

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันของตำรับยาอายุวัฒนะที่ถูกคัดเลือก เพื่อให้ป้องกันโควิด-19

รุจิรดา กลางหล้า*, สุพัตรา ปรศุพัฒนา†, สมชาย สุริยะไกร‡, ศุภชัย ดิยวรรณหิ§

* วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเภสัชกรรมแผนไทย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตำบลในเมือง อำเภอเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

† สาขาวิชาเภสัชเวชและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตำบลในเมือง อำเภอเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

‡ สาขาวิชาเภสัชกรรมคลินิก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตำบลในเมือง อำเภอเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

§ สาขาวิชาเภสัชเวชและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตำบลในเมือง อำเภอเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

§ ผู้รับผิดชอบบทความ: suptiy@kku.ac.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: การติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ การป้องกันโรคยังทำได้ไม่สมบูรณ์ เมื่อติดเชื้อแล้วยังมีโอกาสเกิดภาวะป่วยหลังโควิดได้ ในทางการแพทย์แผนไทยมีตำรับยาอายุวัฒนะที่ใช้กินบำรุงร่างกายป้องกันการเจ็บป่วย ซึ่งเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อใช้เป็นยาป้องกันการติดเชื้อ การศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือkdำรับยาอายุวัฒนะที่มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นยาป้องกันการติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จากนั้นนำตำรับยาที่ผ่านการคัดเลือกมาศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และทดสอบฤทธิ์การเป็นตัวต้านออกซิเดชัน

วิธีการศึกษา: การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง ทำการคัดเลือkdำรับยามีเกณฑ์ในการคัดเลือkdำรับยาได้แก่ 1) เป็นตำรับยาอายุวัฒนะที่ประกอบด้วยเครื่องยาสมุนไพรที่มีระบุสรรพคุณในการบำบัดอาการที่สอดคล้องกับโควิด-19 2) ในตำรับยามีองค์ประกอบของสมุนไพรที่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการป้องกันหรือรักษาโควิด-19 3) ระบุส่วนที่ใช้และปริมาณของสมุนไพรในตำรับไว้ชัดเจน 4) องค์ประกอบในตำรับเป็นสมุนไพรที่หาได้ง่ายและทราบที่มาทางพฤกษศาสตร์ชัดเจน และทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การเป็นสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH FRAP และ ORAC ของสารสกัดตำรับยาที่ผ่านการคัดเลือก

ผลการศึกษา: พบตำรับยาอายุวัฒนะที่ตรงตามเกณฑ์ที่กำหนด จำนวน 2 ตำรับ (AYW-KK-01 และ AYW-KK-02) และตำรับทั้งสองที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด (356.16 ± 3.18 และ 370.05 ± 3.65 mgGAE/g extract) และฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด (41.41 ± 0.36 และ 38.13 ± 0.32 mgQE/g extract) และในการทดสอบฤทธิ์การเป็นตัวต้านออกซิเดชันพบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของตำรับทั้งสองมีฤทธิ์ดีที่สุดทั้งในวิธี DPPH ($IC_{50} = 5.47 \pm 0.06$ และ 4.55 ± 0.06 μ g/mL) วิธี FRAP (188.30 ± 3.53 และ 193.20 ± 1.06 mgTE/g extract) และวิธี ORAC (232.25 ± 4.22 และ 302.57 ± 4.30 mgTE/g extract)

อภิปรายผล: สารสกัดด้วยเมทานอลของยาทั้งสองตำรับแสดงฤทธิ์การเป็นตัวต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุด ฤทธิ์ในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันที่ดีนั้นจะมีผลดีต่อการป้องกันโรค ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันในเลือดสามารถลดความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัส รวมถึงไวรัสโคโรนา 2019

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: สารสกัดของตำรับยา AYW-KK-01 และ AYW-KK-02 มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดี โดยเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว ทั้งนี้เป็นข้อมูลที่สำคัญในการพัฒนาเพื่อส่งเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคโควิด-19

คำสำคัญ: โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019, ยาอายุวัฒนะ, ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม, ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

Assessing Total Phenolic Contents, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities of Selected Ya Ayuwatthana Formulas for COVID-19 Prophylaxis

Rujirada Klengla^{*}, Supatra Porasuphatana[†], Somchai Suriyakrai[‡], Suppachai Tiaworanant^{§,¶}

^{*} Master of Science Program in Thai Traditional Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Mueang Sub-District, Mueang Khon Kaen District, Khon Kean 40002, Thailand

[†] Department of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Mueang Sub-District, Mueang Khon Kaen District, Khon Kean 40002, Thailand

[‡] Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Mueang Sub-District, Mueang Khon Kaen District, Khon Kean 40002, Thailand

[§] Department of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Mueang Sub-District, Mueang Khon Kaen District, Khon Kean 40002, Thailand

[¶] Corresponding author: suptiy@kku.ac.th

Abstract

Introduction and Objective: The COVID-19 virus remains a pressing global health concern, and its existing preventive measures are not foolproof. Additionally, post-COVID complications are still a possibility. Traditional medicine texts contain Ya Ayuwatthana (herbal elixir) formulas, designed to boost the body's defences and prevent illness,^[1] presenting a compelling avenue for infection prevention research. This study aimed to identify and select Ya Ayuwatthana formulas for analyses to determine their total phenolic contents, flavonoid contents and antioxidant properties.

Methods: For this experimental research, the drug formula selection process was guided by the following criteria: (1) inclusion of indications for treating COVID-19 symptoms in the formulas; (2) utilization of ingredients previously studied for their potential effects on COVID-19 prevention or treatment; (3) precise specification of ingredient portions and quantities in the formulas; and (4) utilization of readily available herbs with botanically recognized sources. And subsequently, the total phenolic contents, total flavonoid contents, and antioxidant activities were determined using the DPPH, FRAP, and ORAC assays for the selected formula extracts.

Results: Based on the specified criteria, two Ya Ayuwatthana formulas (AYW-KK-01 and AYW-KK-02) were identified and selected. For both formulas, the aqueous extracts of AYW-KK-01 and AYW-KK-02 exhibited the highest total phenolic contents (356.16 ± 3.18 and 370.05 ± 3.65 mgGAE/g extract) and total flavonoid contents (41.41 ± 0.36 and 38.13 ± 0.32 mgQE/g extract). Furthermore, methanol extracts of both formulas demonstrated the

most substantial antioxidant activities in the DPPH assay ($IC_{50} = 5.47 \pm 0.06$ and $4.55 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$), the FRAP assay (188.30 ± 3.53 and $193.20 \pm 1.06 \text{ mgTE/g extract}$) and the ORAC assay (232.25 ± 4.22 and $302.57 \pm 4.30 \text{ mgTE/g extract}$).

Discussion: Methanol extracts of both formulas displayed the highest antioxidant properties, potentially valuable for disease prevention. Previous research has revealed a correlation between high blood antioxidant levels and the reduction of severity of viral infections including COVID-19.

Conclusion and Recommendation: These outcomes highlight the promising biological properties of extracts from AYW-KK-01 and AYW-KK-02 formulas, particularly when polar solvents are employed. The data were important for future investigations and developments of health-promoting medications aimed at preventing COVID-19.

Key words: coronavirus disease 2019 (COVID-19), Ya Ayuwatthana, total phenolic contents, total flavonoid contents, antioxidant activity

บทนำและวัตถุประสงค์

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 หรือโควิด-19 (coronavirus disease 2019: COVID-19) เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ หรือ SARS-CoV-2 โดยเริ่มระบาดครั้งแรกที่ประเทศจีนในปลายปี 2019 และต่อมาในเดือนมีนาคม ปี 2020 องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ประกาศให้โควิด-19 เป็นโรคระบาดใหญ่ (pandemic disease) อันเป็นผลมาจากการแพร่กระจายของโรคอย่างรวดเร็วไปทั่วโลก ผู้ป่วยจะมีอาการในระบบทางเดินหายใจ เช่น ไข้ ไอ เจ็บคอ คัดจมูก และอาจมีอาการอื่น ๆ เช่น จมูกไม่ได้กลิ่น ลิ้นไม่รับรส ผื่น ตาแดง ท้องเสีย เป็นต้น และในบางรายที่มีอาการรุนแรงอาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น ปอดบวม ปอดอักเสบ ไตวาย หรือกระทั่งเสียชีวิต แนวทางการรักษาของประเทศไทยในช่วงต้นของการระบาด ใช้น้ำยาต้านไวรัสฟาวิพิราเวียร์ (favipiravir) สำหรับผู้ที่ติดเชื้อเป็นหลัก แต่อย่างไรก็ตามยาฟาวิพิราเวียร์มีการรายงานว่าไม่สามารถลดจำนวนไวรัสในร่างกายนอกจากนั้นยังทำให้ระดับกรดยูริกเพิ่มขึ้นอีกด้วย^[2] และในปัจจุบัน

ตามแนวทางเวชปฏิบัติการวินิจฉัย ดูแลรักษา และป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาล กรณีโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (ฉบับปรับปรุงวันที่ 18 เมษายน 2023) มีการปรับแนวทางการรักษาโดยจะจ่ายยาต้านไวรัสเฉพาะในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง ได้แก่ เนอรัมาเทรลเวียร์/ไรโทนาเวียร์ (nirmatrelvir/ritonavir) หรือ เรมเดซิเวียร์ (remdesivir) หรือ โมลนูพิราเวียร์ (molnupiravir) หรือทิซาเกวิแมบ/ซิลกาวิแมบ (tixagevimab/cilgavimab) เป็นแอนติบอดีออกฤทธิ์ยาว (Long-acting Antibody : LAAB) ซึ่งยาด้านไวรัสในกลุ่มนี้พบว่ามียาผลข้างเคียงอื่น ๆ อีกมาก มีข้อจำกัดในการใช้ยาและการเข้าถึงยา

ในส่วนของการป้องกันโควิด-19 หรือป้องกันการติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ของประเทศไทย ในเดือนกุมภาพันธ์ปี 2021 ประเทศไทยเริ่มมีการใช้วัคซีนมาป้องกันการติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 แม้ว่าวัคซีนจะแสดงให้เห็นประสิทธิผลสูงในการลดการเจ็บป่วยที่รุนแรง แต่ยังไม่มียาข้อมูลแน่ชัดในด้านของป้องกันการแพร่เชื้อ และยังมีข้อจำกัดบางประการในการได้รับวัคซีน เช่น ผู้ที่รับวัคซีนแล้วเกิดอาการ

แพ้อย่างรุนแรง (anaphylaxis) เมื่อฉีดเข็มแรก ผู้ที่เป็นโรคเรื้อรังที่ยังควบคุมไม่ได้หรือมีอาการไม่คงที่ ผู้ที่ตั้งครรภ์ก่อน 12 สัปดาห์ เป็นต้น ตลอดระยะเวลาการระบาดของเชื้อยังพบการรายงานการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไปจากเดิม ทำให้วัคซีนที่ผลิตขึ้นไม่สามารถการป้องกันการติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ องค์การอนามัยโลกกล่าวถึงการให้ยาไฮดรอกซีคลอโรควิน (hydroxychloroquine) ซึ่งเป็นยารักษาโรคมalariaเรื้อรัง ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สำหรับผู้สัมผัสเสี่ยงสูงกับผู้ป่วยยืนยันโควิด-19^[3] แต่พบรายงานว่ายาไฮดรอกซีคลอโรควินเมื่อนำมาศึกษาเกี่ยวกับการป้องกันโรคหลังการสัมผัสเชื้อ (post-exposure prophylaxis) ในผู้ที่สัมผัสกับผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นโควิด-19 ภายใน 4 วันหลังการสัมผัสผู้ป่วยยืนยันแล้ว โดยอาสาสมัครจะได้รับยาไฮดรอกซีคลอโรควิน ถูกติดตามสังเกตผลทางห้องปฏิบัติการในการตรวจยืนยันการติดเชื้อโคโรนาไวรัส 2019 และอาการที่สัมพันธ์กับโรคภายใน 14 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับยาไฮดรอกซีคลอโรควิน มีการแสดงอาการของโรค คิดเป็นร้อยละ 11.8 ตรวจพบเชื้อร้อยละ 2.7 ส่วนกลุ่มที่ได้รับยาหลอกมีการแสดงอาการของโรคร้อยละ 14.3 และตรวจพบเชื้อร้อยละ 2.2 ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลุ่มที่ได้รับยาไฮดรอกซีคลอโรควินนั้นมีอาการข้างเคียงจากการใช้ยามากถึงร้อยละ 40.1^[4] ต่อมาในปี 2021 ได้มีรายงานการนำข้อมูลการศึกษาดังกล่าวมาทำทบทวนวิเคราะห์ทางสถิติใหม่พบว่ายาไฮดรอกซีคลอโรควิน นั้นส่งผลดีในการช่วยป้องกันโรคได้ดีกว่ายาหลอกในกลุ่มอาสาสมัครที่อายุไม่เกิน 50 ปี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ^[5]

จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าการจัดการกับโรค

ระบาดได้มุ่งเน้นไปยังการรักษาเป็นส่วนใหญ่ ส่วนมาตรการป้องกันการติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ยังไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ การใช้วัคซีนยังมีข้อจำกัดค่อนข้างมาก และไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ 100% ในส่วนของยาแผนปัจจุบันก็ยังไม่มียาที่ผลิตมาเพื่อใช้ป้องกันการติดเชื้อโดยตรง ส่วนยาต้านไวรัสที่ใช้ก็มีผลข้างเคียงและอาการไม่พึงประสงค์ค่อนข้างมาก ยังมีคนอีกหลายกลุ่มที่ไม่สามารถเข้าถึงวัคซีนหรือยาป้องกันทางแผนปัจจุบันได้ จึงได้เล็งเห็นว่าหากนายาแผนโบราณของไทยที่ประกอบด้วยสมุนไพรที่ใช้อยู่ทั่วไปและมีความปลอดภัย สามารถใช้ติดต่อกันได้เป็นเวลานาน ผลข้างเคียงหรืออาการไม่พึงประสงค์ต่ำกว่ายาแผนปัจจุบัน มาประยุกต์ใช้ในวิกฤตโรคระบาดนี้ ส่งเสริมและควบคู่ไปกับมาตรการการป้องกันต่าง ๆ เพื่อสามารถควบคุมสถานการณ์การระบาดได้ดีขึ้น ซึ่งในต่างประเทศได้มีแนวคิดที่จะนำยามาใช้ป้องกันการเกิดโรคในกลุ่มผู้สัมผัสเสี่ยงสูง ซึ่งได้เคยมีการใช้วิธีนี้กับโรคติดเชื้อมาก่อน อาทิ HIV และองค์การอนามัยโลกได้ให้ความสำคัญกับงานวิจัยในลักษณะนี้^[6,7] อันเป็นแนวทางหนึ่งในการควบคุมการระบาดในระยะยาวของโรคดังกล่าว

“ยาอายุวัฒนะ” ซึ่งเป็นชื่อเรียกยาที่ถือว่ากินแล้วมีอายุยืน (พจนานุกรม ฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2554) ซึ่งเป็นตำรับยาที่ใช้กินเพื่อปรับสมดุลของธาตุให้เป็นปกติ บำรุงร่างกายทำให้ร่างกายแข็งแรง เป็นด่านแรกในการป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ และมีความปลอดภัยเมื่อกินต่อเนื่องในระยะยาว ยาอายุวัฒนะได้มีการบันทึกตำรับยาอายุวัฒนะแทรกไว้ในตำรับตำราต่าง ๆ อาทิเช่น ตำรายาพิเศษของพระเจ้าบรมวงศ์เธอ กรมสมเด็จพระปรมานุชิต

ยาหลวงกรณ ตำรายาไทยหลวงปู่ศุข ตำราโอสธพระ-นารายณ์ เป็นต้น^[1] หรือมีการพิมพ์และเผยแพร่ในหนังสือเทศกาล รวมถึงเป็นตำรายาเกร็ดที่มีบันทึกไว้กระจัดกระจายตามท้องที่ต่าง ๆ ซึ่งตำรับยาอายุวัฒนะนั้นจะประกอบไปด้วยสมุนไพรที่มีสรรพคุณต่าง ๆ ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดและรักษาอาการของโรคโดยเฉพาะการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ซึ่งถือว่าการศึกษาดังกล่าวเป็นที่ยอมรับว่ามีความเกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ต่อไป

ความสำคัญของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีบทบาทในการปกป้องร่างกาย เสริมภูมิคุ้มกัน และป้องกันโรคติดเชื้อต่าง ๆ มีความสำคัญในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ ช่วยลดความรุนแรงของอาการและกระตุ้นการฟื้นตัวของร่างกายในกรณีเมื่อร่างกายเกิดการติดเชื้อหรือเกิดการอักเสบ^[8] ดังนั้นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีอาจเป็นสิ่งสำคัญทางการแพทย์ในการรักษาสุขภาพ ในช่วงที่ต้องเผชิญกับการระบาดของโรคติดเชื้อ ร่างกายมีระบบเอนไซม์และสารต้านออกซิเดชันมากมายที่มีหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระและป้องกันความเสียหายจากกระบวนการออกซิเดชัน ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX) เป็นต้น^[9] แต่หากสารเหล่านี้ไม่สามารถทำหน้าที่ได้เพียงพอหรือมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากเกินไป ร่างกายจึงต้องการสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มจากภายนอก โดยสารต้านออกซิเดชันที่พบในธรรมชาติมีมากมาย และสามารถพบในอาหาร พืช ผลไม้ พืชสมุนไพร ซึ่งเป็นผลมาจากสารองค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร โดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลหรือโพลีฟีนอลซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาจำนวนมากพบว่าสารกลุ่มดังกล่าวมีความสัมพันธ์อย่างมากกับฤทธิ์ทาง

ชีวภาพ รวมถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน^[10]

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกตำรับยาอายุวัฒนะที่คาดว่าจะมีประสิทธิผลในการป้องกันหรือยับยั้งโควิด-19 ได้ดี และนำตำรับยาอายุวัฒนะที่ผ่านการคัดเลือกมาทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การเป็นตัวต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ORAC ซึ่งเป็นการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของตำรับเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการวิจัยและพัฒนาเป็นยาป้องกันโควิด-19 ต่อไปในอนาคต

ระเบียบวิธีการศึกษา

1. การคัดเลือกตำรับยาอายุวัฒนะ

1.1 เอกสารคัมภีร์และแหล่งที่มาของตำรับยา

1.1.1 เอกสารทางการแพทย์แผนไทย ได้แก่

1) ตำรายาพิเศษ ของพระเจ้าบรมวงศ์เธอ กรมสมเด็จพระปวงเรศวริยาหลวงกรณ^[11] 2) ตำรายาไทยหลวงปู่ศุข วัดปากคลองมะขามเฒ่า จังหวัดชัยนาท^[12] 3) ตำราโอสธพระนารายณ์^[13]

1.1.2 ตำรับยาอายุวัฒนะที่ถูกรวบรวมเผยแพร่บนสื่ออิเล็กทรอนิกส์ โดยใช้คำค้น “อายุวัฒนะสูตร ตำรับ” แล้วคัดเลือกเว็บไซต์ที่รวบรวมเผยแพร่ตำรับยาอายุวัฒนะที่ระบุส่วนประกอบในตำรับ วิธีการปรุงยา วิธีการใช้และสรรพคุณไว้ชัดเจน

1.2 วิธีการศึกษาและคัดเลือกตำรับยาอายุวัฒนะ

ทำการรวบรวมข้อมูลจากเอกสารที่กล่าวข้างต้น โดยยาแต่ละตำรับจะต้องผ่านเกณฑ์ที่ละเกณฑ์จึงจะถูกพิจารณาในเกณฑ์ข้อต่อไปตามลำดับ โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกตำรับยาอายุวัฒนะ ดังนี้

1) คัดเลือกตำรับยาอายุวัฒนะที่มีเครื่องยาสมุนไพรมีสรรพคุณในการรักษาอาการที่สอดคล้องกับอาการของโควิด-19

2) องค์ประกอบในตำรับมีรายงานการศึกษาประสิทธิผลที่เกี่ยวกับการป้องกันโควิด-19 ได้แก่ฤทธิ์ต้านไวรัส (antiviral) และฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน (immunomodulation) ที่มียานวิจัยรองรับทั้งในรูปแบบหลอดทดลอง (in vitro), ในสัตว์ทดลอง (in vivo), วิทยาการเคมีเชิงคำนวณ (in silico) หรือการทดสอบทางคลินิก (clinical study)

3) ระบุส่วนที่ใช้และปริมาณของสมุนไพรในตำรับไว้ชัดเจน

4) เป็นสมุนไพรที่หาได้ง่ายและทราบที่มาทางพฤกษศาสตร์ชัดเจน

1.3 บันทึกข้อมูลของตำรับยา ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลด้านสรรพคุณของตำรับ และส่วนประกอบของสมุนไพรในตำรับ

2. ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมและศึกษาฤทธิ์การเป็นตัวต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันของตำรับยาอายุวัฒนะที่ถูกคัดเลือก

2.1 สารเคมี

Methanol, 95% Ethanol, Ethyl acetate, Dichloromethane, Hexane, Acetic acid AR Grade ได้จากบริษัท RCI Labscan Limited (Thailand), Aluminium chloride, Sodium acetate, Sodium nitrate, Iron(III)chloride, Potassium dihydrogen phosphate, Di-sodium hydrogen phosphate ได้จากบริษัท Ajax finechem

(Australia), Sodium carbonate ได้จากบริษัท Orec (Newzealand), Folin Ciocalteu's reagent, hydrochloric acid ได้จากบริษัท Loba (india), 1,1-diphenyl-2 picryl hydrazyl ได้จากบริษัท Tokyo Chemical Industry (Japan), Fluorescein ได้จากบริษัท Himedia (India), 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), Gallic acid, Quercetin, Trolox ได้จากบริษัท Sigma-Aldrich (Switzerland) และ 2, 2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) ได้จากบริษัท Merck (Germany)

2.2 วิธีการศึกษา

2.2.1 การเตรียมผงยาตำรับยาอายุวัฒนะที่ถูกคัดเลือก

2.2.1.1 จัดหาวัตถุดิบและตรวจเอกลักษณ์ของวัตถุดิบโดยใช้ลักษณะภายนอก (macroscopical) และการตรวจทางรังคเลขฝิวบาง (thin-layer chromatography) ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia, THP) หากไม่มีข้อมูลในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยจะใช้ข้อมูลจากตำรามาตรฐานสมุนไพรอื่น ๆ อาทิ ตำรามาตรฐานยาแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน (Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2015) และบทความอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

2.2.1.2 เตรียมตำรับยาตามทีระบุนไว้ในเอกสารตำรายานำเครื่องยาไปบดเป็นผงและผ่านร่อนเบอร์ 80

2.2.2 เตรียมสารสกัดของตำรับยาอายุวัฒนะที่ถูกคัดเลือก

2.2.2.1 ทำการสกัดผงยากับตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

1) สารสกัดด้วยเมทานอลบริสุทธิ์

ซึ่งผงยา 30 กรัมผสมกับเมทานอล 180 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:6 w/v) ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าตลอดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยทำการสกัดรวม 3 ครั้ง จากนั้นนำสารที่กรองได้ไประเหยแห้งเพื่อระเหยนำตัวทำละลายออกให้หมด ด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

2) สารสกัดด้วย 95% เอทานอล ซึ่งผงยา 30 กรัมผสมกับ 95% เอทานอล 180 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:6 w/v) ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าตลอดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยทำการสกัดรวม 3 ครั้ง จากนั้นนำสารที่กรองได้ไประเหยแห้งเพื่อระเหยนำตัวทำละลายออกให้หมด ด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

3) สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ซึ่งผงยา 30 กรัมผสมกับเอทิลอะซิเตท 180 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:6 w/v) ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าตลอดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยทำการสกัดรวม 3 ครั้ง จากนั้นนำสารที่กรองได้ไประเหยแห้งเพื่อระเหยนำตัวทำละลายออกให้หมด ด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4) สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ซึ่งผงยา 30 กรัมผสมกับไดคลอโรมีเทน 180 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:6 w/v) ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าตลอดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยทำการสกัดรวม 3 ครั้ง จากนั้นนำสารที่กรองได้ไประเหยแห้งเพื่อระเหยนำตัวทำละลายออกให้หมด ด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5) สารสกัดด้วยเฮกเซน ซึ่งผงยา 30 กรัมผสมกับเฮกเซน 180 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:6 w/v) ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าตลอดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยทำการสกัดรวม 3 ครั้ง จากนั้นนำสารที่กรองได้ไประเหยแห้งเพื่อระเหยนำตัวทำละลายออกให้หมด ด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

6) สกัดด้วยวิธีการต้มเดือด ซึ่งผงยา 30 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 180 มิลลิลิตร โดยทำการต้มเดือดเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นและกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยทำการต้มซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารที่กรองได้ไปทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็งหรือฟรีซดราย (Freeze Dry)

2.2.2.2 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักผงยาแห้ง (%Yield) จากนั้นเก็บสารสกัดในภาชนะปิดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content: TPC) โดยวิธี Folin-Ciocalteu

เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิกละลายในเมทานอลโดยทำการเจือจางสารละลายที่ละ 2 เท่า (Two fold serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 - 1.95 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเตรียมสารสกัดของตำรับยาละลายด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดูดสารมาตรฐานกรดแกลลิกและสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate (n=5) เติมน้ำละลาย 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 7% โซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว เก็บไว้ในที่มืดเป็น

เวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 760 nm นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ของแต่ละความเข้มข้นของกรดแกลลิกมาสร้างกราฟมาตรฐาน และนำค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง (mg Gallic Acid Equivalent/mg extract; mgGAE/mg extract) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก^[14]

2.2.4 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content: TFC) โดยวิธี aluminum chloride colorimetric

เตรียมสารมาตรฐานเคอควิตินละลายในเมทานอลบริสุทธิ์โดยทำการเจือจางสารละลายที่ละ 2 เท่า (Two fold serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 - 1.95 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเตรียมสารตัวอย่างของตำรับยาละลายด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นทำการดูดสารละลายตัวอย่างของตำรับยาและสารละลายมาตรฐานปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate (n=5) เติมสารละลาย 5% โซเดียมไนเตรท ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 6 นาที แล้วเติม สารละลาย 10% อะลูมิเนียมคลอไรด์ ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 340 nm นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ของแต่ละความเข้มข้นของมาตรฐานเคอควิตินมาสร้างกราฟมาตรฐาน และนำค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอควิตินต่อมิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง (mg

Quercetin Equivalent/mg extract; mgQE/mg extract) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอควิติน^[15]

2.2.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

โดยเตรียมสารมาตรฐานโธรลอกซ์และสารละลายตัวอย่างเจือจางด้วยเมทานอล โดยทำการเจือจางสารละลายที่ละ 2 เท่า (Two fold serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 1,000-1.95 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 0.2 mM DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้คำนวณหาค่าร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) สร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging และความเข้มข้นของสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานที่ทดสอบ จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถเป็นตัวต้านออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) จากสมการเส้นตรงของสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานที่ได้^[16]

2.2.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารที่เป็นตัวต้านออกซิเดชัน (Ferric ion Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay) เตรียมสารละลาย FRAP ซึ่งประกอบด้วย 1) 300 mM Acetate buffer, 2) 10 mM 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine, 3) 20 mM FeCl₃.6H₂O นำสารใน 1), 2) และ 3) ผสมกันในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ

เตรียมสารมาตรฐานโธรลอกซ์ละลายในเมทานอลโดยทำการเจือจางสารละลายที่ละ 2 เท่า

(Two fold serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 - 1.95 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายตัวอย่างของตำรับยาละลายด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร และสารละลาย FRAP 180 ไมโครลิตร ลงใน 96 well-plate ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ของแต่ละความเข้มข้นของมาตรฐานโทรลิกซ์มาสร้างกราฟกราฟมาตรฐาน หลังจากนั้นคำนวณหาความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันได้ในรูป FRAP value ของสารละลายตัวอย่าง โดยการแทนค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างในสมการมาตรฐานโทรลิกซ์ ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของโทรลิกซ์ต่อมิลลิกรัมกรัมของสารสกัด (mg Trolox Equivalent/mg extract); mgTE/mg extract^[17]

2.2.7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay

เตรียมสารมาตรฐานโทรลิกซ์ละลายในเมทานอลโดยทำการเจือจางสารละลายที่ละ 2 เท่า (Two fold serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 - 1.95 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายตัวอย่างของตำรับยาละลายด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นดูดมาตรฐานหรือสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงใน Black 96-well plates (n=5) และเติมสารละลาย 25 nM Fluorescein ปริมาณหลุมละ 150 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่

37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา เติมสารละลาย 153 mM 2, 2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และทำการวัดค่าดูดกลืนแสงของฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่นภาวะกระตุ้น 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย 535 นาโนเมตร โดยทำการวัดทุกนาที เป็นเวลา 180 นาที ด้วยเครื่อง spectrofluorometer ซึ่งจะอ่านค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) และนำมาแทนค่าในสมการความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐานโทรลิกซ์ แล้วแสดงในรูปของค่ามิลลิกรัมสมมูลของโทรลิกซ์ต่อมิลลิกรัมกรัมของสารสกัด (mg Trolox Equivalent/mg extract; mgTE/mg extract)^[18]

2.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; S.D.) (n=5) ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีวิเคราะห์ one - way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical package for the social science) version 28.0.1.0

ผลการศึกษา

1. การคัดเลือกตำรับยาอายุวัฒนะ

ในการรวบรวมตำรับที่ระบุว่าเป็นยาอายุวัฒนะจากเอกสาร ตำราต่าง ๆ รวมทั้งหมด 99 ตำรับ พบตำรายาอายุวัฒนะที่ตรงตามเกณฑ์ที่ระบุทั้งหมด 2 ตำรับ (Figure 1) ซึ่งเป็นตำรับยาอายุวัฒนะที่ไม่ปรากฏชื่อตำรับยา มีรายละเอียดตำรายาบันทึกไว้ดังนี้ ตำรับที่ 1 (แทนด้วยรหัสตำรับยา AYW-KK-01) “หัวขิงหัวข่าเล็ก

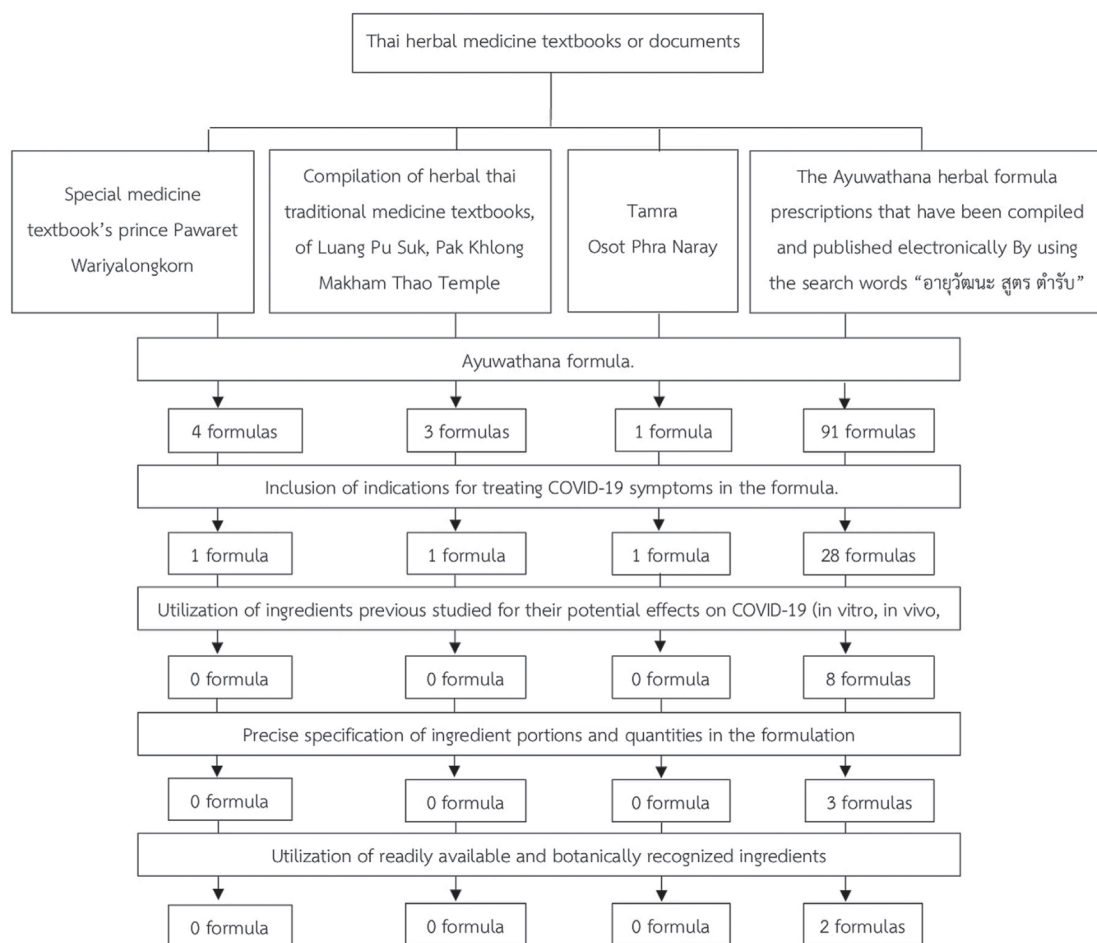


Figure 1 The selection of Ayuwathana medicine based on defined criterias; 1. Inclusion of indications for treating COVID-19 symptoms in the formulas, 2. Utilization of ingredients previous studied for their potential effects on COVID-19, 3. Precise specification of ingredient portions and quantities in the formulation, and 4. Utilization of readily available and botanically recognized ingredients.

หัวเหว้หมู เถาบระเพ็ด ดอกดีปลี กระเทียม รากแจง สมอเทศ สมอไทย สมอพิเภก สมอติงู ลูกมะขามป้อม สมุนไพรรักษาโรคนี้สัปดาห์ละเท่ากัน ตากแดดให้แห้ง ดีแล้วจึงทำเป็นผงยา ใช้ละลายน้ำร้อนรับประทาน ก่อนอาหารเย็น ทำให้นอนหลับสบาย ท้องโล่งทำงาน ดี ไม่มีลมเบียดเบียน ร่างกายกลับแข็งแรง คนแก่จะ กลับเป็นหนุ่มสาว” และตำรับที่ 2 (แทนด้วยรหัสตำรับ

ยา AYW-KK-02) โดยมีรายละเอียดตำรับยาบันทึกไว้ ดังนี้ “เกสรบุณฑน 2 บาท สมอพิเภก 3 บาท สมอไทย 3 บาท มะขามป้อม 3 บาท ดอกดีปลี 3 บาท ลูกเรว 4 บาท ชิงแห้ง 3 บาท ว่านน้ำ 3 บาท ลูกราชดัด 2 บาท บดเป็นผงผสมน้ำผึ้ง รับประทานครั้งละครึ่งลูกพุทรา ทำให้เจริญอาหาร นอนหลับดี แก้อ่อนเพลีย แก้อ่อนเพลีย” ซึ่งเครื่องยาสมุนไพรรักษา

ทั้งสองมีสรรพคุณเกี่ยวกับอาการแสดงของโควิด-19 และพบรายงานการศึกษาเชิงวิทยาศาสตร์ยืนยันเกี่ยวกับฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 เช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน ทั้งการศึกษาในหลอดทดลอง ในสัตว์ทดลอง หรือการศึกษาทางคลินิก (Table 1-2) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลการศึกษาการยับยั้งเชื้อไวรัสด้วยวิทยาการเคมีเชิงคำนวณพบว่า สารสำคัญในสมุนไพรในตำรับส่วนมากมีฤทธิ์ในการจับกับเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ได้ดี เช่น พริกไทย ดิลี หัวแห้วหมู กระเทียม

ซึ่ง เป็นต้น เป็นกลไกเดียวกันกับยาโรพินาเวียร์/ริโทนาเวียร์ (lopinavir/ritonavir) ซึ่งเป็นยาต้านไวรัสที่จ่ายในผู้ป่วยโควิด-19 ที่มีอาการรุนแรง

1. ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และศึกษาฤทธิ์การเป็นตัวต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันของตำรับยาอายุวัฒนะที่ถูกคัดเลือก

2.1 ร้อยละปริมาณสารสกัดและลักษณะทางกายภาพของสารสกัดตำรับยา AYW-KK-01 และ AYW-KK-02

Table 1 Ingredients of AYW-KK-01 formula and biological properties

Ingredients		Relieve symptoms of COVID-19							Anti COVID-19 (in Silico)					
Vernacular name	Scientific name	fatigue, analeptic	Cough, sore throat	muscle pain	fever	diarrhea	Antiviral (<i>in vitro</i>)	Anti COVID-19 (<i>in vitro</i>)	Protease inhibitor	RdRp inhibitor	S-proteins inhibitor	ACE2/TMPRSS2 inhibitor	Immunomodulator (<i>in vivo</i>)	Clinical study
Khing	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X
Kha ling	<i>Alpinia conchigera</i> Griff.	X	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-
Haeo mu	<i>Cyperus rotundus</i> L.	X	X	X	X	X	X	-	X	-	-	-	X	-
Bora phet	<i>Tinospora crispa</i> (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson	X	-	X	X	X	-	-	X	-	-	-	X	X
Dee pee	<i>Piper longum</i> L.	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-	-	X	-
Kra thiam	<i>Allium sativum</i> L.	X	X	X	-	X	X	-	X	-	-	X	X	-
Jang	<i>Maerua siamensis</i> (Kurz) Pax	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
Samo tet	<i>Terminalia arjuna</i> Wight and Arn.	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	-	-	-
Samo thai	<i>Terminalia chebula</i> Retz.	X	X	-	X	X	X	-	X	X	X	-	X	-
Samo phiphek	<i>Terminalia bellirica</i> (Gaertn.) Roxb.	X	X	-	X	X	X	X	-	X	X	-	X	-
Samo di ngu	<i>Terminalia citrina</i> (Gaertn.) Roxb. ex	-	X	-	X	X	-	-	X	X	X	-	-	-
Makham pom	<i>Phyllanthus emblica</i> L.	X	X	-	X	X	X	-	-	X	X	X	X	X

Note: The 'x' symbol in the table indicates the presence of biological properties

Table 2 Ingredients of AYW-KK-02 formula and biological properties

Ingredients		Relieve symptoms of COVID-19							Anti COVID-19 (in Silico)					
Vernacular name	Scientific name	fatigue, analeptic	Cough, sore throat	muscle pain	fever	diarrhea	Antiviral (in vitro)	Anti COVID-19 (in vitro)	Protease inhibitor	RdRp inhibitor	S-proteins inhibitor	ACE2/TMPRSS2 inhibitor	Immunomodulator (in vivo)	Clinical study
Bun nak	Mesua ferrea L.	X	-	-	X	X	-	-	X	-	-	-		-
Samo phiphek	Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb.	X	X	-	X	X	X	X	-	X	X	-		-
Samo thai	Terminalia chebula Retz.	X	X	-	X	X	X	-	X	X	X	-		-
Makham pom	Phyllanthus emblica L.	X	X	-	X	X	X	-	-	X	X	X		X
Phrik thai	Piper longum L.	X	X	X	X	X	X	-	X	-	X	-		-
Reo	Amomum villosum Lour. var. xanthioides (Wall. ex Baker)	X	X	-	X	X	X	-	-	-	-	-		-
	T.L.Wu & S.Chen													
Khing	Zingiber officinale Roscoe	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X		X
Wan-nam	Acorus calamus L.	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-		-
Ratchadat	Brucea javanica (L.) Merr.	X	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-		-

Note: The 'x' symbol in the table indicates the presence of biological properties

ตำรับยาทั้งสองถูกสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกันพบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลบริสุทธิ์ และ 95% เอทานอลมีลักษณะแข็ง มีความเหนียวติดกัน สีน้ำตาลเข้ม ในส่วนของสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม และสารสกัดน้ำด้วยการต้มมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน โดยร้อยละปริมาณสารสกัดของตำรับ AYW-KK-01 และ AYW-KK-02 ที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 18.00 และ 20.50 ตามลำดับ รองลงมาคือ สารสกัดด้วยน้ำ, 95% เอทานอล, เอทิลอะซิเตท, ไดคลอโรมีเทน และ

เฮกเซน ตามลำดับ (Table 3)

2.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของตำรับยา AYW-KK-01 และ AYW-KK-02

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric พบว่า ตำรับทั้งสองที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันทุกตัวให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยสารสกัดน้ำของตำรับยา AYW-

Table 3 Percentage of yield, total phenolic content, total flavonoid content of AYW-KK-01 and AYW-KK-02 extracts

Sample	Extract	% yield	TPC (mgGAE/g extract)		TFC (mgQE/g extract)	
			Mean $\pm$ S.D.	%RSD	Mean $\pm$ S.D.	%RSD
AYW-KK-01	Methanol	18.00	221.32 $\pm$ 0.61 ^A	0.28	36.29 $\pm$ 0.24 ^A	0.67
	95% Ethanol	16.69	83.94 $\pm$ 1.48 ^B	1.77	23.57 $\pm$ 0.18 ^B	0.75
	Ethyl acetate	7.67	72.45 $\pm$ 1.41 ^C	1.94	13.08 $\pm$ 0.24 ^C	1.80
	dichloromethane	6.46	20.38 $\pm$ 0.35 ^D	1.72	7.86 $\pm$ 0.15 ^D	1.91
	Hexane	4.09	10.04 $\pm$ 0.19 ^E	1.94	5.33 $\pm$ 0.52 ^E	1.40
	Water	17.10	356.16 $\pm$ 3.18 ^F	0.89	41.41 $\pm$ 0.36 ^F	0.87
AYW-KK-02	Methanol	20.49	292.85 $\pm$ 3.78 ^G	1.29	36.40 $\pm$ 0.35 ^G	0.95
	95% Ethanol	16.29	190.56 $\pm$ 3.71 ^H	1.95	20.51 $\pm$ 0.36 ^H	1.76
	Ethyl acetate	6.58	83.98 $\pm$ 1.25 ^I	1.49	10.09 $\pm$ 0.15 ^I	1.49
	dichloromethane	5.84	32.70 $\pm$ 0.22 ^J	0.68	4.51 $\pm$ 0.09 ^J	1.94
	Hexane	4.18	25.07 $\pm$ 0.36 ^K	1.45	2.41 $\pm$ 0.10 ^K	1.46
	Water	18.18	370.05 $\pm$ 3.65 ^L	0.99	38.13 $\pm$ 0.32 ^L	0.85

Note: Statistical significance is indicated by Roman alphabet when comparing within the same column. If different Roman alphabet are specified, it means that there is statistical significance at the $p \leq 0.05$ level. TPC: Total phenolic content, TFC: Total flavonoid content, GAE: Gallic acid equivalent, QE: Quercetin equivalent

KK-01 พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (356.16 $\pm$ 3.18 mgGAE/g extract และ 41.41 $\pm$ 0.36 mgQE/g extract) เช่นเดียวกันกับสารสกัดด้วยน้ำของตำรับ AYW-KK-02 (370.05 $\pm$ 3.65 mgGAE/g extract และ 38.13 $\pm$ 0.32 mgQE/g extract) และรองลงมาคือ การสกัดด้วยการหมักกับตัวทำละลาย ได้แก่ เมทานอล, 95% เอทานอล, เอทิลอะซิเตท, ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน ตามลำดับ (Table 3)

2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging assay)

พบว่าสารสกัดของตำรับยา AYW-KK-01 ที่สกัดด้วยวิธีการหมักกับเมทานอลมีฤทธิ์ในการเป็นตัว

ต้านออกซิเดชันดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) เท่ากับ 5.47 $\pm$ 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งดีกว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และสารสกัดของตำรับยา AYW-KK-02 ที่สกัดด้วยเมทานอล และ 95% เอทานอล แสดงฤทธิ์การเป็นตัวต้านออกซิเดชันดีที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.55 $\pm$ 0.06 และ 5.05 $\pm$ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่ามีค่า IC₅₀ ของสารสกัดดังกล่าวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโพลีฟีนอล (4.02 $\pm$ 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Table 4)

Table 4 Results of antioxidant activity of AYW-KK-01 and AYW-KK-02 by DPPH, FRAP and ORAC assay.

Sample	Extract	DPPH assay IC ₅₀ (μg/ml)*	FRAP assay (mgTE/g extract)*	ORAC assay (mgTE/g extract)*
AYW-KK-01	Methanol	5.47 ± 0.06 ^B	188.30 ± 3.53 ^A	232.25 ± 4.22 ^A
	95% Ethanol	11.96 ± 0.22 ^C	109.36 ± 2.04 ^B	96.92 ± 2.11 ^B
	Ethyl acetate	23.02 ± 0.15 ^D	128.10 ± 2.11 ^C	54.68 ± 0.98 ^C
	dichloromethane	61.87 ± 0.87 ^E	56.64 ± 0.53 ^D	36.24 ± 0.75 ^D
	Hexane	90.53 ± 0.97 ^F	50.48 ± 0.45 ^E	18.58 ± 0.13 ^E
	Water	12.25 ± 0.19 ^C	174.36 ± 3.23 ^F	211.53 ± 3.84 ^F
AYW-KK-02	Methanol	4.55 ± 0.06 ^A	193.20 ± 1.06 ^G	302.57 ± 4.30 ^G
	95% Ethanol	5.05 ± 0.02 ^A	182.26 ± 2.21 ^G	215.44 ± 4.12 ^H
	Ethyl acetate	7.20 ± 0.04 ^G	175.12 ± 3.30 ^G	172.76 ± 3.34 ^I
	dichloromethane	58.84 ± 1.15 ^H	90.64 ± 1.12 ^H	123.68 ± 2.00 ^J
	Hexane	63.29 ± 1.16 ^I	75.20 ± 1.11 ^H	71.13 ± 1.38 ^K
	Water	14.85 ± 0.14 ^J	185.80 ± 1.08 ^G	244.69 ± 4.86 ^L
Trolox		4.02 ± 0.03 ^A		

Note: Statistical significance is indicated by Roman alphabet when comparing within the same column. If different Roman alphabet are specified, it means that there is statistical significance at the $p \leq 0.05$ level, TE: = Trolox equivalent

2.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกของสารที่เป็นตัวต้านออกซิเดชัน (Ferric ion Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay)

สารสกัดของตำรับยา AYW-KK-01 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันทุกตัว ให้ปริมาณสารที่เป็นตัวต้านออกซิเดชันเทียบกับสารมาตรฐานที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) พบว่า การสกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ในการเป็นตัวต้านการเกิดออกซิเดชันได้ดีที่สุด ซึ่งมีปริมาณสารที่เป็นตัวต้านออกซิเดชันเทียบกับสารมาตรฐานเท่ากับ 276.30 ± 3.53 mgTE/g extract ตามด้วยสารสกัดด้วยน้ำ 95% เอทานอล เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน ตามลำดับ และตำรับ AYW-KK-02 ที่สกัดด้วยเมทานอล 95% เอทานอล เอทิลอะซิเตท และน้ำ

มีปริมาณสารที่เป็นตัวต้านออกซิเดชันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยให้ค่าปริมาณสารที่เป็นตัวต้านออกซิเดชันเทียบกับสารมาตรฐาน เท่ากับ 193.20 ± 1.06 , 182.26 ± 2.21 , 175.12 ± 3.30 และ 185.80 ± 1.08 mgTE/g extract ตามลำดับ (Table 4)

2.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี oxygen radical absorbance capacity (ORAC) สารสกัดของตำรับยา AYW-KK-01 และ AYW-KK-02 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันทุกตัว ให้ปริมาณสารที่เป็นตัวต้านออกซิเดชันของสารสกัดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยพบว่าทั้งสองตำรับที่สกัดด้วยวิธีการหมักกับเมทานอลมีฤทธิ์ในการเป็นตัวต้านการเกิดออกซิเดชันได้ดีที่สุด โดยมีสารที่เป็นตัวต้านออกซิเดชัน เท่ากับ

232.25 $\pm$ 4.22 และ 302.57 $\pm$ 4.30 mgTE/g extract ตามลำดับ ตามด้วยสารสกัดด้วยน้ำ เอทานอล เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน ตามลำดับ (Table 4)

อภิปรายผล

จากการคัดเลือกตำรับยาอายุวัฒนะที่มีความเกี่ยวข้องกับโควิด-19 ตามเกณฑ์ต่าง ๆ ที่กล่าวข้างต้นจากทั้งหมด 99 ตำรับ พบตำรับยาที่ตรงตามเกณฑ์ในการนำมาพัฒนาเป็นยาในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ทั้งหมด 2 ตำรับ (AYW-KK-01 และ AYW-KK-02) เมื่อนำตำรับทั้งสองมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมพบว่า สารสกัดของตำรับที่สกัดด้วยน้ำด้วยการต้มเดือดให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วยเมทานอล แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เนื่องจากกลุ่มฟีนอลิกโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซี (-OH) เกาะกับวงแหวนเบนซีน^[19] โดยมีสารฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มย่อยหลักของสารกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งสารกลุ่มฟีนอลิกนี้พบมากในรูปของไกลโคไซด์ ละลายได้ดีในน้ำ และเป็นโมเลกุลที่มีขั้วจึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว (เช่น น้ำ, MeOH, EtOAc, acetonitrile, tert-butyl, alcohol และ acetic) บทบาทของตัวทำละลายขั้วสูงจะช่วยให้การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากพืชได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (เช่น Dichloromethane, chloroform, hexane, petroleum ether เป็นต้น) จึงมักนำมาสกัดสารออกฤทธิ์จำพวกฟีนอลและโพลีฟีนอล^[20]

และในการทดสอบฤทธิ์การเป็นตัวต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ORAC พบว่า ตำรับยาทั้งสองมีฤทธิ์ที่ค่อนข้างดี ซึ่งสารต้านออกซิเดชันต่าง ๆ นั้นอาจแสดงประสิทธิผลด้วยกลไกที่ต่างกัน ดังนั้นการทดสอบวิธีที่แตกต่างกันและผ่านกลไกที่ต่างกันเพื่อยืนยันถึงประสิทธิผลในการเป็นตัวต้านออกซิเดชัน ในการทดสอบครั้งนี้พบว่าสารสกัดของตำรับทั้งสอง มีความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันผ่านทั้งกลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระจากวิธี DPPH, FRAP และกลไกการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระจากวิธี ORAC เป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยเฉพาะตำรับยาที่ผ่านการสกัดด้วยเมทานอล และสกัดด้วยน้ำ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีบทบาทหลักในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนหรือให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ที่กระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระตลอดจนกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ต้านการเกิดออกซิเดชันในร่างกาย^[21] ซึ่งจัดเป็นสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันซึ่งพบได้ในธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น gallic acid, ellagic acid, punigluconin ในมะขามป้อม^[22] chebulagic acid, chebulinic acid^[23] ที่พบในกลุ่มสมอ เช่น สมอพิเภก สมอไทย ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงสารสำคัญในสมุนไพรรักษาโควิด-19 ด้วยวิทยาการเคมีเชิงคำนวณ (in silico) เพื่อเป็นการคัดกรองเบื้องต้นก่อนศึกษาในขั้นต่อไป พบว่าสมุนไพรรกลุ่มฟีนอลิกในสมุนไพรรักษาทั้งสองตำรับมีผลในการจับกับเอนไซม์เป้าหมายที่ต้นาจะส่งผลดีในการลดการเข้าเซลล์ของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 เช่น emblicanin A ที่พบในมะขามป้อม และ

ellagic acid, punigluconin, chebulinic acid ที่พบในสมอ^[24-26] สามารถยับยั้งเอนไซม์อาร์เอ็นเอ ดีเพนเดนที อาร์เอ็นเอ พอลิเมอเรส (RNA-dependent RNA polymerase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการต่อสายอาร์เอ็นเอของไวรัสมีกลไกคล้ายกับยา ฟาวิพิราเวียร์และเรมดิซิเวียร์ และกรดซิงกูลาจิก^[26] และ beta-sitosterol^[27] ที่พบในขิงและกระเทียม สามารถจับและอาจยับยั้งการทำงานของ ACE2 และ TMPRSS2 ได้ ซึ่งเป็นตัวรับสำคัญในการเข้าเซลล์ของไวรัส นอกจากนี้ยังพบสมุนไพรรื่นอื่น ๆ ในตำรับที่มีความสามารถในการจับกับเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 เช่น พริกไทย ตีปาลี หัวแห้วหมู กระเทียม ขิง เป็นต้น^[24,28-30] ซึ่งเป็นกลไกการออกฤทธิ์ ทำนองเดียวกับยาต้านเอดส์ โรพินาเวียร์/ริโทนาเวียร์ (lopinavir/ritonavir) นอกจากนี้การศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าสารสกัดน้ำของสมอไทยมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.8 ± 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และพบว่าที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้ง (% inhibition) ได้มากกว่า 90%^[31] และการศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วยที่มีอาการแสดงและสงสัยว่าติดเชื้อเมื่อได้รับผงขิงอัดเม็ดขนาด 500 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้งร่วมกับผลิตภัณฑ์เอ็กไคนาเซีย (echinacea) ร่วมกับยาไฮดรอกซีคลอโรควิน เป็นเวลา 7 วัน เทียบกับกลุ่มที่ได้รับเพียงไฮดรอกซีคลอโรควินพบว่ากลุ่มที่ได้รับสมุนไพรร่วมนั้นมีอาการไข้ ไอ ปวดเมื่อย หายใจไม่อึด ลดลงและดีขึ้นเร็วกว่ากลุ่มที่ได้รับเฉพาะยาไฮดรอกซีคลอโรควินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ^[32]

การติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จะทำให้ร่างกายเกิดภาวะเครียด (oxidative stress) ซึ่งเป็นภาวะความ

ไม่สมดุลของอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เกิดการทำลายออกซิเดชัน (oxidative damage) ต่อดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมันและโมเลกุลขนาดต่าง ๆ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การเกิดออกซิเดชันบริเวณลิพิดของเยื่อหุ้มเซลล์ (lipid peroxidation) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป ส่งผลต่อเอนไซม์และตัวรับบริเวณนั้น เป็นสาเหตุในการเกิดโรคต่าง ๆ^[33] ในการวิเคราะห์ข้อมูลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับโควิด-19 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชันในเลือดกับสภาวะสุขภาพโดยรวมของผู้ป่วยโควิด-19 พบว่า ความเข้มข้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชันในเลือดสามารถลดความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสโดยมีความสัมพันธ์กับปัจจัยการอักเสบ อัตราการเสียชีวิต การบาดเจ็บที่ไตเฉียบพลัน ภาวะลิ้มเลือดอุดตัน การเกิดอาการรุนแรงจนจำเป็นต้องเข้ารับการดูแลในหน่วยอภิบาล (ICU) และความจำเป็นในการใช้เครื่องช่วยหายใจ^[8] แสดงให้เห็นเบื้องต้นว่าระดับสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่สูงขึ้นในผู้ป่วยโควิด-19 อาจมีประโยชน์ในการป้องกันการลุกลามของโรค นอกจากนี้สารที่มีฤทธิ์เป็นตัวต้านออกซิเดชันที่ดีสามารถปรับการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิด Th1 และ Th2^[34] ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่จัดการกับสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย

กระบวนการปรับภูมิคุ้มกันก็มีความสำคัญในการป้องกันโรค มีการศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรรื่นที่นำมาวิเคราะห์การปรับภูมิคุ้มกัน เช่น เช่น ตริฟลา (สมอพิเภก สมอไทย มะขามป้อม) ซึ่งพบเป็นส่วนประกอบในตำรับยาทั้งสองเป็นตำรับยาของไทยที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แรง และมีฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันที่ดี มีผลช่วยปรับภูมิคุ้มกันโดยสารสกัดตรีฟลาด้วย 95%

เอทานอลสามารถเพิ่ม cytotoxic T cell และ natural killer cells อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี^[35] และพบว่าหนูที่ถูกเหนี่ยวนำเกิดภาวะภูมิไวเกิน (delayed type hypersensitivity) เมื่อได้รับยาตรีกูก (ชิง พริกไทย ดีปลี) ปริมาณ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว พบว่ามีดัชนีอาการบวม น้ำที่เท้าของกลุ่มที่ได้รับตรีกูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับตรีกูก และลดลงมากกว่ากลุ่มที่ได้รับยาอินโดเมทาซิน (indomethacin) นอกจากนี้ระดับความเข้มข้นของแอนติเจนมีค่าลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ^[36]

ดังนั้นจากการทดสอบในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าตำรับยา AYW-KK-01 และ AYW-KK-2 ที่สกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ที่มีขี้ผึ้ง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมมากเมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขี้ผึ้งต่ำ และมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่ดี จากการทดสอบเบื้องต้นนี้ แสดงให้เห็นว่าตำรับยาทั้งสองอาจมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นยาป้องกันโควิด-19 อย่างไรก็ดีตามควรมีการศึกษาต่อในกลไกต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับการป้องกันโควิด-19 ในอนาคตต่อไป

ข้อสรุป

จากการรวบรวมตำรับยาอายุวัฒนะที่ถูกบันทึกไว้ในเอกสารตำราต่าง ๆ ผ่านการคัดเลือกอย่างเป็นระบบทำให้ได้ตำรับยาอายุวัฒนะ AYW-KK-01 และ AYW-KK-02 การทดสอบสมุนไพรรักษาที่คัดเลือกมานำไปพัฒนาเป็นยาป้องกันโควิด-19 ได้แสดงให้เห็นว่ามีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดี เช่น มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมสูง และมีฤทธิ์การ

เป็นตัวต้านออกซิเดชันที่ดี โดยเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขี้ผึ้ง ทั้งนี้เป็นข้อมูลที่สำคัญในการพัฒนาในด้านอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบของตำรับยา หรือศึกษาเพิ่มเติมในด้านของสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ที่สำคัญของตำรับยา เป็นต้น เพื่อเป็นประโยชน์การรับมือกับโรคระบาดนี้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

References

1. Department of thai traditional and alternative medicine. Thai public health report thai traditional medicine folk medicine and alternative medicine 2009-2010. Nonthaburi: Department of Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health; 2010. p. 211-57. (in Thai)
2. Golan Y, Campos JAS, Woolson R, Cilla D, Hanabergh R, Gonzales-Rojas Y, Lopez R, Finberg R, Balboni A. Favipiravir in patients with early mild-to-moderate coronavirus disease 2019 (Covid-19): a randomized controlled trial. *Clinical Infectious Diseases*. 2023;76(3):10-17.
3. World Health Organization. Drugs to prevent Covid-19: A WHO living guideline [Internet]. 2021. [cited 2023 Aug 5]; Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-prophylaxes-2023.1>
4. Boulware DR, Pullen MF, Bangdiwala AS, Pastick KA, Lofgren SM, Okafor EC, Skipper CP, Nascene AA, Nicol MR, Abassi M, Engen NW, Cheng MP, LaBar D, Lother SA, MacKenzie LJ, Drobot G, Marten N, Zarychanski R, Kelly LE, Schwartz IS, McDonald EG, Rajasingham R, Lee TC, Hullsiek KH. A randomized trial of hydroxy-

- chloroquine as postexposure prophylaxis for covid-19. New England Journal of Medicine. 2022;383(6):517-25.
5. Luco MJ. hydroxychloroquine as post-exposure prophylaxis for Covid-19: why simple data analysis can lead to the wrong conclusions from well-designed studies. Trends in Medicine. 2021;21(3):1-10.
 6. World Health Organization. A coordinated global research roadmap: 2019 novel. coronavirus. in who [Internet]. Geneva:Switzerland. march 2021 [cited 2023 Aug 5]; Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/a-coordinated-global-research-roadmap>
 7. World Health Organization. Innovation achievements. Covid-19 research and innovation Achievements [Internet]. Apr 2021 [cited 2023 Aug 5]; Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-research-and-innovation-achievements>.
 8. Hosseinpour A, Daneshzad E, Dezfouli RA, Zamani S, Qorbani M. The Association Between Antioxidants and COVID-19 Outcomes: a Systematic Review on Observational Studies. In Biological Trace Element Research. Springer. 2023;201(11):5098-114.
 9. Birben E, Sahiner U.M, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. WAO Journal. 2021;5(1):9-19.
 10. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. In Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2009;2(5):270-78.
 11. Royal Highness prince Pawaret Wariyalongkorn. special medicine textbook's prince Pawaret Wariyalongkorn. Bangkok: Sammitr; 1908. p. 92 (in Thai)
 12. Chamnan T. Compilation of herbal thai traditional medicine textbooks, of Luang Pu Suk, Pak Khlong Makham Thao Temple. Bangkok: Thaiqualitybooks; 2013. p. 384. (in Thai)
 13. Pai boonwangcharoen P. The medical text palm leaf manuscripts Phra Naray "Tamra Osot Phra Naray". 1st. Bangkok: The War Veterans Organization of Thailand Under Royal Patronage His majesty the King; 2012. p. 180 (in Thai)
 14. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology. 1999;(299):152-78.
 15. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. Food Analytical Methods. 2014; 7(9):1776-82.
 16. Parveena R, Shamsia TN, Singhb G, Athara T, Fatimaa S. Phytochemical analysis and *In vitro* biochemical characterization of aqueous and methanolic extract of Triphala, a conventional herbal remedy. Biotechnology Reports. 2018;(17):126-36.
 17. Jeong JH, Jeong HR, Jo YN, Kim HJ, Lee U, Heo HJ. Antioxidant and neuronal cell protective effects of columbia arabica coffee with different roasting conditions. Preventive Nutrition and Food Science. 2013;18(1):30-7.
 18. Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004;52(1):48-54.
 19. Butkhup L. Dietary polyphenolic and their biological effects. Journal of Science and Technology Mahasarakham. 2012;31(4):443-55. (in Thai)
 20. Shanmugapriya K, Saravana PS, Payal H, Mohammed SP, Williams B. Antioxidant potential of pepper (*Piper nigrum* Linn.) leaves and its antimicrobial potential against some pathogenic microbes. Indian Journal of Natural Products and Resources. 2012;3(4):570-77.
 21. Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia. 2011;82(4):513-23.
 22. Bhattacharya A, Chatterjee A, Ghosal S, Bhattacharya SK. Antioxidant activity of active tannoid principles of *Emblca officinalis* (amla). Indian Journal of Experimental Biology. 1999;37(7):676-80.
 23. Pfundstein B, Desouky SKE, Hull WE, Haubner R, Erben G, Owen RW. Polyphenolic compounds in the fruits of egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. Phytochemistry. 2010;71(10):1132-48.
 24. Pandey K, Lokhande KB, Swamy KV, Nagar S, Dake M. In silico exploration of phytoconstituents from phyllanthus emblica and aegle marmelos as potential therapeutics against SARS-CoV-2 RdRp. Bioinformatics and Biology Insights. 2021;15:1-13.
 25. Sharma A, Vora J, Patel D, Sinha S, Jha PC, Shrivastava N. Identification of natural inhibitors against prime targets of SARS-CoV-2 using molecular docking, molecular dynamics simulation and MM-PBSA approaches. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2022;7:3296-311.
 26. Naik KS, Sahithya MD, Kumar CS, Al-Fahad D, Srinath

- M. Identification of potent bioactive compounds from *Terminalia chebula* (retz.) targeting multiple receptors of SARS-CoV-2 through in silico approach: king of ayurveda against Covid-19. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 2021;7(14):1-12.
27. Sankar M, Ramachandran B, Pandi B, Mutharasappan N, Ramasamy V, Prabu PG, Shanmugaraj G, Wang Y, Muniyandai B, Rathinasamy S, Chandrasekaran B, Bayan MF, Jeyaraman J, Halliah GP, Ebenezer SK, In silico screening of natural phytocompounds towards identification of potential lead compounds to treat Covid-19. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021;8.
28. Lakshmi SA, Shafreen RMB, Priya A, Shunmugiah KP. Ethnomedicines of indian origin for combating Covid-19 infection by hampering the viral replication: using structure-based drug discovery approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2021;39(13):4594-609.
29. Kumar SB, Krishna S, Pradeep S, Mathews DE, Pat-tabiraman R, Murahari M, Murthy TPK. Screening of natural compounds from *Cyperus rotundus* Linn against SARS-CoV-2 main protease (Mpro): an integrated computational approach. *Computers in Biology and Medicine*. 2021;134.
30. Rajagopal K, Byran G, Jupudi S, Vadivelan R. Activity of phytochemical constituents of black pepper, ginger, and garlic against coronavirus (Covid-19): an in silico approach. *International Journal of Health & Allied Sciences*. 2022;9(5):43-50.
31. Upadhyay S, Tripathi PK, Singh M, Raghavendhar S, Bhardwaj M, Patel AK. Evaluation of medicinal herbs as a potential therapeutic option against SARS-CoV-2 targeting its main protease. *Phytotherapy Research*. 2020;34(12):3411-9.
32. Mesri M, Saber SSE, Godazi M, Shirdel AR, Montazer R, Koohestani HR, Baghchehghi N, Karimy M, Azizi N. The effects of combination of *Zingiber officinale* and Echinacea on alleviation of clinical symptoms and hospitalization rate of suspected Covid-19 outpatients: a randomized controlled trial. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2021;18(4):775-81.
33. Khadim RM, Al-Fartusie FS. Antioxidant vitamins and their effect on immune system. *Journal of Physics: Conference Series*. 2021;1853.
34. Ajith Y, Dimri U, Dixit SK, Singh SK, Gopalakrishnan A, Madhesh E, Rajesh JB, Sangeetha SG. Immunomodulatory basis of antioxidant therapy and its future prospects: an appraisal. *Inflammopharmacology*. 2017;15:487-98.
35. Phetkate P, Kummalu T, U-Pratya Y, Kietinun S. Significant increase in cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells by triphala: a clinical phase i study. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012.
36. Murunikara V, Rasool MK. Trikatu, an herbal compound as immunomodulatory and anti-inflammatory agent in the treatment of rheumatoid arthritis - An experimental study. *Cellular Immunology*. 2014;287(1):62-8.