นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาความคงตัว ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับเบญจกูล

รุจิรัตน์ แก้วคุ้มภัย*, ทิพาพร ธาระวานิช**, อรุณพร อิฐรัตน์*,***

บทคัดย่อ

บทนำ: ยาเบญจกูล เป็นตำรับยาที่บัญญัติอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ มีสรรพคุณในการใช้เป็นยาปรับธาตุ กระจายกองลมและโลหิต บำรุงกองธาตุทั้ง ๔ ให้บริบูรณ์ ซึ่งในตำรับประกอบด้วยสมุนไพร ๕ ชนิด ได้แก่ ผลดีปลี รากช้าพลู เถาสะค้าน รากเจตมูลเพลิงแดง เหง้าขิง จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่มีผู้ใดศึกษาเกี่ยวกับความคงตัวของสารสกัดตำรับยาเบญจกูล ซึ่งการศึกษาความคงตัวของสารสกัดเป็นสิ่งสำคัญประการหนึ่งที่ใช้ในการประเมินคุณภาพของตัวยา การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความคงตัวของสารสกัดตำรับยาเบญจกูล โดยประเมินจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณของสารประกอบฟีนอลรวม

วิธีการศึกษา: นำสมุนไพรไปทำการสกัดด้วย ๙๕% เอทานอล ทำการเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในสภาวะเร่ง (accelerated conditions) ที่อุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ เป็นระยะเวลา ๑๒๐ วัน โดยจะทำการสุ่มตัวอย่าง ณ วันที่ ๐, ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐ และ ๑๒๐ วัน ตามลำดับ และนำไปประเมินประสิทธิภาพโดยการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay และ 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) cation radical scavenging assay และการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม โดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent

ผลการศึกษา: จากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการ DPPH radical scavenging assay ค่า EC_{50} อยู่ในช่วง ๑๗.๒๔ ± ๐.๔๘ - ๑๗.๗๐ ± ๐.๖๗ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ABTS cation radical scavenging assay มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง ๒๘.๗๑ ± ๑.๐๐ - ๓๓.๑๗ ± ๐.๒๖ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบ ค่า EC_{50} ของช่วงเวลาการเก็บแต่ละช่วงกับวันเริ่มต้นคือ วันที่ ๐ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในส่วนของปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม มีค่า อยู่ในช่วง ๗๒.๔๓ - ๗๗.๔๒ มิลลิกรัมของแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด เมื่อเปรียบเทียบ กับวันเริ่มต้น (วันที่ ๐) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เช่นกัน

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา: สารสกัดตำรับเบญจกูลมีความคงตัวในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลรวม และสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้เป็นระยะเวลา ๒ ปี โดยที่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

คำสำคัญ: ความคงตัว, เบญจกูล, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลรวม

วันที่รับบทความ: ๓ มิถุนายน ๒๕๕๙ **วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๕ กรกฎาคม ๒๕๕๙**

* สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
** ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
*** ศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัยแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทนำ

ยาเบญจกูล เป็นตำรับยาที่บัญญัติอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ มีสรรพคุณในการใช้เป็นยาปรับธาตุ กระจายกองลมและโลหิต บำรุงกองธาตุทั้ง ๔ ให้บริบูรณ์ ซึ่งในตำรับประกอบด้วยสมุนไพร ๕ ชนิด ได้แก่ ผลดีปลี รากช้าพลู เถาสะค้าน รากเจตมูลเพลิงแดง เหง้าขิง ตำรับยานี้ เป็นยาปรับธาตุในยาไทย มักจะให้รับประทานก่อนการให้ยารักษาโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังใช้ เป็นส่วนประกอบในยาบำรุงโลหิตของสตรีอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาเบญจกูลจากการศึกษาด้วยวิธีการ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay มีค่า EC_{50} น้อยกว่า ๓๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[๑] ในส่วนของการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของตำรับยาเบญจกูล ในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ โดยป้อนสารสกัดในขนาด ๑, ๖ และ ๓๖ เท่าของขนาดที่ใช้ในคนปรกติ พบว่าไม่มีความผิดปรกติใดๆ[๒] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ อาทิเช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง พบว่าสารสกัดขั้นเอทธานอลมีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีโดยเฉพาะมะเร็งปอด และมะเร็งเต้านม[๓] การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี พบว่ามีสารประกอบ piperine, plumbagin, myristicine, gingerol เป็นต้น[๔] และมีการศึกษาความปลอดภัยของยาเม็ดจากสารสกัดเบญจกูลในคนปรกติ เป็นระยะเวลา ๑๔ วัน ไม่พบอาการทางคลินิกผิดปรกติและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ปรกติ[๕] นอกจากนี้มีการศึกษาพิษเรื้อรังในสัตว์ทดลอง ไม่พบความเป็นพิษในขนาดที่ใช้ในคน และจากการศึกษาทดลองเบื้องต้น (preliminary experiment) ของอรุณพร อิฐรัตน์ และคณะ พบว่าสารสกัดตำรับยาเบญจกูล ขนาด ๑๐๐ มิลลิกรัม มีแนวโน้มในการลดภาวะไขมันในเลือดได้ โดยสามารถลดระดับ triglyceride ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้นยังลดระดับ LDL, HDL total cholesterol และลดความดันโลหิตสูงในหนูทดลองได้ สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ยังไม่ทราบแน่ชัด[๖] จะเห็นได้ว่าตำรับยาเบญจกูล เป็นตำรับยาที่มีความน่าสนใจในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคเรื้อรังเช่นมะเร็ง ความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดสูง ที่กล่าวมามีสาเหตุการเกิดมาจากสารอนุมูลอิสระทั้งสิ้น[๗] และสารประกอบฟีนอลเป็นสารประกอบที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอล น่าจะใช้เป็นข้อบ่งชี้คุณภาพของสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเกี่ยวกับโรคเรื้อรัง อาทิเช่น ความดันไขมันในเลือดสูง และมะเร็ง ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับเบญจกูล และประมาณสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอล พร้อมทั้งศึกษาความคงตัวของสารสกัด ตำรับเบญจกูลโดยประเมินจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณของสารประกอบฟีนอลรวม เพราะจากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่มีผู้ใดศึกษาเกี่ยวกับความคงตัวของสารสกัดตำรับยาเบญจกูล ซึ่งการศึกษาความคงตัวของสารสกัดเป็นสิ่งสำคัญที่ใช้ในการประเมินคุณภาพของตัวยาก่อนนำมาผลิตเป็นยาสำหรับผู้ป่วย และเพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

คัดเลือกสมุนไพรและตรวจสอบเอกลักษณ์ สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ซึ่งเป็นส่วนประกอบในตำรับยาเบญจกูล ๕ ชนิด ได้แก่ ผลดีปลี รากช้าพลู เถาสะค้าน รากเจตมูลเพลิงแดง และเหง้าขิง ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทยในช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. ๒๕๕๖ (ตารางที่ ๑) ในสัดส่วนที่เท่ากัน จากนั้นทำการบดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิด และนำมารวมกันเป็นตำรับยาเบญจกูลในอัตราส่วนที่เท่ากัน

ตารางที่ ๑ แสดงชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ แหล่งที่มา ส่วนที่ใช้ และอัตราส่วนน้ำหนักของสมุนไพรในตำรับ

สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ส่วนที่ใช้	อัตราส่วนในตำรับ (ร้อยละ)	แหล่งที่มา
ดีปลี	*Piper retrofractum* Vahl.	PIPERACEAE	ผล	๒๐	กาญจนบุรี
ช้าพลู	*Piper sarmentosum* Roxb.	PIPERACEAE	ราก	๒๐	กาญจนบุรี
สะค้าน	*Piper ribesoides* Wall.	PIPERACEAE	เถา	๒๐	กาญจนบุรี
เจตมูลเพลิงแดง	*Plumbago indica* L.	PLUMBAGINACEAE	ราก	๒๐	กาญจนบุรี
ขิง	*Zingiber officinale* Roscoe	ZINGEBERACEAE	เหง้า	๒๐	กาญจนบุรี

การสกัดสมุนไพรตำรับยาเบญจกูล

นำสมุนไพรที่บดแล้วในอัตราส่วนที่เท่ากัน ปริมาณ ๗๐ กิโลกรัม มาทำการหมักด้วย ๙๕% เอทานอล เป็นเวลา ๓ วัน จากนั้นทำการกรอง และนำมาทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator นำกากที่ได้จากการกรองไปหมักซ้ำด้วยวิธีการเดียวกันอีก ๒ รอบ นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมารวมกัน แล้วไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator อีกครั้ง และทำให้แห้งโดยวิธีการ freeze dry ซึ่งได้ปริมาณสารสกัดร้อยละ ๑๑.๑๖

การทดสอบสภาพความคงตัวในสภาวะเร่ง[๙]

ทำโดยการเก็บสารสกัดขนาด ๑๐๐ มิลลิกรัม ในขวดแก้วขนาดเล็กที่มีฝาปิดมิดชิด อย่างละ ๓ ขวดไว้ในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ในสภาวะเร่ง (accelerated conditions) คือ ตู้ควบคุม ที่มีอุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ เป็นระยะเวลา ๑๒๐ วัน โดยจะทำการเก็บตัวอย่างมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลรวม ณ วันที่ ๐, ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐ และ ๑๒๐ วัน ตามลำดับ และนำไปประเมินประสิทธิภาพโดยการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการ DPPH radical scavenging assay และ ABTS cation radical scavenging assay การเลือกใช้ทั้ง ๒ วิธีมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้ เพราะเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ เนื่องจากทั้ง DPPH และ ABTS เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร และทำปฏิกิริยาได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์[๙] เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารสกัดชั้นเอทานอล และเลือกใช้ทั้ง ๒ วิธีเพื่อเป็นการตรวจสอบว่าผลที่ได้มีความแม่นยำและเป็นไปในทิศทางเดียวกันหรือไม่ และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ดังนี้

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay[๑๐]

หลักการ

เป็นการทดสอบโดยใช้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรมีสีม่วง เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยาการสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนสีของ DPPH ให้จางลง

วิธีการทดสอบ

นำสารสกัดที่เก็บเป็นขวดและชั่งแล้ว ๑๐ มิลลิกรัม และสารทดสอบมาตรฐาน (positive control) BHT ชั่งให้มีน้ำหนัก ๑๐ มิลลิกรัม แล้วนำมาทำละลายด้วย absolute ethanol ๑๐ มิลลิลิตร ให้ได้ระดับความเข้มข้น ๑๐๐, ๕๐, ๑๐, ๕ และ ๑ ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารมาตรฐานและสารละลายสารสกัดที่เตรียมไว้ลงใน 96 well plate หลุมละ ๑๐๐ ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DPPH ลงใน 96 well plate หลุมละ ๑๐๐ ไมโครลิตรเช่นกัน และเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา ๓๐ นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ ๕๒๐ นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ ๓ ซ้ำ และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ ๕๐ (EC_{50}) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย วิธี ABTS cation radical scavenging assay[๑๑]

หลักการ

เป็นการทดสอบโดย ABTS หรือ 2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกด้วยการเติมโปแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เมื่อทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนจากสีเขียวน้ำเงินเป็นสารสีจางลง ถึงไม่มีสี

วิธีการทดสอบ

เตรียมสารละลาย ABTS โดยผสมสารละลาย ABTS ในน้ำกลั่นกับสารละลาย potassium persulphate ในน้ำกลั่นให้เข้ากัน ในอัตราส่วน ๑:๑ เก็บไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา ๑๒ - ๑๖ ชั่วโมง แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง ๐.๗ - ๐.๙ ที่ความยาวคลื่น ๗๓๔ นาโนเมตร เตรียมสารละลายสารสกัดตัวอย่าง และสารทดสอบมาตรฐาน (positive control) Trolox และ BHT ให้ได้ความเข้มข้น ๑๐๐, ๕๐, ๑๐, ๕ และ ๑ ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และเติมสารมาตรฐาน และสารละลายสารสกัดที่เตรียมไว้ลงใน 96 well plate ตามด้วยเติมสารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้ว จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๗๓๔ นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ ๓ ซ้ำ และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ ๕๐ (EC_{50})

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic compound)[๑๒]

หลักการ

เป็นการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมด้วย Folin-Ciocalteu's reagent โดยใช้ gallic acid เป็นสารทดสอบมาตรฐาน สารประกอบฟีนอลรวมเมื่อทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent จะทำให้เกิดเป็นสารสีน้ำเงิน

วิธีการทดสอบ

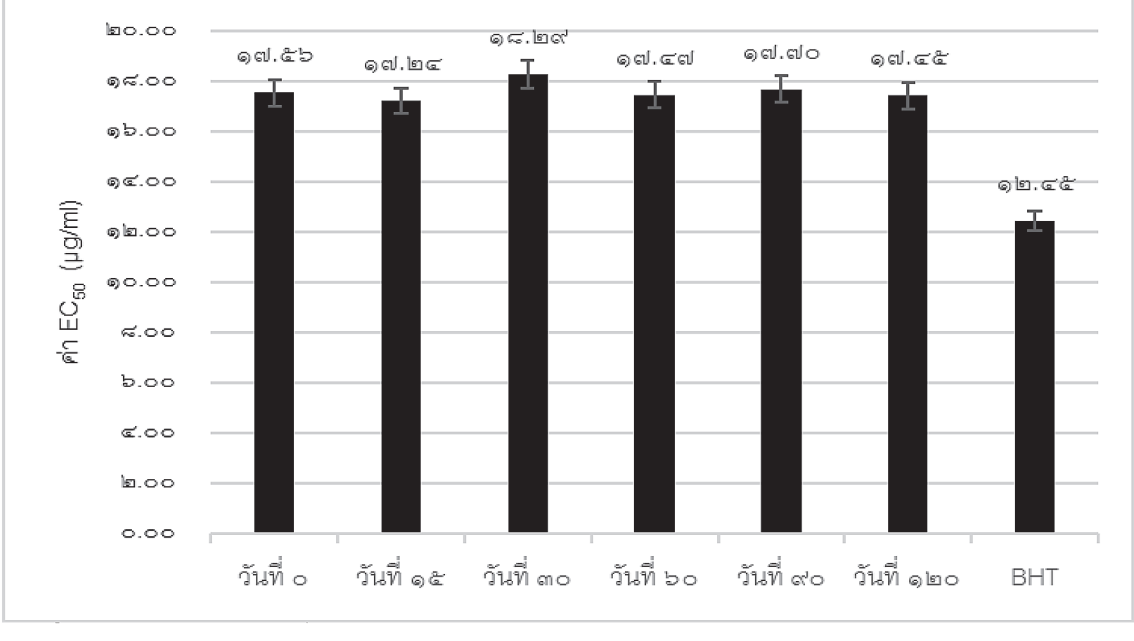
เตรียมสารสกัดตัวอย่าง และสารมาตรฐาน ๑ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน absolute ethanol จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่าง ๒๐ ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate เติม Folin-Ciocalteu's reagent ๑๐๐ ไมโครลิตร และเติมโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate : Na_2Co_3) ลงไป ๘๐ ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๓๐ นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๗๖๕ นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ ๓ ซ้ำ คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจาก calibration curve ของสารมาตรฐาน gallic acid โดยคิดเป็น มิลลิกรัมของแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด (mgGAE/g extract)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

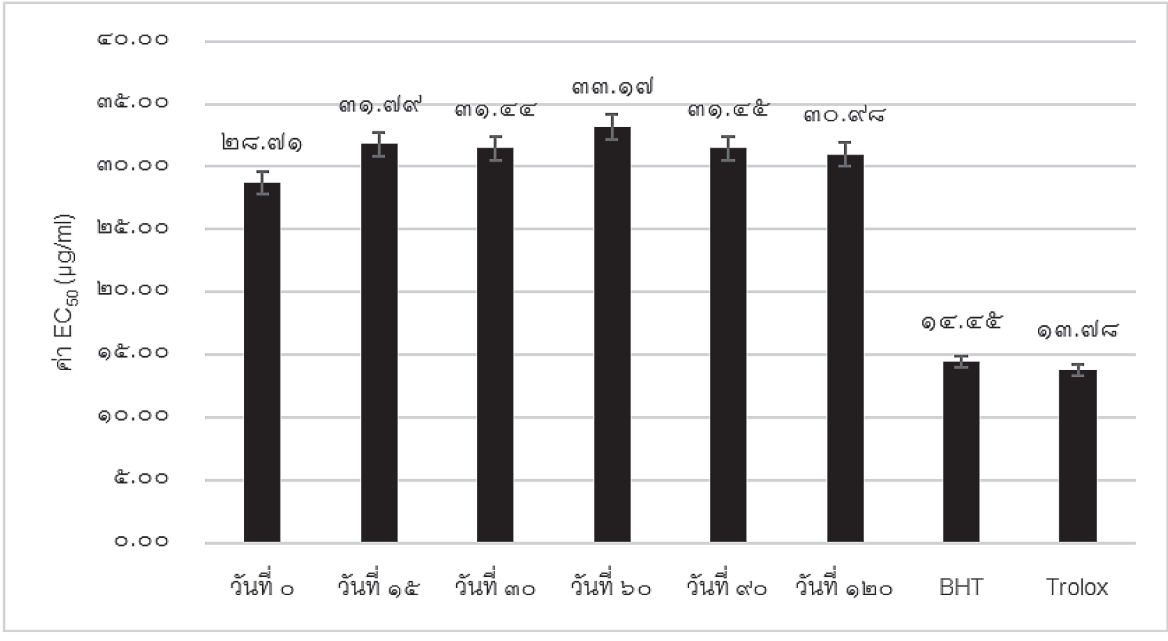
ในการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการ DPPH radical scavenging assay และ ABTS cation radical scavenging assay และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม จะทำการทดสอบซ้ำตัวอย่างละ ๓ ครั้ง เพื่อเป็นการตรวจสอบความแม่นยำของผลที่ได้ และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (± SEM) และใช้ paired t-test ($p < ๐.๐๕$) เปรียบเทียบความแตกต่างของฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างวันที่ ๐ กับวันต่างๆ

ผลการศึกษา

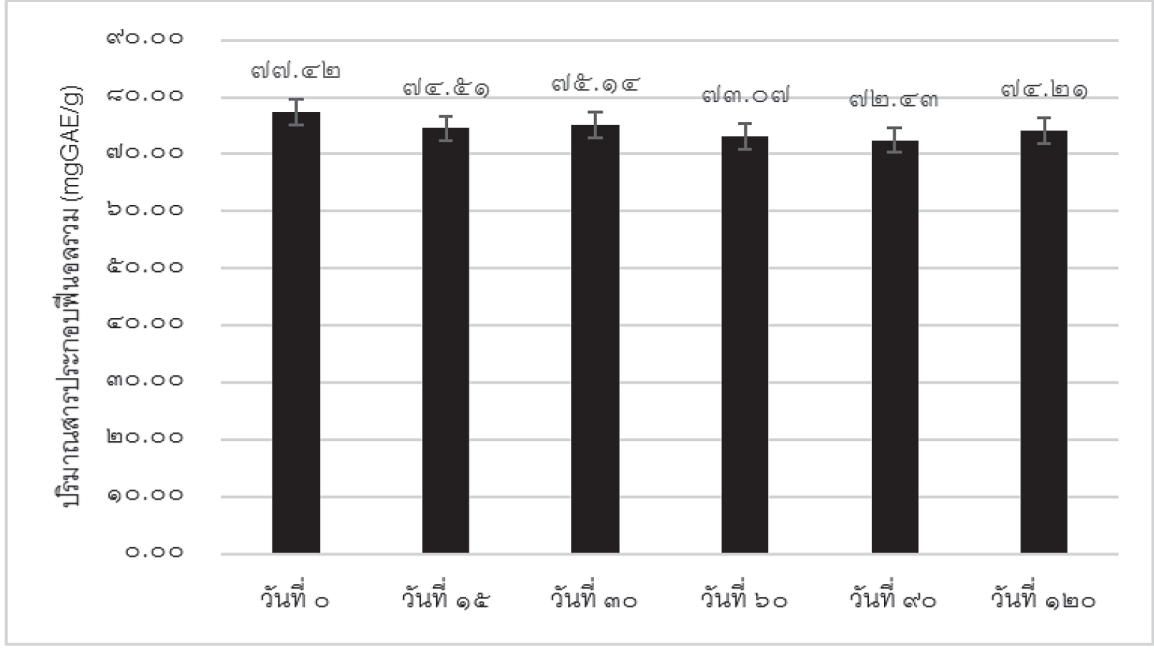
เมื่อเก็บสารสกัดในสภาวะเร่ง ที่มีอุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ เป็นระยะเวลา ๑๒๐ วัน แล้วนำมาทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay พบว่าที่วันเริ่มต้น (วันที่ ๐) มีค่า EC_{50} ๑๗.๕๖ ± ๑.๑๑ และ ๒๘.๗๑ ± ๑.๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า BHT ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานใน DPPH assay รวมไปถึงมีค่ามากกว่า BHT และ Trolox ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน ใน ABTS assay ด้วย



รูปที่ ๑ แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเบญจกูลด้วยวิธีการ DPPH assay (n = ๓)



รูปที่ ๒ แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเบญจกูลด้วยวิธีการ ABTS assay (n = ๓)



รูปที่ ๓ แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดเบญจกูล (n = ๓)

ตารางที่ ๒ สรุปฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay และ ABTS cation radical scavenging assay และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (n = ๓) ในการทดสอบความคงตัวทางชีวภาพ

วันที่	n	DPPH radical		ABTS radical scavenging assay		Total phenolic compound scavenging assay	
		EC_{50} (µg/ml)	± SEM	EC_{50} (µg/ml)	± SEM	mgGAE/g	± SEM
๐	๓	๑๗.๕๖	๑.๑๑	๒๘.๗๑	๑.๐๐	๗๗.๔๒	๓.๓๕
๑๕	๓	๑๗.๒๔	๐.๔๘	๓๑.๗๙	๐.๐๖	๗๔.๕๑	๒.๖๕
๓๐	๓	๑๘.๒๙	๐.๗๒	๓๑.๔๔	๑.๓๘	๗๕.๑๔	๓.๖๔
๖๐	๓	๑๗.๔๗	๑.๑๗	๓๓.๑๗	๐.๒๖	๗๓.๐๗	๓.๑๕
๙๐	๓	๑๗.๗๐	๐.๖๗	๓๑.๔๕	๐.๘๗	๗๒.๔๓	๒.๙๘
๑๒๐	๓	๑๗.๔๕	๐.๐๙	๓๐.๙๘	๐.๖๔	๗๔.๒๑	๓.๕๓
BHT		๑๒.๔๕	๑.๔๖	๑๔.๔๕	๑.๒๔		
Trolox				๑๓.๗๘	๒.๑๕		

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay พบว่าสารสกัดตำรับมีค่า EC_{50} เป็น ๑๗.๕๖ ± ๑.๑๑ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์น้อยกว่า BHT ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็นมาตรฐาน ผลการศึกษามีความสอดคล้องกับการศึกษาของอรุณพร อิฐรัตน์ และคณะ[๑] ที่พบว่าสารสกัดเบญจกูลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วย DPPH assay มีค่า EC_{50} เท่ากับ ๑๔.๙ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ยังไม่มีผู้ใดศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS assay ซึ่งพบค่า EC_{50} เท่ากับ ๒๘.๗๑ ± ๑.๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้กัน พบว่าสารสกัดเบญจกูลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay น้อยกว่าสารมาตรฐาน แต่การวิจัยครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกของการทดสอบเบญจกูลกับ ABTS assay ส่วนการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในเบญจกูล พบว่า มีปริมาณ ๗๗.๔๒ ± ๓.๓๕ มิลลิกรัมของแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด จากการศึกษาในครั้งนี้กล่าวได้ว่าสารสกัดเบญจกูลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay น้อยกว่า วิธีการ DPPH assay อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการทดสอบทั้ง ๒ วิธีนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดตำรับยาเบญจกูล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีและผลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน และมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอล

ผลการศึกษาความคงตัวของสารสกัดตำรับเบญจกูล หลังจากเก็บสารสกัดเบญจกูลไว้ภายใต้สภาวะเร่ง (accelerated conditions) ที่อุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ เป็นระยะเวลา ๑๒๐ วัน แล้วทำการสุ่มตัวอย่าง ณ วันที่ ๐, ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐ และ ๑๒๐ วัน ตามลำดับ และนำสารสกัดดังกล่าวมาทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการ DPPH radical scavenging assay และ ABTS cation radical scavenging assay และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม เพื่อเป็นการประเมินสภาพความคงตัวของสารสกัด พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งสองวิธี จากค่า EC_{50} ของช่วงเวลาการเก็บแต่ละช่วง (ณ วันที่ ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐ และ ๑๒๐) เปรียบเทียบกับวันเริ่มต้น (วันที่ ๐) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งสองวิธี แสดงว่าสารสกัดเบญจกูลมีความคงตัวในฤทธิ์ต้านอนุอิสระมาก ไม่ว่าจะยืนยันด้วยวิธีการใด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก็ยังเท่าเดิม ซึ่งต่างกับการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ วิทยานิพนธ์ของมันทนา สุทธานุรักษ์ ซึ่งศึกษาความคงตัวของยาเม็ดกับเซลล์มะเร็งเต้านมพบว่ายาเม็ดจากสารสกัดไม่คงตัว ในฤทธิ์การต้านมะเร็งเต้านม[๑๗] และอินทัช ศักดิ์ภักดีเจริญ ได้ศึกษาความคงตัวของสารสกัดชั้นเอทานอลของเบญจกูล พบว่า plumbagin ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งไม่คงตัว เมื่อเก็บนาน ๑๒๐ วัน ปริมาณสาร plumbagin จากร้อยละ ๑๐๐ ลดลงเหลือร้อยละ ๒๕.๗๔[๑๔]

ดังนั้นการทดสอบครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของช่วงเวลาการเก็บแต่ละ

ช่วงกับวันเริ่มต้น (วันที่ ๐) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เช่นกัน นั่นหมายถึง สารสกัดเบญจกูลสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลานาน ๒ ปี โดยที่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากผลการวิจัยนี้ควรทำการศึกษาต่อเนื่องในการเก็บสารสกัดในสภาวะเร่งต่อไปอีกเพื่อดูว่า ระยะเวลาใดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงเป็นครึ่งหนึ่ง ก็จะได้อายุการเก็บที่คงไว้ซึ่งสารสำคัญ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคงอยู่ ซึ่งจะบอกอายุที่แท้จริงของสารสกัดตำรับเบญจกูลได้

สารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับเบญจกูลที่แพทย์แผนไทยใช้เป็นยาปรับธาตุ มักจะใช้ในยาบำรุงในสตรี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งสองวิธีมีฤทธิ์ไปในทิศทางเดียวกัน และมีปริมาณสารประกอบฟีนอล มากกว่า ๗๐ มิลลิกรัมของแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด เมื่อศึกษาสภาพความคงตัวภายใต้สภาวะเร่ง พบว่าสารสกัดตำรับเบญจกูลมีสภาพความคงตัวและสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้เป็นระยะเวลา ๒ ปี โดยที่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้น งานวิจัยนี้ใช้สรุปเป็นข้อมูลในการสนับสนุน การใช้เบญจกูลในการปรับธาตุของร่างกายให้เป็นปรกติ ด้วยการลดสารอนุมูลอิสระที่เข้าสู่ร่างกาย ทำให้สารสกัดเบญจกูลเป็นสารสกัดที่สามารถลดการเกิดโรคที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระเข้าสู่ร่างกายได้ นอกจากนี้ ยังสนับสนุนเบญจกูลที่เป็นตัวยาในตำรับบำรุงเลือดได้ และสารสกัดเบญจกูลยังมีความคงตัวในด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น แนวทางการพัฒนาต่อไปควรนำสารสกัดเบญจกูลมาพัฒนาเป็นตัวยาในการรักษาโรคเรื้อรังที่เกิดจากอนุมูลอิสระ เพราะสารสกัดนี้มีความคงตัว ๒ ปี สารสกัดไปพัฒนาเป็นยาเม็ด หรือรูปแบบยาแคปซูล เพื่อใช้ในการทดลองทางคลินิกต่อไป ก็น่าจะมีอายุการใช้งาน ๒ ปี เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามควรทดสอบความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการใช้เซลล์ด้วย เพื่อยืนยันการใช้ในร่างกายอีกทางหนึ่งด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ และศูนย์ความเป็นเลิศการวิจัยแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

๑. อรุณพร อิฐรัตน์ และคณะ. รายงานความก้าวหน้าโครงการการพัฒนาสารสกัดตำรับเบญจกูลเพื่อใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยมะเร็งลำไส้และผู้ป่วยมะเร็งที่เป็นแผลอักเสบเรื้อรัง ปี ๒๕๕๖; ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์.

๒. ปราณี ชวลิตธำรง, เอมมนัส อัตตวิชญ์, พัช รักษามั่น, ปราณี จันทเพ็ญ. พิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณเบญจกูล. วารสารไทยเภสัชสาร ๒๕๒๙;๒๐:๓๙-๕๑.

๓. Ruangnoo S, Itharat A, Sakpakdeejaroen I, Rattarom R, Tappayutpijam P, Pawa KK. In vitro cytotoxic activity of Benjakul herbal preparation and its active compounds against human lung, cervical and liver cancer cells. J Med Assoc Thai 2012;95 Suppl 1:S127-34.

๔. Itharat A, Sakpakdeejaroen I. Determination of cytotoxic compounds of Thai traditional medicine called Benjakul using HPLC. J Med Assoc Thai 2010;93 Suppl 7:S198-203.

๕. ปุณยนุช อมรดลใจ. การศึกษาความปลอดภัยจากยาเม็ดสารสกัดตำรับเบญจกูลในอาสาสมัครปกติ [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; ๒๕๕๔.

๖. อรุณพร อิฐรัตน์ และคณะ. โครงการพัฒนาตำรับเบญจกูลเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพในผู้ป่วยมะเร็ง; ๒๕๕๓.

๗. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:7915-22.

๘. Rakwatin C. Data analysis to study drug stability of accelerated testing and long-testing. Center of stability testing, Office of drug analysis, Department of medical sciences. 1995.

๙. Ahmad R, Ali AM, Israf DA, Ismail NH, Shaari K, Lajis NH. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some Hedyotis species. Life Sci 2005;76:1953-64.

๑๐. 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.

๑๑. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999;26:1231-7.

๑๒. Singelton VR, Orthifer 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.

๑๓. มันทนา สุทธานุรักษ์. การศึกษาการตั้งตำรับและการทดสอบความคงตัวของยาเม็ดจากสารสกัดเบญจกูลเพื่อใช้ในผู้ป่วยมะเร็ง [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; ๒๕๕๓.

๑๔. Intouch Sakpakdeejaroen. Study on cytotoxicity and chemical fingerprint of ethanolic extract of Benjakul preparation [Master degree of science Thesis, Faculty of Medicine]. Pathumthani, Thailand. Thammasat University; 2009.

Abstract

Study on stability testing of the ethanolic extract of Benjakul remedy on antioxidant activities and total phenolic content

Ruchirat Kaewkumpai*, Thipaporn Tharavanij, Arunporn Itharat *, *****

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

** Department of Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

*** Excellence Center of Thai Traditional Medicine Research, Faculty of Medicine, Thammasat University

Introduction: Benjakul is a Thai Traditional medicine preparation in The National Essential Drug Lists of Thailand. It is used for improvement of general health and wellbeing. It is composed of five plants: *Piper retrofractum* fruit, *Piper sarmentosum* root, *Piper ribessoides* stem, *Plumbago indica* root, and *Zingiber officinale* rhizome. There is no report about the stability of the antioxidant activities of the ethanolic extract of Benjakul and determination of total phenolic content. Objective was to investigate the stability of the ethanolic extract of Benjakul by determination its antioxidant activity and total phenolic content.

Method: Benjakul preparations were extracted with 95% ethanol. The extracts were stored under accelerated storage conditions at 45°C and 75% relative humidity (RH) for 4 months and keeping at days 0, 15, 30, 60, 90 and 120 respectively. At the end of the storage, the extracts were tested for antioxidant activities by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) cation radical scavenging assay and also determination of total phenolic content using Folin-Ciocalteu's reagent.

Result: The results from DPPH radical scavenging assay showed that the EC_{50} values of the extracts at days 0, 15, 30, 60, 90 and 120 were 17.24 ± 0.48 - 17.70 ± 0.67 µg/ml. The results from the ABTS assay showed the EC_{50} of the samples as 28.71 ± 1.00 - 33.17 ± 0.26 µg/ml. The antioxidant activities from both assays showed no significant difference at different storage times ($p > 0.05$). In addition, the total phenolic content showed as 72.43 - 77.42 mgGAE/g extract and no significant difference at different storage times with day 0 ($p > 0.05$).

Discussion and Conclusion: The ethanolic extract of Benjakul was stable over 2 years, because of no significant difference of its antioxidant activities and total phenolic content at various time comparison with day 0 under the accelerated storage conditions.

Key words: Stability, Benjakul, Antioxidant activities, Total phenolic compound