

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสารสกัดตำรับประสะขมิ้น อ้อยและสมุนไพรรในตำรับ

กุลิสรา อุ่นเจริญ¹ และวัลลภา ลีลานันท์กุล²

บทคัดย่อ

ตำรับประสะขมิ้นอ้อยจากคัมภีร์พระสรรพคุณยา เป็นตำรับยาแผนไทยของชาติ สรรพคุณแก้ลมปัสสาวะ แก้เจ็บทุกข้อทุกระดูก พบรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรรแต่ละชนิดในตำรับ แต่ยังไม่พบข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ของตำรับยา ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS radical scavenging assay และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ จากสารสกัดชั้นเอทานอลและชั้นน้ำ จากการศึกษาพบว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับประสะขมิ้นอ้อย สมุนไพรรทุกชนิดในตำรับ และสารสกัดชั้นน้ำของขิง ดีปลี หอมแดง อบเชยเทศ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิธี ABTS สารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับประสะขมิ้นอ้อย สมุนไพรรทุกชนิดในตำรับ ไม่รวมอบเชยเทศ และสารสกัดชั้นน้ำของขิง ดีปลี อบเชยเทศ หอมแดง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้ พบสารสกัดชั้นเอทานอลของอบเชยเทศ (DPPH assay) สารสกัดชั้นเอทานอลของขิงและสารสกัดชั้นน้ำของอบเชยเทศ (ABTS assay) พบค่า EC_{50} ไม่แตกต่างจากสารมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สารสกัดชั้นเอทานอลของสมุนไพรรตำรับประสะขมิ้นอ้อย สมุนไพรรทุกชนิดในตำรับ ไม่รวมข่า และสารสกัดชั้นน้ำของขิง ดีปลี มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับประสะขมิ้นอ้อย มีค่า IC_{50} เท่ากับ $35.20 \pm 1.35 \mu\text{g/ml}$ สรุปได้ว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับประสะขมิ้นอ้อยและสมุนไพรรในตำรับ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ และควรมีการศึกษาฤทธิ์แก้ปวด ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง เพื่อเป็นหลักฐานเชิงประจักษ์ในการสนับสนุนการใช้ยาตำรับนี้ต่อไป

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ตำรับประสะขมิ้นอ้อย

¹ อาจารย์ สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Corresponding Author; Wanlapa Leelananthakul, Email: wanlapa.l@msu.ac.th

Received; October 4, 2022; Revised December 23, 2022; Accepted December 25, 2022

Antioxidant and anti-inflammatory activities of Prasa Khamin-Oi remedy and its herbal components

Kulisara Ouncharoen¹ and Wanlapa Leelananthakul²

ABSTRACTS

Prasa Khamin-Oi remedy from Khamphi Sapphakhunya is a national Thai traditional medicine formula that reduces musculoskeletal pain. There were studies of the bioactive compounds in herbal components, but the activities of Prasa Khamin-Oi remedy as a medicinal formula are still unclear. So, the research aims to examine antioxidant and anti-inflammatory activity. The results showed that the 95% ethanol extract (DPPH) of Prasa Khamin-Oi remedy and its herbal components found antioxidant activity. Used water extract (DPPH) found antioxidant activity in *Zingiber officinale* Roscoe, *Piper retrofractum* Vahl., *Cinnamomum verum* J.Presl., and *Allium ascalonicum* L. Although, 95% ethanol extract (ABTS) showed antioxidant activity in Prasa Khamin-Oi remedy and herbal components except for *Cinnamomum verum* J.Presl. And water extract (ABTS) found antioxidant activity in *Zingiber officinale* Roscoe, *Piper retrofractum* Vahl., *Cinnamomum verum* J.Presl., and *Allium ascalonicum* L. However, 95% ethanol extract of *Cinnamomum verum* J.Presl. (DPPH), 95% ethanol extract of *Zingiber officinale* Roscoe (ABTS), and water extract of *Cinnamomum verum* J.Presl. (ABTS) found the EC₅₀ value not significantly different from the positive control ($p < 0.05$). The inhibition of nitric oxide by 95% ethanol extract of Prasa Khamin-Oi remedy found anti-inflammatory activity with IC₅₀ value of 35.20 ± 1.35 µg/ml, and also found in herbal components except for *Alpinia galanga* (L.) willd. While using water extract, *Zingiber officinale* Roscoe, and *Piper retrofractum* Vahl. have anti-inflammatory activity. The 95% ethanol extract of Prasa Khamin-Oi remedy and its herbal components have antioxidant and anti-inflammatory activities. Analgesic activity of this remedy should be conducted to further clarify and support the scientific evidence of this remedy.

Key words: Antioxidant Activity, Anti-Inflammatory Activity, Prasa Khamin-Oi Remedy

¹ Lecturer, Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Mahasarakham University

² Assistant Professor, Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Mahasarakham University

บทนำ (Introduction)

จากรายงานสำนักงานสถิติแห่งชาติ สาเหตุการเจ็บป่วยของประชากรไทย พ.ศ. 2564 พบว่าอาการปวดหลังหรืออาการปวดกล้ามเนื้อ เป็นสาเหตุอันดับที่ 2 ของผู้ที่มีอาการป่วยหรือรู้สึกไม่สบาย คิดเป็นร้อยละ 17.5 ของประชากรไทย¹ ในปัจจุบันการรับประทานยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) เป็นแนวทางการรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง² อย่างไรก็ตาม การใช้ยาในกลุ่ม NSAIDs ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานอาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ จากปัญหาดังกล่าวการเพิ่มทางเลือกการรักษาทดแทนการใช้ยาในกลุ่ม NSAIDs จึงมีความสำคัญในการดูแลสุขภาพของประชากรไทย

อาการปวดกล้ามเนื้อมักสัมพันธ์กับการตึงตัวของกล้ามเนื้อ การใช้งานกล้ามเนื้อมากกว่าปกติ หรือการบาดเจ็บของกล้ามเนื้อ³ สภาวะดังกล่าวเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญคือการขยายหลอดเลือด เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนเข้าสู่เนื้อเยื่อเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม และหลังการอักเสบกระบวนการอักเสบ⁴ โดยสารสื่อกลางที่สำคัญของกระบวนการอักเสบ ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; NO) อีกทั้งขณะเกิดการอักเสบพบอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีการอักเสบอย่างต่อเนื่องและเรื้อรัง⁵ ด้วยเหตุนี้การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและ

การต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์จึงเป็นตัวเลือกที่ดีในการศึกษาประสิทธิภาพของยารักษาอาการปวดกล้ามเนื้อ

จากรายงานสถานการณ์การใช้บริการการแพทย์แผนไทย พบว่าอาการปวดหลังและปวดกล้ามเนื้อเป็นกลุ่มอาการที่พบมากเป็นอันดับสอง แต่มีการใช้ยาสมุนไพรเป็นอันดับหนึ่ง คิดเป็นร้อยละ 31.1 ของประชากรที่ใช้ยาสมุนไพรในปี พ.ศ. 2556 แต่ทั้งนี้การรักษาด้วยยาสมุนไพรในภาพรวมมีแนวโน้มลดลง ด้วยปัจจัยหลายประการ เช่น การขาดการศึกษาวิจัยทางคลินิก ขาดข้อมูลความปลอดภัย เป็นต้น⁶ เช่นเดียวกับตำรับยาประสะขมิ้นอ้อยจากพระคัมภีร์สรรพคุณ ซึ่งได้ถูกประกาศกำหนดเป็นตำราการแพทย์แผนไทยของชาติและตำรับยาแผนไทยของชาติ (ฉบับที่ 13) พ.ศ. 2560⁷ สรรพคุณแก้ลมปัสสาวะ แก้เจ็บทุกข้อทุกกระดูก มีวิธีการใช้ยาคืออบเป็น ผงละลายน้ำ ประกอบด้วยสมุนไพรทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ ขมิ้นอ้อย ขิง พริกไทย ดีปลี หอมแดง กระเทียม อบเชยเทศ ว่านน้ำ และข่า⁸ โดยมีน้ำหนักของสมุนไพรในตำรับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ทั้งนี้สมุนไพรทั้ง 9 ชนิด มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ⁹⁻¹⁹ อีกทั้งขมิ้นอ้อยซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีน้ำหนักมากที่สุดในตำรับ มีรายงานการศึกษาฤทธิ์บรรเทาอาการปวด²⁰ แต่ตำรับประสะขมิ้นอ้อยยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบมาก่อน จากข้อมูลข้างต้นจึงทำให้

ผู้วิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ
ด้านการอักเสบของตำรับประสะขมิ้นอ้อย
และสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับ
เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาใน

การสนับสนุนการใช้ยาตำรับนี้ให้แพร่หลาย
มากขึ้น รวมไปถึงการพัฒนาตำรับยานี้เพื่อใช้
ในการบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อทั้งใน
รูปแบบยารับประทานและยาใช้ภายนอก

ตารางที่ 1 แสดงสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับประสะขมิ้นอ้อย

สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ส่วนที่ใช้	น้ำหนัก ⁷ (ร้อยละ)
ขมิ้นอ้อย	<i>Curcuma zedoaria</i> (Christm.) Roscoe	Zingiberaceae	เหง้า	50
ขิง	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae	เหง้า	6.25
พริกไทย	<i>Piper nigrum</i> L.	Piperaceae	ผล	6.25
ดีปลี	<i>Piper retrofractum</i> Vahl.	Piperaceae	ดอก	6.25
หอมแดง	<i>Allium ascalonicum</i> L.	Alliaceae	หัว	6.25
กระเทียม	<i>Allium sativum</i> L.	Alliaceae	หัว	6.25
อบเชยเทศ	<i>Cinnamomum verum</i> J.Presl.	Lauraceae	เปลือก	6.25
ว่านน้ำ	<i>Acorus calamus</i> L.	Araceae	เหง้า	6.25
ข่า	<i>Alpinia galanga</i> (L.) willd.	Zingiberaceae	เหง้า	6.25

วัตถุประสงค์ (Objective)

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay
และวิธี ABTS radical scavenging assay
ของสารสกัดตำรับประสะขมิ้นอ้อยและ
สมุนไพรในตำรับ
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ
ด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนโตรริกออกไซด์ของ
สารสกัดตำรับประสะขมิ้นอ้อยและสมุนไพร
ในตำรับ

วิธีดำเนินการวิจัย (Methodology)

1. การเตรียมสมุนไพรตำรับ ประสะขมิ้นอ้อย

นำขมิ้นอ้อย ขิง หอมแดง กระเทียม
ข่า จากจังหวัดร้อยเอ็ด อบเชยเทศ พริกไทย
ดีปลี จากจังหวัดจันทบุรี และว่านน้ำ จาก
จังหวัดเชียงใหม่ ตรวจสอบและระบุชื่อ
วิทยาศาสตร์ของเครื่องยา โดยนักพฤกษศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จากนั้นนำสมุนไพร

ทั้งหมดมาล้างทำความสะอาด อบในตู้อบให้แห้ง โดยใช้ความร้อน 50 องศาเซลเซียส และบดด้วยเครื่องบดเป็นผงหยาบ เตรียมสารสกัดเอทานอลโดยนำสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดผสมกันเป็นตำรับ โดยมีขิง พริกไทย ดีปลี หอมแดง กระเทียม อบเชยเทศ ว่านน้ำ และข่า น้ำหนักอย่างละ 20 กรัม และขมิ้นอ้อย น้ำหนัก 160 กรัม รวมน้ำหนักของตำรับยา 320 กรัม และสมุนไพรเดี่ยวน้ำหนัก 200 กรัม นำไปสกัดด้วยวิธี maceration ระยะเวลา 3 วัน และสกัดซ้ำอีก 2 รอบ ด้วยเอทานอล 95% ปริมาตร 600 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และการเตรียมสารสกัดน้ำ ด้วยวิธี decoction โดยชั่งน้ำหนักสมุนไพรเช่นเดียวกับสารสกัดเอทานอล เติมน้ำลงไป 3 เท่าของปริมาณสมุนไพร ต้มเดือด 15 นาที กรองแล้วนำกากมาสกัดซ้ำอีก 2 รอบ และนำส่วนที่กรองได้มาทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง vacuum freeze dry ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้จากการสกัดเพื่อคำนวณ % yield ตามสูตร % Yield = $\frac{\text{น้ำหนักสารสกัด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักผงสมุนไพรแห้ง (กรัม)}} \times 100$

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระ

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging

assay²¹ ทำการทดสอบโดยเตรียมสารละลาย DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 100 μM ในสารละลาย absolute ethanol และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด หยดสารสกัดลงใน 96 well plate หลุมละ 100 μl และเติมสารละลาย DPPH อีก 100 μl ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm. โดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า radical scavenging activity โดยคิดเป็น Half maximal effective concentration (EC_{50}) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ถ้าค่า EC_{50} มีค่าต่ำกว่า 100 $\mu\text{g/ml}$ แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คำนวณ % inhibition จากสมการ % inhibition = $\frac{(\text{Abs control} - \text{Abs sample})}{\text{Abs control}} \times 100$ จากนั้นคำนวณหาค่า EC_{50}

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay²² เตรียมสารละลาย ABTS (2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) โดยผสม 7 mM ABTS กับ 2.45 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Dipotassium peroxodisulphate) ให้เข้ากัน แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน ABTS :

น้ำ เท่ากับ 1:4.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.68-0.72 ที่ความยาวคลื่น 734 nm และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 µg/ml ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด หยดสารสกัดลงใน 96 well plate จำนวน 20 µl และเติมสารละลาย ABTS จำนวน 180 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า radical scavenging activity โดยคิดเป็น Half maximal effective concentration (EC₅₀) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ถ้าค่า EC₅₀ มีค่าต่ำกว่า 100 µg/ml แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คำนวณ % inhibition จากสมการ % inhibition = [(Abs control - Abs sample)/ Abs control] x 100 จากนั้นคำนวณหาค่า EC₅₀

3. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยการยับยั้งไนตริกออกไซด์²³

เติมเซลล์ RAW 264.7 ใน RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/ml) และ streptomycin (100 µg/ml) ลงใน 96-well microplates ด้วยความหนาแน่น 1×10^5

cells/well บ่มเซลล์ใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายเก่าออก เติม LPS (lipopolysaccharide) ที่มีความเข้มข้น 2 ng/ml ลงไปหลุมละ 100 µl เฉพาะหลุม control และ sample ส่วน blank จะใส่ RPMI เติมสารสกัดสมุนไพร (sample solution) จำนวน 100 µl ในหลุมของ sample และ blank of sample ส่วนหลุม control และ blank of control ให้เติม RPMI แล้วนำไปบ่มเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด supernatant แต่ละหลุมมา 100 µl ใส่ใน 96-well microplates เติม Griess reagent หลุมละ 100 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ส่วน supernatant ที่เหลือใน plate แรก เติม MTT หลุมละ 10 µl แล้วนำไปบ่มเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูด supernatant ออกทุกหลุม เติม isopropanol ใน 0.04 M HCl ปริมาตร 100 µl เขย่าแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm เพื่อดูความเป็นพิษของเซลล์ ถ้าเซลล์รอดมากกว่า 70% ในความเข้มข้นนั้นจึงจะวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านการอักเสบ แล้วคำนวณ % inhibition จากสมการ % inhibition = [(Abs control - Abs sample)/ Abs control] x 100 จากนั้นคำนวณหาค่า IC₅₀

การศึกษาทุกการทดลองได้ทดสอบแบบเป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และสถิติ one-way ANOVA เพื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป GraphPad Prism เวอร์ชัน 5.0

ผลการวิจัย (Result)

1. การสกัดสมุนไพรตำรับประสะขมิ้นอ้อย

จากการสกัดสมุนไพรตำรับประสะขมิ้นอ้อย พบว่า การสกัดสารสกัดด้วยวิธี maceration ให้ค่า % yield สูงกว่าการสกัดด้วยวิธี decoction มีค่า % yield เท่ากับ 2.94 และ 2.62 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay สารสกัดชั้นเอทานอลของสมุนไพรตำรับประสะขมิ้นอ้อย และสมุนไพรทุกชนิดในตำรับ และสารสกัดชั้นน้ำของขิง ดีปลี อบเชยเทศ หอมแดง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยพบฤทธิ์สูงสุด 5 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดชั้นน้ำของอบเชยเทศ สารสกัดชั้นเอทานอลของพริกไทย สารสกัดชั้นเอทานอลของขิง สารสกัดชั้นน้ำของขิง และสารสกัดชั้นเอทานอลของดีปลี ทั้งนี้ สารสกัดชั้นเอทานอลของอบเชยเทศมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน trolox (ตารางที่ 2)

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay สารสกัดชั้นเอทานอลของสมุนไพรตำรับประสะขมิ้นอ้อย สมุนไพรทุกชนิดในตำรับไม่รวมอบเชยเทศ และสารสกัดชั้นน้ำของขิง ดีปลี อบเชยเทศ หอมแดง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยพบฤทธิ์สูงสุด 5 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดชั้นเอทานอลของขิง สารสกัดชั้นน้ำของอบเชยเทศ สารสกัดชั้นน้ำของขิง สารสกัดชั้นเอทานอลของพริกไทย และสารสกัดชั้นเอทานอลของหอมแดง ทั้งนี้ สารสกัดชั้นเอทานอลของขิงและสารสกัดชั้นน้ำของอบเชยเทศ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน trolox (ตารางที่ 2)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) ด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์

สารสกัดชั้นเอทานอลของสมุนไพรตำรับประสะขมิ้นอ้อย สมุนไพรทุกชนิดในตำรับ ไม่รวมข่า และสารสกัดชั้นน้ำของขิง ดีปลี มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยพบฤทธิ์สูงสุด 5 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดชั้นเอทานอลของขิง ตำรับประสะขมิ้นอ้อย ว่านน้ำ พริกไทย และหอมแดง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดง % yield ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS radical scavenging assay และฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยการยับยั้งไนตริกออกไซด์ ของสารสกัดตำรับประสะขมิ้นอ้อยและสมุนไพรในตำรับ (n=3)

สมุนไพร	สารสกัด	% yield	EC ₅₀ ของ DPPH assay (µg/ml)	EC ₅₀ ของ ABTS assay (µg/ml)	IC ₅₀ ของ anti-inflammatory activity (µg/ml)
ประสะขมิ้นอ้อย	95% เอทานอล	2.94	69.05 ± 3.85 [*]	88.48 ± 1.94 [*]	35.20 ± 1.35
	น้ำ	2.62	มากกว่า 100	มากกว่า 100	มากกว่า 100
ขมิ้นอ้อย	95% เอทานอล	0.95	84.14 ± 2.56 [*]	60.25 ± 1.92 [*]	70.45 ± 1.42
	น้ำ	3.58	มากกว่า 100	มากกว่า 100	มากกว่า 100
ขิง	95% เอทานอล	1.55	28.94 ± 1.01 [*]	14.98 ± 2.72	14.21 ± 0.23
	น้ำ	1.13	40.22 ± 1.03 [*]	25.48 ± 3.16 [*]	78.32 ± 1.44
พริกไทย	95% เอทานอล	1.87	26.28 ± 1.65 [*]	33.60 ± 1.11 [*]	66.48 ± 3.73
	น้ำ	1.58	มากกว่า 100	มากกว่า 100	มากกว่า 100
ดีปลี	95% เอทานอล	1.52	58.41 ± 2.91 [*]	63.63 ± 3.28 [*]	90.24 ± 2.63
	น้ำ	1.92	78.52 ± 3.11 [*]	98.78 ± 3.15 [*]	85.31 ± 4.22
หอมแดง	95% เอทานอล	0.85	92.38 ± 1.25 [*]	36.42 ± 2.15 [*]	69.25 ± 2.82
	น้ำ	1.07	59.85 ± 3.27 [*]	66.45 ± 1.89 [*]	มากกว่า 100
กระเทียม	95% เอทานอล	1.43	98.28 ± 1.78 [*]	73.41 ± 2.36 [*]	86.35 ± 3.62
	น้ำ	1.35	มากกว่า 100	มากกว่า 100	มากกว่า 100
อบเชยเทศ	95% เอทานอล	2.07	88.98 ± 2.11 [*]	มากกว่า 100	74.26 ± 1.94
	น้ำ	1.10	10.21 ± 1.02	16.64 ± 1.75	มากกว่า 100
ว่านน้ำ	95% เอทานอล	1.02	75.43 ± 4.27 [*]	80.23 ± 1.25 [*]	39.24 ± 1.23
	น้ำ	1.37	มากกว่า 100	มากกว่า 100	มากกว่า 100
ข่า	95% เอทานอล	1.00	69.53 ± 3.83 [*]	79.92 ± 4.06 [*]	มากกว่า 100
	น้ำ	1.33	มากกว่า 100	มากกว่า 100	มากกว่า 100
Trolox	-	-	4.96 ± 0.78	7.37 ± 0.85	-

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

(*) แสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (trolox)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย (Discussion and Conclusion)

ตำรับประสมขมิ้นอ้อยเป็นตำรับยาแผนไทยของชาติ⁶ สรรพคุณแก้ลมบัสสคาค แก่เจ็บทุกข้อทุกระดูก การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการทดลองนี้เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการขจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS radical scavenging assay ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทดสอบได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว เนื่องจาก DPPH และ ABTS เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร²⁴ ทั้งนี้การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี DPPH และ ABTS ให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน เช่น สารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับประสมขมิ้นอ้อย ($EC_{50} = 69.05 \pm 3.85 \mu\text{g/ml}$ และ $88.48 \pm 1.94 \mu\text{g/ml}$ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ตามลำดับ) ซึ่งยังไม่เคยมีผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยานี้ สารสกัดชั้นน้ำของอบเชยเทศ ($EC_{50} = 10.21 \pm 1.02 \mu\text{g/ml}$ และ $16.64 \pm 1.75 \mu\text{g/ml}$ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ตามลำดับ) สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของจุฑามาศ สุขเขม¹⁷ สารสกัดชั้นน้ำของขิง ($EC_{50} = 40.22 \pm 1.03 \mu\text{g/ml}$ และ $25.48 \pm 3.16 \mu\text{g/ml}$ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ตามลำดับ) สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของ Yuxin Li และคณะ¹⁰ ที่พบว่าสารสกัดของขิงแห้งสามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระได้ 90.12% และ 88.44% ในวิธี DPPH และ ABTS assay

ตามลำดับ สารสกัดชั้นเอทานอลของพริกไทย ($EC_{50} = 26.28 \pm 1.65 \mu\text{g/ml}$ และ $33.60 \pm 1.11 \mu\text{g/ml}$ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ตามลำดับ) สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของ Gayatri Nahak และ R.K. Sahu¹² และสารสกัดชั้นเอทานอลของขมิ้นอ้อย ($EC_{50} = 84.14 \pm 2.56 \mu\text{g/ml}$ และ $60.25 \pm 1.92 \mu\text{g/ml}$ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ตามลำดับ) สอดคล้องกับรายงานวิจัยของชุตติมา แก้วพิบูลย์ และณวงศ์ บุญนาค พบว่าสารสกัดเอทานอลของขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($EC_{50} = 150.00$ และ $110.00 \mu\text{g/ml}$ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ตามลำดับ)⁹ จากผลการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าววิเคราะห์ได้ว่าสมุนไพรในตำรับส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ได้แก่ ขิง ข่า และขมิ้นอ้อย ซึ่งมีสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์²⁵ เป็นสารประกอบฟีนอลิก นอกเหนือจากนี้พริกไทยและดีปลี เป็นพืชในวงศ์ Piperaceae มีสารออกฤทธิ์สำคัญคือพิเพอริน สารกลุ่มแอลคาลอยด์ กลุ่มกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์²⁶ ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกเช่นกัน ทำให้สามารถต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ²⁶⁻²⁷

เมื่อทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ พบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับประสมขมิ้นอ้อย สมุนไพรทุกตัวในตำรับ ไม่รวม ข่า มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยสารสกัดชั้นเอทานอลของขิงมีฤทธิ์ด้านการอักเสบดีที่สุด

เมื่อเทียบกับสมุนไพรชนิดอื่น สอดคล้องกับ รายงานวิจัยของ Sudipta Tripathi และคณะ¹¹ พบว่า สารสกัดเอทานอลของขิงด้วยวิธีการ หมัก สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) และสารบริสุทธิ์ 6-gingerol ซึ่งเป็น องค์ประกอบทางเคมีหลักในขิงมีฤทธิ์ยับยั้ง การสร้างไนตริกออกไซด์โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.93 ± 1.29 และ 44.57 ± 1.32 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สารสกัดชั้นเอทานอลของขมิ้นอ้อย ซึ่งมี ปริมาณคิดเป็นร้อยละ 50 ของตำรับ มีฤทธิ์ ด้านการอักเสบ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 70.45 ± 1.42 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัย ของ Sang Kook Lee และคณะ พบว่าสาร กลุ่ม sesquiterpenoid ที่สกัดจากขมิ้นอ้อย สามารถยับยั้ง COX-2 และ iNOS²⁸ และ รายงานของ D.de Fátima Navarro ที่ทดสอบ สาร curcumenol ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นอ้อย พบว่าออกฤทธิ์ลดอาการปวดในหนูถีบจักร ในหลายการทดสอบ ได้แก่ Writhing Test, Formalin test และ Capsaicin test²⁰ และ พบว่า สารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับยา ประสะขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 35.20 ± 1.35 $\mu\text{g/ml}$ จากผล การต้านการอักเสบตำรับประสะขมิ้นอ้อย และสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับ สามารถ วิเคราะห์ความเป็นไปได้ว่าสารสำคัญของ สมุนไพรทั้ง 9 ชนิด ในยาตำรับนี้ ส่งผลแบบ synergistic anti-inflammatory effect²⁹ ทำให้ตำรับยาประสะขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ยับยั้งการ หลั่งไนตริกออกไซด์

นอกเหนือจากนี้ผลการศึกษา สมุนไพรที่ไม่มีฤทธิ์ทั้งการต้านอนุมูลอิสระ และด้านการอักเสบ เช่น ข่า พบว่า สารสกัด ชั้นน้ำไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้นอาจเกิด จากช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษต่ำเกินไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nopparat Mahae and Siree Chaiseri¹⁹ ที่ศึกษาฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระของข่า พบว่าสารสกัดชั้นน้ำ มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ด้วยวิธี DPPH โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับ ปริมาณของสารสกัด ดังนั้นหากเพิ่มความ เข้มข้นของสารสกัดอาจทำให้มีความสามารถ ต้านอนุมูลอิสระได้ และอีกหนึ่งปัจจัยที่มี ผลต่อฤทธิ์ชีวภาพของสมุนไพรคือประเภท ของสารละลายที่นำมาสกัด เช่น พริกไทย จากการทดสอบพบว่าสารสกัดชั้นน้ำของ พริกไทยไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้ง 2 วิธี และไม่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ สอดคล้องกับ รายงานของ Gayatri Nahak และ R.K. Sahu¹² ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดชั้นเอทานอลเทียบกับสารสกัด ชั้นน้ำของพริกไทย พบว่ามีเฉพาะสารสกัด ชั้นเอทานอลเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และรายงานของ Farhana Tasleem และ คณะ¹³ พบว่าเฉพาะพริกไทยที่สกัดด้วย เอทานอลและเฮกเซน มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ในระดับสัตว์ทดลอง ดังนั้นหากใช้ตัวทำ ละลายที่เหมาะสมจะทำให้มีความสามารถ ด้านการอักเสบได้

ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับประสะขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ และด้านการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ ซึ่งผลการศึกษาสามารถนำไปขยายผลการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการยับยั้งการอักเสบ เพื่อพัฒนาเป็นตำรับยาสำหรับบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในวิธีการอื่นเพิ่มเติม เพื่อสนับสนุนประสิทธิผลของตำรับยานี้มากยิ่งขึ้น และควรศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยของตำรับประสะขมิ้นอ้อยโดยละเอียดทั้งการศึกษาต่อในระดับพรีคลินิก (ในสัตว์ทดลอง) และการศึกษาทางคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารอ้างอิง (Reference)

1. กองสถิติสังคม สำนักงานสถิติแห่งชาติ. การสำรวจอนามัยและสวัสดิการ พ.ศ. 2564. [อินเทอร์เน็ต]. 2564. [เข้าถึงเมื่อวันที่ 30 กันยายน 2565]; เข้าถึงได้จาก: <http://164.115.27.97/digital/items/show/20246>
2. The Royal College of Emergency Medicine. Management of Pain in Adults. [Internet]. 2021. [Cited 30 September 2022]; Available from: https://rcem.ac.uk/wp-content/uploads/2021/10/RCEM_BPC_Management_of_Pain_in_Adults_300621.pdf
3. สำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. รายงานสถานการณ์โรคและภัยสุขภาพจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม ปี 2557. [อินเทอร์เน็ต]. 2557. [เข้าถึงเมื่อวันที่ 30 กันยายน 2565]; เข้าถึงได้จาก: http://envocc.ddc.moph.go.th/uploads/situation/01_envocc_situation_57.pdf
4. Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. Pain. 1995; 63(3):289-302.
5. Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. J Physiol Pharmacol. 2003;54(4): 469-87.
6. ราชัน จันทรโกษ, มณีนภา สังข์ศักดิ์ดา, ปรียา มิตรานนท์. สถานการณ์การให้บริการการแพทย์แผนไทย ปี 2552, 2554, 2556. วารสารวิจัยระบบสาธารณสุข. 2559; 10(2): 103-116.

7. กระทรวงสาธารณสุข. การประกาศกำหนดตำราการแพทย์แผนไทยของชาติและตำรับยาแผนไทยของชาติ (ฉบับที่ 13) พ.ศ. 2560. [อินเทอร์เน็ต]. 2560. [เข้าถึงเมื่อวันที่ 20 กันยายน 2565]; เข้าถึงได้จาก: https://www.dtm.moph.go.th/images/document/law/National_Texts_2560-13.PDF?fbclid=IwAR0d2kx31jbthle8vE7ssP8PAR0RG1tKiDiOOjsnbGshbDNI-v0a-WHFTHg
8. คณะกรรมการฝ่ายประมวลเอกสารและจดหมายเหตุ ในคณะกรรมการอำนวยการจัดงานเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว. แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ ภูมิปัญญาทางการแพทย์และมรดกทางวรรณกรรมของชาติ. กรุงเทพฯ : สถาบันภาษาไทย กรมวิชาการ กระทรวงศึกษาธิการ; 2542; 385.
9. ชูติมา แก้วพิบูลย์, ณรงค์ บุญนาค. ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดขมิ้นอ้อย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2565; 30(2): 1-13.
10. Li Y, Hong Y, Han Y, Wang Y, Xia L. Chemical characterization and antioxidant activities comparison in fresh, dried, stir-frying and carbonized ginger. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2016; 1011: 223-32.
11. Tripathi S, Bruch D, Kittur DS. Ginger extract inhibits LPS induced macrophage activation and function. BMC Complement Altern Med. 2008; 8(1): 1-7.
12. Nahak G, Sahu RK. Phytochemical evaluation and antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*. J. Appl. Pharm. Sci. 2011; 1(8): 153-7.
13. Tasleem F, Azhar I, Ali SN, Perveen S, Mahmood ZA. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. Asian Pac J Trop Med. 2014; 7(1): S 461-8.
14. Jadid N, Hidayati D, Hartanti SR, Arraniry BA, Rachman RY, Wikanta W. Antioxidant activities of different solvent extracts of *Piper retrofractum* Vahl. using DPPH assay. AIP Conference Proceedings 2017; 1854, 020019.
15. Boonyapranai K, Kraithep S, Mahawantung J, Thaiyanan P, Singdong R, Thunyaham S, Matrakool B, Saichanma S, Sakorn P. Content and Stability of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Matured Shallot Bulbs' Extract (*Allium ascalonicum* L.). RTAMedJ. 2017; 70(1): 3-9.
16. Shang A, Cao SY, Xu XY, Gan RY, Tang GY, Corke H, Mavumengwana V, Li HB. Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.). Foods. 2019; 8(7): 246.

17. จุฑามาส สุขอม, ชนัญผล ประไพ, ศรัญญู อุ่นทวี, สุดาทิพย์ จันทร. **ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดจากเปลือกอบเชย**. Thai Journal of Science and Technology. 2563; 9(5): 659-67.
18. Mehrotra S, Mishra KP, Maurya R, Srimal RC, Yadav VS, Pandey R, et al. Anticellular and immunosuppressive properties of ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome. Int Immunopharmacol. 2003; 3(1): 53-61.
19. Mahae N, Chaiseri S. Antioxidant activities and antioxidative components in extracts of *Alpinia galanga* (L.) Sw. Kasetsart J. (Nat. Sci.). 2009; 43(2): 358-69.
20. Navarro Dde F, de Souza MM, Neto RA, Golin V, Niero R, Yunes RA, et al. Phytochemical analysis and analgesic properties of *Curcuma zedoaria* grown in Brazil. Phytomedicine. 2002; 9(5): 427-32.
21. 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(8):1663-5.
22. Re R, Pellegrini N, Proreggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Rad Biol Med. 1999; 26 (9-10): 1231-7.
23. Kim SJ, Park H, Kim HP. Inhibition of nitric oxide production from lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells by synthetic flavones: structure-activity relationship and action mechanism. Arch Pharm Res. 2004; 27(9): 937-43.
24. มะลิวรรณ อมตธงไชย. **วิธีวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระ โดยรวมอย่างรวดเร็ว**. วารสารวิชาการ มอบ. 2553; 12(2): 49-59.
25. Tomlinson PB. Studies in the systematic anatomy of the Zingiberaceae. Bot. J. Linn. Soc. 1956; 55(361): 547-92.
26. Kato MJ, Furlan M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. Pure Appl. Chem. 2007; 79(4): 529-38.
27. Alafiatayo AA, Syahida A, Mahmood M. Total anti-oxidant capacity, flavonoid, phenolic acid and polyphenol content in ten selected species of Zingiberaceae rhizomes. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2014; 11(3): 7-13.

28. Lee SK, Hong CH, Huh SK, Kim SS, Oh OJ, Min HY, et al. **Suppressive effect of natural sesquiterpenoids on inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) activity in mouse macrophage cells.** J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2002; 21(2): 141-8.
29. Zhang L, Virgous C, Si H. **Synergistic anti-inflammatory effects and mechanisms of combined phytochemicals.** J Nutr Biochem. 2019; 69: 19-30.