

นิพนธ์ต้นฉบับ

ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการสกัดกับฤทธิ์ทางชีวภาพและความคงตัวของผงยาตำรับหัตถ์ศราร

ภูริทัต กนกกั้งสตาล*, ปิยะ ปิ่นศรีศักดิ์**, ศุภินดา มากชูชิต*, อรุณพร อิฐรัตน์ *· ***

บทคัดย่อ

- บทนำ:** ตำรับยาหัตถ์ศรารเป็นยาไทยในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๕๔ ประกอบด้วยสมุนไพรรวม ๒๑ ชนิด ใช้ในการบรรเทาอาการปวดอักเสบของกล้ามเนื้อและกระดูก การผลิตยาทุกตำรับต้องมีการควบคุมมาตรฐานของผงยาในตำรับโดยเฉพาะฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสารสำคัญ ดังนั้น วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์และควบคุมมาตรฐานผงยาตำรับหัตถ์ศราร รวมไปถึงความคงตัวของฤทธิ์ทางชีวภาพ
- วิธีการศึกษา:** เตรียมผงยาหัตถ์ศรารตามสูตรตำรับที่ระบุในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๕๔ นำไปแช่สกัดด้วย ๕๕% เอทานอลในระยะเวลาที่ต่างกันคือ ๑, ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน ตามลำดับ นำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยการตรวจวัดฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 ด้วยการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยวิธี Griess reagent และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay พร้อมหาค่าสารประกอบฟีนอลรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu ระยะเวลาการสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุด นำไปใช้สกัดผงยาหัตถ์ศราร เพื่อศึกษาความคงตัวของชีวภาพเมื่อเก็บสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ โดยเก็บผงยาไว้เป็นเวลา ๐, ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐ และ ๑๒๐ วันตามลำดับ นำมาสกัดและทดสอบฤทธิ์การด้านการอักเสบ
- ผลการศึกษา:** ฤทธิ์ด้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาการสกัดที่ต่างกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > ๐.๐๕$) โดยสารสกัดที่ใช้เวลาการแช่สกัดเป็นเวลา ๓ วัน มีฤทธิ์ด้านการอักเสบดีที่สุด ($IC_{50} = ๑๗.๒๒ \pm ๒.๑๖$ ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นอันดับที่ ๒ ($EC_{50} = ๑๘.๐๐ \pm ๓.๔๗$ ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) และมีค่าสารประกอบฟีนอลรวมเป็น ๓๑.๕๑ ± ๓.๗๐ มิลลิกรัมแกลลิกแอซิด/กรัมสารสกัด และการศึกษาความคงตัวของชีวภาพ พบว่า ฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์เมื่อเปรียบเทียบกับรายคู่กับ Day 0 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > ๐.๐๕$)
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** สารสกัดตำรับหัตถ์ศราร ที่ได้จากการแช่สกัดนาน ๓ วัน เป็นการสกัดที่ใช้เวลาน้อยที่สุดและมีฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ดีที่สุด ระยะเวลา ๓ วัน นำไปใช้สกัดเพื่อการวิเคราะห์และควบคุมมาตรฐานของผงยาตำรับหัตถ์ศราร และผงยาหัตถ์ศรารมีความคงตัวสามารถเก็บไว้ได้นาน ๒ ปี โดยมีฤทธิ์ด้านการอักเสบคงเดิม
- คำสำคัญ:** ตำรับยาหัตถ์ศราร, ฤทธิ์ด้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลรวม, ระยะเวลาการสกัด, การทดสอบความคงตัว

วันที่รับบทความ: ๒๗ สิงหาคม ๒๕๕๖

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๒๕ ตุลาคม ๒๕๕๖

* สาขาวิชาแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** สาขาวิชาสัตวศาสตร์หรือสัตวแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*** ศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัยแพทย์แผนไทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผู้ให้ติดต่อ: รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณพร อิฐรัตน์ ศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัยแพทย์แผนไทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ ๐๒-๕๒๖๕๗๔๖ อีเมล iarunporn@yahoo.com

บทนำ

ในทางการแพทย์แผนไทย พบว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เข้ารับการรักษาเป็นผู้ป่วยที่มาด้วยกลุ่มอาการกล้ามเนื้อและกระดูก นอกจากการรักษาด้วยการหัตถบำบัด และประคบสมุนไพรแล้ว ยังมีการใช้ยาที่เกี่ยวข้องกับระบบกล้ามเนื้อและกระดูกหลายตำรับ หนึ่งในนั้น คือ ยาตำรับ “สหัสธารา” เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคกลุ่มกล้ามเนื้อและกระดูกมาเป็นระยะเวลานาน โดยเป็นยาที่ใช้ในการบรรเทาอาการปวดลดการอักเสบ และเมื่อวันที่ ๒๘ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๕๔ มีประกาศจากคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ ที่อนุมัติให้ ยาสหัสธารา เป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๕๔ โดยส่วนประกอบของตำรับประกอบด้วยสมุนไพรจำนวน ๒๑ ชนิด ได้แก่ พริกไทย รากเจตมูลเพลิงแดง ผลติบลิ หักคลุมเทศ เนื้อลูกสมอไทย รากตองแตก เหง้าว่านน้ำ การบูร ดอกจันทน์ เทียนแดง ลูกจันทน์ เทียนดา ตักแตน มหาหิงคุ์ เทียนสัตตบุษย์ เทียนขาว รากจิงจ้อ เทียนดำ โกฐกักรา โกฐก้านพร้าว โกฐเขมา และโกฐพุงปลา การประกาศให้ ยาสหัสธาราเป็นยาตำรับในบัญชียาหลักแห่งชาตินั้น แสดงว่า ยาตำรับนี้ เป็นยาตำรับที่มีประสิทธิผลและความปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์มากกว่า ๑,๐๐๐ รายขึ้นไป นอกจากนี้ยังมีการวิจัยที่สนับสนุนว่า สารสกัดตำรับยาสหัสธารามีความสามารถในการต้านการอักเสบโดยไปยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ และ ยับยั้ง COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 โดยมีค่า IC_{50} = ๒.๘๑ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ ๑๖.๘๗ ± ๑.๑๖ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ* ซึ่งลักษณะกลไกการออกฤทธิ์ของ ยาสหัสธารานี้มีความคล้ายคลึงกับยา NSAIDs นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสารสกัดสหัสธารา ไม่มีฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA98 และ TA100 ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีสารกระตุ้นด้วยเอนไซม์จากตับหนู แต่กลับพบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของ AF2 และ 2-AA ทั้งใน TA98, TA100 และ 4-NQO ใน TA98 มีค่า IC_{50} = ๓.๙, ๔.๓ และ ๓.๗ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ อีกทั้งยังต้านการกลายพันธุ์ของ 2-AA ทั้งใน TA98 และ TA100 มีค่า IC_{50} = ๒.๐ และ ๒.๓ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร*

การผลิตยาในรูปแบบยา (dosage form) เพื่อนำมาใช้ในคนจำเป็นต้องมีการควบคุมมาตรฐานของยา เพื่อให้เกิดประสิทธิผลที่เท่าเทียมกันทุกครั้งที่ใช้ยา ดังนั้นวัตถุประสงค์การศึกษานี้คือ การหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการสกัดผงยาตำรับสหัสธาราที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) และสารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic compound) ที่ดีที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ เพื่อนำ

มาใช้ในการสกัดผงยาในการศึกษาความคงตัวของยาของผงยาตำรับสหัสธาราและควบคุมมาตรฐานของยาต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมผงยาสหัสธารา

สมุนไพรที่นำมาศึกษาเก็บจากหลายแหล่งทั่วประเทศไทยรวมไปถึงสมุนไพรนำเข้าที่สั่งซื้อจากร้านขายยาสมุนไพรและมีการตรวจสอบเอกลักษณ์สมุนไพรเพื่อใช้ในการอ้างอิงด้วยการทำ Herbarium specimens เก็บไว้ซึ่งสมุนไพรตามสูตรตำรับยาสหัสธาราในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๕๔ ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรจำนวน ๒๑ ชนิด ในสัดส่วนที่ต่างกัน (ตารางที่ ๑) นำวัตถุดิบทั้งหมดบดให้ละเอียดโดยร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ ๘๐

การสกัดผงยาสหัสธารา

นำผงยาสหัสธาราน้ำหนัก ๑๘๐ กรัม แบ่งออกเป็น ๖ ส่วนๆ ละ ๓๐ กรัม นำมาสกัดโดยใช้ ๙๕% เอทานอลแช่สกัดในระยะเวลาต่างๆ กัน คือ ๑, ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน (แทนด้วยรหัส Day 1, Day 3, Day 5, Day 7, Day 9 และ Day 11 ตามลำดับ) นำไปคำนวณหาร้อยละสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักผงยา (% yield)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity test)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะนำสารสกัดในระยะเวลาต่างๆ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้ คือ

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยวิธีการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide^๔

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96-wells plates (เซลล์มีความเข้มข้น ๑ × ๑๐^๕ เซลล์/หลุม) โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ คือ RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย ๑๐% fetal bovine serum (FBS), penicillin (๑๐๐ หน่วย/มิลลิลิตร) และ streptomycin (๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑ ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายเก่าออก เติม LPS (lipopolysaccharide) ๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตรลงไปหลุมละ ๑๐๐ ไมโครลิตร เฉพาะหลุม control และ sample ส่วน blank จะใส่ RPMI จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพร (sample solution) จำนวน ๑๐๐ ไมโครลิตร ในหลุมของ sample และ blank of sample ส่วนหลุม control และ blank of control ให้เติม RPMI แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๔๘ ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด supernatant แต่ละหลุมมา ๑๐๐ ไมโครลิตร ใส่ใน

96-wells plates เติม Griess reagent หลุมละ ๑๐๐ ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ ๕๗๐ นาโนเมตร ส่วน supernatant ที่เหลือใน plate แรก เติม MTT หลุมละ ๑๐ ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มเพาะ ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒ ชั่วโมง ดูด supernatant ออกทุกหลุม เติม isopropanol ใน ๐.๐๔ M HCl ปริมาตร ๑๐๐ ไมโครลิตร เขย่าแล้ว วัดค่าดูดกลืนแสงที่ ๕๗๐ นาโนเมตร เพื่อดูความเป็นพิษของเซลล์ถ้าเซลล์รอดมากกว่าร้อยละ ๗๐ ในความเข้มข้นนั้นจึงจะวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านการอักเสบ การทดสอบใช้อินโดเมทาซิน (indomethacin) เป็นสารมาตรฐาน และ piperine ที่พบมากใน เมล็ดพริกไทยและติบลิเป็นสารที่เป็น marker ในการวิเคราะห์

การคำนวณ % inhibition of NO production มีดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A - B \times 100}{A - C}$$

โดยที่ A – C: NO₂ - concentration (μM)

A: LPS (+), sample (-)

B: LPS (+), sample (+)

C: LPS (-), sample (-)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ วิธี DPPH[•] เป็นวิธีการใช้ปฏิกิริยาเคมี

นำสารสกัดทั้ง ๖ ส่วนมาละลายใน absolute ethanol ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ๑๐๐, ๕๐, ๑๐, ๕ และ ๑ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และนำมาทดสอบด้วย วิธี DPPH assay วัดค่าดูดกลืนแสง (optical density) ที่ ๕๒๐ นาโนเมตร โดยใช้ BHT (butylated hydroxytoluene) เป็นสารมาตรฐาน นำค่าที่ได้มาคำนวณ ค่า radical scavenging activity (EC₅₀) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ถ้าค่า EC₅₀ มีค่าต่ำกว่า ๒๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic compound) ในสารสกัดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic compound) ในสารสกัดจากผงยาตำรับสหัสธารา ด้วย Folin-Ciocalteu's reagent ตามวิธีของ Slinkard and Singleton (1997) โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน การทดลองจะเตรียมสารสกัดตัวอย่างและสารมาตรฐาน gallic acid ๑ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน absolute ethanol

จากนั้นดูดสารตัวอย่าง ๒๐ ไมโครลิตร ลงใน 96-wells plate เติม Folin-Ciocalteu's reagent ๑๐๐ ไมโครลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate: Na₂CO₃) ๘๐ ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๓๐ นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๗๖๕ นาโนเมตร

การทดสอบความคงตัวของชีวภาพ (Stability test)

นำผงยาสหัสธาราน้ำหนัก ๑,๒๐๐ กรัม แบ่งออกเป็น ๖ ส่วนๆ ละ ๒๐๐ กรัม เมื่อเริ่มการทดลองให้เก็บผงยาส่วนที่หนึ่งไว้ในตู้ -๒๐ องศาเซลเซียส เป็น Day 0 จากนั้นนำผงยาส่วนที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ เป็นเวลา ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐ และ ๑๒๐ วัน ตามลำดับ (Day 15, Day 30, Day 60, Day 90 และ Day 120 ตามลำดับ) เมื่อครบกำหนดเวลาของผงยาแต่ละส่วน ให้นำออกมาเก็บไว้ในตู้ -๒๐ องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับผงยา Day 0 เพื่อรอทำการแช่สกัดและระเหยแห้งพร้อมกัน เมื่อนำผงยาส่วนสุดท้ายคือ Day 120 ออกจากอุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ นำผงยาทุกส่วน มาแช่สกัดและสกัดด้วย ๕๕% เอทานอล พร้อมกัน โดยใช้ระยะเวลาการสกัดที่ดีที่สุดจากผลการศึกษา จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลรวม ทำการทดสอบตัวอย่างละ ๓ ครั้ง (n = ๓) และนำผลที่ได้มาคิดหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่สามารถต้านการอักเสบด้วยการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ ๕๐ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร้อยละ ๕๐ และค่าเฉลี่ยสารประกอบฟีนอลรวม และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (IC₅₀ ± SEM, EC₅₀ ± SEM, GAE ± SEM ตามลำดับ) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่อสกัดในระยะเวลาต่างกันโดย one way ANOVA และมีความแตกต่างในระหว่างวันที่สกัดตามนัยสำคัญทางสถิติ (p < ๐.๐๕)

ในการศึกษาความคงตัวของชีวภาพทดสอบตัวอย่างละ ๓ ครั้ง (n = ๓) และนำผลที่ได้มาคิดหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่สามารถต้านการอักเสบด้วยการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ ๕๐ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (IC₅₀ ± SEM) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นรายคู่กับ Day 0 ด้วย paired t- test และมีความแตกต่างในระหว่างวันที่จัดเก็บตามนัยสำคัญทางสถิติ (p < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๑ แสดงชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และน้ำหนักของพืชในตำรับผงยาสหัสธารา ๑,๐๐๐ กรัม ตามบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๕๔ และแหล่งที่เก็บยา

ชื่อสามัญ/ส่วนที่ใช้	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่เก็บ	ตัวอย่างพรรณไม้หมายเลข	น้ำหนัก (กรัม)
พริกไทย (ล่อน)/ผล	<i>Piper nigrum</i> Linn.	จันทบุรี	SKP146161401	๒๔๐
เจตมูลเพลิงแดง/ราก	<i>Plumbago indica</i> Linn.	ลาว	SKP148160901	๒๒๔
ติบลิ/ผล	<i>Piper retrofractum</i> Vahl.	จันทบุรี	SKP146160301	๙๖
หัตถ์คุณเทศ/ราก	<i>Kleinhovia hospita</i> Linn.	กาญจนบุรี	SKP183110801	๔๘
ส้มอไทย/เนื้อผล	<i>Terminalia chebula</i> Retz.	สระแก้ว	SKP049200301	๑๐๔
ตองแตง/ราก	<i>Baliospermum montanum</i> Muell.A.	กาญจนบุรี	SKP121021301	๘๐
ว่านน้ำ/เหง้า	<i>Acorus calamus</i> Linn.	นนทบุรี	SKP015010301	๘๘
การบูร	<i>Cinnamomum camphora</i> Linn.	จีน	SKP096030301	๑๔
ดอกจันทน์/รก	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	จีน	SKP121130601	๑๓
เทียนแดง/เมล็ด	<i>Lepidium sativum</i> Linn.	อินเดีย	SKP057121901	๑๑
ลูกจันทน์/เมล็ด	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	จีน	SKP121130601	๑๒
เทียนตาตั๊กแตน/ผล	<i>Anethum graveolens</i> Linn.	อินเดีย	SKP199010701	๑๐
มหาหิงคุ์/ยางและเรซิน	<i>Ferula assafoetida</i> Linn.	อินเดีย	SKP199060101	๑๐
เทียนลัดดะบุษย์/ผล	<i>Pimpinella anisum</i> Linn.	จีน	SKP199160101	๙
เทียนขาว/ผล	<i>Cuminum cyminum</i> Linn.	อินเดีย	SKP199030301	๘
จิงจ้อ/ราก	<i>Merremia vitifolia</i> (Burm.f.) Hallier f.	กาญจนบุรี	SKP054132201	๘
เทียนดำ/เมล็ด	<i>Nigella sativa</i> Linn.	จีน	SKP160141901	๗
โกฐกักรา/ราก	<i>Anacyclus pyrethrum</i> (L.) DC.	จีน	SKP051011601	๖
โกฐเขมา/เหง้า	<i>Atractylodes lancea</i> (Thunb) DC.	จีน	SKP051011201	๕
โกฐก้านพร้าว/ราก	<i>Picrorhiza kurroa</i> Benth.	อินเดีย	SKP177161101	๔
โกฐพุงปลา/ปูดบนต้น	<i>Terminalia chebula</i> Retz. (gall)	อินเดีย	SKP019200301	๓

ผลการศึกษา

จากการสกัดผงยาสหัสธารา พบว่า สารสกัด มีความชื้นเหนียว และมี % yield ในระยะเวลาการสกัดที่ต่างกัน
สหัสธาราที่ระเหยแห้งแล้วมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้ม ดังตารางที่ ๒

ตารางที่ ๒ แสดงร้อยละสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักผงยาสหัสธารา (% yield) ในระยะเวลาที่ต่างกัน

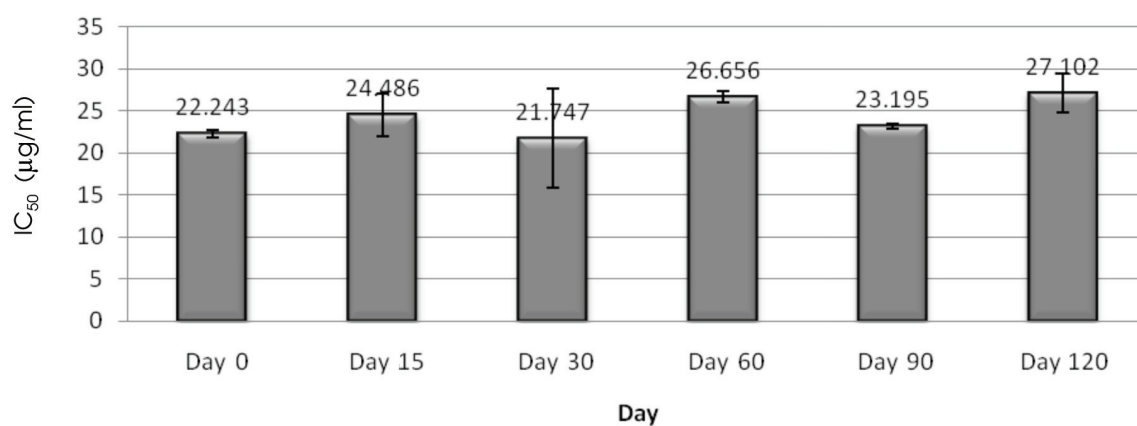
ระยะเวลาแช่สกัด	ตัวทำละลาย	% yield	% เทียบกับ Day 11
Day 1	๙๕% เอทานอล	๓.๕๐	๔๐.๒
Day 3	๙๕% เอทานอล	๔.๒๐	๔๘.๓
Day 5	๙๕% เอทานอล	๕.๕๐	๖๓.๒
Day 7	๙๕% เอทานอล	๖.๗๓	๗๗.๔
Day 9	๙๕% เอทานอล	๕.๙๗	๖๘.๖
Day 11	๙๕% เอทานอล	๘.๗๐	๑๐๐

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตารางที่ ๓ สรุปค่าการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดหัตถ์ชาในเวลาที่ต่างกัน (n = ๓)

ระยะเวลาแช่สกัด	n	NO inhibition		DPPH reduction		Total phenolic compound	
		IC ₅₀ (μg/ml)	± SEM	EC ₅₀ (μg/ml)	± SEM	GAE (mg/g)	± SEM
Day 1	๓	๒๓.๕๕	๒.๕๒	๑๕.๐๒	๐.๔๑	๔๐.๗๘	๖.๕๒
Day 3	๓	๑๗.๒๒	๒.๑๖	๑๘.๐๐	๓.๔๗	๓๑.๕๑	๓.๗๐
Day 5	๓	๑๗.๕๑	๔.๖๒	๑๘.๒๕	๓.๒๐	๔๑.๒๕	๖.๓๕
Day 7	๓	๒๓.๒๕	๓.๕๐	๒๓.๘๗	๒.๑๒	๔๒.๒๐	๖.๗๕
Day 9	๓	๒๐.๑๘	๑.๑๘	๑๘.๘๕	๒.๘๑	๓๘.๘๗	๖.๐๘
Day 11	๓	๒๘.๑๘	๕.๕๑	๒๐.๓๕	๒.๐๖	๓๘.๘๘	๕.๑๑
Indomethacin		๒๐.๓๒	๓.๒๘				
piperine		๑๗.๐๐	๑.๒๓				
BHT				๑๓.๗๓	๑.๗๕		

การทดสอบความคงตัวของชีวภาพของผงยาหัตถ์ชา (Stability test)



รูปที่ ๑ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดผงยาหัตถ์ชาในการทดสอบความคงตัวของชีวภาพ ($p > 0.05$)

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

การวิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาเมื่อทำการสกัดด้วย ๕๕% เอทานอล ในเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า ร้อยละสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนัก พงยาสหัตถาร (%yield) ที่มากที่สุดคือ สารสกัด Day 11 (๘.๗) จะพบว่า มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการสกัด จะมีเพียง Day 9 ที่ค่า %yield ลดลงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อคิด เทียบร้อยละของการสกัด พบว่า วันที่ ๓ สามารถสกัดสารได้ ร้อยละ ๔๘.๓ ซึ่งเกือบครึ่งของการสกัดที่ต้องใช้เวลาแช่นาน ๑๑ วันและเมื่อวันที่ ๕ สกัดได้ ร้อยละ ๖๓.๒ แสดงว่า การใช้วัน ในการแช่สกัดเพียง ๓ วันจะได้สารสกัดประมาณครึ่งหนึ่งของการ แช่สกัดนานถึง ๑๑ วันซึ่งนับว่า การแช่สกัดนาน ๑๑ วัน จะ เสียเวลาถ้าจะต้องแช่สกัดเพื่อทำการวิเคราะห์ ซึ่งสอดคล้องกับ หลักการสกัดสมุนไพรที่อาศัยหลักการแพร่ (diffusion) เพราะ การสกัดนานมากเกินไปไม่ทำให้ได้ปริมาณสารมากขึ้น เพราะ สารที่ถูกสกัดมีความอิ่มตัวจึงไม่สามารถสกัดออกมาได้มากขึ้น

เมื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาการสกัดที่แตกต่างกัน พบว่า ค่าความ สามารถในการต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลา ๑ ถึง ๑๑ วันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้น จึงพิจารณาจากระยะเวลาที่ตีดีที่สุดในการสกัดที่ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะฤทธิ์ด้านการอักเสบดีที่สุด พบว่า สารสกัด ที่ได้จากการแช่สกัด ๓ วันหรือ Day 3 ($IC_{50} = ๑๗.๒๒ \pm ๒.๑๖$ ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) มีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ตีดีที่สุด รองลงมา คือ Day 5 ($IC_{50} = ๑๗.๕๑ \pm ๕.๖๒$ ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) ซึ่งมี ฤทธิ์ดีกว่า indomethacin ($IC_{50} = ๒๐.๓๒ \pm ๓.๒๘$ ไมโครกรัม/ มิลลิกรัม) และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบใกล้เคียงกับสารประกอบหลักที่อยู่ในเมล็ดพริกไทย และผลดีปัสที่มีปริมาณถึง ร้อยละ ๓๓.๖ ของตำรับ คือ piperine ($IC_{50} = ๑๗.๐๐ \pm ๑.๒๓$ ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) และเมื่อใช้เวลาการสกัดนาน ทำให้ ฤทธิ์ด้านการอักเสบลดลงหรือมีค่า IC_{50} สูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็น เพราะสารเปลี่ยนแปลงไปในขณะแช่สกัด หรือมีสารอื่นที่ ออกมามากขึ้นโดยเฉพาะสารที่มีความเป็นขี้ผึ้งมาก ซึ่งสังเกต จากปริมาณสารที่แช่สกัด ๑๑ วันปริมาณมากกว่า แสดงว่า สารที่ออกมาครั้งหลังมีฤทธิ์ด้านการอักเสบน้อยลง ดังนั้น การสกัดเพื่อต้องการสารออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของตำรับ สหัตถารไม่ควรแช่สกัดนานเกิน ๓ วัน ซึ่งอาจเป็นเพราะ สารออกฤทธิ์ด้านการอักเสบเป็นสารที่มีความเป็นขี้ผึ้งน้อย เช่น piperine ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในพริกไทยที่มีปริมาณ มากที่สุด ในตำรับสหัตถาร เป็นสารอัลคาลอยด์มีฤทธิ์ด้าน การอักเสบที่มีผลต่อ mediator $IL-\beta$ ที่มีผลต่อการอักเสบของ เนื้อเยื่อกระดูก และมีผลต่อการยับยั้ง COX-2^๑

ในขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด Day 3 ($EC_{50} = ๑๘.๐๐ \pm ๓.๔๗$ ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) เป็นสารสกัด ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นอันดับที่ ๒ รองจาก Day 1 ($EC_{50} = ๑๕.๐๒ \pm ๐.๔๑$ ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) ซึ่งมีฤทธิ์ ใกล้เคียงกับ BHT ($EC_{50} = ๑๓.๗๓ \pm ๑.๗๕$ ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) ดังนั้น จะเห็นว่าถ้าต้องการฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับ สหัตถารไม่ควรแช่เพียง ๑ วัน สารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะออกมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามการแช่นาน ๓ วัน ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระไม่แตกต่างกับการแช่สกัด ๑ วัน เมื่อศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ด้านการอักเสบและฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ ในระยะเวลาต่างกันไม่พบว่า มีความสัมพันธ์กัน ($r = ๐.๒๘๑, p > 0.05$) สำหรับการหาค่าสารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic compound) พบว่า สารประกอบฟีนอลรวม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อสกัดในระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยสารสกัด Day 7 (๔๒.๒๐ ± ๖.๗๕ มิลลิกรัมแกลลิกแอซิด/กรัมสารสกัด) มีค่า สารประกอบฟีนอลสูงสุด รองลงมาคือ Day 5 (๔๑.๒๕ ± ๖.๓๕ มิลลิกรัมแกลลิกแอซิด/กรัมสารสกัด) ในขณะที่ Day 3 มีค่าสารประกอบฟีนอลเท่ากับ ๓๑.๕๑ ± ๓.๗๐ มิลลิกรัม แกลลิกแอซิด/กรัมสารสกัด จากการหาปริมาณของสาร ประกอบฟีนอลรวม พบว่า ค่าที่ได้อยู่ในช่วง ๓๑.๕๑ ถึง ๔๒.๒๐ มิลลิกรัมแกลลิกแอซิด/กรัมสารสกัด เมื่อหา ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ระหว่าง ฤทธิ์ด้านการอักเสบ กับปริมาณสารฟีนอลรวม ได้ค่า $r = ๐.๔๗๓$ ($p > 0.05$) ดังนั้น การหามาตรฐานของผงยาของฤทธิ์ด้านการอักเสบ ไม่มีความสัมพันธ์กับค่าสารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic compound) การวิเคราะห์ปริมาณสารด้านการอักเสบน่าจะ เป็น piperine ซึ่งพบจากงานวิจัยของนรินทร์ กากะทุม^๑ พบว่า สารสกัดสหัตถารมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ และ piperine เป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้ง ไนตริกออกไซด์

จากการนำค่าการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบหรือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวันที่ ๓ มาเปรียบเทียบกับค่าของ วันที่ ๑ พบว่า ฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งสองฤทธิ์ไม่มีความแตกต่าง กันทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อแช่สกัดเพื่อสกัดสารในระยะ เวลาของการแช่สกัดที่แตกต่างกัน ดังนั้น การสกัดให้เกิด ประโยชน์สูงสุด คือ การสกัดที่ใช้ระยะเวลาที่น้อยที่สุดและ ยังคงมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีอยู่ด้วย สำหรับพงยาสหัตถาร เป็นยาที่มีสรรพคุณในการบรรเทาปวดลดอักเสบ จึงต้องให้ ความสำคัญกับฤทธิ์ด้านการอักเสบมากที่สุด ดังนั้นสารสกัด พงยาสหัตถารด้วยการแช่สกัด ๓ วัน ได้สารสกัดสหัตถารที่มี ฤทธิ์ด้านการอักเสบดีที่สุด อีกทั้งยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็น

อันดับที่ ๒ ดังนั้น การเลือกการสกัดเพียง ๓ วันจึงเหมาะสมสำหรับในการนำไปวิเคราะห์และควบคุมมาตรฐานของผงยาดำรับสหัสธาราต่อไป

การศึกษาความคงตัวของผงยาดำรับสหัสธาราที่ใช้ในการวิจัย พบว่า เมื่อเก็บผงยาดำรับสหัสธาราไว้ในที่อุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ เป็นเวลา ๐, ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐ และ ๑๒๐ วัน ตามลำดับ และนำมาสกัดโดยใช้ระยะเวลาในการแช่สกัด ๓ วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ได้ทำการศึกษาแล้วว่าเป็นระยะเวลาที่ดีที่สุด จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} เป็นรายคู่กับ Day 0 พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) หมายความว่า ยาดำรับสหัสธาราสามารถเก็บอยู่ในอุณหภูมิปกติและยังคงมีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้นาน ๒ ปี ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากสารที่พบมากที่สุดที่เป็นส่วนประกอบของสหัสธาราคือ piperine ที่เป็นส่วนประกอบหลักของพริกไทย และผลดิบลิ ซึ่งค่อนข้างคงตัว และได้เคยศึกษามาแล้วในวิทยานิพนธ์ของ นรินทร์ กากะทุม* ซึ่งพบว่า piperine ในสารสกัดดำรับสหัสธารามีความคงตัวในสภาวะแรง อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำวิเคราะห์ปริมาณ piperine ของผงยาดำรับสหัสธาราที่เก็บในช่วงเวลาต่างๆ ในสภาวะแรง เปรียบเทียบกับ ปริมาณ piperine สารสกัดดำรับสหัสธารา ที่การเก็บในลักษณะในสภาวะแรงเช่นกัน ว่ามีปริมาณของ piperine ที่มีความแตกต่างกันหรือไม่ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้เป็นการยืนยันว่า ผงยาดำรับสหัสธารามีความคงตัวในฤทธิ์ด้านการอักเสบนานกว่า ๒ ปี ดังนั้นการใช้ผงยาดำรับสหัสธาราในรูปแบบ capsule ก็น่าจะมีอายุมากกว่า ๒ ปี ทั้งนี้ เพราะเมื่อเก็บนานเกิน ๔ เดือนยังคงมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ และมีค่าของฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยการยับยั้งไนตริกออกไซด์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

สรุปผลการศึกษา

สารสกัดดำรับสหัสธารา ที่ได้จากการแช่สกัดนาน ๓ วัน เป็นการสกัดที่ใช้เวลาน้อยที่สุดและมีฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ดีที่สุด ในการนำไปใช้สกัดเพื่อการวิเคราะห์และควบคุมมาตรฐานของผงยาดำรับสหัสธารา และผงยาดำรับสหัสธารายังเก็บไว้ได้นาน ๒ ปี โดยมีฤทธิ์ด้านการอักเสบลดลง อย่างไรก็ตามในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลรวม ไม่พบความสัมพันธ์กัน จึงไม่สามารถใช้ทดแทนกันได้โดยตรง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบระยะเวลาการสกัดที่เหมาะสมที่จะทำ

สารออกฤทธิ์ออกมาได้มากที่สุด ทำให้สามารถใช้ประโยชน์ในการสกัดสารสกัดจากสหัสธาราเพื่อเตรียมเป็นยาที่ได้จากสารสกัดต่อไป หรือจะใช้ในการทำมาตรฐานของผงยาในการวิจัยทางคลินิกว่า ผงยาจะต้องมีฤทธิ์ด้านการอักเสบอยู่ในช่วง IC_{50} ไม่เกิน ๓๐ ไมโครกรัม/มิลลิกรัมจึงจะผ่านเกณฑ์มาตรฐาน หรือหากใช้ค่าเคมีของผงยาก็อาจใช้ค่าสารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic compound) ในการกำหนดเป็นเกณฑ์มาตรฐาน โดยควรไม่ต่ำกว่า ๓๐ มิลลิกรัมแกลลิคแอซิด/กรัมสารสกัด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และศูนย์ความเป็นเลิศการวิจัยแพทย์แผนไทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

๑. Kakatum N. Anti-inflammatory activity of Thai traditional remedy extract for muscle pain treatment called Sahastara and its plant ingredients [Master degree of science (Applied Thai Traditional Medicine) Thesis, Faculty of Medicine]. Pathumthani, Thailand. Thammasat University;2011.
๒. Sripanidkulchai A. Mutagenicity and antimutagenicity tests of extracts from Thai traditional medicines. *KKU Research Journal* 2007;12:492-8.
๓. Tewtrakul S, Itharat A. Nitric oxide inhibitory substances from the rhizomes of *Dioscorea membranacea*. *J Ethnopharmacol* 2007;109:412-6.
๔. Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Effects of compounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor-alpha productions in RAW 264.7 macrophage cells. *J Ethnopharmacol* 2008; 120:81-4.
๕. Yamasaki K, Hashimoto A, Kokusenya Y, Miyamoto T, Sato T. Electro chemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1994;42:1663-5.
๖. Bonina F, Puglis C, Tomaina A, Mulinacci N, Romani A, Vicier FF. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of three lyophilized extracts of *Sedum telephium* L. leaves. *J Pharm Pharmacol* 2000;52:1279-85.

๗. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 2004;85:231-7.
๘. Ying X, Chen X, Cheng S, Shen Y, Peng L, Xu HZ. Piperine inhibits IL- β induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. *Int Immunopharmacol* 2013;17:293-9.
๙. 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.

Abstract

Correlation of extraction time with biological activities and stability test of crude Sahastara remedy

Puritat Kanokkangsadal*, Piya Pinsornsak**, Sunita Makchuchit*, Arunporn Itharat *,***

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

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

*** Excellent Center of Research on Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

Corresponding author: Assoc. Prof. Arunporn Itharat, Excellent center of research on Thai Traditional Medicine, Thammasat University
Tel. 02-9269749 E-mail: iaruporn@yahoo.com

Introduction: Sahastara remedy is a Thai traditional medicine used for analgesic and anti-inflammation in the musculoskeletal system. It is also a remedy which was published in Thailand National List of Essential Medicine in 2011. It is composed of twenty one plants. There is no report for quality control by testing pharmacology activity especially, anti-inflammatory activity of this preparation. Thus, the aim of this study was to investigate the best extraction time for being standardization analysis method of Sahastara remedy and also to study in stability test.

Method: Sahastara remedy was extracted with 95% ethanol in 6 different durations that they were Day 1, 3, 5, 7, 9 and 11 respectively. All of extracts were tested for anti-inflammatory activity by examining nitric oxide releasing inhibitory activity and determination of NO content by Griess reagent assay. Free radical scavenging activity was also tested by DPPH radical assay. Total phenolic compound was determined by Folin-Ciocalteu. The day of extraction which showed the highest anti-inflammatory activity was used for studying on stability of Sahastara powder drug. The stability study by an accelerated condition (45 °C and 75% RH) of crude Sahastara remedy were studied by keeping in 6 different durations (Day 0, 15, 30, 60, 90 and 120 respectively). Then, Sahastara remedy was extracted and tested anti-inflammatory activity.

Results: The statistically analysis showed that anti-inflammatory and free radical scavenging activities were not significantly different for extraction in different durations ($p > 0.05$). However, the extract at Day 3 showed the best anti-inflammatory activity ($IC_{50} = 17.22 \pm 2.16 \mu\text{g/ml}$) and the second of antioxidant activity by DPPH radical assay ($EC_{50} = 18.00 \pm 3.47 \mu\text{g/ml}$). The total phenolic content of the Day 3 extract was $31.51 \pm 3.70 \text{ mg GAE/g}$. The stability of pharmacology activity showed that anti-inflammatory activity at every day were not significantly different when compared with Day 0 ($p > 0.05$).

Discussion and conclusion: The best duration for extraction of Sahastara remedy which was appropriate for quality control on anti-inflammatory activity was three days. Sahastara remedy powder was stable in 2 years with anti-inflammatory activity.

Key words: Sahastara remedy, Anti-inflammatory, Antioxidant, Total phenolic content, Extraction time, Stability test