

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความคงตัวของยาต้ม แก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอเมืองล้านนา

ศกุนตลา คงดี*, รัชฎาวรรณ อรรคนิมาตย์[†], จิรัญญา พรหมเชียง[†], อารีญา ช่างทอง*, ปราณี ศรีราช*

* สาขาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ตำบลแร่ อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร 47160

[†] หลักสูตรการแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต สาขาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ตำบลแร่ อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร 47160

* ผู้รับผิดชอบบทความ: Ratchadawan.au@rmuti.ac.th

บทคัดย่อ

จากสถานการณ์ปัจจุบันที่มีการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ทำให้ตำรับยาแก้ไข้และสมุนไพรที่มีฤทธิ์ลดไข้ถูกนำมาศึกษามากมาย ยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอเมืองล้านนา ซึ่งมีประวัติการใช้เป็นยาลดไข้ในภาคเหนือ ประกอบด้วย บอระเพ็ด ทองพันชั่ง ผักหวานบ้าน และต้นตีนเป็ด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความคงตัวของยาต้ม ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) การเกิดตะกอน และสีของยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอเมืองล้านนา ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 °C. ความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\%RH$ เป็นระยะเวลา 7 วัน ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยใช้วิธี Folin Ciocalteu method และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมโดย aluminum chloride colorimetric ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging และ วิธี ABTS ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอุณหภูมิต่าง ๆ มีค่าลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นแปรผันตรงกับระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่สีของยาต้มที่อุณหภูมิ 4 °C. พบว่าไม่มีความเปลี่ยนแปลง ผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอเมืองล้านนา พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยผลปริมาณฟีนอลิกรวม ที่ 4 °C. วันที่ 0 = 161.13 ± 5.62 และ วันที่ 7 = 15.34 ± 6.21 , 25 °C. วันที่ 0 = 160.53 ± 11.78 และ วันที่ 7 = 14.32 ± 1.13 , 40 °C. วันที่ 0 = 160.09 ± 7.39 และ วันที่ 7 = 12.82 ± 6.91 mg GAE/g extract และผลปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ที่อุณหภูมิ 4 °C. วันที่ 0 = 20.32 ± 0.43 และ วันที่ 7 = 7.80 ± 0.34 , อุณหภูมิ 25 °C. วันที่ 0 = 20.10 ± 0.47 และ วันที่ 7 = 7.27 ± 0.20 , อุณหภูมิ 40 °C. วันที่ 0 = 20.06 ± 0.55 และ วันที่ 7 = 6.63 ± 0.43 mg QE/g extract ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอเมืองล้านนา ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 °C. วิธี DPPH พบว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน ค่า IC_{50} มีค่าระหว่าง $14.74 \pm 0.04\% - 23.18 \pm 0.72\%w/w$ ของน้ำหนักยาต้ม เช่นเดียวกับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของยาต้มแก้ไข้ตัวร้อน พบว่าค่า IC_{50} มีค่าระหว่าง $2.63 \pm 0.12\% - 3.95 \pm 0.05\%w/w$ และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C. มีความคงตัวของยาต้มที่ดีที่สุด ซึ่งผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้แนวทางในการเก็บรักษาตำรับยาต้มทางการแพทย์แผนไทย และการแพทย์พื้นบ้านให้มีความคงตัวที่ดีได้

คำสำคัญ: แก้ไข้ตัวร้อน, ยาต้ม, หมอเมืองล้านนา, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ความคงตัว

A Study of Antioxidant and Physicochemical Stability in Antipyretic Decoction of Traditional Lanna Recipe

Sakoontala Kongdee*, Ratchadawan Aukkanimart^{*,‡}, Jirunya Promchiang[†], Areeya Changthong*, Pranee Sriraj*

*Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan, Sakon Nakhon campus, Rae Sub-District, Phang Khon District, Sakon Nakhon 47160, Thailand

[†]Master of Thai Traditional Medicine Program, Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan, Sakon Nakhon campus, Rae Sub-District, Phang Khon District, Sakon Nakhon 47160, Thailand

[‡]Corresponding author: Ratchadawan.au@rmuti.ac.th

Abstract

During the current COVID-19 outbreak, Thai traditional antipyretic recipes and antipyretic herbs have been widely studied. Antipyretic Thai/Lanna herbal decoction for relieving fever in the North consists of *Tinospora crispa*, *Rhinacanthus nasutus*, *Sauropus androgynus* and *Alstonia scholaris*. This research aimed to study the physical stability, pH, sedimentation, and color of the Lanna antipyretic decoction at 4 °C, 25 °C and 40 °C with 75 ± 5% RH for 7 days. The testing included the Folin Ciocalteu method for quantifying total phenolic content, the aluminium chloride colorimetry for flavonoid content, and the DPPH radical scavenging and ABTS methods for antioxidant activities. The results demonstrated that, for the decoction, the pH values at various temperatures dropped with storage time, the sediment amounts increased with storage time, but its color did not change at 4 °C. Its total phenolic and flavonoid contents rose with storage time. The total phenolic contents in mg GAE/g extract at Days 0 and 7 were 161.13 ± 5.62 and 15.34 ± 6.21 at 4 °C, 160.53 ± 11.78 and 14.32 ± 1.13 at 25 °C, and 160.09 ± 7.39 and 12.82 ± 6.91 at 40 °C, respectively; while the flavonoid contents in mgQE/g extract at Days 0 and 7 were 20.32 ± 0.43 and 7.80 ± 0.34 at 4 °C, 20.10 ± 0.47 and 7.27 ± 0.20 at 25 °C, and 20.06 ± 0.55 and 6.63 ± 0.43 at 40 °C, respectively. The decoction's free radical inhibition (IC₅₀) values at 4 °C, 25 °C and 40 °C by DPPH ranged from 14.74 ± 0.04 to 23.18 ± 0.72 %w/w; and by ABTS the values ranged from 2.63 ± 0.12 to 3.95 ± 0.05 %w/w. At the storage temperature of 4 °C, the decoction showed the best physical stability. Thus, the results can be used in setting up storage guidelines for Thai traditional and folk decoctions to ensue the best stability

Key words: fever, decoction, traditional Lanna healer, antioxidant activity, stability

บทนำและวัตถุประสงค์

การแพทย์พื้นบ้านล้านนา เป็นภูมิปัญญาการแพทย์ทางภาคเหนือของไทยที่มีบทบาทสำคัญต่อผู้คน มีการสืบทอดจากรุ่นสู่รุ่นอย่างยาวนาน เป็น

ศาสตร์ในการรักษาสุขภาพ ซึ่งเกิดจากการสั่งสมความรู้ ทักษะและประสบการณ์ สัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อม เชื่อมโยงกับธรรมชาติและสิ่งเหนือธรรมชาติ โดยในการบำบัดรักษาอาการเจ็บป่วยจะมีหมอพื้นบ้านล้าน

นาหรือเรียกว่า “หมอเมือง” มาเป็นผู้มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่สืบต่อและถ่ายทอดภูมิปัญญาในการป้องกันและดูแลสุขภาพสุขภาพของคนในชุมชน^[1]

จากสถานการณ์ปัจจุบันที่มีการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ทำให้ตำรายาแก้ไข้และสมุนไพรที่มีฤทธิ์ลดไข้ ถูกนำมาศึกษามากมาย ซึ่งใช้ในทางการแพทย์แผนไทยปรากฏในคัมภีร์ตำกิลา หมายถึง อาการสับสนร้อนสับสนหนาว ปวดศีรษะมาก ระวิงระไว ไอ จาม น้ำมูกตก กระหายน้ำเล็กน้อย ปัสสาวะเหลือง ร่างกายรู้สึกอ่อนเพลีย ในหลักทฤษฎีปรัชญาการแพทย์แผนไทย เกิดจากเสมหะ อุรุษเสมหะ ในกองมหาภูตรูป อาโปธาตุพิการ ธาตุรูปของวาโยธาตุ กองโกฏฐาสยาธาตุพิการร่วมเรียกว่า หุ่นโทษ กองวาโย เสมหะพิการ^[2] ในทางหมอเมืองสาเหตุของไข้เกิดจากการทำงานหนัก สภาพอากาศ ความอ่อนแอทางร่างกาย สิ่งเหน็ดเหนื่อย การกินอาหารแสลง ซึ่งจำแนกออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ ไข้วันเว้นวัน ไข้หวัด/ไข้ตัวร้อน ไข้ขึ้น/ไข้ดิน ไข้สุด (ดำแดงเหลือง ขาว) และไข้ตุ่มลิ้น โดยตำรายาแก้ไข้หมอเมืองล้านนาที่ปรากฏในหนังสือตำราหมอยา ได้ข้อมูลตำรายาจากหมอสุม จันทฤทธิ์ จังหวัดเชียงราย และหมออินตา โปธิมา จังหวัดเชียงใหม่ เป็นตำรายาแก้ไข้ตำรับที่ 3 เป็นยาต้มที่ประกอบไปด้วย รากผักหวานบ้าน ทองพันชั่ง บอระเพ็ด เปลือกไม้ตีนเป็ด^[3]

ในทางการแพทย์แผนปัจจุบันไข้มักจะมีสาเหตุมาจากความเจ็บป่วยหรือโรคภัยต่าง ๆ ที่พบบ่อยจะเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย ภาวะร่างกายขาดน้ำ การตากแดดเป็นเวลานาน อาการที่พบได้ทั่วไปเมื่อเป็นไข้ ได้แก่ ปวดหัว หนาวสั่น ครั่นเนื้อครั่นตัว ปวดเมื่อยตามเนื้อตัว อ่อนเพลีย ตัวร้อน

ซึ่งความรุนแรงของอาการจะขึ้นอยู่กับสาเหตุของโรค ไข้เป็นสัญญาณเตือนความผิดปกติในร่างกายที่บ่งบอกถึงความเจ็บป่วยว่าระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายกำลังทำงานตามหน้าที่เพื่อต่อสู้กับเชื้อโรคบางอย่างที่บุกรุกเข้าสู่ร่างกาย^[4] ความสัมพันธ์ของอนุมูลอิสระและความเครียดออกซิเดชันกับการเกิดไข้ กรณีที่เกิดจากจุลชีพ lipopolysaccharide กระตุ้น cytokines ก่อให้เกิดการอักเสบ และกระตุ้นเม็ดเลือดขาวเพื่อจับกินเชื้อโรค จากนั้นให้หลั่งอนุมูลอิสระ เช่น ไฮดรอกซิลเรดิคัล ไนตริกออกไซด์ และอนุมูลอิสระอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบในทางกลับกันอนุมูลอิสระที่หลั่งออกมาจำนวนมาก ทำให้เกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และสารต้านอนุมูลอิสระจึงสามารถลดสารก่อไข้ที่เกิดจาก cytokines อื่น ๆ เช่น NO และ OH /prostaglandin E2 ที่สร้างขึ้นระหว่างกระบวนการเกิดไข้ได้^[5]

ในอดีตมีการใช้ยาสมุนไพรรักษาโรคต่าง ๆ กันอย่างกว้างขวางมาเป็นเวลานาน ต่อมาสมุนไพรได้รับความนิยมน้อยลง สมุนไพรที่เข้ายาแก้ไข้เถาบอระเพ็ด ใบทองพันชั่ง เปลือกต้นตีนเป็ด และรากผักหวานบ้าน มีรายงานผลข้างเคียงของบอระเพ็ดต่อดับเล็กน้อย หากใช้นานกว่า 4 สัปดาห์^[6] มีรายงานการบริโภคผักหวานที่ผสมกับฝักรังหรือสับปะรดที่ไม่ผ่านการปรุงสุกนาน 10 สัปดาห์ พบว่าทำให้เกิดอาการไอหรือหายใจลำบากได้^[7] และเปลือกต้นตีนเป็ด นาน 13 สัปดาห์ ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียนในสัตว์ทดลองได้^[8] จากปัญหาดังกล่าวและจากนโยบายส่งเสริมการใช้ยาสมุนไพรของภาครัฐ ทำให้ประชาชนเริ่มหันกลับมาใช้ยาแผนโบราณ ยาสมุนไพร หรือยา

พัฒนาจากสมุนไพรมากขึ้น โดยยังคงคำนึงถึงหลัก การประเมินด้านคุณภาพ ด้านความปลอดภัย และ ด้านประสิทธิผล “ใช้” เป็นอาการสำคัญทางการ แพทย์แผนไทย โดยการรักษามักใช้ยาตำรับมากกว่า สมุนไพรเดี่ยว ซึ่งยาตำรับเป็นรูปแบบการปรุงยา สมุนไพรที่ใช้มานาน เป็นการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย สมุนไพร ข้อดีของยาตำรับ คือ ดูดซึมง่าย ออกฤทธิ์เร็ว^[9] วิธีการเตรียมง่ายและสะดวก ซึ่งยาตำรับแก้ไข้ตัวร้อน ตำรับหอมเมืองล้านนา ประกอบด้วย เถาบอระเพ็ด ใบทองพันชั่ง รากผักหวานบ้าน และเปลือกต้นตีนเป็ด เป็นตำรับยาพื้นบ้านล้านนาของทางภาคเหนือ วิธีการ ต้มยาโดยนำสมุนไพรที่เตรียมไว้มาต้มในน้ำ 3 ส่วนให้ เหลือ 1 ส่วนหรือต้มรับประทานจนยาจืดไม่เกิน 7-10 วัน ต้มครั้งละ 1 แก้ว 3 เวลาหลังอาหาร^[3,10]

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความ คงตัวทางกายภาพ ศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ รวมและฟีนอลิกรวม ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ ของยาตำรับแก้ไข้ตัวร้อน ตำรับหอมเมืองล้านนา เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยว กับ การเก็บรักษายาตำรับให้คงสภาพ เพื่อนำไปสู่การ ศึกษาถึงฤทธิ์ลดไข้ของยาตำรับแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหอม เมืองล้านนาต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 สมุนไพรในตำรับยา

ตำรับยาตำรับแก้ไข้ตัวร้อนหอมเมืองล้านนา ได้ ข้อมูลจากการรวบรวมในตำราการแพทย์พื้นบ้าน ล้านนา สาขาหมอยา ข้อมูลจากหอมสม จันทฤทธิ์

จังหวัดเชียงราย และหมออินตา โปธิมา จังหวัด เชียงใหม่ ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ เถา บอระเพ็ด ใบทองพันชั่ง เปลือกต้นตีนเป็ด และราก ผักหวานบ้าน^[3] จากสวนสมุนไพรในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดตาก พิสูจน์เอกลักษณ์โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ พิเชษฐ เวชวิฐาน ผู้เชี่ยวชาญด้านสมุนไพรพื้นบ้าน เทียบลักษณะสมุนไพรกับหนังสือ Thai Herbal Pharmacopoeia และฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดย กระบวนการเก็บและช่วงเวลาเก็บสมุนไพรอ้างอิง ตามหลักเภสัชกรรมไทย คือ เถาบอระเพ็ด เก็บเวลา 12.00 น. ใบทองพันชั่ง เก็บเวลา 08.30 น. เปลือกต้น ตีนเป็ด เก็บเวลา 13.00 น. รากผักหวานบ้าน เก็บเวลา 15.30 น. และทำการเก็บตัวอย่างสมุนไพรที่ห้องปฏิบัติ การวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ชั้น 4 ห้อง 403 ระบุรหัส สมุนไพร ดังนี้ เถาบอระเพ็ด (TC64001) ใบทองพันชั่ง (RN64002) เปลือกต้นตีนเป็ด (AS64003) และ รากผักหวานบ้าน (SA64004)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเตรียมยา นำสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดล้าง ทำความสะอาดและสับเป็นชิ้นขนาดประมาณ 3 เซนติเมตร ซึ่งสมุนไพร ชนิดละ 50 กรัม ปริมาณ ทั้งหมดของตำรับ 200 กรัม ต่อน้ำ 600 กรัม (ใน อัตราส่วน 1:3 w/w) ต้มให้เดือดจนเหลือ 1 ส่วน คือ 200 กรัม แบ่งเก็บยาตำรับในหลอดทดลองปลอดเชื้อ ขนาด 15 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาว บาง กรองผ่านกระดาษกรองและนำไปทดสอบต่อไป

2.2 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพ ยา ตำรับแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหอมเมืองล้านนาใส่หลอด

ทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำเก็บที่ตู้ปั๊มควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมสภาวะแรงที่อุณหภูมิสถานะอุณหภูมิ 4, 25 และ 40 °ซ. โดยเก็บในโถควบคุมความชื้น (desiccators) ที่บรรจุสารละลายอิ่มตัวยวดยของ sodium chloride ซึ่งทำให้เกิดความชื้นสัมพัทธ์ $75\% \pm 5^{[10]}$ เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน^[11-12] จากนั้นมาบันทึกลักษณะสีการเกิดตะกอน และความเป็นกรดต่าง

2.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) นำยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอมือเมืองล้านนา หยดลง 96-well plate ปริมาตร 20 μL เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's phenol reagent 20 μL ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 100 μL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 300 μL ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80, 160 และ 320 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย mg GAE/g extract ดัดแปลงจากการศึกษาของ Mohamed El-Sayed M^[13]

2.4 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid content) นำยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับ

หมอมือเมืองล้านนา หยดลง 96-well plate ปริมาตร 50 μL และเติม 2% อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ปริมาตร 50 μL ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 435 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader ใช้สารเคอควิติน (quercetin) เป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0.8125, 1.625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, และ 50 $\mu\text{g/mL}$) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารเคอควิติน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย mg QE/g extract ดัดแปลงจากการศึกษาของ Mohamed El-Sayed M^[13]

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ด้วยวิธี DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) โดยเตรียมสารละลาย DPPH 0.4 mM ละลายในเอทานอล จากนั้นทำการทดสอบสารตัวอย่าง โดยผสมยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอมือเมืองล้านนา นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 และ 5% w/w ปริมาตร 100 μL กับสารละลาย DPPH 100 μL ใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้โทรลอกซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Radical Scavenging)^[14] จากสมการ

$$\% \text{ inhibition DPPH}^* = \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{(\text{Abs}_{\text{control}})} \times 100$$

โดย $\text{Abs}_{\text{control}}$ คือค่าดูดกลืนแสงของ DPPH* ที่ไม่ได้ใส่ยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอมือเมืองล้านนา
 $\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือค่าดูดกลืนแสงของ DPPH* ที่ใส่ยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอมือเมืองล้านนา

2.6 การทดสอบความสามารถในการกำจัด

อนุมูลอิสระ ABTS assay [2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)] เตรียมสารละลาย ABTS ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K_2SO_4) ละลายในน้ำกลั่น แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ทำการทดสอบสารตัวอย่าง โดยผสมยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอเมืองล้านนา นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้

ความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 และ 5% w/w ปริมาตร 50 μ L กับสารละลาย ABTS ปริมาตร 100 μ L ใน 96 well Plate ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้โทรลอกซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Radical Scavenging)^[15] จากสมการ

$$\% \text{ inhibition ABTH}^{*+} = \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{(\text{Abs}_{\text{control}})} \times 100$$

โดย $\text{Abs}_{\text{control}}$ คือค่าดูดกลืนแสงของ ABTH^{*+} ที่ไม่ได้ใส่ยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอเมืองล้านนา
 $\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือค่าดูดกลืนแสงของ ABTH^{*+} ที่ใส่ยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอเมืองล้านนา

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และความคงตัวของยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอเมืองล้านนาจะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ นำผลที่ได้คิดค่าเฉลี่ยและหาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard Deviation: S.D.) โดยจะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (inhibition concentration; IC₅₀) และค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mg QE/g extract) ตามลำดับ ส่วนศึกษาความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและลักษณะทางกายภาพ ในวันที่ 0-7 วิเคราะห์สถิติโดยใช้ one-way ANOVA และความคงตัวของยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอเมืองล้านนาจะใช้ paired t-test โดย

กำหนดความเชื่อมั่น 95% ระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบความคงตัวของยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนตำรับหมอเมืองล้านนา

ผลการทดสอบความคงตัวของยาต้มแก้ไข้ตัวร้อนหมอเมืองล้านนาที่สภาวะอุณหภูมิ 4, 25 และ 40 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75%RH เป็นระยะเวลา 0-7 วัน ดังนี้

1) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) พบว่าที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ค่า pH มีค่า 6.77-6.90 ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. ค่า pH มีค่า 6.20-6.87 ในขณะที่อุณหภูมิ 40 °ซ. ค่า pH มีค่า 5.37-6.88 โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ค่า pH คงที่มากที่สุด และที่อุณหภูมิ 40 °ซ. ค่า pH เปลี่ยนแปลงเป็นกรดอ่อนๆ มากที่สุด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่าความเป็นกรด-ด่างของยาต้มแก้ไข้ดำรับหมอมือเมืองลำนานาที่อุณหภูมิต่างกัน

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)		
	4 °ซ.	25 °ซ.	40 °ซ.
0	6.90 ± 0.03 ^a	6.87 ± 0.01 ^{a*}	6.88 ± 0.01 ^{a*}
1	6.88 ± 0.03 ^a	6.49 ± 0.02 ^{*b}	6.26 ± 0.06 ^{*c}
2	6.84 ± 0.10 ^a	6.47 ± 0.05 ^{*b}	6.05 ± 0.08 ^{*c}
3	6.80 ± 0.03 ^a	6.45 ± 0.03 ^{*b}	5.97 ± 0.09 ^{*c}
4	6.79 ± 0.10 ^a	6.39 ± 0.08 ^{*b}	5.59 ± 0.14 ^{*c}
5	6.79 ± 0.10 ^a	6.30 ± 0.07 ^{*b}	5.50 ± 0.11 ^{*c}
6	6.78 ± 0.03 ^a	6.24 ± 0.04 ^{*b}	5.43 ± 0.07 ^{*c}
7	6.77 ± 0.04 ^a	6.20 ± 0.03 ^{*b}	5.37 ± 0.01 ^{*c}

หมายเหตุ สัญลักษณ์ *คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ในช่วงอุณหภูมิเดียวกัน และ ^{a,b,c} ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิต่าง ๆ ในแถวเดียวกัน กำหนดความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

2) การเกิดตะกอน (เซนติเมตร) พบว่าที่อุณหภูมิ 4 °ซ. การเกิดตะกอน 0.00-0.16 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. การเกิดตะกอน 0.00-0.70 เซนติเมตร ในขณะที่อุณหภูมิ 40 °ซ. การเกิดตะกอน 0.00-1.06 เซนติเมตร โดยพบว่าวันที่ 7 ของการศึกษาที่อุณหภูมิ 40 °ซ. มีตะกอนยามากที่สุด ต่างจากกลุ่มที่เก็บยาต้มที่อุณหภูมิ 4 และ 25 °ซ. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเกิดตะกอนของยาต้มแก้ไข้ดำรับหมอมือเมืองลำนานาที่อุณหภูมิต่างกัน

วันที่	การเกิดตะกอน (เซนติเมตร)		
	4 °ซ.	25 °ซ.	40 °ซ.
0	0.0 ± 0.00 ^a	0.0 ± 0.00 ^a	0.0 ± 0.00 ^a
1	0.10 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.00 ^{ab}	0.73 ± 0.15 ^{*c}
2	0.10 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.00 ^{ab}	1.00 ± 0.00 ^{*c}
3	0.10 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.00 ^{ab}	1.00 ± 0.00 ^{*c}
4	0.10 ± 0.00 ^a	0.23 ± 0.05 ^{*b}	1.00 ± 0.00 ^{*c}
5	0.10 ± 0.00 ^a	0.23 ± 0.05 ^{*b}	1.00 ± 0.00 ^{*c}
6	0.10 ± 0.00 ^a	0.46 ± 0.15 ^{*b}	1.06 ± 0.15 ^{*c}
7	0.16 ± 0.05 ^a	0.70 ± 0.17 ^{*b}	1.06 ± 0.15 ^{*c}

หมายเหตุ สัญลักษณ์ *คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ในช่วงอุณหภูมิเดียวกัน และ ^{a,b,c} ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิต่าง ๆ ในแถวเดียวกัน กำหนดความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

3) สีทางกายภาพจากชุดคู่มือเทียบสี (color chart) สีของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองล้านนา เริ่มต้นการศึกษาในวันที่ 0 พบว่า ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 °ซ. มีสีเทาอมส้ม 166A (gray-orange 166A) เหมือนกัน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. วันที่ 0-7 ยาต้มมีสีเทาอมส้ม 166A (gray-orange 166A) ตลอดระยะ

เวลาที่ศึกษา ส่วนที่อุณหภูมิ 25 °ซ. วันที่ 1-7 ยาต้มมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย มีสีเทาอมส้ม 165A (gray-orange 165A) และอุณหภูมิ 40 °ซ. ยาต้มมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด มีสีเทาอมส้ม 177C (gray-orange 177C) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 สีของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองล้านนาที่อุณหภูมิต่างกัน

วันที่	สี		
	4 °ซ.	25 °ซ.	40 °ซ.
0	 gray-orange 166A	 gray-orange 166A	 gray-orange 166A
1	 gray-orange 166A	 gray-orange 165A	 gray-orange 177C
2	 gray-orange 166A	 gray-orange 165A	 gray-orange 177C
3	 gray-orange 166A	 gray-orange 165A	 gray-orange 177C
4	 gray-orange 166A	 gray-orange 165A	 gray-orange 177C
5	 gray-orange 166A	 gray-orange 165A	 gray-orange 177C
6	 gray-orange 166A	 gray-orange 165A	 gray-orange 177C
7	 gray-orange 166A	 gray-orange 165A	 gray-orange 177C

2. ผลการศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกรวมของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองล้านนา

จากการหาปริมาณฟีนอลิกรวม โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 161.13 ± 5.62 , 157.22 ± 8.23 , 148.07 ± 11.90 , 119.15 ± 6.88 , 84.61 ± 4.07 , 47.19 ± 2.35 , 37.01 ± 4.92 และ 15.34 ± 6.21 mg

GAE/g extract ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 160.53 ± 11.78 , 155.89 ± 9.00 , 146.49 ± 12.13 , 117.48 ± 7.44 , 83.74 ± 3.59 , 44.59 ± 1.42 , 36.01 ± 1.83 และ 14.32 ± 1.13 mg GAE/g extract และที่อุณหภูมิ 40 °ซ. พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 160.09 ± 7.39 , 155.12 ± 8.08 , 144.27 ± 9.55 , 116.73 ± 8.61 , 82.13 ± 6.98 , 43.12 ± 6.34 , 34.87 ± 7.08 และ 12.82 ± 6.91 mg GAE/g extract ซึ่งปริมาณฟีนอลิกรวมลดลงอย่าง

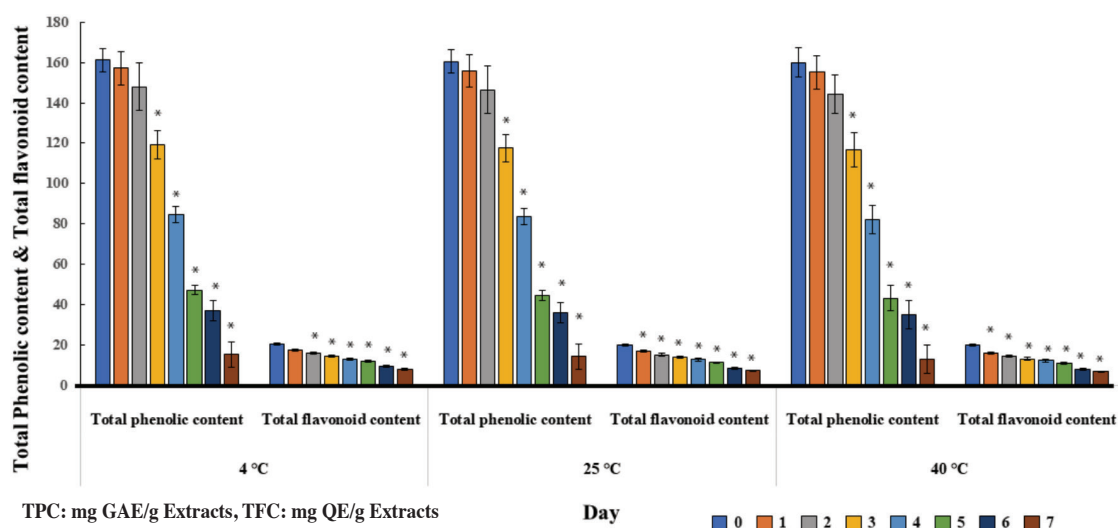
มีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 3 โดยปริมาณฟีนอลิกรวมลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) (ภาพที่ 1)

3. ผลการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอเมืองล้านนา

จากการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารเคออสิดิน (ความเข้มข้น 0.8125, 1.625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, และ 50 $\mu\text{g/ml}$) ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย mg QE/g extract ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 20.32 ± 0.43 , 17.34 ± 0.41 , 15.91 ± 0.48 , 14.27 ± 0.40 , 13.03 ± 0.51 , 11.88 ± 0.49 , 9.16 ± 0.52 และ 7.80 ± 0.34 mg QE/g extract ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 20.10 ± 0.47 , 16.74 ± 0.49 , 15.07 ± 0.72 , 13.71 ± 0.52 , 12.73 ± 0.65 , 11.19

± 0.44 , 8.47 ± 0.59 และ 7.27 ± 0.20 mg QE/g extract และที่อุณหภูมิ 40 °ซ. พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 20.06 ± 0.55 , 16.01 ± 0.61 , 14.37 ± 0.65 , 13.12 ± 0.59 , 12.23 ± 0.68 , 10.79 ± 0.43 , 8.01 ± 0.57 และ 6.63 ± 0.43 mg QE/g extract ซึ่งปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 (ภาพที่ 1)

โดยโพลีฟีนอล (polyphenol) คือ กลุ่มของสารพฤกษเคมีที่มีขนาดใหญ่ที่สุดซึ่งทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ โดยกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารประกอบโพลีฟีนอลที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งพบในส่วนต่าง ๆ ของพืช ผลการศึกษาพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมเริ่มลดลงในวันที่ 3 และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่อุณหภูมิ 25 และ 40 °ซ. เริ่มลดลงในวันที่ 1 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0



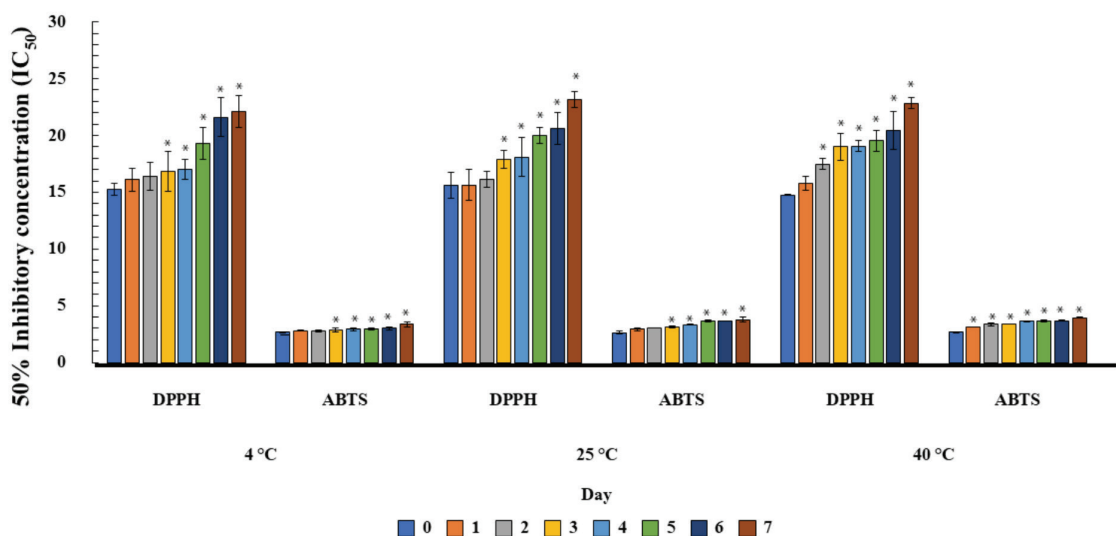
ภาพที่ 1 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอเมืองล้านนาที่เวลา 0-7 วัน (* $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ในอุณหภูมิเดียวกัน)

4. ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองลำนานา

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองลำนานา โดยวิธี DPPH ทำการวัด % free radical inhibition ของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองลำนานาที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 % ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน อุณหภูมิ 4 °ซ. พบว่าความสามารถการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% หรือ IC_{50} เท่ากับ 15.23 ± 0.53 , 16.10 ± 1.03 , 16.40 ± 1.27 , 16.85 ± 1.75 , 17.00 ± 0.90 , 19.31 ± 1.42 , 21.60 ± 1.70 และ 22.10 ± 1.42 %w/w ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. พบว่าความสามารถการยับยั้งอนุมูลอิสระ IC_{50} เท่ากับ 15.63 ± 1.14 , 15.64 ± 1.37 , 16.13 ± 0.72 , 17.88 ± 0.78 , 18.10 ± 1.72 , 20.01 ± 0.70 , 20.64 ± 1.4 และ 23.18 ± 0.72 %w/w ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 40 °ซ. พบว่าความสามารถการยับยั้งอนุมูลอิสระ IC_{50} เท่ากับ 14.74 ± 0.04 , 15.78 ± 0.58 ,

17.49 ± 0.47 , 19.03 ± 1.19 , 19.07 ± 0.45 , 19.52 ± 0.95 , 20.48 ± 1.67 และ 22.85 ± 0.51 %w/w ตามลำดับ และพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระจะลดลงในวันที่ 2-3 และจากการเก็บรักษายาต้มในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 2)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองลำนานา โดยวิธี ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ณ อุณหภูมิ 4 °ซ. พบว่าความสามารถการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% หรือ IC_{50} เท่ากับ 2.65 ± 0.03 , 2.79 ± 0.05 , 2.80 ± 0.07 , 2.85 ± 0.16 , 2.92 ± 0.16 , 2.94 ± 0.08 , 3.00 ± 0.09 และ 3.37 ± 0.22 %w/w ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. พบว่าความสามารถการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% หรือ IC_{50} เท่ากับ 2.63 ± 0.12 ,



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบการยับยั้งอนุมูลอิสระของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองลำนานาที่เวลา 0-7 วัน (* $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ในอุณหภูมิเดียวกัน)

2.94 ± 0.12, 3.05 ± 0.02, 3.13 ± 0.08, 3.35 ± 0.02, 3.64 ± 0.11, 3.67 ± 0.03 และ 3.77 ± 0.22 %w/w ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 40 °ซ. พบว่าความสามารถการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% หรือ IC₅₀ เท่ากับ 2.67 ± 0.04, 3.13 ± 0.01, 3.36 ± 0.15, 3.41 ± 0.01, 3.62 ± 0.03, 3.68 ± 0.10, 3.70 ± 0.04 และ 3.95 ± 0.05 %w/w ตามลำดับ และพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระจะเริ่มลดลงในวันที่ 1-2 และจากการเก็บรักษาในอุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การเก็บรักษายาต้มที่สามารถรักษาความเสถียรของคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ คือที่อุณหภูมิ 4 °ซ. คือประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระคงที่ในเวลา 2 วัน (ภาพที่ 2)

อภิปรายผล

ยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองล้านนาประกอบด้วย เถาบระเพ็ด ใบทองพันชั่ง รากผักหวานบ้าน และเปลือกต้นตีนเป็ด มีสรรพคุณรักษาอาการแก้ไข้ ครั่นเนื้อครั่นตัว อ่อนเพลีย ตัวร้อน คัดจมูก น้ำมูกไหล ไอมีเสมหะ เจ็บคอ ปวดหัว หน้าแดง หิวน้ำบ่อย มีรายงานการศึกษาพบสารสำคัญในสมุนไพบบระเพ็ด ได้แก่ syringin และ magnoflorine มีรายงานว่ามียุทธภัณฑ์ด้านการอักเสบและลดไข้^[16-17] ทองพันชั่งมีสารสำคัญ คือ rhinacanthin-C^[18] ผักหวานบ้านมีสารสำคัญ เช่น ascorbic acid, fatty acids^[19] เปลือกต้นตีนเป็ดมีสารสำคัญกลุ่ม picric acid, alstonine และ echitamine เป็นต้น^[20]

จากผลการศึกษาความคงตัวของทางกายภาพของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองล้านนาที่สภาวะอุณหภูมิ 4, 25 และ 40 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ±

5 %RH เป็นระยะเวลา 0-7 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 25 และ 40 °ซ. ซึ่งความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของทั้ง 3 อุณหภูมิ มีค่าลดลงกับระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) การเกิดตะกอนพบว่าที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ณ วันที่ 7 ของการศึกษามีการเกิดตะกอนที่ 0.16 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. มีการเกิดตะกอนที่ 0.7 เซนติเมตร และ 40 °ซ. มีการเกิดตะกอนที่ 1.06 เซนติเมตร การเกิดตะกอนขึ้นโดยแปรผันตรงกับอุณหภูมิและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2) ในขณะที่สีของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองล้านนาพบว่าที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ไม่มีความเปลี่ยนแปลงของสีเกิดขึ้นตลอด 7 วัน คือมีสีน้ำตาลอมเทา gray-orange 166A ส่วนที่อุณหภูมิ 25 และ 40 °ซ. เริ่มเปลี่ยนจากสีส้มอมเทา gray-orange 165A และ gray-orange 177C หลังวันที่ 1 เป็นต้นไป (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการต้มน้ำยาเบญจกูลที่ต้มในหม้อดินที่อุณหภูมิ 97-98 °ซ. ให้เหลือ 1/3 ส่วนหลังต้มพบว่าสารสกัดมีสีน้ำตาลเข้ม มีค่าความเป็นกรด (pH) เท่ากับ 4.99-5.11^[21] นอกจากนี้ยาต้มควรเก็บไว้ในตู้เย็น (4 °ซ.) เพื่อลดการเจริญเติบโตของเชื้อรา มีรายงานพบว่าที่อุณหภูมิ 0-5 °ซ. เมแทบอลิซึมของเชื้อราจะลดลงทำให้เชื้อราเจริญเติบโตช้า^[22] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความคงตัวของทางกายภาพและทางเคมีของยาน้ำเชื่อมมอร์ฟีนซัลเฟต^[23] เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างกันมีความคงตัวของทางกายภาพและทางเคมี โดยที่สีกลิ่น และความเป็นกรดต่างของตำรับไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับยาที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ และมีปริมาณตัวยาคงเหลือที่อุณหภูมิต่าง ๆ มากกว่า 90% อาจเนื่องมาจากการเป็นการเตรียมยาโดยใช้สารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งโครงสร้างและความคงตัวจะดีกว่ายาต้มสมุนไพรร

และแตกต่างจากการศึกษาความคงตัวของทางกายภาพ และทางเคมีของตำรับกลีเซอรินจากสารสกัดชะเอม ทั้ง 2 พบว่าสารสกัดในวันที่ 0 มีเนื้อละเอียด มีตะกอน น้อย มีความหนืดมาก และค่า pH เป็นกลางและเมื่อ ถูกทดสอบสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็น เวลา 30 วัน พบว่ามีสีและการแขวนลอยในตำรับ และความหนืดลดลง ส่วนในด้านความคงตัวของทางเคมีพบว่าตำรับที่ผ่านสภาวะเร่งมีปริมาณฟีนอลิกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องจากกลีเซอริน เป็นสารประเภท trihydric alcohol จึงไม่สามารถถูก oxidize จึงทำให้ตำรับยาที่มีการผสมกลีเซอริน มีความคงตัวสูง (high stability)^[24]

จากผลการศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกรวมของ ยาตำแก้ใช้ตำรับหมอมือเมืองล้านนาที่เวลา 0-7 วัน ที่ อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 °ซ. พบว่ามีปริมาณฟีนอลิก รวมจะค่อนข้างคงที่ในสองวันแรกของการศึกษา โดย ปริมาณฟีนอลิกรวมลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และผลการศึกษาหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมไม่ แตกต่างกัน (ในวันที่ 0-1 ของการศึกษา) แต่ที่อุณหภูมิ 25 และ 40 °ซ. พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลง แตกต่างกันตั้งแต่วันแรกของการศึกษา โดยปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวมลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่ เพิ่มขึ้น ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนั้นได้มีการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อ ปริมาณฟลาโวนอยด์ในดอกไม้ที่รับประทานได้ 14 สาย พันธุ์ พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ร่วมกับการ ใช้ภาชนะบรรจุภัณฑ์แบบ active modified atmosphere สามารถชะลอการสูญเสียฟลาโวนอยด์ได้^[25] และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์ทาง

บวกกับฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยา ตำแก้ใช้ตำรับหมอมือเมืองล้านนาด้วยวิธี DPPH และ ABTS โดยวิธี DPPH พบว่าที่อุณหภูมิ 4 °ซ. มีค่า IC_{50} ระหว่าง $15.23 \pm 0.53\%$ - $22.10 \pm 1.42\%$ ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. มีค่า IC_{50} ระหว่าง $15.63 \pm 1.14\%$ - $23.18 \pm 0.72\%$ ที่อุณหภูมิ 40 °ซ. มีค่า IC_{50} ระหว่าง $14.74 \pm 0.04\%$ - $22.85 \pm 0.51\%$ และวิธี ABTS พบว่าที่ความ เข้มข้นระหว่าง 0.3125-5% ความสามารถในการยับยั้ง สารอนุมูลอิสระได้ 50% ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. มีค่า IC_{50} ระหว่าง $2.65 \pm 0.03\%$ - $3.37 \pm 0.22\%$ ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. มีค่า IC_{50} ระหว่าง $2.63 \pm 0.12\%$ - $3.77 \pm 0.22\%$ ที่อุณหภูมิ 40 °ซ. มีค่า IC_{50} ระหว่าง $2.67 \pm 0.04\%$ - $3.95 \pm 0.05\%$ ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบ ค่า IC_{50} เมื่อ เริ่มต้นและสิ้นสุดการศึกษาพบมีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นอุณหภูมิถือเป็นปัจจัย ที่สำคัญต่อการเก็บรักษายาตำแก้ใช้ตำรับหมอมือ เมืองล้านนา เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและ ทางเคมี แปรผันตามอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิสูงอัตรา การเกิดปฏิกิริยาสูงทำให้อนุภาคแยกตัวออกมาจากน้ำ จึงส่งผลให้เกิดตะกอนขึ้น และส่งผลให้สีเปลี่ยนแปลง เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลต่อโครงสร้างของ สารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) รวมอยู่ในโครงสร้าง โดยอุณหภูมิ ที่สูงจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลไฮดรอกซิล (OH-) ทำให้ เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือแตกหักของพันธะได้^[26] อีกทั้งอุณหภูมิ ออกซิเจน และแสงแดดสามารถทำให้เกิดการสลายของฟลาโวนอยด์ได้^[27] การเก็บรักษายา ตำแก้ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ การเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ในสารกลุ่ม triterpenoid ที่พบในใบกระท่อม สาร rhinacanthin ที่พบในใบทองพันชั่ง สารกลุ่ม

picrinine, alstonine และ echitamine ที่พบในเปลือกต้นตีนเป็ด และสาร ascorbic acid, fatty acids ในรากผักหวานบ้าน ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระในยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองล้านนาลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นและมีความจำเป็นในด้านการควบคุมคุณภาพสมุนไพร เช่น ทำการตรวจสอบอัตลักษณ์ระดับมหภาค (macroscopic) จุลภาค (microscopic) คุณสมบัติด้านเคมีกายภาพ (physicochemical) และสารพฤกษเคมี (phytochemical) เพื่อควบคุมสมุนไพรให้มีมาตรฐาน^[28]

ข้อสรุป

จากการศึกษานี้พบว่ายาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองล้านนา มีปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น และมีความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C สามารถทำให้ความคงตัวของยาที่ดีที่สุด ซึ่งข้อมูลนี้นำไปใช้ประโยชน์ในการเก็บรักษาตำรับให้มีความคงตัวที่ดีได้ ในการศึกษาต่อไปควรทำการศึกษาลักษณะสำคัญของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองล้านนาด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เทียบสารมาตรฐาน ควรศึกษาทางจุลชีววิทยาของยาต้มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ กัน ควรศึกษาความเป็นพิษของยาต้มแก้ไข้ตำรับหมอมือเมืองล้านนาในสัตว์ทดลองที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดไข้และในอาสาสมัครสุขภาพดี เพื่อเป็นทางเลือกในการพัฒนาเป็นยาสมุนไพรที่ใช้ป้องกันและรักษาโรคติดต่อ

เชื้อไวรัสโคโรนา 2019

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้อาคารสถานที่ วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่าง ๆ

References

1. Sawai W, Daranee O. A study of medicinal plants utilization of folk healers: a case study of folk healers in Chiang Rai Province Thailand. J Thai Trad Alt Med. 2018;16(3):420-35. (in Thai)
2. Suraphan S. Treatment of fever with the philosophical theory of Thai traditional medicine. [Internet]. 2014 [cited 2020 Dec 20]; Available from: <http://www.morsuraphan.com/knowledge/64>. (in Thai)
3. Yingyong T, Kanyanoot T. Tamra kanphaet phúnban Lanna sakha mohya: choose kanphaet phúnban lae kanphaet chonpao paknai series. Chiang Rai: Thailand. School of Traditional and Alternative Medicine, Chiang Rai Rajabhat University; 2004. 166 p. (in Thai)
4. Sudpranorm S, Worawan K. Pathophysiology in nursing. Bangkok: Srisavarindhira Thai Red Cross Institute of Nursing; 2004. 84 p. (in Thai)
5. Hou C-C, Lin H, Chang C-P, Huang W-T, Lin M-T. Oxidative stress and pyrogenic fever pathogenesis. Eur J Pharmacol. 2011;667(1-3):6-12.
6. Langrand J, Regnault H, Cachet X, Bouzidi C, Villa AF, Serfaty L, Garnier R, Michel S. Toxic hepatitis induced by a herbal medicine: *Tinospora crispa*. Phytomedicine. 2014;21(8-9):1120-3.
7. Lai RS, Chiang AA, Wu MT, Wang JS, Lai NS, Lu JY, Ger LP, Roggli V. Outbreak of bronchiolitis obliterans associated with consumption of *Sauropus androgynus* in Taiwan. Lancet. 1996;348(9020):83-5.
8. Zhao Y-L, Su M, Shang J-H, Wang X, Bao G-L, Ma J, Sun Q-D, Yuan F, Wang J-K, Luo X-D. Acute and sub-chronic toxicity of indole alkaloids extract from leaves of *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. in beagle dogs. Nat Prod Bioprospect.

- 2020;10(4):209-20.
9. Puangkaew N, Udompittayasan J, Sukdang K, Rattanama P, Hlong N. A study of herbal folk medicine wisdom to treat the flu: case study of Mr. Jitr Boonluang, Wang Wiset district, Trang province. *TJPHS*. 2021;4(2):111-22. (in Thai)
 10. Raymond CR, Paul JS, Siân CO. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th editions. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain London, UK: Pharmaceutical press and American pharmacists association; 2006. 651 p.
 11. Ayurveda College (Jivaka Komarapat). Thai pharmacy textbook. 2nd editions. Bangkok: Thai Traditional Medicine. Promotion Foundation; 2559. 262 p. (in Thai)
 12. Joungmunkong Z, Na-Ranong S, Rakrod S, Ornlaor S, Sila-on W. Accelerated stability testing of extemporaneous suspensions and reconstituted powder for suspensions of acetazolamide and furosemide. *Isan J Pharm Sci*. 2013;9(1):32-9. (in Thai)
 13. Mohamed El-Sayed M, Metwally NH, Ibrahim IA, Abdel-Hady H, Abdel-Wahab BSA. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of *Petroselinum crispum* Mill. *J Appl Life Sci Int*. 2018;19(2):1-7. (in Thai)
 14. Liyana-Pathirana CM, Shahidi F. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *J Agric Food Chem*. 2005;53(7):2433-40.
 15. Oyedemi SO, Bradley G, Afolayan AJ. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of aqueous extract of *Strychnos henningsii* Gilg. *Afr. J Pharm Pharmacol*. 2010;4(2):70-8.
 16. Haque M, Jantan I, Harikrishnan H, Ahmad W. Standardized ethanol extract of *Tinospora crispa* upregulates pro-inflammatory mediators release in LPS-primed U937 human macrophages through stimulation of MAPK, NF- κ B and PI3K-Akt signaling networks. *BMC Complement Med Ther*. 2020;20(1):245.
 17. Rakib A, Ahmed S, Islam MA, Haye A, Uddin SMN, Uddin MMN, Hossain MK, Paul A, Emran TB. Antipyretic and hepatoprotective potential of *Tinospora crispa* and investigation of possible lead compounds through in silico approaches. *Food Sci Nutr*. 2020;8(1):547-56.
 18. Panichayupakaranant P, Charoonratana T, Sirikatitham A. RP-HPLC analysis of rhinacanthins in *Rhinacanthus nasutus*: validation and application for the preparation of rhinacanthin high-yielding extract. *J Chromatogr Sci*. 2009;1;47(8):705-8.
 19. Bose R, Kumar MS, Manivel A, Chandra Mohan S. Chemical constituents of *Sauropus androgynus* and evaluation of its antioxidant activity. *Res. J. Phytochem*. 2018;12(1):7-13.
 20. Pankti K, Payal G, Manodeep C, Jagadish K. A phytopharmacological review of *Alstonia scholaris*: A panoramic herbal medicine. *Int J Ayurveda Res*. 2012;3(3):367-71.
 21. Weerapreeyakul N, Sripanidkulchai B, Chadbunchachai S, Subcharoen P. Evaluation of physical properties of Benjakul decoction and the possibility of contamination with heavy metals. *J Thai Trad Alt Med*. 2007;5(2):142-50. (in Thai)
 22. Kubicek CP, Esser K, Druzhinina IS. Environmental and microbial relationships. Vol. 4. Heidelberg, Germany: Springer Science & Business Media; 2007.
 23. Sila-on W, Sungkapat S, Anansuchartkul J, Wattanawong W. Physical and chemical stability study of morphine sulfate syrup. *Isan J Pharm Sci*. 2008;4(2):134-9. (in Thai)
 24. Ritdet P, Masthong R, Limsuwan S, Sakulkeo O, Joycharat N. Physical and chemical stability of glycerin formulations containing extracts from *Albizia myriophylla* and cha-em-thang song. *Isan J Pharm Sci*. 2020;16(2):45-56. (in Thai)
 25. Ounamornmas P, Sommano S. Analyses of bioactive ingredients and antioxidant activities of some edible flowers. *Journal of Agriculture (Thailand)*. 2016;32(3):435-45. (in Thai)
 26. Elmegerhi S, Su C, Buglewicz DJ, Aizawa Y, Kato TA. Effect of hydroxyl group position in flavonoids on inducing single-stranded DNA damage mediated by cupric ions. *Int J Mol Med*. 2018;42(1):658-64.
 27. Chaaban H, Ioannou I, Chebil L, Slimane M, Gerardin C, Paris C, Charbonnel C, Chekir L, Ghoul M. Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *J Food Process Preserv*. 2017;41(5):e13203.
 28. Alam F, Saqib QNU. Pharmacognostic study and development of quality control parameters for fruit, bark and leaf of *Zanthoxylum armatum* (Rutaceae). *Anc Sci Life*. 2015;34(3):147-55.