

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความคงตัวของสารสกัด ตำรับยาทัพยาธิคุณ

นฤมล เทียรวรรณ*, อภิญา ล้อมไธสง*, กนกนันท์ หล้าสองเมือง*[†], วุฒิชัย วิสุทธิพรต[‡]

*สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยบัณฑิต วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดพิษณุโลก ตำบลวังทอง อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก 65130

[†]กลุ่มงานบัณฑิตศึกษา วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดพิษณุโลก ตำบลวังทอง อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก 65130

[‡]ผู้รับผิดชอบบทความ: Kanoknan@scphpl.ac.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ยาทัพยาธิคุณเป็นตำรับยาที่มีสรรพคุณระงับปวดแก้อาการไข้ในทางการแพทย์แผนไทยนิยมนำมารักษาอาการจากโรคเบาหวาน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความคงตัวของสารสกัดตำรับยาทัพยาธิคุณ ผู้วิจัยจึงต้องการพิสูจน์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในตำรับยาทัพยาธิคุณ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรตำรับยาทัพยาธิคุณมาก่อน อีกทั้งยังเป็นการพิสูจน์ว่าตำรับยาทัพยาธิคุณมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบที่สามารถช่วยชะลอความเสื่อมระดับเซลล์ซึ่งตรงกับสรรพคุณของตำรับที่ช่วยบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ ปวดเมื่อย จุกเสียด กินอาหารไม่ร่ำรส และนอนไม่หลับอีกด้วย

วิธีการศึกษา: การศึกษานี้เป็นงานวิจัยในห้องปฏิบัติการโดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ฤทธิ์การต้านการอักเสบ nitric oxide และศึกษาความคงตัวของตำรับยาทัพยาธิคุณจากสาร piperine ด้วยวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ HPLC ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80 °ซ. ระยะเวลา 3, 6, 9 และ 12 วัน

ผลการศึกษา: พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.625 mg/ml, 0.312 mg/ml, 0.156 mg ความยาวคลื่นแสง 515 nm พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของตำรับยาทัพยาธิคุณปริมาณ 0.8859 mg/ml การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้ง nitric oxide ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.313 mg/ml, 0.156 mg/ml, 0.078 mg/ml, 0.039 mg/ml, 0.020 mg/ml, 0.098 mg/ml ที่ความยาวคลื่นคลื่นแสง 515 nm พบว่าสามารถยับยั้งกระบวนการ nitric oxide ปริมาณ 1.59 mg/ml การศึกษาความคงตัวของตำรับยาทัพยาธิคุณ ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80 °ซ. เป็นระยะเวลา 3, 6, 9 และ 12 วัน เพื่อคำนวณหาค่าวันหมดอายุ (T90) พบว่า เมื่อเก็บตัวตำรับยาทัพยาธิคุณ ที่อุณหภูมิ 50 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 7 วัน, อุณหภูมิ 60 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 6 วัน, อุณหภูมิ 70 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 4 วัน, อุณหภูมิ 80 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 3 วัน, อุณหภูมิ 25 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 23 วัน และอุณหภูมิ 30 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 16 วัน

อภิปรายผล: การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตำรับยาทัพยาธิคุณโดยการหาค่า antioxidant ด้วยวิธีการ DPPH radical scavenging assay, ฤทธิ์การยับยั้ง nitric oxide และศึกษาความคงตัวของตำรับยาทัพยาธิคุณ ทำให้

ทราบถึงคุณสมบัติทางเคมีในการต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ และยังพบว่าตำรับยาทพยาคิคุณสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25°C. ได้นานถึง 23 วัน โดยตำรับยาทพยาคิคุณเป็นตำรับยาทางการแพทย์แผนไทยที่ช่วยในการบรรเทาอาการกระดูกในอก แก้วคอกลิ้นเนื้อ มือชาเท้าชา นอนไม่หลับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่า ตำรับยาทพยาคิคุณสามารถต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้ชะลอความเสื่อมของร่างกายและยังต้านการอักเสบได้อีกด้วย

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบ พบว่า สารสกัดตำรับยาทพยาคิคุณที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ต้องใช้ปริมาณ 0.8859 mg/ml จึงจะสามารถต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid และใช้ปริมาณ 1.59 mg/ml ในการต้านการอักเสบ. ในด้านความคงตัวตำรับยาทพยาคิคุณในรูปแบบผงสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้อง 25°C. ได้นานถึง 23 วัน อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ใช้กระบวนการสกัดด้วยเอทานอลเพียงอย่างเดียว ในการศึกษาครั้งต่อไปควรเพิ่มตัวแปรและวิธีการสกัดที่หลากหลายเพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่ครอบคลุมและแม่นยำยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: ตำรับยาทพยาคิคุณ, การต้านอนุมูลอิสระ, DPPH assay, nitric oxide, ความคงตัว

Antioxidant, Anti-inflammation and Stability Properties of Ya Thappayathikhun Formula Extract

Naruemon Thianwan*, Apinya Lomthaisong*, Kanoknan Lasongmueang*,†, Wudtichai Wisutitprot†

*Thai Traditional Medicine, Sirindhorn College of Public Health Phitsanulok, Wang Thong Sub-District, Wang Thong District, Phitsanulok 65130, Thailand

†Graduate School, Sirindhorn College of Public Health Phitsanulok, Wang Thong Sub-District, Wang Thong District, Phitsanulok 65130, Thailand

*Corresponding author: Kanoknan@scphpl.ac.th

Abstract

Introduction and Objectives: Ya Thappayathikhun is a Thai traditional medicinal (TTM) formula commonly used to treat numbness due to diabetes. This research aimed to investigate the pharmacological properties of the TTM formula especially its antioxidant and anti-inflammatory activities as well as extract stability. The researchers sought to prove the pharmacological properties of this medicinal formula since no previous pharmacological studies had been conducted on it. Additionally, they aimed to confirm that the medicinal formula possesses antioxidant and anti-inflammatory properties, which can help slow down cellular deterioration, aligning with the traditional use of this formula to alleviate symptoms such as muscle pain, chest pain, numbness, loss of taste, and insomnia.

Methods: This research was conducted in a laboratory setting and involved the study of antioxidant properties using the DPPH assay, anti-inflammatory properties using the Nitric Oxide method, and an examination of the formula's stability with Piperine as the main compound, assessed through High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) at temperatures of 50°C, 60°C, 70°C, and 80°C over durations of 3, 6, 9, and 12 days.

Results: Antioxidant properties were studied using the DPPH assay at concentrations of 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, and 0.156 mg/mL, at a light wavelength of 515 nm. The formula exhibited antioxidant properties with an effective concentration of 0.8859 mg/mL. Anti-inflammatory properties were studied using the Nitric Oxide inhibition method at concentrations of 1, 0.5, 0.313, 0.156, 0.078, 0.039, 0.020, and 0.098 mg/mL, at a light wavelength of

515 nm. The formula was able to inhibit the Nitric Oxide process with an effective concentration of 1.59 mg/mL. The stability of the medicinal formula was assessed at temperatures of 50°C, 60°C, 70°C, and 80°C, for durations of 3, 6, 9, and 12 days. The results revealed that the formula can be stored at 50°C for 7 days, 60°C for 6 days, 70°C for 4 days, 80°C for 3 days, 25°C for 23 days, and 30°C for 16 days.

Discussion: The study demonstrates that the medicinal formula possesses antioxidant and anti-inflammatory properties, as evidenced by the DPPH assay and Nitric Oxide inhibition method results. These properties align with the traditional use of the formula in alleviating various symptoms, such as chest pain, muscle pain, numbness, loss of taste, and insomnia. Furthermore, the stability study provides valuable information for determining the formula's shelf life and appropriate storage conditions. It is clear that the formula can be stored for different durations at various temperatures, ensuring its efficacy and safety over time.

Conclusion and Recommendation: This research provides scientific support for the traditional use of the Thai medicinal formula and highlights its potential benefits in addressing oxidative stress and inflammation, essential aspects of maintaining overall health. Further studies should explore additional variables and extraction methods to provide more comprehensive and accurate results.

Key words: *Ya Thappayathikhun* formula, antioxidant, DPPH assay, nitric oxide, stabilization

บทนำและวัตถุประสงค์

ตำรับยาทัพยาธิคุณเป็นตำรับยาในคัมภีร์แพทย์แผนโบราณของขุนโสภิตบรรณลักษณะเล่ม 2 กล่าวไว้ดังนี้ “ยาชื่อทัพยาธิคุณ เอาสะค้าน ผักแพวแดง ดอกตี่ ว่านน้ำ ยาดำ มหาหิงค์ โกฐสอ โกฐจุฬาลัมพา โกฐพุงปลา กัญชา อุตพิต เนื้อฝักราชพฤกษ์ ชะเอมเทศ ดีปลี แก่นแสมทะเล เอาลิ่งละ 1 ส่วน พริกไทย ล่อนเท่ายาทั้งหลาย ตำเป็นผง เอาน้ำใบกะเม็งน้ำ ลูกประคำดีควาย เคล้ายาผงตากแดดให้แห้งลิ่งละ 7 ครั้ง แล้วบดด้วยน้ำผึ้ง กินหนัก 1 สลึง แก้ก้อน 5 ประการ ซึ่งให้จุกเสียดแลเป็นพรรตึก แก้กลมเป็นก้อนในอุทร ให้เจ็บทั่วร่างกาย เจ็บสะเอว มือเท้าตายกระด้างแล เมื่อยขบทุกข้อทุกลำ ชัดแข้งขา เจ็บทวารหนัก พิการต่าง ๆ เจ็บศีรษะเวียนหน้าตา เจ็บไหล่ทั้งสอง ปากเปรี้ยว เสียงแหบแห้ง ชัดสีข้าง ชัดอก ท้องขึ้น กินอาหารไม่มีรส นอนไม่ใคร่หลับ โรคทั้งนี้เป็นเพราะเสมหะแห้ง บรุขและสตรีเป็นเหมือนกัน” สรรพคุณ

ของตำรับยาทัพยาธิคุณ แก้ก้อนที่ทำให้จุกเสียด เป็นพรรตึก เจ็บเมื่อยขบตามร่างกาย กินอาหารไม่รู้รส นอนไม่หลับ^[1]

ในทางการแพทย์แผนไทย ตำรับยาทัพยาธิคุณ นิยมนำมารักษารบเรหาอาการชาปลายมือปลายเท้า และอาการมือขมในผู้ป่วยมะเร็งตับ^[2] ซึ่งตำรับยาทัพยาธิคุณมีตัวยาดังนี้ สะค้าน ผักแพวแดง ดอกตี่ ว่านน้ำ ยาดำ มหาหิงค์ โกฐสอ โกฐจุฬาลัมพา โกฐพุงปลา อุตพิต เนื้อในฝักราชพฤกษ์ ชะเอมเทศ ดีปลี แก่นแสมทะเล กัญชา อย่างละ 1 ส่วน และพริกไทย ล่อน 16 ส่วน ทัพยาธิคุณเป็นตำรับที่มีส่วนผสมของกัญชา สารที่พบการใช้มากคือ cannabidiol (CBD), Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), cannabinol (CBN) และ cannabigerol (CBG) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอาการ และข้อบ่งใช้ การใช้ตำรับยาแผนไทยที่มีกัญชาเป็นส่วนประกอบกับสารสำคัญ หรือสารสกัดจากกัญชาทางการแพทย์แผนตะวันตก พบความ

สอดคล้องในการนำไปใช้ในบางกลุ่มอาการ ได้แก่ แก้คลื่นไส้ อาเจียน กระตุ้นความอยากอาหาร นอนไม่หลับ ลดความวิตกกังวล ลดอาการปวดเรื้อรัง^[3]

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรในตำรับยา ทักษิณคุณ สะค้านมีฤทธิ์ลดการอักเสบ ฤทธิ์ระงับปวด (*Piper interruptum* Opiz) ว่านน้ำมีฤทธิ์ลดอาการปวดเส้นประสาท ฤทธิ์ขับปัสสาวะ ฤทธิ์ยับยั้งการสะสมเซลล์ไขมัน ยาตำมีฤทธิ์กระตุ้นการขับถ่าย ใช้สำหรับเป็นยาระบาย โกลฐอมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (furanocoumarins) โกลฐพาลัมพามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส โกลฐพุงปลา มีฤทธิ์ชะลอวัย ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเมดิเลสเตอรอลิน เซอเมเทศมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Helicobacter pylori* ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ตีปัสมีฤทธิ์ลดไขมัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ระงับปวด ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร พริกไทยล่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย และสาร oleoresins ของพริกไทยล่อน ฤทธิ์ต้านเชื้อราและแบคทีเรีย ฤทธิ์ระงับปวด

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ มหาหิงค์มีฤทธิ์ช่วยลดอาการปวดเกร็งในช่องท้อง (antispasmodic), ขับลม (carminative), ช่วยย่อย (digestive), ระบาย (laxative) และมีฤทธิ์ถ่ายพยาธิบางชนิด (anthelmintic) เนื้อฝักราชพฤกษ์มีสารในกลุ่ม anthraquinones หลายชนิด เช่น rhein, aloe-emodin และ sennosides ซึ่งมีฤทธิ์เป็นยาระบาย สารสกัดจากส่วนฝักดอก และส่วนต่าง ๆ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ สารสกัดจากส่วนใบมีฤทธิ์ฆ่าพยาธิใบไม้ ขับปัสสาวะ ลดการอักเสบ สารสกัดจากเมล็ด ลำต้น และเปลือกต้นมีฤทธิ์ลดไขมันและลดน้ำตาลในเลือด

อุตพิดมีฤทธิ์ลดอาการปวด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แก่นแสมทะเลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์รักษาแผล ผักแพวแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดองดึงมีฤทธิ์แก้ปวด และต้านการอักเสบ (oleoresins) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา แบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านพิษงู^[4]

การศึกษานี้จึงต้องการพิสูจน์ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในตำรับยา ทักษิณคุณ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ตัวยาทั้งตำรับ เป็นการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความคงตัวของตำรับยาในอุณหภูมิต่าง ๆ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรตำรับยา ทักษิณคุณมาก่อน และเพื่อนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในงานวิจัยตำรับยา ทักษิณคุณในการศึกษาทางคลินิกต่อไป อีกทั้งยังเป็นการพิสูจน์ว่าตำรับยา ทักษิณคุณมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบที่สามารถช่วยชะลอความเสื่อมระดับเซลล์ซึ่งตรงกับสรรพคุณของตำรับที่ช่วยบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ ปวดเมื่อย จุกเสียด กินอาหารไม่ร่ำรส และนอนไม่หลับอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยา ทักษิณคุณ
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของตำรับยา ทักษิณคุณ
3. เพื่อศึกษาความคงตัวของตำรับยา ทักษิณคุณที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80 °C. ระยะเวลา 3, 6, 9, และ 12 วัน

ระเบียบวิธีศึกษา

การศึกษานี้เป็นการวิจัยทดลองในห้องปฏิบัติการ (laboratory) คือเพื่อหาฤทธิ์การต้านอนุมูล

อิสระด้วยวิธีการ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) เพื่อหาค่าความต้านอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้กระบวนการ nitric oxide เพื่อหาการยับยั้ง nitric oxide และศึกษาความคงตัว ด้วยวิธีทดสอบโดยเก็บตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ 50, 60, 70, 80 °C. ระยะเวลา 3, 6, 9, และ 12 วัน โดยทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ piperine ในตำรับยาทพยาคิณ เนื่องจากเป็นสมุนไพรที่ใช้ปริมาณมากที่สุดในตำรับและจัดเป็นตัวยาหลักในการออกฤทธิ์ทางเภสัชกรรมไทย

การศึกษานี้ได้รับการพิจารณารับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากวิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดพิษณุโลก เอกสารรับรองเลขที่ SCPHPL 2/2566.1.14

1. ขั้นตอนการสกัดสาร

นำตำรับยาทพยาคิณที่ได้จากโรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชเด่นชัย จังหวัดแพร่ ในรูปแบบยาผง ปริมาณ 250 g แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก ด้วยเครื่องชั่งสาร (digital scale) ให้ได้ปริมาณ 100 g นำใส่บีกเกอร์ (beaker) ตวง ethanol 95% ปริมาณ 1,000 ml นำมาสกัดกับตำรับยาทพยาคิณ ในบีกเกอร์ (beaker) จากนั้นนำฟอยล์มาหุ้มเพื่อกันแสง เก็บในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยคนสารทุกวันเมื่อครบ 3 วัน นำสารสกัดในบีกเกอร์ (beaker) มากรองด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump oil free) นำสารสกัดที่ได้มากลั่นระเหย ด้วยการใช้สารแบบหมุน rotary evaporator จนได้สารสกัดเป็นน้ำเหลว จากนั้นนำมาระเหยต่อใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 °C. สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นของเหนียวมีสีน้ำตาลเข้ม เก็บสารสกัดไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 2-4 °C.

2. ขั้นตอนในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

เตรียมสารละลาย DPPH โดยชั่งสาร DPPH 15.78 mg ต้องการใช้สาร DPPH 0.2 mM ซึ่งต้องเปลี่ยน mM เป็น mg โดย

$$1 \text{ mole} = 394.32 \text{ mg}$$

$$0.2 \text{ mole} = 0.2 \times 394.32 = 78.86 \text{ mg}$$

$$1,000 \text{ ml ใช้ DPPH } 78.86 \text{ mg}$$

$$200 \text{ ml ใช้ DPPH } (78.86 \times 200) / 1,000 = 15.78 \text{ mg}$$

ลงในหลอด microcentrifuge tube ดูดสาร ethanol 95% มา 1000 μ l ใส่หลอด microcentrifuge tube ที่มีสาร DPPH ทำการเขย่าให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นหยดสารละลาย DPPH ลงใน volumetric flask เติมสาร ethanol 95% ปริมาณ 200 ml เขย่าสารให้เข้ากัน นำฟอยล์มาหุ้มเพื่อกันแสง นำเก็บใส่ตู้เย็น ซึ่งสารสกัดตำรับยาทพยาคิณ 10 mg ใส่หลอด microcentrifuge tube จากนั้นดูดสาร ethanol 95% มา 1,000 μ l ทำการเขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำสารละลายสารสกัดตำรับยาทพยาคิณมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ดังนี้ คือ 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.625 mg/ml, 0.312 mg/ml, 0.156 mg/ml, 0.078 mg/ml, 0.039 mg/ml, 0.019 mg/ml, 0.009 mg/ml นำสารละลายสารสกัดตำรับยาทพยาคิณ ลงใน 96 well plate จำนวน 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 หลุม และหยด DPPH ลงไป เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 nm ดัดแปลงวิธีการของพิชชาภรณ์ วันโย^[5] โดยใช้ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐานคำนวณ % inhibition of DPPH radical แต่ละความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาทพยาคิณ และสารมาตรฐาน DPPH ด้วยสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition of DPPH radical} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสาร DPPH

นำค่า inhibition of DPPH radical มาสร้างกราฟเพื่อหาค่า IC_{50} ของสารสกัดตำรับยาหทัยาธิคุณ และสารมาตรฐาน DPPH

3. ขั้นตอนในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ nitric oxide

การเตรียมสารละลาย

A = sodium nitroprusside ปริมาณ 0.26 g ในบีกเกอร์ (beaker) แล้วเติม water ปริมาณ 10 ml มาสกัดสาร

B = ชั่งสารสกัดตำรับยาหทัยาธิคุณ 10 mg ใส่ในหลอด microcentrifuge tube จากนั้นดูดสาร ethanol 95% มา 1,000 μ l ทำการเขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ดังนี้ คือ 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.313 mg/ml, 0.156 mg/ml, 0.078 mg/ml, 0.039 mg/ml, 0.020 mg/ml, 0.098 mg/ml

C = ชั่ง sulfanilamide 1% ละลายกับ 5% phosphoric acid

D = ชั่ง naphthylene diamine 0.1% ละลายกับน้ำ ปริมาณ 100 ml

4. ขั้นตอนการทดลอง

ชั่ง sodium nitroprusside ปริมาณ 0.26 g ในบีกเกอร์ (beaker) ละลายกับน้ำ ปริมาณ 10 ml แทนด้วย = A คือ สาร sodium nitroprusside เติมน้ำละลาย A ปริมาณ 680 μ l ใน micro-

centrifuge tube แล้วเติม phosphate buffered saline ปริมาณ 160 μ l มาสกัดสาร เติมน้ำละลาย B คือ สารละลายสารสกัดตำรับยาหทัยาธิคุณ ที่นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ดังนี้ คือ 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.313 mg/ml, 0.156 mg/ml, 0.078 mg/ml, 0.039 mg/ml, 0.020 mg/ml, 0.098 mg/ml ดูดสารละลาย B ปริมาณ 160 μ l มาสกัดกับสารในข้อที่ 2 จากนั้นนำไปเก็บในที่มืด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบ 3 ชั่วโมง เติมน้ำละลาย sulfanilamide ปริมาณ 20 μ l มาเก็บในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที แทนด้วย = C คือ สาร sulfanilamide 1% ละลายกับ 5% phosphoric acid เมื่อครบ 15 นาที เติมน้ำละลาย naphthylene diamine ปริมาณ 20 μ l มาเก็บในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที แทนด้วย = D คือ สาร naphthylene diamine 0.1% ละลายกับน้ำ ปริมาณ 100 ml เมื่อครบ 15 นาที เติมน้ำละลาย A + B + C + D ใส่ลงใน 96 well plate 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 100 μ l เติมน้ำละลาย B ใส่ลงใน 96 well plate ความเข้มข้นละ 3 หลุม หลุมละ 100 μ l นำสารละลาย A + C + D ใส่ลงใน 96 well plate 3 หลุม หลุมละ 100 μ l นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 nm ดัดแปลงจากวิธีการของ Phonphat Nitiwuttidecha^[6] โดยใช้ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน

คำนวณ % inhibition of nitric oxide ที่แต่ละความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาหทัยาธิคุณ และสารมาตรฐาน nitric oxide ด้วยสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition of nitric oxide} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงตัวควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

ข้อมูลแสดงผลเป็นค่าร้อยละ

นำค่า inhibition of nitric oxide มาสร้างกราฟเพื่อหาค่า IC_{50} ของสารสกัดตำรับยาทัพยาธิคุณและสารมาตรฐาน nitric oxide

5. ขั้นตอนการทดสอบความคงตัว โดยใช้หลัก การทดสอบ Drug stability^[7]

ซึ่งผงยาตำรับทัพยาธิคุณ ปริมาณ 1 g จำนวน 16 ขวด เก็บขวดแก้วในข้อที่ (1) ไว้ที่ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven) อุณหภูมิ 50 °ซ. จำนวน 4 ขวด อุณหภูมิ 60 °ซ. จำนวน 4 ขวด, อุณหภูมิ 70 °ซ. จำนวน 4 ขวด, และอุณหภูมิ 80 °ซ. จำนวน 4 ขวด แต่ละอุณหภูมิจะเก็บไว้ที่เวลา 3 วัน 6 วัน 9 วัน และ 12 วัน เท่ากันทุกอุณหภูมิ เมื่อครบ 3 วัน นำขวดแก้ว 1 ขวด ของแต่ละอุณหภูมิ (50 °ซ., 60 °ซ., 70 °ซ., 80 °ซ.) จากตู้อบมาแช่ในตู้เย็น (รวมทั้งหมด 4 ขวด) เมื่อครบ 6 วัน นำขวดแก้ว 1 ขวด ของแต่ละอุณหภูมิ (50 °ซ., 60 °ซ., 70 °ซ., 80 °ซ.) จากตู้อบมาแช่ในตู้เย็น (รวมทั้งหมด 4 ขวด) เมื่อครบ 9 วัน นำขวดแก้ว 1 ขวด ของแต่ละอุณหภูมิ (50 °ซ., 60 °ซ., 70 °ซ., 80 °ซ.) จากตู้อบมาแช่ในตู้เย็น (รวมทั้งหมด 4 ขวด) เมื่อครบ 12 วัน นำขวดแก้ว 1 ขวด ของแต่ละอุณหภูมิ (50 °ซ., 60 °ซ., 70 °ซ., 80 °ซ.) จากตู้อบมาแช่ในตู้เย็น (รวมทั้งหมด 4 ขวด) เมื่อเก็บขวดแก้วครบทุกอุณหภูมิแล้ว นำ ethanol 95% ปริมาณ 10 ml มาสกัดสารเก็บในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบ 3 วัน นำ syringe มาดูดสารทุกอุณหภูมิ ใส่ catalong peptides ปริมาตร 0.5 cc เจือจางสาร โดยดูดสารสกัดทัพยาธิคุณ ปริมาตร 100 μ l มาทำการละลายกับ ethanol 95% ปริมาตร 900 μ l นำมาตรวจวัดปริมาณสาร piperine ด้วยเครื่อง HPLC

ผลการศึกษา

1. ผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

ผลการศึกษาฤทธิ์ของตำรับยาทัพยาธิคุณต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบ DPPH radical scavenging assay ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.625 mg/ml, 0.312 mg/ml, 0.156 mg/ml, 0.078 mg/ml, 0.039 mg/ml, 0.019 mg/ml, 0.009 mg/ml นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยแทนที่สมการการคำนวณหา IC_{50} ได้เท่ากับ 0.8859 mg/ml

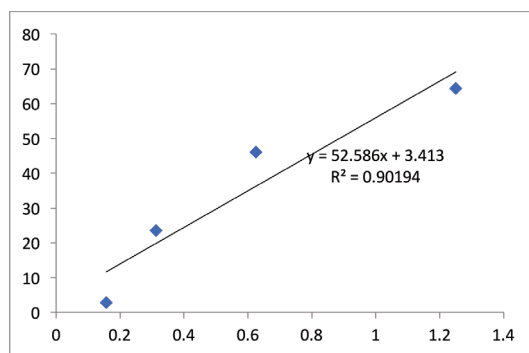


Figure 1 The inhibition of antioxidant activity consistent with the concentration that has a higher inhibitory effect.

2. ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ nitric oxide

ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของตำรับยาทัพยาธิคุณ ด้วยวิธีการทดสอบการยับยั้ง nitric oxide ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.313 mg/ml, 0.156 mg/ml, 0.078 mg/ml, 0.039 mg/ml, 0.020 mg/ml, 0.098 mg/ml จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยแทนที่สมการการคำนวณหา IC_{50} ได้เท่ากับ 1.59 mg/ml

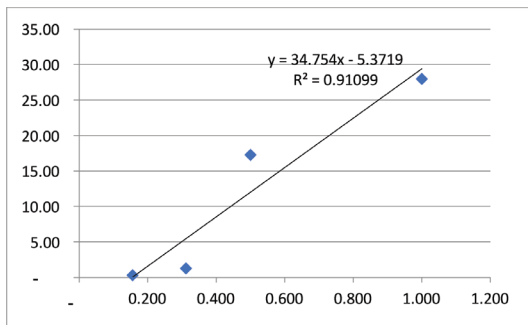


Figure 2 The inhibition of the anti-nitric oxide effect, consistent with the higher the concentration, the higher the inhibitory effect.

3. การทดสอบความคงตัว

ผลการศึกษาความคงตัวของตำรับยาที่พายาคูณ ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80 °ซ. แล้วนำมาตรวจวัดปริมาณสาร piperine ด้วยเครื่อง HPLC โดยปริมาณ piperine คงเหลือในแต่ละช่วงเวลามีความสัมพันธ์ในรูปแบบ natural logarithm และเวลาได้ (Figure 3) ซึ่งพฤติกรรมของการสลายตัวดังกล่าวจัดเป็นการสลายตัวในปฏิกิริยาอันดับที่ 1 (first order reaction)

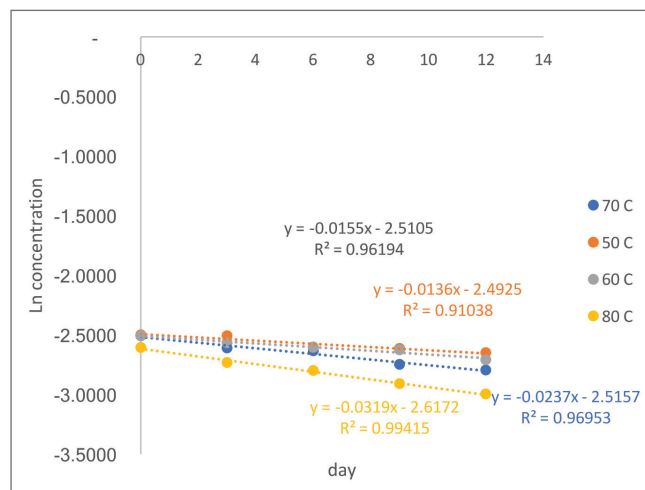


Figure 3 Relationship between the concentration of piperine and the duration (days) when stored at different temperatures.

y = ค่าความเข้มข้น, x = ระยะเวลา (วัน), R = ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์

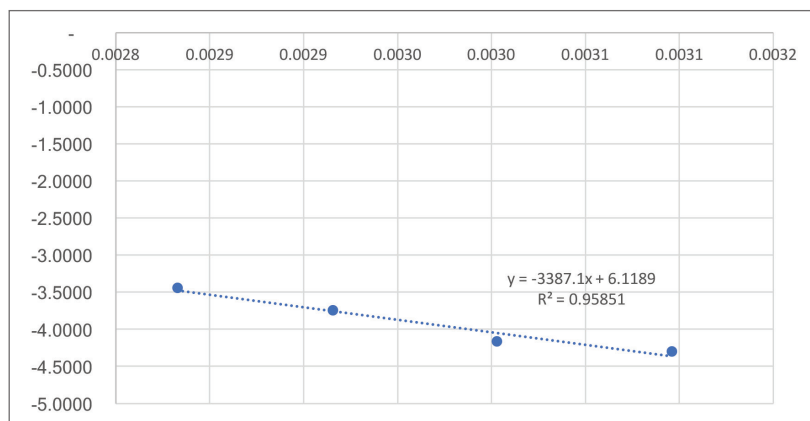


Figure 4 Relationship between reaction constants.

Table 1 The expiration date (T90). From the relationship of the reaction ranks, we can calculate the amount of piperine that remains 90% at various temperatures from the equation $T90 = 0.105/K$.

	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	25 °C	30 °C
K	0.0136	0.0155	0.0237	0.0319	0.00453	0.0064
LNK	-4.2977	-4.1669	-3.7423	-3.4451	-5.397240	-5.05853
T (K)	323.0000	333.0000	343.0000	353.0000	298.0000	303.0000
1/T	0.0031	0.0030	0.0029	0.0028	0.0034	0.0033
T90	7.72	6.77	4.43	3.29	23.18	16.54

จาก Table 1 การหาวันหมดอายุ (T90) ของสาร piperine ในผงยาตำรับทพยาคูณสกัดในสารละลาย ethanol 95% พบว่าเมื่อเก็บสาร piperine ไว้ที่อุณหภูมิ 50 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 7 วัน, อุณหภูมิ 60 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 6 วัน, อุณหภูมิ 70 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 4 วัน, อุณหภูมิ 80 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 3 วัน, อุณหภูมิ 25 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 23 วัน, อุณหภูมิ 30 °ซ. สามารถเก็บได้นาน 16 วัน

อภิปรายผล

การศึกษาตำรับยาทพยาคูณ ด้วยกระบวนการทั้ง 3 วิธี คือ antioxidant, การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านวิธีการวัด nitric oxide และความคงตัวของตำรับยาทพยาคูณซึ่งตัวยาคูณอยู่ในรูปแบบผง นำมาสกัดด้วย ethanol 95% พบว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระที่ปริมาณ 0.8859 mg/ml สามารถยับยั้ง nitric oxide ที่ปริมาณ 1.59 mg/ml ทำให้ทราบว่าคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้น และยืนยันได้ว่า ตำรับยาทพยาคูณมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบได้ในระดับการทดลองห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) สามารถนำไป

ต่อยอด และพัฒนาตำรับยาเพื่อการใช้ต่อมนุษย์และประโยชน์ต่อวงการแพทย์แผนไทยต่อไป ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของคุณสุวดี โพธิ์วิจิตร, 2563 ที่ศึกษาเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร และงานวิจัยของคุณกมลลักษณ์ ลือเรือง, 2565 ที่ศึกษาเรื่องฤทธิ์ต้านการอักเสบของพิกัดยาตรีภูก พบว่า สมุนไพรในตำรับยาทพยาคูณ มีฤทธิ์ใกล้เคียงในด้านต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ และผลจากการทดสอบความคงตัวของตำรับยา พบว่า ตำรับยาทพยาคูณเหมาะสมที่จะเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ มากกว่าในที่ที่มีอุณหภูมิสูง เนื่องจากอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไปมีผลต่อคุณภาพของยาได้โดยทั่วไปมักให้เก็บยาที่อุณหภูมิห้อง คือ อุณหภูมิประมาณ 18-25 °ซ. ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของคุณศศิประภา ชิตร์ตถา, 2564 ที่ศึกษาเรื่องความคงสภาพของยา แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองในครั้งนี้ เป็นเพียงผลการศึกษาในหลอดทดลองเท่านั้น จึงควรที่จะทำการทดลองในระยะต่อไป คือ การทดลองในสัตว์ทดลอง และการวิจัยทางคลินิก เพื่อทดสอบความปลอดภัยของยาก่อนที่จะนำมาใช้กับมนุษย์ต่อไป

ข้อสรุป

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบ ที่สกัดด้วย ethanol 95% พบว่า สารสกัดตำรับยาทพยาคิคุณ ต้องใช้ปริมาณ 0.8859 mg/ml สามารถทำให้ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid และใช้ปริมาณ 1.59 mg/ml สามารถต้านการอักเสบ ด้วยวิธีการยับยั้ง nitric oxide ได้ ในด้านความคงตัวตำรับยาทพยาคิคุณในรูปแบบผงสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้อง 25 °ซ. ได้นานถึง 23 วัน อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ใช้กระบวนการสกัดด้วย ethanol เพียงอย่างเดียว ในการศึกษาครั้งต่อไปควรเพิ่มตัวแปรและวิธีการสกัดที่หลากหลายเพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่ครอบคลุมและแม่นยำยิ่งขึ้น

References

1. Pirunrat S, Safawi M, Nasri W, Sirirat S. A study of the stability and preliminary properties of herbal extracts from Thai medicinal herbs for antimicrobial activity on the skin. Thai Medical Journal. 2012;8(1):117-28. (in Thai)
2. Suchada M, Pweena L. Analysis of antioxidant properties by DPPH, ABTS, and FRAP methods and the total phenolic content of herbal extracts in the homotophacitrat medicine [internet]. 2019 [cited 2023 Nov 7]; Available from: <https://sci.bsru.ac.th/sciweb/e-magazine/15-1/chapter-10.pdf3> (in Thai)
3. Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University. Cannabis in Thai herbal medicine. [internet]. 2023 [cited 2023 Sep 12]; Available from: <https://www.si.mahidol.ac.th/th/healthdetail.asp?aid=1518> (in Thai)
4. Faculty of Pharmacy, Ubon Ratchathani University. Piper nigrum L. [internet]. 2007 [cited 2023 Nov 7]; Available from: <https://apps.phar.ubu.ac.th/thaicrudedrug/main.php?action=viewpage&pid=90> (in Thai)
5. Phitchaphon W, Janwipark N, Wongpredee P, Kumijiam B. Antioxidant activity of Mahad leaf extract using the DPPH radical scavenging assay. [internet]. 2022 [cited 2023 Nov 7]; Available from: https://rspg.ksu.ac.th/manage/img_file/yL9AIo46mpf20210923163644.pdf (in Thai)
6. Phonphat N, Teeratat S. Study on antioxidant and anti-inflammatory activities of *Dracaena loureiri* Gagnep stem woods. RSU National Research Conference 2016; [internet] [cited 2023 Nov 7]; Available from: <https://rsucon.rsu.ac.th/files/proceedings/nation2016/G1-07.pdf>. (in Thai)
7. Sasiprapa Ch. Drug stability. Siam University [internet]. [cited 2023 Nov 7]; Available from: ccpe.pharmacycouncil.org. (in Thai)