสอบปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัด 80 % เอทานอล เปลือกสะเดาที่เก็บ 8 ช่วงเวลา เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$)
Gallic acid มีค่าเท่ากับ 0.9974 (y = 0.002x + 0.0814)



ภาพ 3 แสดงผลการทดสอบ DPPH ของสารสกัด 80 % เอทานอล เปลือกสะเดาที่เก็บ 8 ช่วงเวลา เปรียบเทียบสารมาตรฐาน BHT มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$)

การอภิปรายผล

คุณภาพสมุนไพรมีคุณภาพตรงตามมาตรฐานที่ Thai Herbal Pharmacopoeia กำหนดเนื่องจากผู้วิจัยได้ยืนยันความถูกต้องของสะเดาจากหน่วยงานพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพและเก็บเกี่ยววัตถุดิบด้วยตนเอง อีกทั้งยังใช้วิธีการเก็บเกี่ยววัตถุดิบตามตำราเภสัชกรรมแผนไทย ซึ่งช่วยให้มั่นใจได้ถึงการคัดเลือกและการจัดการที่เหมาะสมตามกระบวนการมาตรฐาน วิธีการที่มีมาตรฐานตรงตามหลักการนี้ช่วยเพิ่มคุณภาพของสมุนไพร

จากการศึกษาสารสกัด 80% ethanol ของเปลือกต้นสะเดาที่เก็บในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของทุกช่วงเวลาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Duda et al. (2015) ที่ทำการทดสอบพืชสมุนไพร Agastache foeniculum, Lavandula angustifolia, Melissa officinalis and Nepeta cataria ที่เก็บในช่วงเวลา 11.00 น. กับ 16.00 น. พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและฟีนอลิกรวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือ ยาม 2 กลางคืน (N2) สารสกัด N2 ช่วงเวลา 21.00 - 24.00 น. ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของธีร์ หะวานนท์ และ เกียรติสุดา เหลืองวิลัย (2562) ที่พบว่าดอกอัญชันที่เก็บในช่วงบ่ายเวลา 16.00 - 17.00 น. มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุด (43.48 mgGAE/g) ในขณะที่การศึกษาปริมาณความเข้มแสงต่อปริมาณสารฟีนอลิกรวมในใบเตยพบว่าปริมาณความเข้มแสงที่มากที่สุดคือ 45,233 ลักซ์ มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุด (18.19 mgGAE/g) เห็นได้ว่าแสงแดดมีผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกในพืช การเก็บเกี่ยวพืชที่มีสารฟีนอลิกจึงควรเก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แดดแรงซึ่งจะมีความเข้มแสงสูง (นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์ และคณะ.,2560)

ความแตกต่างดังกล่าว อาจเกิดจากสภาพแวดล้อม ฤดูกาล การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยว ที่มีผลต่อการสร้าง สะสม หรือการเปลี่ยนแปลงของสารฟีนอลิก

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าค่า IC50 ของตัวอย่างแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยสารสกัด N1 (กลางคืน) มีค่า IC50 ต่ำที่สุดที่ 3.9907 µg/mL ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ในขณะที่สารสกัด D3 (กลางวัน) มีค่า IC50 สูงที่สุดที่ 4.8727 µg/mL แสดงถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยปริมาณฟีนอลิกที่สูงมีแนวโน้มที่จะแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้น

ISSN 3057-0336 (Online)

จากการทดลองพบว่าสารสกัดเปลือกสะเดาสามารถต้านอนุมูลที่ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของสะเดาที่มีสารกลุ่ม Polysaccharides, Peptidoglycan, Gallic acid, epicatechin, catechin ซึ่งสามารถต้านการอักเสบ (anti-inflammation) กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory) และประกอบด้วยสาร margolone, margolonone, isomargolonone มีฤทธิ์ในการยังยั้งแบคทีเรีย (antibacterial) (Uzzaman, 2020) ดังนั้นจึงควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ anti-inflammatory, antibacterial และ immunomodulatory ซึ่งสอดคล้องกับสรรพคุณของเปลือกสะเดาตามทฤษฎีแพทย์แผนไทยกำหนดไว้

แสดงให้เห็นว่าการเก็บสมุนไพรในช่วงเวลาที่แตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญในพืช ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีของแพทย์แผนไทยเกี่ยวกับการเก็บสมุนไพรตามช่วงเวลาที่เหมาะสม ทฤษฎีนี้ระบุว่า การเก็บสมุนไพรในช่วงเวลาที่ถูกต้องจะทำให้ได้สรรพคุณยาที่ดีที่สุด โดยอิงจากสภาวะแวดล้อม เช่น เวลากลางวันและกลางคืน ฤดูกาลและทิศทาง ซึ่งแพทย์แผนไทยเชื่อว่าช่วงเวลาต่าง ๆ ส่งผลต่อความเข้มข้นของสารประกอบในพืช จากการศึกษาสารสกัด 80% ethanol ของเปลือกต้นสะเดาที่เก็บในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

การนำผลการวิจัยไปใช้

จากผลการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนากระบวนการควบคุมคุณภาพสมุนไพร โดยเฉพาะในด้านการกำหนดช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวตามองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อให้ได้วัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพสูงสุด ซึ่งสามารถช่วยเสริมสร้างมาตรฐานในการผลิตสมุนไพรของการแพทย์แผนไทยได้อย่างเป็นระบบและมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับ

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

1. ควรคำนึงถึงฤดูการเก็บเกี่ยวร่วมกับการเลือกเก็บสมุนไพรตามยามตามตำราแพทย์แผนไทย เพื่อให้ได้สารสำคัญที่สามารถแสดงปริมาณได้อย่างแน่ชัด
2. ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงปริมาณสารสำคัญกลุ่มอื่นที่พบในเปลือกต้นสะเดา เช่น bakayanin nimbosterin, nim Oil เป็นต้น รวมถึงวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอื่น ที่แตกต่างกัน ได้แก่ ABTS และ FRAP เพื่อยืนยันผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
3. ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ Anti-Inflammation, Anti bacteria และ Anti-viral เพื่อให้สอดคล้องกับสรรพคุณอื่นๆ ของเปลือกต้นสะเดา

รายการอ้างอิง

ธีร์ หะวานนท์, & เกียรติสุดา เหลืองวิลัย. (2562). ผลของเวลาเก็บเกี่ยวและฤดูกาลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสารฟีนอลิกทั้งหมดในดอกอัญชัน. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า, 37*(4), 133-160.

นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์, ภาวิณี อารีศรีสม, เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์, วาริน สุทนต์, และ กอบลาภ อารีศรีสม. (2560). ผลของอายุการเก็บเกี่ยวและความเข้มแสงต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบเตยหอม. *แก่นเกษตร, 45*(3), 433-438.

มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์แผนไทยเดิมฯ โรงเรียนอายุรเวท (ชีวกโกมารภัจจ์). (2548). *ตำราเภสัชกรรมไทย* (พิมพ์ครั้งที่ 1). พิฆเณศ พริ้นติ้ง เซ็นเตอร์.

Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 12*(1), 1-10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19

Alzohairy, M. A. (2016). Therapeutic role of Azadirachta indica (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,2016*, 1-11. https://doi.org/10.1155/2016/7382506

Ashafa, A. O. T., Yakubu, M. T., Grierson, D. S., & Afolayan, A. J. (2012). Toxicological evaluation of the aqueous extract of Azadirachta indica stem bark in Wistar rats. *African Journal of Biotechnology, 11*(22), 6112-6118. https://doi.org/10.5897/AJB11.4144

Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. L. W. T. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, *30*(6), 609-615. https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240

Department of medical sciences, Ministry of Public Health. (2018). *Thai Herbal Pharmacopoeia 2018*. The Agricultural Co-operative Federation of Thailand.

Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. (2023). *Thai Herbal Pharmacopoeia 2021 Supplement 2023*. Bangkok: Author.

Duda, S. C., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D., Duda, M., Mărgăoan, R., & Bobiş, O. (2015). Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of Agastache foeniculum, Lavandula angustifolia, Melissa officinalis and Nepeta cataria: Effect of harvest time and plant species. *Industrial Crops and Products*, *77*, 499-507. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.045

Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627-650.

Khan, M. R., Kihara, M., Omoloso, A. D., & Akhtar, S. (2012). Antioxidant activity of different parts of Annona muricata (soursop). *Journal of Medicinal Plants Research, 6*(31), 4591-4599. https://doi.org/10.5897/JMPR11.1172

Muhammad, H. L., Yusuf, A. M., & Abdulkadir, U. (2020). Phytochemical screening and antioxidant activities of Azadirachta indica bark extract and its fractions. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences, 19*(2), 123-132.

Tristantini, D., & Amalia, R. (2019). Antioxidant activity of plant extracts using DPPH method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 299*(1), 012021. https://doi.org/10.1088/1755-1315/299/1/012021

Uzzaman, S. (2020). Pharmacological activities of neem (Azadirachta indica): A review. *International Journal of Pharmacognosy and Life Science*, 1(1): 38-41. https://doi.org/10.33545/27072827.2020.v1.i1a.8.