นิพนธ์ต้นฉบับ

ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ทางชีวภาพกับระยะเวลาการสกัด และการศึกษาความคงตัวของผงยาตำรับประสะเปราะใหญ่

ณิชมน มุขสมบัติ*, ไวพจน์ จันทร์วิเมลือง**, ศุณิตา มากชูชิต*, อรุณพร อิฐรัตน์*, ***

บทคัดย่อ

บทนำ: ตำรับยาประสะเปราะใหญ่ มีสรรพคุณเป็นยารักษาอาการหวัด หอบหืด และแก้ไข้อยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๕๔ แต่ไม่มีรายงานการศึกษาวิธีการควบคุมคุณภาพของผงยาตำรับประสะเปราะใหญ่ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ การศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ทางชีวภาพของการสกัดผงยาตำรับประสะเปราะใหญ่กับระยะเวลาการสกัด เพื่อหาระยะเวลาการสกัดที่ทำให้ฤทธิ์ต้านการแพ้ดีที่สุดของยาตำรับเพื่อนำมาใช้ทดสอบความคงตัวของผงยาตำรับประสะเปราะใหญ่

วิธีการศึกษา: นำไปสกัดโดยการแช่สกัดด้วย ๙๕% เอทานอล ในระยะเวลาที่ต่างกัน คือ ๑, ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน จากนั้นนำสารสกัดมาศึกษาฤทธิ์ต้านการแพ้ โดยวิธีการวัดค่าการยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ β-hexosaminidase จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู (RBL-2H3), ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging assay และปริมาณสารฟีนอลรวมโดยวิธีการใช้ Folin-Ciocalteu reagent ระยะเวลาการสกัดที่ทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะฤทธิ์ต้านการแพ้ดีที่สุดนำมาใช้สกัดผงยาเก็บที่เวลา ๐, ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐ และ ๑๒๐ วัน ในสภาวะเร่ง ที่อุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ เพื่อเป็นการทดสอบความคงตัวของฤทธิ์ต้านการแพ้ของผงยาตำรับ

ผลการศึกษา: การแช่สกัดผงยาตำรับประสะเปราะใหญ่ ในระยะเวลาแตกต่างกันมีฤทธิ์ต้านการแพ้ และมีปริมาณสารฟีนอลรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการสกัดเป็นเวลา ๓, ๗ และ ๑๑ วัน มีความแตกต่างทางสถิติจากการสกัด ๑ วัน ($p < 0.05$) ซึ่งพบว่าการสกัดเป็นระยะเวลา ๑ วันมีฤทธิ์ต้านการแพ้ที่ดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ ๑๒.๘๓ ± ๐.๘๔ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีสารฟีนอลรวมเท่ากับ ๒๘.๔๓ ± ๓.๖๗ มิลลิกรัมแกลลิคแอซิด/กรัมสารสกัด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีเป็นอันดับที่ ๕ มีค่า EC_{50} เท่ากับ ๘๕.๘๔ ± ๔.๑๘ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยฤทธิ์ต้านการแพ้มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($p < 0.05$, $r = -0.871$) การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งพบว่า ค่าการยับยั้งเอนไซม์ β-hexosaminidase จากการแช่สกัดเป็นระยะเวลา ๑ วัน มีความคงตัวเนื่องจากค่าการยับยั้งเอนไซม์ β-hexosaminidase ของวันอื่นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เพื่อเปรียบเทียบกับวันที่ ๐ ($p > 0.05$)

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา: ระยะเวลาการแช่สกัดผงยาประสะเปราะใหญ่เพื่อใช้รักษาอาการแพ้ เนื่องจากอาการหวัด หอบหืด ที่เหมาะสมที่สุดคือ การแช่สกัดเป็นระยะเวลา ๑ วัน เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านการแพ้ที่ดีที่สุดและใช้เวลาในการแช่สกัดน้อยที่สุด การศึกษาความคงตัวพบว่า สามารถเก็บผงยาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน ๒ ปี โดยที่ฤทธิ์ต้านการแพ้ไม่เปลี่ยนแปลง

คำสำคัญ: ประสะเปราะใหญ่, ต้านการแพ้อากาศ, ต้านอนุมูลอิสระ, ปริมาณฟีนอลรวม

วันที่รับบทความ: ๑๖ กันยายน ๒๕๕๖ **วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๒๕ ตุลาคม ๒๕๕๖**

* สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
** โครงการจัดตั้งภาควิชาโสต ศอ นาสิก วิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
*** ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์แผนไทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผู้ให้ติดต่อ: รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณพร อิฐรัตน์ ศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัยแพทย์แผนไทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ ๐๒-๙๒๖๙๗๕๖ อีเมล iarunporn@yahoo.com

บทนำ

ยาประสะเปราะใหญ่ เป็นยาตำรับยาไทยที่อยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ มีสรรพคุณใช้เป็นยาแก้พิษไข้ตานชางสำหรับเด็ก แก้หวัด[๑] และเปราะหอม ซึ่งเป็นตัวยาสมุนไพรที่ใช้มากที่สุด (ใช้ครึ่งหนึ่งของยาทั้งหมด) มีสรรพคุณในการแก้หวัด คัดจมูกได้[๒] ซึ่งมีรายงานว่า มีฤทธิ์ต้านการแพ้ โดยการยับยั้งเอนไซม์เบต้าเฮ็กโซซามินิเดส (β-hexosaminidase) มีค่า IC_{50} เท่ากับ ๑๔.๙๑ ± ๐.๘๖ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนยาประสะเปราะใหญ่เมื่อสกัดด้วย ๙๕% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านการแพ้ที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ ๑๖.๕๙ ± ๑.๖๘ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งทั้งสารสกัดชั้นเอทานอลของตำรับประสะเปราะใหญ่และเปราะหอม ซึ่งเป็นตัวยาหลักมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์เบต้าเฮ็กโซซามินิเดส (β-hexosaminidase) ดีกว่ายาต้านการแพ้ชื่อยาคีโตติเฟน (Ketotifen) ที่ใช้กันในปัจจุบันซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ ๔๐.๔๑ ± ๑.๗๑ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร[๓] และตำรับยาประสะเปราะใหญ่ ยังมีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; NO) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ ๑๘.๔๐ ± ๐.๔๓ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร[๔] จะเห็นได้ว่ายาประสะเปราะใหญ่ เป็นยาที่ควรมีการศึกษาวิจัยในการใช้เป็นยาแก้หวัดภูมิแพ้ทางคลินิก แต่ยังไม่มีผู้ใดที่ศึกษาวิธีการควบคุมคุณภาพของผงยาประสะเปราะใหญ่ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระยะเวลาการแช่สกัดผงยาที่ระยะเวลาแตกต่างกันที่ทำให้ฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณของสารประกอบฟีนอลรวมดีที่สุด ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น ที่จะนำยาตำรับยาประสะเปราะใหญ่ไปศึกษาการควบคุมคุณภาพและการศึกษาความคงตัวของผงยา เพื่อใช้ประโยชน์ในการนำไปใช้ในการวิจัยทางคลินิกต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

๑.๑ สมุนไพรที่จะศึกษา

สมุนไพรจำนวน ๒๑ ชนิด ได้แก่ กระวาน กานพลู โกฐเขมา โกฐจุฬาลำพา โกฐเชียง โกฐสอ โกฐหัวบัว เกสรบัวหลวง จันทน์แดง จันทน์เทศ ดอกจันทน์ เทียนขาว เทียนข้าวเปลือก เทียนแดง เทียนดำ เทียนตาตั๊กแตน บุนนาค เปราะหอม พิกุล ลูกจันทน์ และสารภี เก็บหรือซื้อมาและได้บันทึกแหล่งที่มาพร้อมทั้งทำพิพิธภัณฑ์พืชไว้เพื่อเก็บอ้างอิง

ตารางที่ ๑ แหล่งที่มา หมายเลขของตัวอย่างพรรณไม้ และส่วนที่ใช้ของสมุนไพรในตำรับประสะเปราะใหญ่ และปริมาณยาใน ๑,๐๐๐ กรัม

สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ส่วนที่ใช้	น้ำหนัก (กรัม)	ตัวอย่างพรรณไม้หมายเลข	แหล่งที่มา
กระวาน	*Amomum testaceum* Ridl.	ZINGIBERACEAE	ผล	๒๕	SKP206011101	จันทบุรี
กานพลู	*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry	MYRISTICACEAE	ดอก	๒๕	SKP123190101	จันทบุรี
โกฐเขมา	*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.	COMPOSITAE	เหง้า	๒๕	SKP051011201	จีน
โกฐจุฬาลำพา	*Artemisia annua* L.	COMPOSITAE	ทุกส่วน	๒๕	SKP051010101	จีน
โกฐเชียง	*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels	UMBELLIFERAE	ราก	๒๕	SKP199010901	จีน
โกฐสอ	*Angelica dahurica* Benth.	UMBELLIFERAE	ราก	๒๕	SKP199010401	จีน
โกฐหัวบัว	*Ligusticum sinense* Oliv. cv. Chuanxiong	UMBELLIFERAE	เหง้า	๒๕	SKP199121901	จีน
เกสรบัวหลวง	*Nelumbo nucifera* Gaertn.	NELUMBONACEAE	เกสร	๒๕	SKP125141401	นครปฐม
จันทน์แดง	*Dracaena loureiri* Gagnep.	DRACAENACEAE	ลำต้น	๒๕	SKP065041201	จันทบุรี
จันทน์เทศ	*Myristica fragrans* Houtt.	MYRISTICACEAE	ลำต้น	๒๕	SKP121130601	จันทบุรี
ดอกจันทน์	*Myristica fragrans* Houtt.	MYRISTICACEAE	รก	๒๕	SKP121130601	ชุมพร
เทียนขาว	*Cuminum cyminum* L.	UMBELLIFERAE	ผล	๒๕	SKP199030301	อินเดีย
เทียนข้าวเปลือก	*Foeniculum vulgare Mill. var. dulce* (Mill.) Thell.	UMBELLIFERAE	ผล	๒๕	SKP199062201	อินเดีย

ตารางที่ ๑ แหล่งที่มา หมายเลขของตัวอย่างพรรณไม้ และส่วนที่ใช้ของสมุนไพรในตำรับประสะเปราะใหญ่ และปริมาณยาใน ๑,๐๐๐ กรัม (ต่อ)

สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ส่วนที่ใช้	น้ำหนัก (กรัม)	ตัวอย่างพรรณไม้หมายเลข	แหล่งที่มา
เทียนแดง	*Lepidium sativum* L.	CRUCIFERAE	เมล็ด	๒๕	SKP057121901	อินเดีย
เทียนดำ	*Nigella sativa* L.	RANUNCULACEAE	เมล็ด	๒๕	SKP160141901	อินเดีย
เทียนตาตั๊กแตน	*Anethum graveolens* L.	UMBELLIFERAE	ผล	๒๕	SKP199010701	อินเดีย
บุนนาค	*Mesua ferrea* L.	GUTTIFERAE	ดอก	๒๕	SKP08313060	ราชบุรี
เปราะหอม	*Kaempferia galanga* L.	ZINGIBERACEAE	เหง้า	๕๐๐	SKP206110701	กาญจนบุรี
พิกุล	*Mimusops elengi* L.	SAPOTACEAE	ดอก	๒๕	SKP171130501	ราชบุรี
ลูกจันทน์	*Myristica fragrans* Houtt.	MYRISTICACEAE	เมล็ด	๒๕	SKP121130601	ชุมพร
สารภี	*Mammea siamensis* Kosterm.	GUTTIFERAE	ดอก	๒๕	SKP083131901	ราชบุรี

นำสมุนไพรตำรับประสะเปราะใหญ่ทั้ง ๒๑ ชนิด ตามสัดส่วนที่ได้กำหนดไว้ ดังแสดงในตารางที่ ๑ ไปย่อยให้มีขนาดเล็ก แล้วร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ ๘๐ จากนั้นแบ่งผงยาทั้งหมดออกเป็น ๖ ส่วน ส่วนละ ๑๐๐ กรัม สกัดด้วย ๙๕% เอทานอล ที่ระยะเวลาต่างๆ ดังนี้ สกัดระยะเวลานาน ๑, ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จากนั้นคำนวณหาร้อยละสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชแห้ง (% yield)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและการหาปริมาณสารประกอบทางเคมี

ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการหาปริมาณสารฟีนอลรวม ดังนี้

ฤทธิ์ต้านการแพ้

การทดสอบฤทธิ์ต้านการแพ้มีหลักการดังนี้ คือ การใช้สิ่งแปลกปลอมต่อเนื้อเยื่อร่างกาย (antigen) ไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด basophil (Rat basophilic leukemia; RBL-2H3 cells) ทำให้เกิด degranulation การเกิด degranulation จะมีการหลั่งสารฮิสทามีน (histamine) ควบคู่กับการหลั่งเอนไซม์ β-hexosaminidase เสมอ[๕] ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งฮิสทามีน ที่หลั่งจาก mast cell และ basophil จึงใช้ปริมาณ β-hexosaminidase ที่หลั่งออกมาเป็นตัวชี้วัดอาการภูมิแพ้ที่เกิดขึ้น ซึ่งวิธีการวัดปริมาณ β-hexosaminidase ที่หลั่งออกมาโดยใช้เทคนิควัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible spectrophotometry) ถือเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว[๖]

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ β-hexosaminidase[๗] โดยเลี้ยงเซลล์ RBL-2H3 cells ใน 24 well-plate (โดยเซลล์มีความเข้มข้น ๕ x ๑๐^{๕} เซลล์/มิลลิลิตร) อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์คือ minimum essential medium eagle (MEM) ที่ประกอบด้วย ๑๕% Fetal bovine serum (FBS), penicillin (๑๐๐ หน่วย/มิลลิลิตร) และ streptomycin (๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑ ชั่วโมง เติม dinitrophenylated IgE solution (DNP-IgE) ที่อยู่ใน MEM ลงไปหลุมละ ๔๐ ไมโครลิตร เฉพาะหลุม control และหลุม sample ส่วน blank จะใส่ MEM เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ดูดสารละลายเก่าออกแล้วล้างด้วย buffer A solution (ประกอบด้วย 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM $MgCl_2$, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH pH 7.2) ๔๐๐ ไมโครลิตร เติม buffer A solution ๑๖๐ ไมโครลิตร ลงไปทุกหลุม เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที เติมสารสกัดสมุนไพร (sample solution) จำนวน ๒๐ ไมโครลิตร ลงไปในหลุม sample ส่วนหลุม blank และ control เติม buffer A ๒๐ ไมโครลิตรแล้วเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที เติม dinitrophenylated bovine serum albumin solution (DNP-BSA) ๒๐ ไมโครลิตรในหลุม control และ sample ส่วนหลุม blank เติม buffer A แล้วจึงเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒๐ นาที pipette sample solution ๕๐ ไมโครลิตรลงใน 96 well-plate เติม 1 mM p-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide (PNAG)

๕๐ ไมโครลิตรลงใน ๔๘ หลุมด้านบน ส่วนด้านล่างเติม citric acid แล้วเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒ ชั่วโมง เติม Na_2CO_3 buffer ๒๐๐ ไมโครลิตรแล้ววิเคราะห์ *p-nitrophenol* โดยใช้ UV-Vis detector ที่ความยาวคลื่น ๔๐๕ นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ได้ร้อยละ ๕๐ (inhibitory concentration can inhibit 50% enzyme release; IC_{50}) จากค่า dose response curve โดยใช้ prism program

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

DPPH หรือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl เป็นอนุมูลอิสระ สามารถรับ electron hydrogen radical ได้ ซึ่งเมื่อ DPPH อยู่ในรูปสารละลายใน absolute ethanol จะมีสีม่วง และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้มีสีจางลง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (buthylhydroxytoluene; BHT) สามารถวิเคราะห์ปริมาณ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๕๒๐ นาโนเมตร หลังจากปฏิกิริยาดำเนินไปจนถึงภาวะคงที่

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH[๔]

ชั่งสารมาตรฐาน BHT และ สารสกัดสมุนไพร หนัก ๑๐ มิลลิกรัม ละลายด้วย absolute ethanol ๑๐ มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ความเข้มข้น ๑๐๐, ๕๐, ๓๐, ๑๐ และ ๑ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (เตรียม ๒ มิลลิลิตร) นำสารมาตรฐาน BHT และสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆ เติมลงใน 96 well plate หลุมละ ๑๐๐ ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH ที่เตรียมโดยละลาย DPPH ใน absolute ethanol (6×10^{-5} M) (MW DPPH = 394.32) ใน 96 well plates หลุมละ ๑๐๐ ไมโครลิตร ทิ้งไว้ ๓๐ นาทีในที่มืด และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง (microplate reader) ที่ ๕๒๐ นาโนเมตร และหาค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ ๕๐ (effective concentration can inhibit 50% free radical; EC_{50}) จากค่า dose response curve ด้วย prism program

การหาปริมาณสารฟีนอลรวม

การทดสอบหาปริมาณฟีนอลรวม (total phenolic compounds) ด้วย Folin-Ciocalteu's reagent ตามวิธีของ (Miliauskas et al., 2004) โดยใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐานคำนวณปริมาณสารฟีนอลรวมเฉลี่ยในรูปมิลลิกรัม ของ gallic acid equivalents (GAE) ต่อสารสกัดชั้นเอทานอล ๑ กรัม[๔]

วิธีการทดลองหาสารประกอบฟีนอลรวม

ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงตามวิธี Folin-Ciocalteu's method[๑๐] โดยประยุกต์ใช้ใน 96 well plate ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมคำนวณจาก calibration curve ของสารมาตรฐานแกลลิกแอซิด (gallic acid) โดยคิดเป็น มิลลิกรัมของแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g of extract) การคำนวณค่าสารประกอบฟีนอลรวมในวิธีนี้จะคิดจากความสามารถในการทำปฏิกิริยาเคมีของสารตัวอย่างที่สัมพันธ์อย่างเท่ากันกับแกลลิกแอซิด[๑๑] การทดลองโดยการเตรียมสารสกัดตัวอย่างและสารมาตรฐานแกลลิกแอซิด ๑ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน absolute ethanol ดูดสารตัวอย่าง ๒๐ ไมโครลิตรลงใน 96 well plate เติม Folin-Ciocalteu's reagent ๑๐๐ ไมโครลิตร เติมโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate: Na_2CO_3) ๘๐ ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๓๐ นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๗๖๕ นาโนเมตร

การทดสอบความคงตัว

นำผงยา ๑,๒๐๐ กรัม แบ่งออกเป็น ๖ ส่วนๆ ละ ๒๐๐ กรัม เมื่อเริ่มการทดลองให้เก็บผงยาส่วนที่ ๑ เข้าตู้ -๒๐ องศาเซลเซียส คิดเป็นตัวอย่างที่ Day 0 และนำผงยาส่วนที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ เป็นเวลา ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐ และ ๑๒๐ วัน ตามลำดับ ให้เป็น Day 15, Day 30, Day 60, Day 90 และ Day 120 ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดเวลาของผงยาแต่ละวันตามกำหนด ให้นำออกมาเก็บไว้ที่ตู้ -๒๐ องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับผงยา Day 0 เพื่อรอทำการแช่สกัด และสกัดพร้อมกันเมื่อนำผงยาส่วนสุดท้ายคือ Day 120 ออกจากอุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ นำผงยาทุกระยะเวลามาแช่สกัดและสกัดด้วย ๙๕% เอทานอลพร้อมกันโดยใช้ระยะเวลาที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการแพ้ในเวลาที่ต่างกัน จากผลการทดลองข้างต้นสารสกัดที่เก็บในการศึกษาความคงตัวนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ หลังจากนั้นจึงเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของวันที่เก็บในสภาวะเร่งแต่ละระยะเวลากับ Day 0 เป็นรายคู่ ถ้าระยะเวลาต่างๆ มีฤทธิ์ทางชีวภาพไม่แตกต่างกันแสดงว่าผงยามีความคงตัว และถ้า ๔ เดือนผลของการทดสอบฤทธิ์ไม่แตกต่างกับ วันเริ่มต้นหรือ Day 0 แสดงว่าผงยามีความคงตัวมีอายุนาน ๒ ปี โดยฤทธิ์ทางชีวภาพไม่เปลี่ยนแปลง ตามข้อกำหนดของ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข[๑๒]

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

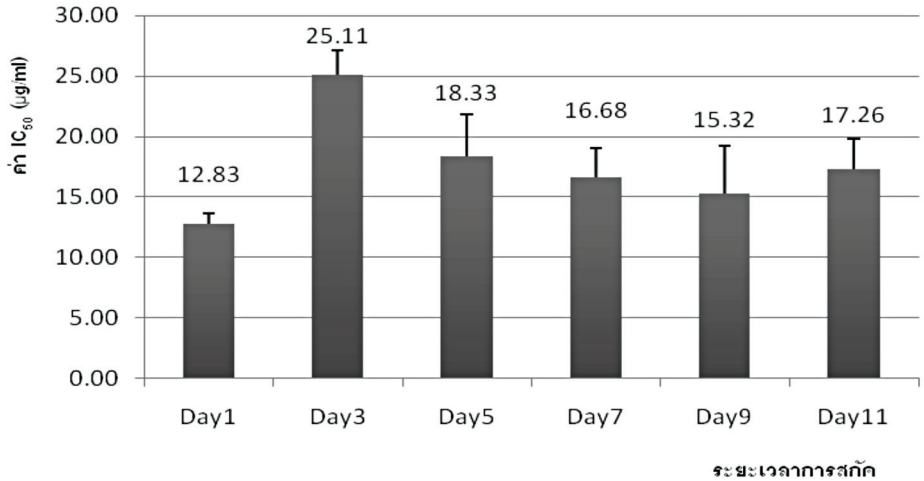
ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลรวมทำการทดสอบตัวอย่างละ ๓ ครั้ง และนำมาผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความคลาดเคลื่อน

มาตรฐานของการวัด (standard error of measurement; SEM) ส่วนความแตกต่างระหว่างฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลในแต่ละวัน และปริมาณสารฟีนอลรวมจากการสกัดเอทานอลในแต่ละวัน ประเมินโดยใช้สถิติ one-way ANOVA ($p < ๐.๐๕$) ส่วนด้านการทดสอบความคงตัว วิเคราะห์โดยใช้สถิติ pair-T test ($p < ๐.๐๕$)

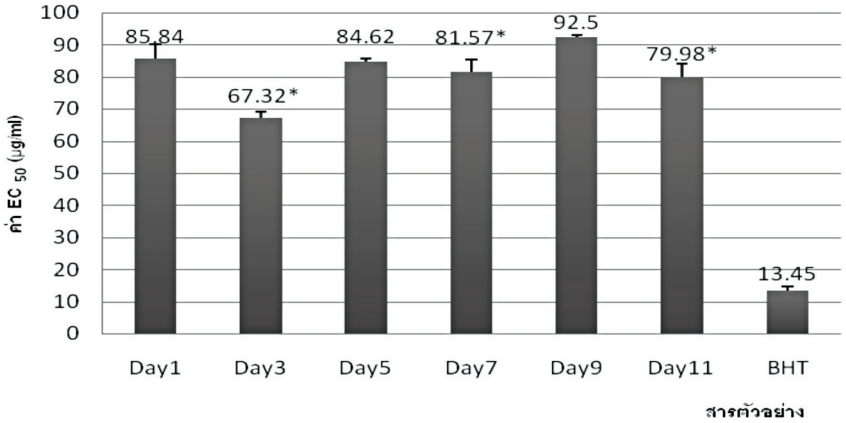
ผลการศึกษา

ตารางที่ ๒ แสดงร้อยละน้ำหนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสมุนไพรแห้ง (% yield) ที่ได้จากการแช่สกัดสารด้วย ๙๕ % เอทานอล ที่ระยะเวลาการสกัดต่างๆ

ระยะเวลาที่ใช้แช่สกัดสาร (วัน)	% yield
๑	๖.๑๕
๓	๕.๗๕
๕	๖.๖๘
๗	๗.๓๓
๙	๖.๒๗
๑๑	๗.๑๕

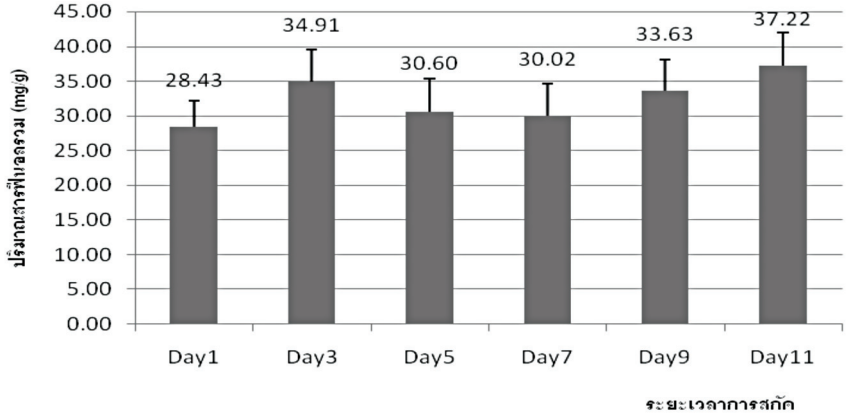


รูปที่ ๑ แสดงฤทธิ์ต้านการแพ้ของตำรับยาประสะเปราะใหญ่ เมื่อสกัดด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน (n = ๓)



*$p < ๐.๐๕$ เป็นค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวันที่ ๑

รูปที่ ๒ แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาประสะเปราะใหญ่ เมื่อสกัดด้วยระยะเวลาต่างกัน (n = ๓)

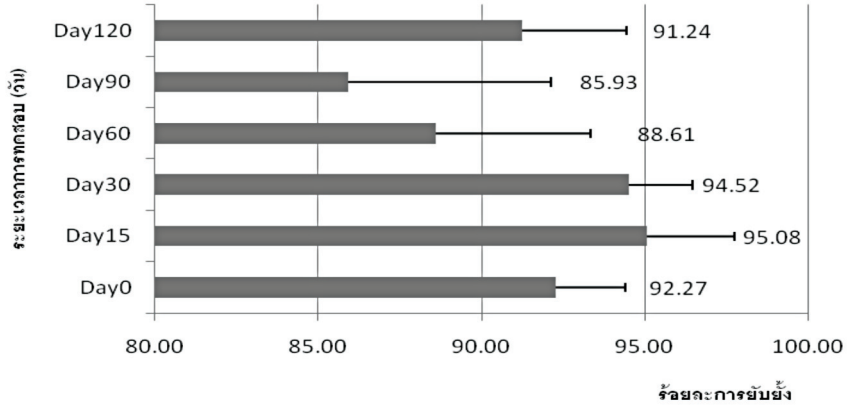


รูปที่ ๓ แสดงปริมาณสารฟีนอลรวมของตำรับยาประสะเปราะใหญ่ เมื่อสกัดด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน (n = ๓)

ตารางที่ ๓ แสดงฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลรวม เมื่อสกัดผงยาประสะเปราะใหญ่ เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน (n = ๓)

ระยะเวลาการสกัด / ฤทธิ์	ฤทธิ์ต้านการแพ้ (n = ๓)		ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (n = ๓)		ปริมาณฟีนอลรวม (n = ๓)	
	IC_{50} (µg/ml)	SEM	EC_{50} (µg/ml)	SEM	(mg gallic acid /g of extract)	SEM
๑ วัน	๑๒.๘๓	๐.๘๔	๘๕.๘๔	๔.๑๘	๒๘.๔๓	๓.๖๗
๓ วัน	๒๕.๑๑	๑.๙๘	๖๗.๓๒*	๑.๙๗	๓๔.๙๑	๔.๖๙
๕ วัน	๑๘.๓๓	๓.๔๗	๘๔.๖๒	๑.๐๕	๓๐.๖๐	๔.๗๐
๗ วัน	๑๖.๖๘	๒.๓๒	๘๑.๕๗*	๓.๙๔	๓๐.๐๒	๔.๕๘
๙ วัน	๑๕.๓๒	๓.๙๐	๙๒.๕๐	๐.๖๗	๓๓.๖๓	๔.๔๐
๑๑ วัน	๑๗.๓๖	๒.๔๕	๗๙.๙๘*	๔.๑๑	๓๗.๒๒	๔.๘๔

*p < ๐.๐๕ เป็นค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวันที่ ๑



รูปที่ ๔ แสดงค่าการยับยั้งเอนไซม์ β-hexosaminidase ที่ความเข้มข้น ๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของตำรับยาประสะเปราะใหญ่ที่สกัดด้วยเอทานอลระยะเวลา ๑ วัน (n = ๓)

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

วิจารณ์ผลการศึกษา

ผงยาตำรับประสะเปราะใหญ่นำมาสกัดด้วย ๙๕% เอทานอล โดยการแช่สกัดเป็นระยะเวลาแตกต่างกัน ได้แก่ ๑, ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน พบว่า การแช่สกัดเป็นระยะเวลา ๗ วัน มีค่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสมุนไพรแห้ง (% yield) ที่มากที่สุด คือร้อยละ ๗.๓๓ และการแช่สกัดด้วยเอทานอลเป็นระยะเวลา ๓ วันจะมีค่าร้อยละน้ำหนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสมุนไพรแห้ง (% yield) ที่น้อยที่สุดคือ ร้อยละ ๕.๗๕ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และเมื่อนำสารสกัดที่ได้จากการแช่สกัด ๙๕% เอทานอล ในระยะเวลาต่างๆ ไปทำการทดสอบฤทธิ์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และหาปริมาณสารฟีนอลรวมพบว่า การแช่สกัดตำรับยาประสะเปราะใหญ่ เป็นระยะเวลา ๑, ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ β-hexosaminidase หรือฤทธิ์ต้านการแพ้โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง ๑๒.๘๓ ± ๐.๘๔ ถึง ๒๕.๑๑ ± ๑.๙๘ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยฤทธิ์ต้านการแพ้ที่ดีที่สุดคือ การสกัดด้วยการแช่สกัดเอทานอลเป็นเวลา ๑ วัน และการสกัดด้วยการแช่ด้วยเอทานอลเป็นเวลา ๓ วัน จะมีฤทธิ์ต้านการแพ้น้อยที่สุด แต่เมื่อนำมาทดสอบทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาของศุณิตา มากชูชิต ที่พบว่า สารสกัดประสะเปราะใหญ่ มีฤทธิ์ต้านการแพ้ มีค่า IC_{50} = ๑๖.๕๙ ± ๑.๖๘ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร[๓] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ยาประสะเปราะใหญ่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อย มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง ๖๗.๓๒ ± ๑.๙๗ ถึง ๙๒.๕ ± ๐.๖๗ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นมาตรฐาน คือ BHT มีค่า EC_{50} เท่ากับ ๑๓.๔๕ ± ๑.๒๗ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า การแช่สกัดเป็นเวลา ๓, ๗ และ ๑๑ วัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างจากการแช่สกัดเวลา ๑ วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อหาปริมาณสารฟีนอลรวม พบว่า การแช่สกัดตำรับยาประสะเปราะใหญ่ เป็นระยะเวลา ๑, ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน มีค่าปริมาณสารฟีนอลรวมอยู่ในช่วง ๒๘.๔๓ ± ๓.๖๗ ถึง ๓๗.๒๒ ± ๔.๘๔ มิลลิกรัมแกลลิกแอซิด/กรัมสารสกัด โดยปริมาณสารฟีนอลรวมในการสกัดด้วยการแช่สกัดเอทานอลเป็นเวลา ๑ วัน จะมีปริมาณสารฟีนอลรวมน้อยที่สุด และการสกัดด้วยการแช่สกัดเอทานอลเป็นเวลา ๑๑ วัน จะมีปริมาณสารฟีนอลรวมมากที่สุด แต่เมื่อนำมาทดสอบทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการแพ้ ปริมาณสารฟีนอลรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สรุปได้ว่า ระยะเวลาการแช่สกัดผงยาประสะเปราะใหญ่ที่เหมาะสมที่สุด คือ การแช่สกัดยาประสะเปราะใหญ่ด้วยเอทานอลเป็นระยะเวลา ๑ วัน เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านการแพ้ที่ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับจุดมุ่งหมายในการใช้ยาประสะเปราะใหญ่ในการรักษาหวัดภูมิแพ้ นอกจากนั้นแล้วยังมีค่าร้อยละน้ำหนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสมุนไพรแห้ง (%yield) ที่ค่อนข้างสูงและใช้เวลาในการแช่สกัดน้อย แต่มีฤทธิ์ต้านการแพ้ที่ดี เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาเป็นยาในรูปแบบสารสกัดต่อไป ถึงแม้ว่าการสกัดด้วยวิธีนี้จะมีปริมาณสารฟีนอลรวมที่น้อยและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ดีนักก็ตาม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการสกัดใช้เวลาน้อยที่สุด แต่ฤทธิ์ที่ตรงตามสรรพคุณดีที่สุดต้องเป็นการแช่สกัด ๑ วัน ซึ่งระยะเวลาการสกัดนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็นรูปสารสกัดตำรับต่อไป

เมื่อนำผลการทดลองหาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารฟีนอลรวม พบว่า ฤทธิ์ต้านการแพ้มีความสัมพันธ์ผกผันระดับสูงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($r = -0.๘๗๑$) ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลรวม ($r = -0.๓๗๖$) และฤทธิ์ต้านการแพ้ไม่สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลรวมเช่นกัน ($r = 0.๒๑๖$) นั่นอาจหมายความได้ว่า ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นจะใช้การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแทนการทดสอบฤทธิ์ต้านการแพ้ไม่ได้ เนื่องจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กันในทางตรงข้ามกับฤทธิ์ต้านการแพ้ และปริมาณสารฟีนอลรวมไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านการแพ้ เนื่องจากค่าที่ได้คือ ค่า $r = 0.๒๑๖$ ซึ่งน้อยมาก แสดงว่า ปริมาณสารเคมีที่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านการแพ้ไม่ใช่กลุ่มของสารฟีนอล ดังนั้น ยังคงต้องแยกสารที่ออกฤทธิ์ต้านการแพ้และดูปริมาณสารที่ออกฤทธิ์ต้านการแพ้นั้นว่ามีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านแพ้หรือไม่ ถ้าสัมพันธ์กันจึงจะใช้เป็นการควบคุมคุณภาพทางเคมีด้วยสารที่แยกได้ ดังนั้นการทดลองต่อไปต้องแยกสารที่ออกฤทธิ์ต้านการแพ้เพื่อใช้ควบคุมมาตรฐานทางเคมีของสารสกัดในการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง โดยการเก็บผงยาประสะเปราะใหญ่ ไว้ที่อุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ เป็นเวลา ๐, ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐ และ ๑๒๐ วัน แล้วนำมาสกัดโดยเลือกระยะเวลาการสกัดที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งคือการแช่สกัดเป็นระยะเวลา ๑ วัน แล้วนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านการแพ้ โดยใช้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ β-hexosaminidase ที่ความเข้มข้นของสารสกัด ๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ β-hexosaminidase ที่เวลาต่างกัน คิดเป็น ร้อยละ ๙๒.๒๗ ±

๒.๑๓, ๙๕.๐๘ ± ๒.๖๖, ๙๔.๕๒ ± ๑.๙๕, ๘๘.๖๑ ± ๔.๗๔, ๘๕.๙๓ ± ๖.๒๑, ๙๑.๒๔ ± ๓.๒๐ ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทดสอบทางสถิติเปรียบเทียบ ช่วงเวลาการเก็บแต่ละช่วงเวลา กับ Day 0 มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ยาประสะเปราะใหญ่ยังคงมีฤทธิ์ในการต้านการแพ้ เมื่อเก็บผงยาประสะเปราะใหญ่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา ๒ ปี[๑๒] โดยฤทธิ์ต้านการแพ้ไม่เปลี่ยนแปลง

สรุปผลการศึกษา

ผลการศึกษาสรุปว่า การสกัดผงยาตำรับประสะเปราะใหญ่โดยการแช่สกัดด้วย ๙๕% เอทานอลเป็นระยะเวลา ๑, ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน ให้ค่าร้อยละน้ำหนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสมุนไพรแห้ง (%yield) ไม่แตกต่างกัน และมีฤทธิ์ต้านการแพ้ และมีปริมาณสารฟีนอลรวมมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อย และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการสกัดเป็นเวลาวันที่ ๓, ๗ และ ๑๑ วัน มีความแตกต่างจากการสกัดเป็นเวลา ๑ วัน แสดงว่า การสกัดยาประสะเปราะใหญ่เพื่อนำไปใช้ในการรักษาอาการแพ้เนื่องจากหวัดภูมิแพ้นั้น สามารถสกัดได้โดยการแช่สกัดด้วย ๙๕% เอทานอลเป็นระยะเวลา ๑ วัน การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ระยะเวลาน้อยที่สุดในการสกัดยาประสะเปราะใหญ่และให้ผล ต้านการแพ้ที่ดีที่สุด และจากการหาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านการแพ้มีความสัมพันธ์แบบผกผันระดับสูงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแทนการทดสอบฤทธิ์ต้านการแพ้ได้ และฤทธิ์ต้านการแพ้นั้นไม่สัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลรวม แสดงว่า ไม่สามารถใช้ค่าฟีนอลรวมแทนค่าสารเคมีที่ออกฤทธิ์ต้านการแพ้ได้ จากการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งพบว่า ค่าการยับยั้งเอนไซม์ β-hexosaminidase จากการแช่สกัดเป็นระยะเวลา 1 วัน มีความคงตัวเนื่องจาก ค่าการยับยั้งเอนไซม์ β-hexosaminidase ของวันอื่น ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ($p > 0.05$) ผงยาประสะเปราะใหญ่สามารถเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องได้ ๒ ปี โดยที่ยังคงมีฤทธิ์ต้านการแพ้ได้ไม่เปลี่ยนแปลง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ภายใต้ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์แผนไทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

๑. คัมภีร์ปฐมจินดาร์ ผูก๖. ใน; ขุนโสภิตบรรณลักษณ์. คัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณ.สมาคมเภสัชกรรมไทยโบราณแห่งประเทศไทย วัดสามพระยา จังหวัดพระนคร ; ไม่ระบุปีที่พิมพ์. หน้า ๑๗๖.

๒. คัมภีร์สรรพคุณยา. ใน: มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์ไทยเดิมฯ และโรงเรียนอายุรเวทธำรง สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์. ตำราการแพทย์ไทยเดิม (แพทยศาสตร์สงเคราะห์ ฉบับอนุรักษ์ เล่มที่๑). กรุงเทพมหานคร: ศุภวนิชการพิมพ์; ๒๕๕๐. หน้า ๔๐๔.

๓. ศุณิตา มากชูชิตและคณะ. การศึกษาฤทธิ์ต้านการแพ้ของตำรับยาไทยชื่อประสะเปราะใหญ่. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ๒๕๕๒;๗:๑๒๓.

๔. Makchuchit S, Itharat A. Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of Thai medicinal plants. J Med Assoc Thai 2010;93:227-35.

๕. Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. J Immunol 1979;123:1445-50.

๖. Cheong H, Choi EJ, Yoo GS, Kim KM, Ryu SY. Desacetylmatricarin, an anti allergic component from taraxacum platycarpum. Planta Med 1998;64:577-8.

๗. Matsuda H, Tewtrakul S, Morikawa T, Yoshikawa M. Anti-allergic activity of stilbenes from *Korean rhubarb (Rheum undulatum* L.): structure requirements for inhibition of antigen-induced degranulation and their effects on the release of TNF-α and IL-4 in RBL-2H3cells. J Bioorganic Med Chem 2004;12:4871-6.

๘. Bonina F, Puglia C, Tomaino A, Saija A, Mulinacci N, Romani A, et al. In-vitro antioxidant and in-vivo photoprotective effect of three lyophilized extracts of *Sedum telephium* L. leaves. J Pharm Pharmacol 2000;52:1279–85.

๙. 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.

๑๐. Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. Methods Enzymol 299 (Oxidants and Antioxidants Part A) 1999;11:152-78.

๑๑. Katalinic V, Milos M, Kusilic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chem 2006;94:550-7.

๑๒. 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 biological activities on different extraction period times and stability study of Pra-sa-prao-hyai remedy

Nichamon Mukkasombut*, Waipoj Chanvimalueng, Sunita Makchuchit*, Arunporn Itharat *, *****

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

** Department of Otolaryngology, 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: Pra-sa-prao-hyai formula has been used in Thai traditional medicine to treat colds, asthma and fever and it is also a herbal preparation in herbal national drug list in Anno Domini 2011. There is no report for biological control of this preparation. Thus, the objective of this research was to study on correlation of biological activity of extract from Pra-sa-prao-hyai remedy and extraction period times. This knowledge was also used to investigate for stability of powder drug of this remedy.

Methods: Pra-sa-prao-hyai remedy was extracted with 95% ethanol in different times, they were 1, 3, 5, 7, 9 and 11 days respectively. All of extracts were tested for antiallergic activity by determination on inhibitory effect of β-hexosaminidase enzyme from Rat basophilic leukemia (RBL-2H3). DPPH scavenging activity was also tested by DPPH radical assay and total phenolic content was measured by Folin-Ciocalteu reagent. The day of extraction which showed the highest of allergic activity was also used for studying on stability of Pra-sa-prao-hyai powder drug. The stability studies by an accelerated condition (45°C and 75% RH) of crude remedy were studied by keeping in 6 different times (Day 0, 15, 30, 60, 90 and 120 respectively). Then, these powder drugs which was kept in each times was extracted and tested antiallergic activity.

Results: The extracts from crude drug which were extracted in each times were not significantly different on antiallergic and total phenolic content ($p > 0.05$). The DPPH scavenging activity of extract at Day 3, 7 and 11 were significantly different with Day 1. The extract at Day 1 showed the best antiallergic activity (IC_{50} = 12.83 ± 0.84 μg/ml), total phenolic contents 28.43 ± 3.67 mg gallic acid/g extract and it showed the fifth of DPPH scavenging activity (EC_{50} = 85.84 ± 4.18 μg/ml). It showed reversely correlation between antiallergic and DPPH scavenging activities ($p < 0.05$, $r = -0.871$). The crude powder of Pra-sa-prao-hyai remedy was stable because the percentage of antiallergic activity of each time was not significantly different when they were compared with Day 0 ($p > 0.05$).

Discussion and Conclusion: The best time for extraction of Pra-sa-prao-hyai remedy was maceration for one day. Pra-sa-prao-hyai remedy powder was stable and it had shelf life of antiallergic activity as 2 years.

Key words: Pra-sa-prao-hyai, Antiallergy, DPPH scavenging activities, Total phenolic content