

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดจากตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตาในเซลล์ ATDC-5

วาสุกา พลายงาม*, สมพร ผลกระโทก*, สันหจจุทา พวงมาลา*, มรกต ชาตาทิคุณ†‡

* วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

† สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ตำบลไทยบุรี อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160

‡ ผู้รับผิดชอบบทความ: moragot.ch@wu.ac.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคข้ออักเสบที่ทำให้พิการได้ในตริกออกไซด์ (NO) ถูกกำหนดให้เป็นหนึ่งในสาเหตุที่สำคัญของการเกิดการอักเสบในโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งจากงานวิจัยหลายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารสกัดจากพืชมีฤทธิ์ในการป้องกันโรคข้อเข่าเสื่อมโดยการยับยั้งการแสดงออกของ NO และการสังเคราะห์ inducible nitric oxide synthase (iNOS). การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ ATDC-5 mouse chondrogenic รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดที่ได้จากเอทานอลจากตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตา

วิธีการศึกษา: หาปริมาณสารฟีนอลิกโดยวิธี Folin-ciocalteu และสารฟลาโวนอยด์ ที่ได้จากตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตา โดยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย DPPH และ ABTS Assay ฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี NO assay ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ใน ATDC-5 mouse chondrogenic cell และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay ของตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตาที่สกัด 95% เอทานอล

ผลการศึกษา: พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตามีปริมาณฟีนอลิก เท่ากับ 479.33 ± 2.08 mg GAE/g extract. และ มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 177.89 ± 3.02 mg QE/g ext จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่ายาแก้ลมอุทงคมาวาตามีค่า IC_{50} เท่ากับ $137.72 \mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และมี IC_{50} เท่ากับ $27.28 \mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 ของสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตาที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 25, 50 และ $100 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งพิจารณาจากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต้องไม่ต่ำกว่า 80% พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ $100 \mu\text{g/ml}$ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แต่หากปรับเพิ่มเป็น $200 \mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตาทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ $100 \mu\text{g/ml}$ เป็นความเข้มข้นสูงสุดในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ โดยใช้ L-NA เป็นสารมาตรฐาน จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตามีค่า IC_{50} เท่ากับ $41.88 \mu\text{g/ml}$

อภิปรายผล: การศึกษานี้ให้ข้อมูลว่ายาแก้ลมอุทงคมาวาตาแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งไนตริกออกไซด์ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อม โดยน่าจะมาจากสารประกอบฟีนอลและ

ฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีความสำคัญต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้สรุปได้ว่าตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตาเป็นตำรับยาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ จึงควรมีการศึกษายอื่น ๆ เพิ่มเติม เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปใช้รักษาข้อเข่าเสื่อมต่อไป

คำสำคัญ: ตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตา, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ด้านการอักเสบ

Antioxidant and Nitric Oxide Inhibitory Activities of Ya-Kae-Lom-Utthang-Ka-Ma-Va-Ta Thai Traditional Medicine Formula in ATDC-5 Cells

Waluga Plaingam^{*}, Somporn Phonkrathok^{*}, Sanhajutha Puangmala^{*}, Moragot Chatatikun^{†,‡}

^{*}College of Oriental Medicine, Rangsit University, Lak Hok Sub-District, Mueang Pathum Thani District, Pathum Thani 12000, Thailand.

[†]Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, Walailak University, Thai Buri Sub-District, Tha Sala District, Nakhon Si Thammarat 80160, Thailand.

[‡]Corresponding author: moragot.ch@wu.ac.th

Abstract

Introduction and Objectives: Knee osteoarthritis (KOA), a disabling joint inflammatory disease, is caused by nitric oxide (NO) established as one of its major causes. Many previous studies have shown that bioactive compounds and plant extracts can exhibit chondroprotective effects by suppressing the expression of NO and inducible nitric oxide synthase (iNOS). The objectives of this research were to determine total phenolic content and total flavonoid content, and investigate antioxidant and inhibitory effects of nitric oxide by 95% ethanolic extract of Ya-Kae-Lom-Utthang-Ka-Ma-Va-Ta (UKLU) formula in ADTC-5 mouse chondrogenic cells.

Methods: The total phenolic and total flavonoid contents were determined by folin ciocalteu and aluminium chloride methods, respectively. Antioxidant activity was also determined using DPPH and ABTS radical scavenging assays. Inhibitory activity against nitric oxide production was induced by lipopolysaccharide (LPS) used as the assay for anti-inflammation in ATDC-5 cells. In finally, the MTT assay was used to measure cytotoxicity.

Results: In the UKLU formula extract, 479.33 ± 2.08 mg GAE/g and 177.89 ± 3.02 mg GAE/g of total phenolics and total flavonoids, respectively, were found. In the formula extract's antioxidant activity testing, the IC₅₀ values were 137.72 µg/mL for DPPH method and 27.28 µg/mL in ABTS method. And finally, the formula extract was further tested for anti-inflammatory via inhibition of nitric oxide production and cytotoxicity in ATDC-5 cells. The ethanolic extract of the formula showed the nitric oxide inhibitory activities with the IC₅₀ value at 41.88 µg/mL.

Discussion: This study provides scientific information on YKLU formula's antioxidant and anti-inflammatory activities via NO inhibition effects, which are associated with KOA. The effects might mainly result from phenolic compounds and flavonoids with such antioxidant and anti-inflammatory capacities.

Conclusion and Recommendation: The present investigation indicates that the YKLU formula has antioxidant and anti-inflammatory activities. Further studies should be carried out on the feasibility of using the formula in treating KOA in the future.

Key words: Ya-Kae-Lom-Utthang-Ka-Ma-Va-Ta, antioxidant activity, anti-inflammatory

บทนำและวัตถุประสงค์

การศึกษาวัยจี้ยตำรับยาสมุนไพรของไทยเป็นความจำเป็นหนึ่งที่จะเพิ่มศักยภาพของประเทศและเป็นหนทางหนึ่งของการนำไปสู่การพึ่งตนเองด้านยาถือเป็นความมั่นคงด้านสุขภาพอย่างหนึ่งและนำไปสู่ความยั่งยืนด้านเศรษฐกิจ โดยเฉพาะในเรื่องของโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมและความชรา ซึ่งจากข้อมูลของ United Nations World Population Ageing ประเทศไทยกำลังอยู่ในช่วงการเปลี่ยนผ่านเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ โดยสมบูรณ์ (Complete-Aged Society) คือ มีสัดส่วนประชากรที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไปเกินร้อยละ 20 ของประชากรโดยตัวเลขของประเทศไทย แต่จากข้อมูลประชากรของประเทศไทยปี 2558 จำนวนประชากรในประเทศไทยอยู่ที่ 65,203,979 คน เป็นผู้มีอายุ 60 ปีขึ้นไป 10,569,021 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 16.2 ของประชากรทั้งหมด แปลว่าประเทศไทยก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุแล้ว และคาดการณ์ว่าในปี 2564 ไทยจะเข้าสู่สังคมประชากรสูงวัยแบบสมบูรณ์^[1] หนึ่งในปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญ โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ คือ โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง^[2] ผู้ที่มีภาวะข้อเข่าเสื่อมมาก ถ้าไม่ได้รับการรักษา หรือปฏิบัติตัวอย่างเหมาะสม อาจทำให้มีความเจ็บปวด ข้อเข่าผิดรูป เดินได้ไม่ปกติ ปฏิบัติกิจวัตรประจำวันต่างๆ ไม่สะดวก มีความทุกข์ทรมาน ทั้งทางด้านร่างกายและจิตใจ โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นการเสื่อมของข้อเข่า โดยพบว่าตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในโรคนี้ได้แก่ กระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) ในข้อชนิดมีเยื่อข้อ (synovial joint) จะมีการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งเกิดขึ้นช้า ๆ อย่างต่อเนื่องตามเวลาที่ผ่านไป มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของกระดูกอ่อนผิวข้อ รวมถึงผิวกระดูกต้นขา และกระดูก

หน้าแข้ง เช่น กระดูกใต้กระดูกอ่อน (sub-chondral bone) หนาตัวขึ้น มีการลดลงของน้ำไขข้อ ทำให้คุณสมบัติการหล่อลื่นลดลง^[3-4] สาเหตุของ osteoarthritis มาจากหลายปัจจัย ถึงแม้ว่าจะไม่ได้จัดอยู่ใน inflammatory arthropathy แต่การดำเนินไปของโรคมีความสัมพันธ์กับการที่ chondrocyte cells ที่เป็น unique cell ที่เป็นส่วนประกอบของ articular cartilage ที่ฝังตัวใน extracellular matrix^[5] เกิดการ overexpression ของ pro-inflammatory mediators ต่าง ๆ เช่น IL-1, TNF- α และ nitric oxide เป็นสาเหตุให้เกิด cartilage degeneration ซึ่งมีรายงานพบว่าปริมาณของ nitric oxide ใน chondrocyte cells ของผู้ป่วย osteoarthritis มากขึ้นกว่าปกติ^[6] ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์ ATDC-5 mouse chondrogenic cell line ที่เป็น *in vitro* model ที่ดีในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบแบบเหนี่ยวนำให้เกิด nitric oxide^[7] สำหรับยาที่ใช้ในการรักษา osteoarthritis ปัจจุบันจะเป็นยาในกลุ่มของ non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ซึ่งพบทั้งผลข้างเคียงและผลไม่พึงประสงค์^[8] จึงทำให้ปัจจุบันมีการหาทางเลือกใหม่ของยาที่มีประสิทธิผลและความปลอดภัยเพื่อเป็นทางเลือกของการบำบัดรักษา โดยสมุนไพรและสารจากสมุนไพรได้ถูกนำมาใช้ ข้อมูลจากรายงานตำรับยาแผนไทยแห่งชาติฉบับ 2561 ที่จัดทำโดยกองคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทยและแพทย์พื้นบ้านไทย, กองวิชาการและแผนงาน, สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข มีตำรับยาที่น่าสนใจและน่าจะมีประสิทธิผลในการใช้บำบัด รักษาโรคข้อเสื่อมได้ คือ ตำรับยาแก้ลมอุทฺธังคมาวาตา ที่มาของตำรับยามาจากตำราพระโอสถครั้งรัชกาลที่ 2 (กองคุ้มครองและ

ส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทยและแพทย์พื้นบ้านไทย, กองวิชาการและแผนงาน, สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2561) ประกอบด้วย โกลูเซมา มหาหิงค์ สิ่งละ 4 ส่วน การบูร กานพลู ดอกจันทร์ ผลพิลังกาสงา กัญชา สิ่งละ 6 ส่วน โกลูบัว สมอเทศ กระลำพัก จันทร์ชะมด พริกหอม ดีปลี สิ่งละ 8 ส่วน พริกไทย 40 ส่วน ทำเป็นจุนบดละลายน้ำผึ้งให้กินหนักสัปดาห์ ใช้แก้ลมอุทกชงคมาวาตา แก้ลมอัมพฤกษ์ อัมพาต เป็นเห็บซา แก้ลมใหญ่ทั้งหลายที่เกิดในกองธาตุ จากการสืบค้นพบว่าข้อมูลงานวิจัยของยาตำรับนี้ยังน้อยอยู่มาก ทางผู้วิจัยจึงเกิดแนวคิดที่จะศึกษาฤทธิ์ของตำรับยานี้ โดยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ รวมทั้งทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของตำรับยาสมุนไพรดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์รวมถึงทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบผ่านกลไกยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์และความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5

ระเบียบวิธีศึกษา

1. อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือและวัสดุ ประกอบด้วย Analytical Balance (4 ตำแหน่ง Sartorius, Germany), Micro pipette (Gilson, France), microplate reader (Bio-TEK, USA), 96 well plate (Nunc, Denmark), Laminar air flow (Faster, Italy), Centrifuge (Labortechnik, Germany), Rotary evaporator (Buchi, Switzerland), CO2 incubator (Gibthai, Thai)

สารเคมี ประกอบด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethyl

benzothiazoline-6-sulfonic Acid), 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), 3(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl) 2,5, Diphenyl tetrazolium bromide (Sigma, USA) Absolute ethanol, Ethyl Acetate, Folin-Ciocalteu, Alpha-tocopherol, Butylated hydroxytoluene (BHT), Fetal bovine serum, gallic Acid, L-nitroarginine (L-NA), Quercetin (Sigma, USA), Ascorbic acid (RCI-Labscan, Thai), Autoclave (Tomy SX-700, Japan), Aluminum chloride (Ajax Finechem, Thai), Dulbecco's modified eagle medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (Sigma-aldrich, Germany), Penicillin-streptomycin (Invitrogen, USA)

ADTC-5 mouse chondrogenic cells จาก RIKEN BRC ประเทศญี่ปุ่น

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเตรียมตำรับยาและสารสกัด

นำสมุนไพร ประกอบด้วย พริกไทย 400 กรัม โกลูเซมา มหาหิงค์ อย่างละ 40 กรัม การบูร กานพลู ดอกจันทร์ ผลพิลังกาสงา ใบกัญชา อย่างละ 60 กรัม โกลูบัว สมอเทศ กระลำพัก จันทร์ชะมด ดีปลี พริกหอม อย่างละ 80 กรัม (ซื้อจากบริษัท เจริญสุขโฮสเทลและเวชพงศ์โฮสเทล) มาล้างให้สะอาด ทำการอบที่ 60 °ซ จนกว่าจะแห้ง ยกเว้น มหาหิงค์ และการบูร จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดแล้วผ่านร่อน นำมาประกอบเป็นตำรับ แล้วนำไปสกัดด้วย 95% เอทานอล โดยใช้ตำรับยา 500 กิโลกรัม ต่อ 95% เอทานอล 2 ลิตร นำไปตั้งเขย่าไว้ 24 ชั่วโมง นำมากรองเอาส่วนใสและนำกากมาสกัดต่ออีก 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาเอทานอลออกให้หมด

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วย

วิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัด โดยใช้วิธี Aluminum Chloride Colorimetric Method อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Aluminum Chloride ($AlCl_3$) จับกับหมู่ Ketone และ Hydroxyl ของสารฟลาโวนอยด์ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลืองในสถานะที่เป็นกรด การศึกษาครั้งนี้ใช้ Quercetin เตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50-120 $\mu g/ml$ และเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ดูดสารตัวอย่างจำนวน 100 ไมโครลิตร เติมน้ำละลาย 10% $AlCl_3$ จำนวน 40 ไมโครลิตร ตามด้วย 95% Ethanol จำนวน 600 ไมโครลิตร และสารละลาย 1M Sodium Acetate จำนวน 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที นำค่าไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม เทียบกับกราฟมาตรฐาน Quercetin รายงานผลในหน่วย mgE ของ Quercetin ต่อกรัม ของสารสกัดหยาบ [mg Quercetin Equivalent (QE)/g of Crude Extract] ซึ่งปริมาตรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบ

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกด้วยวิธี

Folin-Ciocalteu Assay

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) ด้วยวิธี Folin Ciocalteu อาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบฟีนอลิกในการเปลี่ยนแปลงสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่มีสีเหลืองในสถานะที่เป็นต่างให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งจะสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีเกิดจากปฏิกิริยาของไอออน Mo (VI) สีเหลืองเมื่อมีการรับอิเล็กตรอน

จากสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น Mo (VI) จากสีเหลือง กลายเป็นสีน้ำเงินดังสมการปฏิกิริยาต่อไปนี้ การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสามารถทำได้โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic Acid) เป็นสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 60-200 $\mu g/ml$ เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ดูดสารตัวอย่างจำนวน 100 ไมโครลิตร เติมน้ำละลาย 10% v/v Folin-Ciocalteu จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำละลาย 0.7 M Sodium Carbonate (Na_2CO_3) จำนวน 800 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) เทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic Acid รายงานผลในหน่วย mgE ของ Gallic Acid ต่อกรัม ของสารสกัดหยาบ [mg Gallic Acid Equivalent (GAE)/g of Crude Extract] ซึ่งปริมาตรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบ

2.4 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วย

วิธี 2,2-Diphenyl-Picrylhydrazyl หรือ DPPH Assay

เป็นหนึ่งในวิธีการที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชเนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว (Figure 1) สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 nm ซึ่งจะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ การแสดงผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบนิยมรายงานเป็นค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึง ปริมาณสาร

ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50% โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบกับค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระแล้วหาค่า IC_{50} ในการคำนวณความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระจะเปรียบเทียบค่าของสารทดสอบกับสารมาตรฐาน การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วย DPPH โดยเตรียมอนุมูลอิสระ DPPH ความเข้มข้น 2 mM ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำการเจือจางอนุมูลอิสระ DPPH ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.03 nm จากนั้นจึงเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ Butylated Hydroxytoluene (BHT) วิตามินซี และวิตามินอี ที่

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

$$\text{โดยที่ } A_{\text{control}} = \text{Absorbance of Control} - \text{Absorbance of Control Blank}$$

$$A_{\text{sample}} = \text{Absorbance of Sample} - \text{Absorbance of Sample Blank}$$

2.5 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วย

วิธี 2,2-Azino-Bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) หรือ ABTS Assay

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}, 2,2-Azino-bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) Radical) (Figure 2) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 nm เริ่มจากการเตรียมอนุมูล ABTS ที่ความเข้มข้น 7 mM ในน้ำ 10 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 mM ในน้ำ 12.5 ml ที่อุณหภูมิ 4 °C ในที่มืดเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดอนุมูลอิสระ ABTS จากนั้นนำไปเจือจางด้วย

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

$$\text{โดยที่ } A_{\text{control}} = \text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of control blank}$$

$$A_{\text{sample}} = \text{Absorbance of sample} - \text{Absorbance of sample blank}$$

ความเข้มข้น 0.7810, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งละลายอยู่ในเอทานอล บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย microplate reader จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าการยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระและสร้างกราฟระหว่างค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของตัวอย่าง เพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) โดยการทดลองครั้งนี้จะทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ต่อ 1 ตัวอย่าง การคำนวณ % การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH Radical มีดังนี้

เอทานอล เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.7 ± 0.03 nm เตรียมสารมาตรฐาน Ascorbic Acid, BHT และ α -Tocopherol ที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งละลายอยู่ในเอทานอล บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ Scavenging Activity และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร เพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ 50% (IC_{50}) โดยการทดลองครั้งนี้จะทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ต่อ 1 ตัวอย่าง การคำนวณ % การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS Radical ดังนี้

2.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

2.6.1 การเลี้ยงเซลล์ ATDC-5

เซลล์ ATDC-5 ถูกนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ใน culture flask ที่มีอาหารเลี้ยงชนิด DMEM/Ham's F-12 ที่มีสารเติม 5% Fetal Bovine Serum, Human Transferrin 3×10^3 M, Penicillin 50 unit/ml และ Streptomycin 50 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ Human Transferrin, 3×10^8 Sodium Selenite นำไปบ่มใน CO₂ Incubator ที่มี 5% CO₂ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ และ Sub-culture ทุก 2 วัน รอจนได้ปริมาณเซลล์หนาแน่นเต็มที่จึงนำมาทำการทดสอบ

2.6.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

นำเซลล์ ATDC-5 ไปเลี้ยงใน 24 well plate โดยให้มีจำนวนเซลล์ 80,000 cells/well ในอาหาร DMEM/Ham's F-12 แล้วบ่มเซลล์ในตู้ CO₂ Incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ดูดอาหารเก่าออกเปลี่ยนเป็นอาหารที่ไม่มี FBS จำนวน 500 ไมโครลิตร ยกเว้นกลุ่ม FBS control บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ที่ทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงที่ไม่มี FBS ลงไป 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่ม 4 ชั่วโมง แล้วเติม LPS ที่ความเข้มข้น 250 ng/ml บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายแต่ละหลุมมา 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate แล้วเติม Griess Reagent ลงในแต่ละหลุมอีก 100 ไมโครลิตร จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา Griess Reaction ตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เซลล์สร้างขึ้นที่ความยาวคลื่น 550 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา

ค่ายับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์และค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้ง NO ที่ 50% (IC₅₀) โดยใช้ L-Nitroarginine (L-NA) เป็นสารมาตรฐาน

2.7 การทดสอบความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 Mouse Chondrogenic Cell โดยใช้วิธี 3-(4,5-Dimethyl thiazole-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Assay ซึ่งหลักการคือจะอาศัยเอนไซม์ภายในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ของเซลล์ที่มีชีวิตรีดิวซ์ MTT ที่เป็นสารสีเหลืองให้เป็นผลึก formazan สีม่วง ทำการทดสอบโดยเลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate โดยแต่ละหลุมให้มีปริมาณเซลล์อยู่ที่ 8,000 เซลล์ บ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเป็นชนิดที่ไม่มี FBS ยกเว้นในกลุ่มที่เป็นกลุ่มควบคุม นำไปบ่มต่อ 24 ชั่วโมง แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 100 ไมโครลิตร หลังจากทดสอบสารตัวอย่างกับเซลล์ในตู้ CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (10 ไมโครลิตร, 5 mg/ml) ลงไปในแต่ละหลุมแล้วบ่มต่อใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายทิ้งไปแล้วเติมตัวทำละลายผลึก 100 ไมโครลิตร (เตรียมจาก 10 g SDS+83.7 ไมโครลิตร ของ HCl ปรับปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น) เพื่อละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ด้วย microplate reader โดยสารที่ทดสอบจะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อค่าร้อยละการรอดชีวิตน้อยกว่า 80% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษา

1. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากพืชจำเป็นต้องมีการตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เพื่อยืนยันว่าสารสกัดที่นำมาทำการทดสอบฤทธิ์นั้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาตินั้นมีหลายชนิด และแต่ละชนิดมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิกรวม ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน (lignin) และที่พบกลุ่มใหญ่ที่สุดคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ ซึ่งพืชชนิดใดก็ตามที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงก็จะแสดงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ในสารสกัดของตำรับยาอุทงคมาวาตา โดยวิธี Folin-Ciocalteu Reagent และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) กรดแกลลิก (gallic acid, GAE) จากสมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสามารถคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมสมมูลกับกรดแกลลิกได้จากกราฟสมการความชันคือ $y = 0.0051x - 0.1744$ มีค่า $R^2 = 0.9992$ จากการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตามีปริมาณฟีนอลิก เท่ากับ 479.33 ± 2.08 mg GEA/g ext. จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ในสารสกัดตำรับ โดยคำนวณจากสมการถดถอยเชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน Quercetin จะได้กราฟที่มีสมการความชัน $y = 0.0114x - 0.0652$ ที่มีค่า $R^2 = 0.9909$

พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 177.89 ± 3.02 mg OE/g ext

2. ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS

พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตา มีค่า IC_{50} เท่ากับ $137.72 \mu\text{g/ml}$ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานคือ ascorbic acid, BHT และ α -Tocopherol ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.01, 12.35 และ $7.75 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วย DPPH และจากการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้อนุมูลอิสระ ABTS ผลการทดสอบของสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตา พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ $27.28 \mu\text{g/ml}$ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน คือ ascorbic acid, BHT และ α -Tocopherol พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.41, 1.80 และ $6.26 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์และความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 ของสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตา ด้วย 95% เอทานอล ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ $100 \mu\text{g/ml}$ จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งพิจารณาจากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ต้องไม่ต่ำกว่า 80% พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ $100 \mu\text{g/ml}$ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แต่หากปรับเพิ่มเป็น $200 \mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตาทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ $100 \mu\text{g/ml}$ เป็นความเข้มข้นสูงสุด จากการศึกษากิจกรรมยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ที่ถูกสร้างขึ้นโดยกระตุ้นด้วย LPS

ของสารสกัดตำรับยาด้วย 95% เอทานอล โดยใช้ L-NA เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลเป็นความเข้มข้นของสารสกัด $\mu\text{g/ml}$ ที่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 (inhibition concentration 50; IC_{50}) ทั้งนี้ในการคำนวณค่า IC_{50} จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวตามีค่า IC_{50} เท่ากับ $41.88 \mu\text{g/ml}$ และสารมาตรฐาน L-NA มีค่า IC_{50} เท่ากับ $21.75 \mu\text{g/ml}$

อภิปรายผล

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาแรกที่นำตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวตามาทำการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม รวมทั้งทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบและความเป็นพิษในเซลล์ ATDC-5 จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากตำรับยามีฤทธิ์ที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระสอดคล้องกันทั้งวิธี DPPH (IC_{50} เท่ากับ $137.72 \mu\text{g/ml}$) และ ABTS (IC_{50} เท่ากับ $27.28 \mu\text{g/ml}$) สัมพันธ์กับการพบปริมาณ สารประกอบฟีนอลิก ($479.33 \pm 2.08 \text{ mg GAE/g ext.}$) และฟลาโวนอยด์รวม ($177.89 \pm 3.02 \text{ mg OE/g ext.}$) และจากการวิเคราะห์ตำรับพบว่าตัวยาหลักคือพริกไทยที่มีการใส่มากถึง 40 ส่วน และมีรายงานการศึกษา ก่อนหน้าเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* ของพริกไทยหลายการศึกษา^[9-13] นอกจากนี้พริกไทยแล้ว สมุนไพรตัวอื่นในตำรับก็มีรายงานฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ เช่น สารสกัดเอทานอลและน้ำของกระลำพักมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและลดการอักเสบของข้อในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan, การอักเสบเรื้อรังโดย

การใช้ cotton pellet เหนี่ยวนำให้เกิด granuloma ในหนู และหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบของข้ออักเสบด้วย complete Freund's adjuvant ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์สำคัญคือ triterpenoids^[14] และส่วนใบของกระลำพักที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ตับและต้านสารอนุมูลอิสระ โดยการลดระดับบิลิรูบิน คอเลสเทอรอล ไตรกลีเซอไรด์และไขมันรวมทั้งยังเพิ่มระดับของ glutathione ของเนื้อเยื่อ^[15] โกลูหัวบัว สารสกัดของเหง้าโกลูหัวบัวมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและป้องกันเซลล์ตับที่ถูกทำลาย ซึ่งพบสารออกฤทธิ์สำคัญคือ lignans และ phenols ที่มีผลในการลดการผลิต NO ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS ซึ่งออกฤทธิ์ได้ดีกว่า curcumin และยังมีการศึกษาที่ให้ผลของสารสกัดเหง้าโกลูหัวบัวที่มีสารออกฤทธิ์ใหม่ 3 ชนิด คือ chuanxiongside A, (2E,4E)-8-(6-O-inositolyl)-8-oxo-2,7-dimethyl-octadienoic acid และ chuanxiongside C ซึ่งมีฤทธิ์ในการลดการผลิต NO ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS ดังนั้นการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า เหง้าของโกลูหัวบัวมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจและในหนูทดลอง ดีป्ली พบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลและชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS radical scavenging assay และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์^[16] ักฤษา สารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้ง TNF- α , COX-2 และ i-NOS ในเซลล์โมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และยับยั้งการอักเสบและการบวมในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการบวมเรื้อรัง^[17] และมีการศึกษาที่ให้ผลของสารสกัดน้ำมันของเมล็ดักฤษาสามารถยับยั้งการอักเสบในหนูที่ถูก

กระตุ้นด้วย carrageenan ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับยาต้านการอักเสบชนิด Indomethacin^[18] กานพลู สารสกัดเอทานอลของดอกกานพลูซึ่งมี eugenol สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1 β , TNF- α , NO และ IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7^[19] และสารสกัดเอทานอลของดอกกานพลูยังมีฤทธิ์ในการระงับความเจ็บปวดและต้านการอักเสบ นอกจากนี้สารสกัดน้ำของดอกตูมกานพลูยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในหนูที่เหนี่ยวนำด้วย carrageenan และลด granuloma ในโมเดล cotton pellet granuloma^[20] โกลูเมมา สารสกัดเอทานอลของเหง้าแห้งของโกลูเมมา มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบโดยยับยั้งการหลั่ง iNOS และ PGE2 ผ่านการลดการแสดงออกของยีนและโปรตีนชนิด iNOS และ TNF- α ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 รวมทั้งมีฤทธิ์ในการลดการอักเสบของกระเพาะอาหารในหนูทดลอง^[21] จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ของตำรับมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ของสมุนไพรเดี่ยวที่ประกอบเป็นตำรับ และจากผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าการใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า 100 $\mu\text{g/ml}$ จะทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงน้อยกว่า 80% หากวิเคราะห์จากตำรับยาจะพบว่ามีการใส่พริกไทยที่มีฤทธิ์เผ็ดร้อนมากถึง 40 ส่วน และนอกจากนี้มีการใส่การบูรและมหาหิงคุ์ ซึ่งอาจมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์

ข้อสรุป

การศึกษาคั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกโดยวิธี Folin-ciocalteu assay และสารฟลาโวนอยด์โดยวิธี aluminum chloride colorimetric assay แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย DPPH และ ABTS Assay ฤทธิ์ต้าน

การอักเสบด้วยวิธี NO assay ใน ATDC-5 mouse chondrogenic cell ทั้งยังศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดย MTT Assay จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตา มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ $479.33 \pm 2.08 \text{ mg GAE/g ext.}$ และมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ $177.89 \pm 3.02 \text{ mg OE/g ext.}$ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่ายาแก้ลมอุทงคมาวาตามีค่า IC_{50} เท่ากับ $137.72 \mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และมี IC_{50} เท่ากับ $27.28 \mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 ของสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตา ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ความเป็นพิษต่อเซลล์พิจารณาจากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต้องไม่ต่ำกว่า 80% พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แต่หากปรับเพิ่มเป็น 200 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตาทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง ผลของการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งไนตริกออกไซด์ พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตามีค่า IC_{50} เท่ากับ $41.88 \mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐาน L-NA ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ $21.75 \mu\text{g/ml}$ แต่ยังถือว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ จึงสรุปได้ว่าตำรับยาแก้ลมอุทงคมาวาตาเป็นตำรับยาที่น่านำมาศึกษาต่อยอดเพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ในกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

(วชน.) ปี พ.ศ. 2564 ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัย นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยยังได้รับการช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากหลาย ๆ หน่วยงานในมหาวิทยาลัยรังสิต ทั้ง สถาบันวิจัยที่คอยช่วยเหลือประสานงานในทุกขั้นตอนตลอดการวิจัย ศูนย์เครื่องมือรวมทั้งสนับสนุนเครื่องมือในการวิเคราะห์ วิทยาลัยเภสัชศาสตร์ ที่เอื้อเพื่อให้ใช้ห้องเพาะเลี้ยงเซลล์ และวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออกที่สนับสนุนด้านสถานที่และอุปกรณ์ในการดำเนินงาน

References

1. United Nations. Report of The world population ageing 2017. [Internet]. 2013. [cited 2023 Jan 16]; Available from: https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2017_Report.pdf.
2. Tangtrakulwanich B, Suwanno P. Epidemiology and risk factors of patellofemoral osteoarthritis in adults: a population-based study in southern Thailand. *J Med Assoc Thai*. 2012;95(8):1048.
3. Pai YC, Rymer WZ, Chang RW, Sharma L. Effect of age and osteoarthritis on knee proprioception. *Arthritis and Rheumatism*. *Arthritis Rheum*. 1997;40(12):2260-5.
4. Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*. 2006;20(1):3-25.
5. Scotece M, Gómez R, Conde J, Lopez V, Gómez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: inhibition of MIP-1 α and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes. *Life Sci*. 2012;91(23-24):1229-35.
6. Scotece M, Conde J, Abella V, López V, Francisco V, Ruiz C, Gualillo O. Oleocanthal inhibits catabolic and inflammatory mediators in LPS-activated human primary osteoarthritis (OA) chondrocytes through mapks/nf- κ b pathways. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(6):2414-26.
7. Santoro A, Conde J, Scotece M, Abella V, López V, Pino J, Gualillo O. Choosing the right chondrocyte cell line: Focus on nitric oxide. *J Orthop Res*. 2015;33(12):1784-8.
8. Fendrick AM, Greenberg BP. A review of the benefits and risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of mild-to-moderate osteoarthritis. *Osteopath Med Prim Care*. 2009;3(1):1. Doi: 10.1186/1750-4732-3-1. PubMed PMID: 19126235
9. Jeena K, Liju VB, Umadevi NP, Kuttan R. Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of black pepper essential oil (*Piper nigrum* Linn). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2014;17(1):1-12.
10. Meghwal M, Goswami TK. *Piper nigrum* and piperine: an update. *Phytother Res*. 2013;27(8):1121-30.
11. Nahak G, Sahu RK. Phytochemical evaluation and antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011;01(08):153-7.
12. Wang B, Zhang Y, Huang J, Dong L, Li T, Fu X. Anti-inflammatory activity and chemical composition of dichloromethane extract from *Piper nigrum* and *P. longum* on permanent focal cerebral ischemia injury in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2017;27(3):369-74.
13. Takooree H, Aumeeruddy MZ, Rengasamy KR, Venugopala KN, Jeewon R, Zengin G, Mahomoodally MF. A systematic review on black pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(sup1):S210-43.
14. Harpalani AN, Taranalli AD, Otari KV, Karadi RV, Shete RV. An anti-inflammatory and anti-arthritis potential of aqueous and alcoholic extract of *Euphorbia antiqorum* Linn. *Pharmacologyonline*. 2011;2:287-98.
15. Jyothi T, Prabhu K, Jayachandran E, Lakshminarasu S, Setty R. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Euphorbia antiqorum*. *Pharmacognosy Magazine*. 2008;4(13):25-30.
16. Ouncharoen K, Leelananthakul W. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Prasa Khamin-Oi remedy and its herbal components. *Journal of Khon Kaen Provincial Health*. 2023;4(2):225-38. (in Thai)
17. Shebaby W, Saliba J, Faour WH, Ismail J, El Hage M, Daher CF, Mroueh M. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity evaluation of *Lebanese Cannabis sativa* L. ssp. *indica* (Lam.). *J Ethnopharmacol*. 2021;270:113743. Doi: 10.1016/j.jep.2020.113743 PubMed PMID: 33359187.
18. El Badwi S, Elnabi J, Dahab M. Anti-inflammatory Activity of the Plant *Cannabis sativa* (L) petroleum ether extract in albino rats. *Research in Pharmacy*. 2011;1:18-25.

19. Rusmana D, Elisabeth M, Widowati W, Fauziah N, Maesaroh M. Inhibition of inflammatory agent production by ethanol extract and eugenol of *Syzygium aromaticum* (L.) flower bud (clove) in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Research Journal of Medicinal Plants*. 2015;9(6):264-74.
20. Ahmad T, Shinkafi TS, Routray I, Mahmood A, Ali S. Aqueous extract of dried flower buds of *Syzygium aromaticum* inhibits inflammation and oxidative stress. *J Basic Clin Pharm*. 2012;3(3):323-7. Doi:10.4103/0976-0105.103813. PubMed PMID: 24826043.
21. Hossen MJ, Amin A, Fu XQ, Chou JY, Wu JY, Wang XQ, Yu ZL. The anti-inflammatory effects of an ethanolic extract of the rhizome of *Atractylodes lancea*, involves Akt/NF- κ B signaling pathway inhibition. *J Ethnopharmacol*. 2021;277:114183. doi:10.1016/j.jep.2021.114183.