

นิพนธ์ฉบับ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดของตำรับตรีเกสรมาศ

ปฐมพงษ์ เผือกสี, ภาณุฐิ์ เดชะยนต์, จิตพิสุทธิ จันทร์ทองอ่อน, อรุณพร อัฐรัตน์

บทคัดย่อ

- บทนำ:** ตำรับยาตรีเกสรมาศประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ เปลือกฝิ่นต้น เกสรบัวหลวง และลูกมะตูมอ่อน มีสรรพคุณแก้ไอและหลอดลมอักเสบ รักษาในผู้ป่วยที่แพ้พิษจากการเจ็บป่วย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดตำรับตรีเกสรมาศและวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด
- วิธีการศึกษา:** นำสมุนไพรทั้งสามชนิดซึ่งผสมรวมเป็นตำรับได้เป็นสารสกัดเข้มข้นเอธานอล 95% และชันน้ำจากนั้นนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ฤทธิ์ต้านการแพ้ด้วยวิธียับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β -hexosaminidase ฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง nitric oxide และการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu
- ผลการศึกษา:** สารสกัดเข้มข้นเอธานอล 95% และชันน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วยวิธี DPPH (EC_{50} เท่ากับ 3.86 ± 0.11 และ 16.00 ± 3.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) อีกทั้งสารสกัดทั้งสองมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดโดยมีค่าสมมูล gallic acid (GAE) เท่ากับ 300.24 ± 2.23 และ 184.92 ± 4.33 มิลลิกรัมต่อสารสกัด 1 กรัม และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านการแพ้พบว่า สารสกัดเข้มข้นเอธานอล 95% มีฤทธิ์ต้านการแพ้ด้วยวิธียับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β -hexosaminidase (IC_{50} เท่ากับ 93.51 ± 0.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่สารสกัดชันน้ำไม่มีฤทธิ์ต้านการแพ้ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบพบว่าสารสกัดทั้งสองไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ
- สรุปผลการศึกษา:** ตำรับตรีเกสรมาศมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการแพ้และมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาของการแพทย์แผนไทย
- คำสำคัญ:** ตำรับตรีเกสรมาศ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านการแพ้, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด

วันที่รับบทความ: 4 กันยายน 2561 วันที่แก้ไขบทความ: 1 พฤษภาคม 2562 วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: 3 พฤษภาคม 2562

บทนำ

ตำรายาตรีเษรมาศเป็นตำรายาหนึ่งในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561 ว่าด้วยบัญชียาจากสมุนไพร มีสรรพคุณแก้อ่อนเพลีย ปรึษาตุในผู้ป่วยที่เพิ่งฟื้นจากการเจ็บป่วย เช่น ไข้ท้องเสีย เป็นต้น ประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ เปลือกฝิ่นต้น เกสรบัวหลวง และลูกมะตูมอ่อน สูตรตำรับในผงยา 90 กรัม ประกอบด้วย เปลือกฝิ่นต้น เกสรบัวหลวง ลูกมะตูมอ่อน หนักสิ่งละ 30 กรัม ขนาดและวิธีใช้ คือรับประทานครั้งละ 1 กรัม ชงน้ำร้อนประมาณ 120 - 200 มิลลิลิตร ดื่มขณะย่ำยั้งวันละ 4 ครั้ง ก่อนอาหารและก่อนนอน¹ การสืบค้นรายงานทางเภสัชวิทยา พบว่า สารสกัดตำรับตรีเษรมาศขึ้นเอธานอล 95% ทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Broth Dilution พบว่าสารสกัดมีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimum Inhibitory concentration, MIC) ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* เท่ากับ 1,000 มากกว่า 1,000 และ มากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารมาตรฐาน vancomycin มีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐาน rifampicin มีค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* และ *E. coli* เท่ากับ 40 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร² ส่วนสมุนไพรในตำรับบรรยายกันว่า เปลือกฝิ่นต้นที่สกัดด้วย methanol พบสาร microcyclic lathyrane diterpenoids multifidone และ multifidinol เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้าน *Plasmodium falciparum* D6 และ W2 ซึ่งเป็นปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 1,485 กับ 47,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร microcyclic lathyrane diterpenoids มีฤทธิ์ต้าน *Plasmodium falciparum* D6 และ W2 ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7,231.5 และ 7,805.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida glabrata* *S. aureus* และ methicillin-resistant *S. aureus* โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 130.5 34.8 และ 28.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร³ เกสรบัวหลวงได้มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสารสกัดขึ้นต้นน้ำเอธานอล 95% และกากที่เหลือจากการหมักเอธานอลนำมาสกัดด้วยการต้มด้วยวิธี DPPH พบว่า มีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.87 ± 0.01 83.27 ± 2.98 และ 32.72 ± 2.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ⁴ ลูกมะตูมอ่อนได้มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสารสกัดขึ้นต้นน้ำที่ปริมาณของสารสกัดขนาด 50 100 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัม ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH superoxide nitric oxide hydroxyl และ ABTS⁺ radical scavenging ในหลอดทดลอง พบว่า ทุก

ขนาดปริมาณของสารสกัดมีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ทุกวิธี โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับปริมาณของสารสกัด⁵ และสารสกัดผลมะตูมอ่อนขึ้นเอธานอล 95% มีฤทธิ์ต้านการแพ้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 70.03 ± 0.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดขึ้นต้นน้ำมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 40.22 ± 2.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนอกจากนี้สารสกัดผลมะตูมอ่อนขึ้นต้นน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วยวิธี ABTS โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 36.40 ± 1.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ FRAP โดยมีค่า FRAP value เท่ากับ 111.61 ± 0.59 Fe^{2+} ต่อกรัมของน้ำหนักรากสารสกัด และ TEAC value เท่ากับ 39.04 ± 0.23 มิลลิกรัม trolox equivalent ต่อกรัมของน้ำหนักรากสารสกัด ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดทั้งสองขึ้นต้นน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดังกล่าว⁶ แต่อย่างไรก็ตามในส่วนตำรับตรีเษรมาศยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระฤทธิ์ต้านการแพ้และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการแพ้และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดตำรับตรีเษรมาศและวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดของตำรับ

วิธีการศึกษา

1. การสกัดสารสกัด

นำเปลือกฝิ่นต้น เกสรบัวหลวงและผลมะตูมอ่อน จากจังหวัดนครปฐม มาล้าง แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบในตู้อบแห้ง (รุ่น UFE 800 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี) โดยใช้ความร้อนประมาณ 50°C ใช้เวลาอบให้แห้งประมาณ 2 วัน โดยสมุนไพรทั้งสามชนิดได้ถูกตรวจสอบจากผู้เชี่ยวชาญในสถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จากนั้นนำมาบดเป็นผงหยาบ ซึ่งน้ำหนักโดยสมุนไพรแต่ละชนิด ซึ่งหนักชนิดละ 30 กรัม แล้วนำมาผสมรวมกัน จากนั้นนำไปสกัดด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้ 1) สกัดด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลาย (maceration) นำสมุนไพรมาแช่หมักใน เอธานอล 95% ปริมาตร 300 มิลลิลิตร คนบ่อยๆ เป็นเวลา 3 วัน กรองเอาส่วนตัวทำละลายมาระเหยให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศแล้วนำกากมาสกัดซ้ำ ด้วยวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง แล้วทำสารสกัดให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่อง vacuum dry 2) สกัดด้วยวิธีการต้มกับน้ำ (decoction) นำสมุนไพรมาต้มในน้ำเดือด 15 นาที กรองแล้วนำกากมาสกัดซ้ำ ด้วยวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง และนำส่วนที่กรองได้มาทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำให้แห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็ง (รุ่น Lyolab LT บริษัท LSI ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีวิเคราะห์การจับอนุมูลอิสระ DPPH⁷

นำสารสกัดชั้นเอธานอล 95% มาละลายใน absolute ethanol และสารสกัดชั้นน้ำมาละลายในน้ำ ทำให้เป็นความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1 10 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี DPPH วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader (Bio Tek, USA) โดยใช้ BHT (butylated hydroxytoluene) เป็นสารมาตรฐาน นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า radical scavenging activity โดยคิดเป็น half maximal effective concentration (EC_{50}) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ถ้าค่า EC_{50} มีค่าต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คำนวณ % inhibition จากสมการ $\% \text{ inhibition} = [(\text{Abs control} - \text{Abs sample}) / \text{Abs control}] \times 100$ จากนั้นคำนวณหา IC_{50} ใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5

3. การทดสอบฤทธิ์ด้านการแพ้ (anti-allergic activity) ด้วยวิธียับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β -hexosaminidase⁸

เลี้ยง RBL-2H3 (ซึ่งเป็นเซลล์ basophilic leukemia cell line ที่ได้จากหนู *Rattus norvegicus* ชื้อมาจาก American type culture collection: ATCC (CRL-2256) ประเทศสหรัฐอเมริกา) ใน 24-well microplates (cell มีความเข้มข้น 2×10^5 cells/well) medium ที่ใช้เลี้ยง cell คือ minimum essential medium eagle (MEM) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units ต่อมิลลิลิตร) และ streptomycin (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดย incubate cells ใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม anti-dinitrophenylated IgE (anti-DNP IgE) solution (ความเข้มข้น 0.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อยู่ใน MEM ลงไปหลุมละ 40 ไมโครลิตร เฉพาะหลุม control และ sample ส่วน blank จะใส่ MEM บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลายเก่าออกแล้วล้างด้วย buffer A solution (ประกอบด้วย NaCl 119 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 0.4 mM, PIPES 25 mM, NaOH pH 7.2 40 mM) 400 ไมโครลิตร 2 ครั้ง แล้วเติม buffer A solution 160 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพร (sample solution) ที่ความเข้มข้น 1 10 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดชั้นเอธานอลใช้สารละลาย DMSO (Dimethyl Sulfoxide) เป็น

ตัวทำละลาย ส่วนสารสกัดชั้นน้ำใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงไปในหลุม sample ส่วนหลุม blank และ control เติม buffer A บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม dinitrophenylated bovine serum albumin (DNP-BSA) solution 20 ไมโครลิตร ในหลุม control และ sample ส่วนหลุม blank เติม buffer A บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที ดูด solution จาก 24-well microplates ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplates จากนั้นเติม p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 1 mM (PNAG) 50 ไมโครลิตร ลงใน 48 หลุมด้านบน ส่วน 48 หลุมด้านล่างเติม citric acid บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Na_2CO_3 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงไปได้สาร p-nitrophenol ที่มีสีเหลืองเมื่ออยู่ในสารละลายเบส pH 10 ซึ่ง p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นจะถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้ UV-Vis detector ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA)

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β -hexosaminidase มีดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (T - B - N) / (C - N)] \times 100$$

โดยที่ Control (C): ค่าการดูดกลืนแสง DNP-BSA (+), test sample (-) Test (T): ค่าการดูดกลืนแสง DNP-BSA (+), test sample (+)

Normal (N): ค่าการดูดกลืนแสง DNP-BSA (-), test sample (-) Blank (B): ค่าการดูดกลืนแสง DNP-BSA (-), test sample (+)

หมายเหตุ การคำนวณหา IC_{50} ใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5

4. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง nitric oxide⁹

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 (ซึ่งเป็นเซลล์ macrophage ที่ได้จากหนู *Mus musculus*; Abelson murine leukemia virus transformed ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สุญญา ตีวตระกูล ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเทศไทย) ใน 96-well microplates (cell มีความเข้มข้น 1×10^5 cells/well) โดยอาหารที่ใช้เลี้ยง cell คือ RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS, penicillin (100 units ต่อมิลลิลิตร) และ streptomycin (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยบ่ม cells ใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

หลังจากนั้นดูดสารละลายเก่าออก เติม LPS (lipopolysaccharide) ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อยู่ใน RPMI ลงไป หลุมละ 100 ไมโครลิตร เฉพาะหลุม control และ sample ส่วน blank จะใส่ RPMI จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพร (sample solution) ที่ความเข้มข้น 1 10 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดขึ้นเอทานอลใช้สารละลาย DMSO เป็นตัวทำละลาย ส่วนสารสกัดขึ้นน้ำใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จำนวน 100 ไมโครลิตรในหลุมของ sample และ blank ของ sample ส่วนหลุม control และ blank ของ control ให้เติม RPMI แล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด supernatant แต่ละหลุมมา 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well microplates เติม Griess reagent หลุมละ 100 ไมโครลิตร เคาะ microplate เบาๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA)

การคำนวณ % inhibition of NO production = $[(OD \text{ control} - OD \text{ sample}) / OD \text{ control}] \times 100$

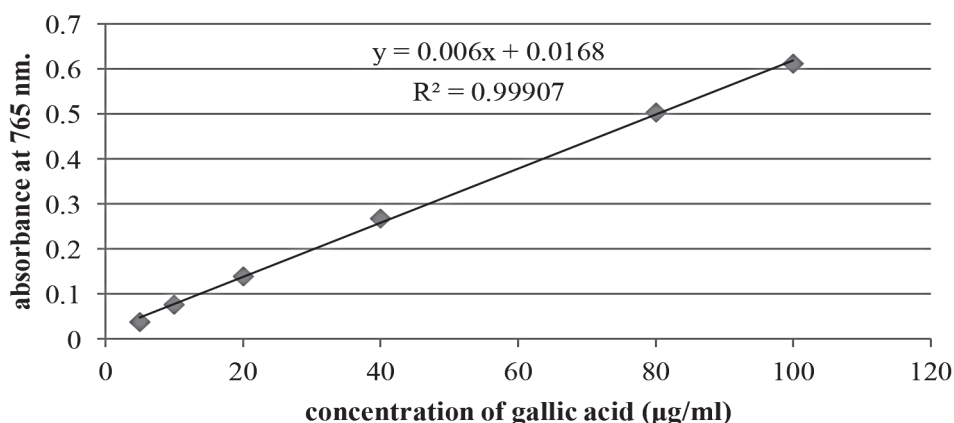
การคำนวณหา IC_{50} ใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

เป็นการทดสอบ cell viability เพื่อดูว่าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรงหรือไม่ โดยนำเซลล์ที่บ่มกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT หลุมละ 10 ไมโครลิตร เคาะ microplate เบา ๆ แล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา

2 ชั่วโมง ดูด supernatant ออกทุกหลุม เติม isopropanol ใน 0.04 M HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA) คำนวณร้อยละการรอดชีวิต ตามสมการ The Percentage of survival = $(Abs. \text{Sample} / Abs. \text{Control}) \times 100$ โดยสารสกัดที่จะนำไปคำนวณหา IC_{50} ต้องมีค่าร้อยละการรอดชีวิต มากกว่า 70

5. การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด¹⁰

การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu นำสารสกัดขึ้นเอทานอล 95% มาละลายใน absolute ethanol และสารสกัดขึ้นน้ำมาละลายในน้ำ ทำให้เป็นความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ UV-Vis detector ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA) โดยคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร gallic acid แล้วรายงานผลอยู่ในหน่วยของ มิลลิกรัม เมื่อเทียบกับ gallic acid ต่อกรัมของน้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิกรัมสมมูล gallic acid/กรัมของตัวอย่าง)



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร กับปริมาณของกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

6. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ “ฤทธิ์ด้านการแพ้ ฤทธิ์ด้านการอักเสบและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด” จะทำการทดสอบซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้งและนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($\pm$ SEM) และสถิติ one-way ANOVA เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5

ผลการศึกษา

1. การสกัดสารสกัด

จากการสกัดสารสกัดของตำรับตรีเษรมาศพบว่า การสกัดด้วยวิธีต้มน้ำให้ค่าร้อยละสิ่งสกัด (% yield) สูงกว่า การสกัดด้วยวิธีการแช่เย็นด้วยตัวทำละลายโดยสารสกัดเข้มข้นของตำรับตรีเษรมาศ มีค่าร้อยละสิ่งสกัดเท่ากับ 14.82 และ สารสกัดเข้มข้นเอธานอล 95% มีค่าร้อยละสิ่งสกัดเท่ากับ 7.99 (ตารางที่ 1)

2. การทดสอบฤทธิ์ด้านการแพ้ (anti-allergic activity) ด้วยวิธียับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β -hexosaminidase

ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดเข้มข้นเอธานอล 95% มีฤทธิ์ด้านการแพ้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 93.81 ± 0.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ด้านการแพ้ไม่ดีกว่าสารมาตรฐาน ketotifen (IC_{50} เท่ากับ 25.06 ± 2.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดเข้มข้นนั้นพบว่าไม่มีฤทธิ์ด้านการแพ้ (IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ตารางที่ 1)

3. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง nitric oxide

ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดเข้มข้นเอธานอล 95% และชั้นน้ำไม่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่สารมาตรฐาน indomethacin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 29.97 ± 2.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT พบว่า สารสกัดทุกชั้นไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่าร้อยละการรอดชีวิต เกิน 70 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1)

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีวิเคราะห์การจับอนุมูลอิสระ DPPH*

ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดตำรับตรีเษรมาศเข้มข้นเอธานอล 95% และชั้นน้ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 3.86 ± 0.11 และ 16.00 ± 3.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อีกทั้งสารสกัดตำรับตรีเษรมาศเข้มข้นเอธานอล 95% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสาร BHT ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (EC_{50} เท่ากับ 12.98 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

5. การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด

กราฟมาตรฐานของสาร gallic acid เป็นสมการเชิงเส้นตรง $y = 0.006x + 0.0168$ $R^2 = 0.9991$ การหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด พบว่าสารสกัดเข้มข้นเอธานอล 95% และชั้นน้ำมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด โดยมีค่าสมมูล gallic acid เท่ากับ 300.24 ± 2.23 และ 184.92 ± 4.33 มิลลิกรัมต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละสิ่งสกัด (% yield) และผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านการแพ้และฤทธิ์ด้านการอักเสบของ สารสกัดตำรับตรีเษรมาศและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดของตำรับ (n = 3)

สาร	% yield	EC_{50} (μ g/ml) ของ DPPH assay	IC_{50} (μ g/ml) ของ Anti- allergic activity	IC_{50} (μ g/ml) ของ Anti- inflammatory activity	มิลลิกรัม gallic acid equivalent ต่อกรัม ของน้ำหนักรวบรวม ของวิธี Folin-Ciocalteu
สารสกัดตำรับตรีเษรมาศ เข้มข้นเอธานอล 95%	7.99	$3.86 \pm 0.11^*$	93.51 ± 0.83	มากกว่า 100	300.24 ± 2.23
สารสกัดตำรับตรีเษรมาศชั้นน้ำ	14.82	16.00 ± 3.60	มากกว่า 100	มากกว่า 100	184.92 ± 4.33
BHT	-	12.98 ± 0.01	-	-	-
Ketotifen	-	-	25.06 ± 2.02	-	-
Indomethacin	-	-	-	29.97 ± 2.33	-

(*) indicates a significant difference at the level $p < 0.05$, compared with positive control of each assay

วิจารณ์

ตำรับยาตรีเกรสมาศประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ เปลือกฝิ่นต้น เกสรบัวหลวง และลูกมะตูมอ่อน มีสรรพคุณแก้ร้อนเพ็ญ ปรึษาตุในผู้ป่วยที่เพ่งพึนจากการเจ็บป่วย เช่น ไข้ ท้องเสีย เป็นต้น ในส่วนของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการขจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) ด้วยวิธีวิเคราะห์การจับอนุมูลอิสระ DPPH[•] สารสกัดชั้นเอธานอล 95% และชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตีมาก ตำรับตรีเกรสมาศจึงมีคุณสมบัติในการขจัดอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ สารสกัดทั้งสองมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดที่สูง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าสารกลุ่มฟีนอลิกเป็นสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ โดยสารกลุ่มฟีนอลิกมีบทบาทในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์¹¹ ซึ่งสอดคล้องกับสรรพคุณของตำรับที่แก้ร้อนเพ็ญและปรึษาตุในผู้ป่วย¹ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ด้านการแพ้ด้วยวิธียับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β -hexosaminidase พบว่า สารสกัดชั้นเอธานอล 95% มีฤทธิ์ด้านการแพ้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ามะตูมอ่อนที่เป็นส่วนประกอบของตำรับมีส่วนทำให้ตำรับมีฤทธิ์ด้านการแพ้ โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบสารสกัดผลมะตูมอ่อนชั้นเอธานอล 95% มีฤทธิ์ด้านการแพ้⁶ อย่างไรก็ตามสารสกัดชั้นน้ำไม่มีฤทธิ์ด้านการแพ้ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบพบว่าสารสกัดทั้งสองไม่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง nitric oxide

ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า ตำรับตรีเกรสมาศมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการแพ้และมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาของการแพทย์แผนไทยที่ใช้ตำรับตรีเกรสมาศ แก้ร้อนเพ็ญ ปรึษาตุในผู้ป่วยที่เพ่งพึนจากการเจ็บป่วย ดังนั้นตำรับตรีเกรสมาศควรมีการศึกษาวิจัยด้วยกลไกอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับสรรพคุณและศึกษาในระดับสัตว์ทดลองและคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561. <http://www.fda.moph.go.th/sites/drug/Shared%20Documents/New/nlem2561.PDF>. เข้าถึงเมื่อ 1 เมษายน 2562.
2. Chusri S, Jangkaia D, Limsuwan S, Voravuthikunchai SP. Assessments of antibacterial activity, phytochemical constituents, and cytotoxicity of herbal preparations used in Thailand. *Eur J Integr Med* 2014;6:294-300.
3. Falodun A, Imieje V, Erharuyi O, et al. Isolation of antileishmanial, antimalarial and antimicrobial metabolites from *Jatropha multifida*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014;4:374-8.
4. Makchuchit S. Anti-inflammatory and anti-allergic activities of Thai traditional medicine preparation called Prasaprophyai [dissertation]. Pathumthani: Thammasat University; 2010.
5. Krushna GSS, Kareem MA, Reddy VD, Padmavathi P, Hussain SA, Kodihela LD. *Aegle marmelos* fruit extract attenuates isoproterenol-induced oxidative stress in rats. *J Clin Biochem Nutr* 2012;50:199-204.
6. ปฐมพงษ์ เผือกลี, ภาณุฐ เดชะยนต์, จิตพิสุทธิ์ จันทรทองอ่อน, อรุณพร อิฐรัตน์. ฤทธิ์ด้านการแพ้ ฤทธิ์ด้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมอ่อน. *ธรรมศาสตร์เวชสาร* 2561;18:349-57.
7. Yamasaki K, Hashimoto A, Kokusenya Y, Miyamoto T, Sato T. Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1994;42:1663-5.
8. Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. *J Ethnopharmacol* 2007;109:535-8.

9. Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Effects of compounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide, prostaglandin E₂ and tumor necrosis factor- α productions in RAW 264.7 macrophage cells. J Ethnopharmacol 2008; 120:81-4.
10. Miliauskus G, Venskutonis PR, van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem 2014;85:231-7.
11. เจนจิรา จิรัมย์, ประสงค์ สีหนาม. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์ 2554;1:59-70.

Abstract

Antioxidant, anti-allergic and anti-inflammatory activities and total phenolic compounds of Tregaysornmas formula

Pathompong Phuaklee, Bhanuz Dechayont, Jitpisute Chunthorn-Orn, Arunporn Itharat

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

Introduction: Tregaysornmas formula, including *Jatropha multifida* L., *Nelumbo nucifera* Gaertn. and *Aegle marmelos* (L.) Corrêa, was discovered in Thai Pharmacy scripture. In Thai traditional medicine, it has been used to treat fatigue and maintain body balance of patients. The objective of this study was to investigate the antioxidant, anti-allergic and anti-inflammatory activities of Tregaysornmas formula and determine their total phenolic content.

Methods: Two extraction methods (maceration and decoction) were used to extract Tregaysornmas formula. DPPH assays were used to evaluate antioxidant activity. Inhibitory effects on the release of β -hexosaminidase and nitric oxide inhibitory assay were used to evaluate anti-allergic and anti-inflammatory activities. Folin-Ciocalteu's reagent was used to determine total phenolic content.

Results: The 95% ethanol and water extracts displayed the high antioxidant activity on DPPH assay ($EC_{50} = 3.86 \pm 0.11$ and 16.00 ± 3.60 μ g/ml, respectively). Furthermore, both extracts showed the total phenolic content with 300.24 ± 2.23 and 184.92 ± 4.33 mg GAE/g, respectively. For anti-allergic activity, the 95% ethanol extract exhibited the potent allergic activity by inhibitory effects on the release of β -hexosaminidase ($IC_{50} = 93.51 \pm 0.83$ μ g/ml), whereas, water extract had no anti-allergic activity. In addition, both were not show anti-inflammatory activity on nitric oxide inhibitory assay.

Conclusion: Tregaysornmas formula showed antioxidant and ant-allergic activities and revealed high total phenolic compounds. These results support the use of Tregaysornmas formula in Thai traditional medicine.

Key words: Tregaysornmas formula, antioxidant, anti-allergic, anti-inflammatory, total phenolic compounds