ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าข่าลิง
Antioxidative Effect of *Alpinia Conchigera* Rhizome Extracts

นิพนธ์ต้นฉบับ **Original Article**

นพวัฒน์ เพ็งค่าศรี, จัตุพล กันทะมูล, ภัทราภรณ์ โตวัฒนกิจ, วชิรวิทย์ วงศ์ษารัฐ, วนิดา ใจหมั่น, นิภาพร เมืองจันทร์ และ สุภารัตน์ จันทร์เหลือง*

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

* **ติดต่อผู้นิพนธ์:** s_chanluang@yahoo.co.th

วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2554;6(3):195-201

Noppawat Pengkumsri, Chattupol Kantamul, PattarapornTowattanakit, Wachirawit Wongsarat, Wanida Jaiman, Nipaporn Muangchan and Suparat Chanluang*

Faculty of Pharmaceutica Sciences, Ubonratchathani University, Warinchumrab, Ubonratchathani 34190 Thailand

* **Corresponding author:** s_chanluang@yahoo.co.th

Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2011;6(3):195-201

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเฮกเซน (hexane) เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) และเมทานอล (methanol) และศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวของสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทิลอะซิเตทในหนูขาว **วิธีการศึกษา:** สกัดสารจากเหง้าข่าลิงโดยวิธีเปอร์โคเลชันด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล วัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลองด้วย DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันไลโนเลอิกที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดด้วยความร้อน ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในสัตว์ทดลองโดยเหนี่ยวนำให้หนูขาวเกิดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ในวันสุดท้ายหลังได้รับสารสกัดข่าลิงชั้นเอทิลอะซิเตทในขนาด 100, 200 และ 500 มก./กก. ทุกวันนาน 28 วัน เก็บตับและสมองเพื่อวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ **ผลการศึกษา:** สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดคือ 120.44 ± 0.01 มคก./มก. ผลการศึกษาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระพบค่า IC50 เท่ากับ 12.32 ± 0.28 มคก./มก. เมื่อทดสอบด้วย DPPH assay และมีค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) เท่ากับ 26.02 ± 1.92 มิลลิโมลาร์/มก. เมื่อทดสอบด้วย ABTS assay ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วย FRAP assay มีค่า FRAP value 1.16 ± 0.05 ไมโครโมลาร์/มก. สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทิลอะซิเตทสามารถลดการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันไลโนเลอิกที่ถูกเหนี่ยวนำโดยความร้อนในขณะเก็บได้ สารสกัดดังกล่าวทุกขนาดสามารถลดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตับและสมองของหนูขาวได้ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ **สรุป:** สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทิลอะซิเตทเมื่อทดสอบในหลอดทดลองมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี จึงควรศึกษาเพื่อหาโครงสร้างสารสำคัญ กลไกการออกฤทธิ์ และความปลอดภัย เพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป

คำศัพท์ที่สำคัญ: เหง้าข่าลิง, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม, คาร์บอนเตตระคลอไรด์, มาลอนไดอัลดีไฮด์

Abstract

Objectives: To investigate the antioxidative effect of *Alpinia conchigera* rhizome extracts in hexane, ethyl acetate, and methanol and to study such effect of ethyl acetate fraction in male Wistar rats. **Methods:** *Alpinia conchigera* rhizomes were extracted by percolation with hexane, ethyl acetate, and methanol, respectively. Total phenolic content of each fraction was determined. *In vitro* studies of antioxidative effect of 3 fractions were investigated using DPPH, ABTS, and FRAP assay. Antilipid peroxidation effects were evaluated using heat induced linoleic acid peroxidation. *In vivo* antioxidative effect of ethyl acetate fraction was studied in oxidative stress male Wistar rats induced by carbon tetrachloride at the last day after each extract was given orally (100, 200 or 500 mg/kg) consecutively for 28 days. The liver and brain were harvested and prepared for malondialdehyde (MDA) content assay. **Results:** The highest total phenolic content was shown in ethyl acetate fraction at 120.44 ± 0.01 µg/mg. Free radical scavenging activity of ethyl acetate fraction was revealed as IC50 at 12.32 ± 0.28 µg/mL for DPPH assay and TEAC value at 26.02 ± 1.92 µg/mg for ABTS assay. The reducing power of ethyl acetate fraction expressed as FRAP value was 1.16 ± 0.05 µM/mg. The ethyl acetate fraction decreased peroxidation of linoleic acid induced by heat during storage. The results of *in vivo* antioxidant study indicated that each dose in ethyl acetate fraction did not significantly reduce the amount of liver and brain MDA. **Conclusion:** *Alpinia conchigera* rhizome ethyl acetate extract showed antioxidative effect *in vitro*; therefore, chemical compound, mechanism of action, and toxicity for new drug development should be further evaluated.

Keywords: *Alpinia conchigera*, rhizome, antioxidative effect, total phenolic content, carbontetrachloride, malondialdehyde

บทนำ

อนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการต่างๆในร่างกาย รวมถึงการได้รับจากสิ่งแวดล้อม เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสื่อมของร่างกาย ความเจ็บป่วยและโรคภัยต่าง ๆ ขึ้น เมื่ออนุมูลอิสระมีจำนวนมากในร่างกาย ส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ โดยมีผลต่อสารชีวโมเลกุลที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน ปกติภายในร่างกายของเรามีกลไกป้องกันการโจมตีจากอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นในร่างกาย เช่น เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเทส (superoxide dismutase) คะตะเลส (catalase) กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathionperoxidase) เป็นต้น แต่ถ้าจำนวนอนุมูลอิสระมีมากเกินไปหรือการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอ จำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก สารต้านอนุมูลอิสระที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี วิตามินเอ ซีลีเนียม เบต้าแคโรทีน และพฤกษเคมีต่าง ๆ เช่น สารในกลุ่มโพลีฟีนอล ไอโซ ฟลาโวน เป็นต้น ในปัจจุบันมีการนำสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาใช้เป็นจำนวนมาก เช่น

กระเทียม[1] หัวหอม[2] ชา ขิง และมะเขือเทศ[3] องุ่น[4] เป็นต้น ข่าลิง หรือข่าป่า (*Alpinia conchigera* Griff.) เป็นพืชในสกุลข่า (*Alpinia* spp.) ที่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเหมือนกับพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกัน Elsaawely และคณะ (2007)[5] ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกและเมล็ดของ *Alpinia zerumbet* โดยวิธีวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH assay) พบว่าสารสกัดชั้นเอทธิลอะซิเตท (ethyl acetate) มีฤทธิ์แรงที่สุด และสารสกัดชั้นเอทธิลอะซิเตทจากใบและรากของ *Alpinia zerumbet* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แรงเช่นกัน[6] เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Wong และคณะ (2009)[7] เมื่อศึกษาด้วยวิธีเดียวกัน ส่วนในปี 2004 Mohamad และคณะ[8] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH assay ของผล *Alpinia rafflesiana* พบสารสำคัญในสารสกัดผลแห้งชั้นเมทานอล (methanol) คือ 2,3,4,6-tetrahydroxy- chalcone และมีค่า 50% inhibitory concentration (IC_{50}) เท่ากับ 55 ไมโครโมลาร์ และยังมีรายงานฤทธิ์ดังกล่าวของพืชในสกุลนี้อีกเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข่าลิงในหลอดทดลอง หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องการทำลายเนื้อเยื่อไขมันในหนูขาวที่ได้รับคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (carbontetrachloride; CCl_4) ของสารสกัดชั้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด

วิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์สำคัญที่ใช้ในการศึกษาเช่น rotary evaporator (Buchi, ประเทศสวิทเซอร์แลนด์), spectrophotometer (odyssey รุ่น 59000-02, ประเทศอิตาลี), homogenizer รุ่น 3431-J75 (Thomas Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Heraeus, ประเทศเยอรมัน) เข็มป้อนยาสัตว์ทดลอง ชุดเครื่องมือผ่าตัด สารเคมี เช่น vitamin C, thiobarbituric acid (TBA), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) จาก Sigma-Aldrich (ประเทศเยอรมัน) potassium persulfate, carbontetrachloride และ gracial acetic จาก Carlo (ประเทศอิตาลี) vitamin E และ trolox, 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) จาก Acros (ประเทศเบลเยียม) ferrous chloride, ferric chloride hexahydrate, peroxosulphate, และ Folin–Ciocalteu reagents จาก Fluka (ประเทศสวิทเซอร์แลนด์) ส่วน 2, 2-Azino-bis (3-ethylbenzothialine-6-sulfonic acid; ABTS) ได้จากบริษัท Wako (ประเทศญี่ปุ่น)

สมุนไพรและสัตว์ทดลอง

สมุนไพร

เหง้าข่าลิงที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์จากนักพฤกษศาสตร์ ตัวอย่างแห้งของข่าลิงเก็บไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สกัดสารจากเหง้าข่าลิง (rhizome) ด้วยเฮกเซน เอทธิลอะซิเตท และเมทานอล โดยวิธีหมักแบบเปอร์โคเลชัน (percolation) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ล้างเหง้าข่าลิงให้สะอาดหั่นเป็นชิ้นเล็ก อบที่ 45 °C เป็นเวลา 3 วันจนแห้ง บดละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร ชั่งน้ำหนักผงแห้ง 1 กิโลกรัม ห่อด้วยผ้าขาวบางใส่ลงในคอลัมน์ เติมตัวทำละลาย hexane พอท่วม ปิดฝาทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ได้และทำซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมดกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 2 ทำให้แห้งด้วย rotary evaporator จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณปริมาณสารสกัดที่ได้ หลังจากนั้นผึ่งผงสมุนไพรที่เหลือให้แห้ง และสกัดด้วยวิธีเดียวกันแต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเอทธิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ

สัตว์ทดลอง

หนูขาว (Wistar rat) เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ น้ำหนักระหว่าง 120–150 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เลี้ยงในกรงสัตว์ทดลองที่ได้รับมาตรฐาน กินอาหารเม็ดสำเร็จรูปตามมาตรฐานของสำนักสัตว์ทดลอง และดื่มน้ำกรองตลอดเวลา เปลี่ยนอาหารและน้ำดื่มทุกวัน สภาวะแวดล้อมในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองคืออุณหภูมิ 25 ± 2 °C ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60 ความมืด/สว่าง 12/12 ชั่วโมง และปล่อยให้หนูปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ 7 วัน ก่อนการทดลอง

วิธีการทดลอง

1) การศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบ *In vitro*

1.1) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)[9]

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยใช้ Folin-Ciocalteu colorimetric method อาศัยหลักการที่สารประกอบฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับกรดฟอสโฟทังสติก (phosphor-tungstic acid) และกรดฟอสโฟโมลิบดิก (phosphomolybdic acid) เกิดเป็นสารประกอบที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน

1.2) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity assay[10]

เป็นการวัดความสามารถของสารในการรีดิวซ์ $DPPH^{\cdot}$ (100 ไมโครโมลาร์ในเมทานอล) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระสีม่วง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ไปเป็นเป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว (20 นาทีที่ที่อุณหภูมิห้อง) คำนวณเป็น % inhibition ของสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (% inhibition = $[(Abs_{DPPH} - Abs_{DPPH+test}) \times 100] / Abs_{DPPH}$) เขียนกราฟระหว่าง % inhibition และความเข้มข้น เพื่อหาค่า IC_{50} เตรียมสารละลายเผื่อใช้ (stock solution) ของวิตามินซี (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดเผื่อใช้ของสมุนไพร (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ด้วยเมทานอล

1.3) ABTS (2,2'-azinobis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) assay[11]

สารละลายเผื่อใช้ของ ABTS (7 มิลลิโมลาร์) เป็นสารที่คงตัว แต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย potassium peroxide จะทำให้ ABTS เปลี่ยนไปเป็นอนุมูล $ABTS^{+\cdot}$ ที่มีสีฟ้าเขียว ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระบบจะทำให้อนุมูล $ABTS^{+\cdot}$ เปลี่ยนกลับมาเป็น ABTS (6 นาที) ทำให้การดูดกลืนแสงลดลง ศึกษาเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ โทลอกซ์ (trolox; 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในเมทานอล) สารสกัดเผื่อใช้ของสมุนไพร (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แสดงผลเป็นความสามารถต้านอนุมูลอิสระเทียบกับโทลอกซ์ (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; TEAC)

1.4 Ferric reducing ability power (FRAP) assay[12]

FRAP assay เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรับอิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) โดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method โดยที่ ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) complex จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ ทำให้เกิด Fe^{2+}-TPTZ complex (10 นาที) ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้มดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จึงสามารถใช้วัด total reducing power ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ได้ เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ โทลอกซ์ (trolox; 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในเมทานอล) ใช้สารละลายมาตรฐาน $FeSO_4$ (50-1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรใน 40 มิลลิโมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก) สร้างกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณ Fe^{2+} ที่เกิดจากปฏิกิริยาของโทลอกซ์หรือสารสกัดสมุนไพร แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า FRAP value ซึ่งหมายถึง ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+}ของสาร นั่นคือถ้าสารใดมีค่า FRAP value สูงก็จะสามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้สูง

1.5) Ferric thiocyanate assay (FTC assay)[13,14]

เป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันไลโนเลอิก (5 %v/v ใน 95% ethanol) ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระโดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 °C วัดปริมาณของเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ ที่เกิดในช่วงแรกของปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมัน โดยเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ ferrous chloride เกิดเป็น ferric ion แล้ว ferric ion จะรวมตัวกับ thiocyanate เกิดเป็น ferric thiocyanate (สีแดง) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร คำนวณเป็นร้อยละการยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยใช้สูตร lipid peroxidation inhibition (%) = 100 - $[(A_{sample}/A_{control}) \times 100]$

2) การศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบ *In vivo*

2.1) การให้สารทดสอบแก่หนูขาว

แบ่งหนูขาวออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัวและให้สารทดสอบติดต่อกันเป็นเวลา 28 วันดังนี้คือ กลุ่มหนูปกติ กลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลาย กลุ่มควบคุมได้รับวิตามินอี (300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) กลุ่มทดสอบที่ได้รับสารสกัดข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตท ในขนาด 100, 200 หรือ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ และในวันที่ 28 หนูขาวทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่มหนูปกติได้รับคาร์บอนเตตระคลอไรด์ในขนาด 300 ไมโครลิตร/กิโลกรัม โดยฉีดเข้าช่องท้อง[15]

2.2) การประเมินฤทธิ์ต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในตับและสมอง[16]

ปั่นบดตับและสมองที่ได้จากหนูขาวที่ได้รับสารต่างๆดังกล่าวข้างต้นในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ที่เย็นในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ด้วยเครื่อง homogenizer วิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA) ที่เป็นผลผลิตจากการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับสาร TBA ในสภาวะที่เป็นกรดและอุณหภูมิสูง ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพู thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเนื้อตับและสมองแสดงผลเป็น นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน (nmol MDA/mg protein) ซึ่งวัดโดยวิธี Lowry[17] วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางสถิติด้วยวิธี One way ANOVA และ post hoc ด้วย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value < 0.05)

การศึกษานี้เป็นหนึ่งการศึกษาในชุดงานวิจัยเรื่องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของข่าลิง ซึ่งได้รับความเห็นชอบจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ผลการศึกษา

สารสกัดจากเหง้าข่าลิงหลังจากสกัดด้วยการหมักแบบเปอร์โคเลชันดังนี้ ปริมาณของสารสกัด ชั้นเฮกเซน เอทธิลอะซิเตท และเมทานอล คิดเป็นร้อยละ 4.06, 2.17 และ 6.55 ของน้ำหนักผงแห้งตามลำดับ ซึ่งสารสกัดที่ได้ลักษณะข้นหนืด สีน้ำตาลดำ

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือ สารสกัด 1 กรัมมีปริมาณสารฟีนอลรวมเทียบเท่ากับกรดแกลลิก 120.44 ± 0.01 มิลลิกรัม ส่วนสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเฮกเซน และเมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม รองลงมาคือ 34.80 ± 0.05 และ 23.06 ± 0.01 มิลลิกรัม ตามลำดับ

ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน: *In vitro*

เมื่อทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตท มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.32 ± 0.28 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี ABTS assay สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตทที่มีค่า TEAC สูงที่สุดคือ 26.02 ± 1.92 มิลลิโมลาร์/มิลลิกรัม และพบความสามารถเป็นตัวรับอิเล็กตรอนของสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตทมีค่าเท่ากับ Fe^{3+} 1163.30 ± 47.71 ไมโครโมลาร์/มิลลิกรัม แสดงว่าสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแรงที่สุด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าข่าลิงเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay

สารทดสอบ	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่าง ๆ (mean ± SD)†		
	IC_{50} of DPPH (µg/ml)	TEAC value (mM/mg compound)	FRAP value (mM/mg compound)
วิตามินซี	2.59 ± 0.42	NT	NT
โทลอกซ์	3.91 ± 0.38	-	9.924 ± 0.081
สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตท	12.32 ± 0.28	26.02 ± 1.92	1.16 ± 0.05
สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเมทานอล	71.64 ± 2.45 *,$,#	7.75 ± 1.06	0.30 ± 0.01
สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเฮกเซน	54.48 ± 6.89 *,$,#,	2.87 ± 0.88	0.18 ± 0.02

† n = 3

* P < 0.05 เทียบกับวิตามินซี, $ P < 0.05 เทียบกับโทลอกซ์, # P < 0.05 เทียบกับสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตท

TEAC = trolox equivalent antioxidant capacity; NT = not tested

การทดสอบความสามารถในการต้านการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันไลโนเลอิกที่ถูกกระตุ้นให้เกิดด้วยความร้อนในขณะเก็บ พบว่าการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เก็บ ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 3 ของการทดสอบ สารทดสอบทุกชนิดสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันได้ โดยโทลอกซ์สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันได้สูงสุดคือ ร้อยละ 50.74 ± 5.86 และสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตทสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากชั้นอื่น คือ ร้อยละ 43.68 ± 4.59 และประสิทธิภาพในการลดการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันลดลงในวันที่ 6 ของระยะเวลาทดสอบ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดเหง้าข่าลิง

สารทดสอบ	การยับยั้ง lipid peroxidation (% as mean ± SEM)	
	วันที่ 3	วันที่ 6
โทลอกซ์	50.74 ± 5.86	43.08 ± 2.28
สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตท	43.68 ± 4.59	28.11 ± 3.08
สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเมทานอล	31.48 ± 6.71	7.78 ± 6.40
สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเฮกเซน	39.42 ± 5.37	24.94 ± 4.35

ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน: *In vivo*

ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในสมอง

ปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์เป็นตัวชี้วัดการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ในเนื้อสมองของหนูปกติมีค่า เท่ากับ 0.0675 ± 0.0022 นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน ส่วนหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับคาร์บอนเตตระคลอไรด์มีปริมาณ มาลอนไดอัลดีไฮด์เท่ากับ 0.1037 ± 0.0066 นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หนูที่ได้รับวิตามินอีติดต่อกันเป็นเวลา 28 วันแล้วได้รับคาร์บอนเตตระคลอไรด์ พบว่ามีระดับของมาลอนไดอัลดีไฮด์ลดลงเป็น 0.0803 ± 0.0039 นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน ส่วนหนูที่ได้รับสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตททุกขนาด สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันได้ โดยมีปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (ตารางที่ 3)

ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตับ

ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเนื้อตับของหนูปกติ เท่ากับ 0.014 ± 0.0013 นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน ส่วนหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับคาร์บอนเตตระคลอไรด์ มีปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ เท่ากับ 0.0204 ± 0.0021 นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และวิตามินอีสามารถลดระดับปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็น 0.0123 ± 0.0021 นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตททุกขนาดสามารถลดระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ลงได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณตามมาลอนไดอัลดิไฮด์ในเนื้อสมองและตับของหนูที่ได้รับสารทดสอบชนิดต่าง ๆ

สารทดสอบ	ปริมาณ malondialdehyde (nmol/mg protein as mean ± SEM)	
	สมอง	ตับ
หนูปกติ	0.0675±0.0022	0.0149±0.0013
กลุ่มควบคุม (corn oil)	0.1037±0.0066*	0.0204±0.0021*
วิตามินอี (300 mg/kg)	0.0803±0.0039	0.0123±0.0021#
สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตท		
100 mg/kg	0.0734±0.0065	0.0162±0.0030
200 mg/kg	0.0556±0.0026	0.0157±0.0030
500 mg/kg	0.0663±0.0105	0.0170±0.0021

* $P < 0.05$ เทียบกับหนูปกติ

# $P < 0.05$ เทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในครั้งนี้ เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจาก DPPH และ ABTS เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร[13] ผลที่ได้จากการทดลองทั้งสองวิธีนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเหง้าข่าลิงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี แต่การทดลองทั้งสองนี้ทำปฏิกิริยาในตัวกลางที่

เป็นสารอินทรีย์ (organic medium) เพราะละลายสารทุกชนิดด้วยเมทานอล แต่ในความเป็นจริงแล้ว เซลล์ในร่างกายของมนุษย์อยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำ หรือมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยน้ำ เพราะฉะนั้นควรมีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในตัวกลางที่เป็นน้ำด้วย[18]

นอกจากนี้ยังศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเหง้าข่าลิง มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ เพื่อให้อยู่ในสภาวะที่เสถียร เนื่องจากสารสกัดเหง้าข่าลิงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จัดว่าเป็นสารสกัดหยาบ ซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิด ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าข่าลิงอาจมาจากสารจำพวกโพลีฟีนอล เช่น แคทิชิน (catechins) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และ แอนโทไซยานิน (anthocyanins) เป็นต้น[13] เนื่องจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ที่พบว่าสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตทที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hakimoglu และคณะ (2007)[19] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Elzaawely และคณะ (2007)[5] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณน้ำมันหอมระเหย (essential oil) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากดอกและเมล็ดของ *Alpinia zerumbet* พบว่าสารสกัดชั้นเอทธิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี นอกจากนี้ผลการศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการเหม็นหืนของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ซึ่งเกิดจากกระบวนการเปอร์ออกซิเดชันของไขมันที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อน ยังพบว่าสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตท มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมัน ที่เป็นสาเหตุของการเกิดเหม็นหืนของน้ำมันในขณะเก็บ

จากผลจากการศึกษาพบว่าสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตทที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม มากที่สุด จัดเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี เป็นทั้งตัวขจัดอนุมูลอิสระ และเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อให้อยู่ในสภาวะเสถียร นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตทมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่เป็นสาเหตุของการเกิดเหม็นหืนของน้ำมันในขณะเก็บ ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันในสัตว์ทดลอง ของสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตท ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระที่ได้จากคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) ซึ่งเป็นส่วนประกอบเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มอวัยวะของเซลล์ (organelles) ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย คาร์บอนเตตระคลอไรด์เป็นสารที่มีพิษต่อตับ เมื่อเข้าไปในร่ายกายแล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยเอนไซม์ CYP_{450} เกิดเป็น trichloromethylperoxyl free radical[20-22] และถูกนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับถูกทำลาย ใช้เป็นรูปแบบในการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ปกป้องตับ ซึ่งมีลักษณะทางพยาธิเหมือนการเกิดตับอักเสบจากไวรัส[23] ในการทำลายเซลล์ตับของอนุมูลอิสระที่เกิดจากคาร์บอนเตตระคลอไรด์ด้วยการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์[24] นั้นทำให้เกิดสารตัวกลางหลายชนิดคือ มาลอนไดอัลดิไฮด์ สารไฮดร็อกซีโนนีนอล (4-hydroxynonenal) และสารคอนจูเกตไดอื่นอีกหลายชนิด (conjugated dienes) เป็นต้น[24]

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีการหาปริมาณมาลอนไดอัลดิไฮด์ ซึ่งเป็นสารตัวกลางชนิดหนึ่งของการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและส่วนใหญ่แล้วเกิดจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว[25] เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง เพราะเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน แต่อย่างไรก็ตามมาลอนไดอัลดิไฮด์ไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันเท่านั้น ยังเกิดได้จากเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยกรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid) เป็นสำคัญ รองลงมาคือ ทอมบิน (thrombin) และบางส่วนได้จากการกระตุ้นของ ADP อิพิเนฟริน (epinephrine) หรือคอลลาเจน (collagen)[26] นอกจากนี้มาลอนไดอัลดิไฮด์ยังสลายตัวง่ายในระหว่างการเก็บ เพราะฉะนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรวัดปริมาณสารดัชนีชี้วัดตัวอื่น ๆ ร่วมด้วย นอกจากนี้ควรวัดระดับของเอนไซม์ในร่างกายที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย เช่น เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเทส คะตะเลส กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส เพื่อศึกษาผลการแสดงออกของยีนในตับ วิตามินอี และสารสกัดเหง้าข่าลิงสามารถลดระดับตามมาลอนไดอัลดิไฮด์ได้แสดงว่ามีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปกป้องการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ จัดเป็นสารที่เพิ่มความแข็งแรงให้เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane stabilizer) หรือการได้รับสารติดต่อกันเป็นเวลานานอาจมีผลกระตุ้นให้เกิดการฟื้นฟูของตับ (hepatic regeneration) ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Hemabarathy และคณะ (2009)[27] ที่พบว่าสารสกัดหยาบของข่า (*Alpinia galanga*) มีฤทธิ์ในการต้านความเป็นพิษต่อตับในหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยยาพาราเซตามอล โดยสามารถลดระดับของมาลอนไดอัลดิไฮด์ และเพิ่มระดับเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

จากการศึกษาของ Pongpiriyadacha และคณะในปี 2008[28] พบว่าสารสำคัญในส่วนเหง้าของสารสกัดข่าลิงได้แก่ สารกลุ่ม phenylpropanoids ได้แก่ 1-acetoxychavicol acetate, chavicol, chavicol acetate, eugenol, terpenoids และ β-bisaboline ซึ่งใช้เป็นสารแต่งกลิ่นหอม มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านเนื้องอก นอกจากนี้ Athamaprasangsa และคณะ (1994)[29] ยังพบ 1-hydroxy, cinnamyl alcohol, 4-acetoxy acetate, cymene para, heptan-3-one 5-hydroxy-7- (4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1-phenyl, heptane-3-5-dione ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารแต่งกลิ่นหอม สารตัวกลางในการสร้างสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ แวกซ์ (wax) เป็นต้น ส่วน 1-7-diphenyl kaempferide เป็น kaemferol glycoside ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม conjugated flavonoids ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[30] และจากการศึกษาหาสารสำคัญ

ด้วยวิธี gas chromatography mass spectrometry ในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงของ Bhuiyan และคณะ ในปี 2010[31] พบสารประกอบหลักเป็นสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoids) คือ eucalyptol, chavicol, β-pinene, และ caryophyllene เป็นต้น ซึ่งสารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ใช้เป็นสารแต่งกลิ่นหอม (fragrance) ดังนั้นเพื่อพัฒนาสารจากสมุนไพรมาใช้เป็นยา ควรมีการศึกษาต่อยอดเพื่อทราบถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้ในครั้งนี้เป็นผลจากสารสำคัญชนิดใด และศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ รวมถึงศึกษาความปลอดภัยต่อไปทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนทั้งเงินทุนและเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 2001; 131(3):1010S-10105S.
2. El-Demerdash FM, Yousef MI, Abou El-Naga NI. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2005;43:57-63.
3. Afshari AT, Shirpoor A, Tarshid A, et al. The effect of ginger on diabetic nephropathy, plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation in rats. *Food Chem* 2007;101:148-153.
4. Jayaprakasha GK, Selvi T, Sakariah KK. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extractss. *Food Res Int* 2003; 36:117-122.
5. Elzaawely AA, Xuan TD, Koyama H, Tawata S. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. *Food Chem* 2007; 104:1648-1653.
6. Elzaawely AA, Xuan TD, Tawata S. Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. *Food Chem* 2007;103:486-494.
7. Wong FF, Lim YY, Omar M. Antioxidant and antimicrobial activities of some *Alpinia* species. *J Food Biochem* 2009;33(6):835-851.
8. Mohamad H, Abas F, Permana D, et al. DPPH free radical scavenger components from the fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak. (Zingiberaceae). *Z Naturforsch* 2004;59(11-12):811-815.
9. Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem* 2005;89:191.
10. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res* 2001;15(2):127-130.
11. Lo KM, Cheung PCK. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. alba. *Food Chem* 2005;80:533-539.
12. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measuring of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239:70-76.
13. Ahmad R, Ali AM, Israf DA, Ismail NH, Shaari K, Lajis NH. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and anti-bacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis* species**.** *Life Sci* 2005;76:1953–1964.
14. Habsah M, Amran M, Mackeen MM, et al. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *J Ethnopharmacol* 2000;72:403–410.
15. Kumar RS, Sivakumar T, Sivakumar P, et al. Hepatoprotective and in vivo antioxidant effects of *Careya arborea* against carbontetrachloride induced liver damage in rats. *Int J Mol Med Adv Sci* 2005;1(4):418-424.
16. Shimazawa M, Chikamatsu S, Morimoto N, et al. Neuroprotection by Brazilian green propolis against in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2(2):201-207.
17. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265-275.
18. Guan TT, Whiteman M. Antioxidant activity of some tropical fruits. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National University of Singapore. 2002.
19. Hakimoglu F, Kizil G, Kanay Z, Kizil M, Isi H. The effect of ethanol extract of *Hypericum lysimachioides* on lipid profile in hypercholesterolemic rabbits and its *in vitro* antioxidant activity. *Atheroscler* 2007;192:113-122.
20. Leea KJ, Wooa E, Choib CY, et al. Protective effect of acteoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Life Sci* 2004;74(8):1051-1064.
21. Gupta M, Mazumder UK, Kumar TS, Gomathi P, Kumar RS. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Bauhinia racemosa* against paracetamol and carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *Iran J Pharmacol Ther* 2004;3:12-20.
22. Raja S, Nazeer Ahamed KFH, Kumar V, Mukherjee K, Bandyopadhyay A, Mukherjee PK. Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *J Ethnopharmacol* 2007;109:41-47.
23. Sreelatha S, Padma PR, Umadevi M. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Tox* 2009;47:702-708.
24. Grotto D, Malia LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova* 2009;32(1): 169-174.
25. Rio DD, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studirs on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutri Met Cardio Dis* 2005;15:316-328.
26. Smith JB, Ingerman CM, Silver MJ. Malondialdehyde formation as an indicator of prostaglandin production by human platelets. *J Lab Clin Med* 1976;88(1):167-172.
27. Hemabarathy B, Siti Balkis B, Victor F. Paracetamol hepatotoxicity in rats treated with crude extract of *Alpinia galangal*. *J Biol Sci* 2009;9:57-62.
28. Pongpiriyadacha Y, Nuansrithong P, Chumbuajan O, Sirintharawech N, Chantip D. Gastroprotective effects of the extract from *Alpinia conchigera* Griff. in rats and the possible mechanism. *KMITL Sci J* 2008;8(2):38-45.

29. Athamaprasangsa S, Buntrarongroj U, Dampawan P, et al. A 1,7-diaryl heptanoid from *Alpinia conchigera*. *Phytochemistry* 1994;37(3):871-873.
30. Mohamad H, Abas F, Permana D, et al. DPPH free radical scavenger components from the fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak. (Zingiberaceae). *Z Naturforsch* 2004;59c:811-815.
31. Bhuiyan MNI, Chowdhury JU, Begum J, Nandi NC. Essential oils analysis of the rhizomes of *Alpinia conchigera* Griff. and leaves of *Alpinia malaccensis* (Burm.f.) Roscoe from Bangladesh. *Afr J Plant Sci* 2010;4(6):197-201.

Editorial note
Manuscript received in original form on August 15, 2011;
accepted in final form on October 15, 2011