

ความเป็นพิษต่อเซลล์ฤทธิ์ด้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระของ ตำรับยาห้ารากที่สกัดด้วยน้ำ

Cytotoxicity, Anti-inflammation and Antioxidant Activities of Water Extracted Ya-Ha-Rak

วียดา กวานเทียน^{1*} และ กิ่งกาญจน์ บรรลือพิช²
Wiyada Kwanhian^{1*} and Kingkan Bunluepuech²

บทคัดย่อ

ยาห้ารากเป็นตำรับยาแผนโบราณของไทย นิยมใช้เป็นยาลดไข้ ประกอบด้วยรากยาสมุนไพร 5 ชนิด โดยตามแบบแผนโบราณใช้โดยการต้มในน้ำ ดังนั้นการศึกษานี้จึงสกัดยาห้ารากด้วยน้ำเพื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และการยับยั้งการอักเสบโดยการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่สร้างจากเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) และวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ผลการศึกษาพบค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (CC50) เท่ากับ 44.32 ± 3.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การยับยั้งการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ ร้อยละ 50 (IC50) เท่ากับ 16.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มีค่า ความเข้มข้นของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ร้อยละ 50 (SC50) เท่ากับ 120.17 ± 0.07 และ 73.27 ± 0.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาสามารถยืนยันฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบ และการต้านอนุมูลอิสระของยาห้ารากที่สกัดด้วยน้ำ

คำสำคัญ: ยาห้ารากสกัดด้วยน้ำ ด้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ

¹ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

² คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

* Corresponding author e-mail: kwiyada@wu.ac.th

Abstract

Ya-Ha-Rak (YHR) as a Thai traditional herb formula. YHR has been widely used in as traditional antipyretics drug. Its ingredients consist of five types of herbal roots. The traditional using of YHR is boiling which is water extraction. In this study, we investigated the effect of water extracted-YHR on anti-inflammatory effect on RAW 264.7 macrophages cells which stimulated by lipopolysaccharide (LPS). In addition, anti-oxidation efficacies were determined the scavenging DPPH and ABTS radical activity. The cytotoxic concentration 50 (CC50) of water extracted-YHR was 44.32 ± 3.25 $\mu\text{g/ml}$. Anti-inflammatory efficacy by nitric oxide releasing inhibition was shown as inhibitory concentration 50 (IC50) 16.56 $\mu\text{g/ml}$. The anti-oxidation efficacy was determined the DPPH and ABTS radical scavenging. The scavenging concentration 50 (SC50) was 120.17 ± 0.07 and 73.27 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The results can confirm the anti-inflammatory and anti-oxidant efficacies of water extracted YHR.

Keywords: Water extracted YA-Ha-Rak, Anti-inflammation, Anti-oxidation

บทนำ

ตำรับยาห้าราก เป็นยารักษาอาการไข้ ที่บรรจุอยู่ในบัญชียาจากสมุนไพร ในบัญชียาหลักแห่งชาติ กลุ่มยาแผนไทยแก้ไข้ ซึ่งมีทั้งสิ้น 6 ตำรับ ได้แก่ ยาเขียวหอม ยาจันทร์ลีลา ยาประสะจันทร์แดง ยาประสะเปราะใหญ่ ยามหานิลแห่งทอง และยาห้าราก (บัญชียาจากสมุนไพร ฉบับท้ายประกาศบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2559, 2559) ยาห้ารากเป็นตำรับยาแผนโบราณของไทย ที่มีการนำมาใช้รักษาอาการไข้ มีชื่อเรียกตำรับยานี้หลายชื่อ ได้แก่ ยาเบญจโลกวิเชียร ยาแก้วห้าดวง และยาเพชรสว่าง (กองการประกอบโรคศิลปะ, 2542) ตำรับยาห้ารากประกอบด้วยสมุนไพร 5 อย่าง ได้แก่ รากชิงช้า (*Capparis micracantha* DC) รากย่านาง (*Tiliacora triandra* Colebr) รากเท้าชายม่อม (*Clerodendrum petasites* Lour) รากคนทา (*Harrisonia perforate* (Blanco) Merr) และรากมะเดื่อชุมพร (*Ficus racemosa* L) นำมารวมกันด้วยสัดส่วนเท่ากัน (กองการประกอบโรคศิลปะ, 2542; Nuaeissara *et al.*, 2011) ในตำรับยาแผนโบราณยาห้ารากจะรับประทานโดยการต้มกับน้ำ แล้วนำมาดื่มช่วยลดไข้จากอาการหวัดได้ ปัจจุบันมีการทำเป็นเม็ดและแคปซูลสำเร็จรูป ทำให้สะดวกต่อการรับประทาน

ไข้ (Fever หรือ Pyrexia) เกิดขึ้นเมื่อมีการอักเสบ (inflammation) ซึ่งเป็นอาการที่ร่างกายมีอุณหภูมิสูงกว่าสภาวะปกติ เกี่ยวข้องกับภาวะติดเชื้อ ภาวะเนื้อเยื่อถูกทำลาย ถูกกระตุ้นโดยการหลั่งพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin E2; PGE2) ซึ่งสามารถกระตุ้นไฮโปทาลามัสจนอุณหภูมิร่างกายถูกปรับเปลี่ยนให้สูงขึ้น เป็นกลไกที่ช่วยต่อสู้กับการจุลชีพก่อโรคให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ เพราะในอุณหภูมิที่สูงเกินไปที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของเชื้อจะไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ยังเป็นการกระตุ้นอัตราเมตาบอลิซึมของร่างกาย และกระตุ้น heat shock proteins ซึ่ง

จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันตามมา การอักเสบเกี่ยวข้องกับการสร้างสารอนุมูลอิสระจากเซลล์ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; NO) คือ สารอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างจากไมโทคอนเดรียของเซลล์หลายชนิด ทั้งเซลล์ผนังหลอดเลือด และเซลล์แมคโครฟาจ เกิดจาก L-arginine ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนและ Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) โดยอาศัยเอนไซม์ Nitric oxide synthases (NOS) ร่วมกับโคแฟกเตอร์ ได้แก่ Flavin adenine dinucleotide (FAD) ฟลาวิน (Flavin) ฮีม (Heme) เป็นต้น เกิดเป็น L-citrulline และไนตริกออกไซด์ ขึ้น โดยทำหน้าที่เป็นสารส่งสัญญาณที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของการอักเสบได้ สำหรับสภาวะปกติจะทำหน้าที่เป็น Anti-inflammatory effect แต่สภาวะที่มีการกระตุ้นให้มีการสร้างปริมาณสูง เช่น กำจัดสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ จุลชีพซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ และการตอบสนองต่อการอักเสบ เหนียวหนาและควบคุมการตายของเซลล์ โดยยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยขัดขวางการจับตัวของสารต่างๆ ที่ตำแหน่ง complex III และ IV ในระบบลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน ทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) ทำหน้าที่เหมือนตัวขยายหลอดเลือด (Vascular relaxing agent) เป็นสารยับยั้งการจับกลุ่มของเกล็ดเลือด และยังควบคุมการไหลเวียนเลือด ระบบหัวใจ ระบบประสาท (Kuo and Schroeder, 1995; Nathan and Xie, 1994)

อนุมูลอิสระ (Free radicals) คือสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (Unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งเกิดในกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระ และว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์ เช่น ลิพิด โปรตีน เอนไซม์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ คาร์โบไฮเดรต เซลล์เมมเบรน คอลลาเจน ไมโทคอนเดรีย และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดอาการและโรคต่างๆ เช่น ชรา มะเร็ง หัวใจขาดเลือด ความจำเสื่อม ขออักเสบ และภูมิแพ้ เป็นต้น อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นจากปัจจัยที่รับเข้าจากภายนอกคือการติดเชื้อจุลชีพ จากรังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ และจากการรับประทานยาบางชนิด เช่น พาราเซตามอล เป็นต้น (บุหรณ์ พันธุ์สวรรค์, 2556; Nathan and Xie, 1994)

ผลการศึกษาที่ผ่านมาเคยมีการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบและการต้านอนุมูลอิสระโดยการวัด DPPH radical scavenging activity ของยาหำรากที่สกัดด้วยเอทานอล พบว่า สามารถยับยั้งการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระได้ (Juckmeta and Itharat, 2012) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาที่แสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ การต้านการอักเสบ และการต้านอนุมูลอิสระของยาหำรากที่สกัดด้วยน้ำ ซึ่งเป็นการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบตำรับยาสมุนไพรโบราณ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบโดยการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของยาหำรากที่สกัดด้วยน้ำ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารสกัดยาหารากที่สกัดด้วยน้ำ

ตำรับยาสมุนไพรห้าราก ประกอบไปด้วยรากสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ รากมะเดื่อชุมพร (*F. racemosa* L) รากชิงช้า (*C. micracantha* DC) รากเท้าชายม่อม (*C. petasites* Lour) รากคนทา (*H. perforate* (Blanco) Merr) และรากย่านาง (*T. triandra* Colebr) ที่เก็บมาจากสวนสมุนไพรสวนยาไทยทองนพคุณ โดยนายทรัพย์สิน ทองนพคุณ แพทย์แผนไทยจากคณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ซึ่งตัวอย่างสมุนไพรถูกเก็บไว้ที่หอพรรณไม้ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การเตรียมสารสกัดจากยาสมุนไพรห้าราก เตรียมได้จากผงยาสมุนไพร 1 กิโลกรัม ที่ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด โดยใช้สัดส่วนของสมุนไพรแต่ละชนิดเท่ากัน นำมาสกัด 3 ครั้ง ด้วยน้ำ 5 ลิตร โดยวิธีการสกัดแบบไหลย้อนกลับ (Reflux extraction) ภายใต้ความดันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิธีการโดยย่อคือ นำขวดก้นกลมที่บรรจุตัวอย่างยาสมุนไพรห้าราก ไปสกัดด้วยชุดสกัดแบบไหลย้อนกลับ โดยเมื่อให้ความร้อนแก่สารตัวอย่างในขวดก้นกลม สารตัวอย่างจะระเหยเป็นไอแล้วผ่านการควบแน่นไหลย้อนกลับมาใหม่ในขวดก้นกลมที่มีสารตัวอย่างขวดเดิม เป็นอย่างนี้ซ้ำๆ รอบจนครบ 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมารองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 4) แล้วนำสารละลายที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง เพื่อแยกตัวทำละลายออกจากด้วยเครื่อง Rotary Evaporator จนได้สารสกัดที่แห้งหนืด สารที่สกัดได้มีน้ำหนัก 20.56 กรัม ซึ่งคำนวณร้อยละของสารที่สกัดได้ (% yield) เท่ากับ 2.05 นำสารสกัดยาหารากที่ได้มาละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) บริสุทธิ์ ให้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบถัดไป

2. การเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

เลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ Completed-RPMI (RPMI-1640 ที่มี Heated-inactivated fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10 กับ penicillin 100 ยูนิต/มิลลิลิตร และ Streptomycin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน T25 flask เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตร้อยละ 80-90 ของ flask ล้างด้วย PBS และขูดให้เซลล์หลุดออกจากผิว flask ด้วย cell scraper ถ่ายเซลล์ใส่ในหลอดทดลอง 15 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 1,800 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ใน refrigerated centrifuge นำมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการย้อมด้วย Trypan blue ที่จะย้อมไม่ติดเซลล์ที่มีชีวิต ปรับจำนวนเซลล์ด้วยอาหาร RPMI-1640 ตามจำนวนที่ต้องการนำไปทดสอบ

3. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Nemudzivhadi and Masoko, 2014)

เติมเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 จำนวน 10^5 เซลล์/100 ไมโครลิตร ใน 96 well culture plate บ่มในคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมสารสกัดยาหารากที่เจือจางด้วย RPMI 1640 ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 50 25 12.5 6.25 3.625 และ 1.625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มไว้ 48 ชั่วโมง โดยมีการควบคุมผลการทดลองโดยหลุมที่มีเฉพาะเซลล์ (เติม RPMI-1640 แทนยาหาราก เป็น cell control) หลุมที่เติม DMSO หลุมที่เติมยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ Indomethacin 100

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แทนสารสกัดยาห้าราก เมื่อครบเวลาสารละลายทั้งหมดถูกดูดทิ้ง แล้วเติม MTT 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่ม 2 ชั่วโมง จะเห็นผลึก Formazan เติม DMSO 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ที่ baseline 690 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ดังสมการ % Viability = (OD test / OD cell control) × 100

นำร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต และค่าความเข้มข้นของสารสกัดยาห้าราก สร้างกราฟเพื่อหาสมการความสัมพันธ์ และนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 50 (CC50) ของสารสกัดยาห้าราก การทดสอบจะทำ 3 หลุมในคราวเดียวกัน และทำการทดลองซ้ำอีก 3 ครั้งเพื่อนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดลอง

4. ทดสอบคุณสมบัติยับยั้งการอักเสบ (Kim *et al.*, 2004)

นำเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงความเข้มข้น 2×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมนลงใน 96 well plate (ได้จำนวนเซลล์ 10^5 เซลล์/หลุม) บ่มใน CO₂ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาเติม LPS 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ และสารสกัดยาห้ารากที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 50 25 12.5 6.25 3.625 และ 1.625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร ยกเว้นหลุมที่ควบคุมที่จะมีเฉพาะเซลล์และ LPS ให้เติม RPMI-1640 แทน และต้องทำการทดลองหลุมที่เติมยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ Indomethacin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แทนสารสกัดยาห้าราก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ครบเวลาดูดถ่าย supernatant จากทุกหลุม 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate อันใหม่เติม Griess's reagent (sulfanilamide ร้อยละ 1 N - 1-naphthylethylenediamine dihydrochloride ร้อยละ 0.1 และ phosphoric acid ร้อยละ 2) ทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่มืดในอุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ที่ baseline 650 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ โดยกำหนดให้ หลุมควบคุมที่จะมีเฉพาะเซลล์และ LPS มีระดับการสร้างไนตริกออกไซด์ ร้อยละ 100 ดังสมการ ร้อยละของการยับยั้งการสร้าง NO = (OD test / OD cell control) × 100

5. ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

5.1 วิธี DPPH free radical scavenging (Juckmeta and Itharat, 2012)

ทดสอบปฏิกิริยาด้านออกซิเดชัน โดยใช้สารสกัดยาห้ารากที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ 100 50 25 และ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (เจือจางในเมทานอล) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 0.16 มิลลิโมลาร์ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ในเมทานอล 100 ไมโครลิตร ถ้าเกิดปฏิกิริยาด้านอนุมูลอิสระ สีจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นไม่มีสี บ่ม 30 นาทีในที่มืด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร สารละลายมาตรฐานใช้ไทรอล็อกซ์ ความเข้มข้น 0 ถึง 0.1 ไมโครโมลาร์ หลอดควบคุมใช้เมทานอลแทนสารละลายมาตรฐานไทรอล็อกซ์ คำนวณค่าร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) โดยใช้สมการ % scavenging = [(OD control - OD test) / OD control] × 100 นำค่าที่ได้มาของแต่ละความเข้มข้นไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานหรือ

ความเข้มข้นของสารสกัดยาห้รรก เมื่อได้สมการเส้นตรงนำการหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (scavenging concentration 50; SC50) ของสารมาตรฐาน Trolox (มิลลิโมล/ลิตร) และของสารสกัดยาห้รรก (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ของสารตัวอย่าง (ยาห้รรก) เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox เรียกว่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) มีหน่วยเป็น มิลลิโมลาร์ Trolox/กรัมของสารตัวอย่าง (mM Trolox/g sample) แสดงถึงความเข้มข้นของ Trolox ที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยาห้รรก ดังสมการ $\text{Antioxidant Capacity} = \text{SC50 of Trolox} / \text{SC50 of sample}$

5.2 วิธี ABTS scavenging activity (Ndam *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2014)

ทดสอบปฏิกิริยาด้านออกซิเดชัน โดยใช้สาร ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt) จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกด้วยการเติม potassium persulfate ซึ่งมีสีเขียว เมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นไม่มีสี วิธีการโดยสังเขปคือ เตรียมสารละลาย ABTS^{•+} โดยการผสม ABTS 75 มิลลิโมลาร์ กับ 1.225 มิลลิโมลาร์ potassium persulfate ในน้ำกลั่น บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยเมทานอลให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 415 นาโนเมตร เป็น 0.7 ± 0.02 การทดสอบเริ่มโดย นำสารสกัดยาห้รรกเจือจางด้วยเมทานอล ที่ความเข้มข้น 100 50 25 และ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย ABTS^{•+} ในเมทานอลปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 415 นาโนเมตร คำนวณค่าร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) ค่าความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (scavenging concentration 50; SC50) และค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยาห้รรกเช่นเดียวกับข้อ 5.1

6. การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เมื่อต้องการเปรียบเทียบจะเทียบโดย T-test

ผลการวิจัย

1. ผลการประเมินความเป็นพิษของสารสกัดยาห้รรกที่สกัดด้วยน้ำ

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากยาห้รรกที่สกัดด้วยน้ำต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 โดยการตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay เมื่อคำนวณหาคร่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% viability) แล้วนำไปสร้างกราฟเพื่อหาสมการความสัมพันธ์ของค่า (% viability) และค่าความเข้มข้นของยาห้รรกที่สกัดด้วยน้ำ แล้วนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (CC50) ผลการศึกษาพบว่า CC50 เท่ากับ 44.32 ± 3.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกค่าความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 12.5 6.25 3.625 และ 1.625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปใช้ในการทดสอบประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

2. ผลการประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดยาหำรากที่สกัดด้วยน้ำ

เมื่อกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ด้วย LPS ในสถานะที่มีสารสกัดยาหำรากที่สกัดด้วยน้ำ ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ปริมาณไนตริกออกไซด์ ที่ถูกกระตุ้นจะมีปริมาณต่ำกว่าในสถานะที่ไม่มีสารสกัด ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 1 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่มีสารสกัด (มีเฉพาะ LPS 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดยาหำรากที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขึ้นไปมี ไนตริกออกไซด์ ต่ำกว่าสถานะที่ไม่มีสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) นอกจากนี้เมื่อนำความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์ และความเข้มข้นของสารสกัดยาหำราก ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น จะได้ความสมการความสัมพันธ์ที่สามารถนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 (Inhibition concentration 50; IC50) ได้ค่าเป็น 16.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ของสารสกัดยาหำรากที่สกัดด้วยน้ำ

สารทดสอบ	NO (μ M) (mean $\pm$ SD)	p -value ^a
LPS 100 μ g/ml	83.91 $\pm$ 7.42	-
YHR 1.5625 μ g/ml	73.47 $\pm$ 0.65	0.350
YHR 3.125 μ g/ml	62.05 $\pm$ 0.91	0.053
YHR 6.25 μ g/ml	58.28 $\pm$ 1.35	0.038*
YHR 12.5 μ g/ml	54.67 $\pm$ 0.58	0.023*
Indomethacin	21.99 $\pm$ 1.58	0.015*

หมายเหตุ: ^a p -value ทดสอบโดยสถิติ Unpaired-T test เทียบกับสถานะที่มีเฉพาะ LPS,

* significant different < 0.05

3. ผลการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

สารสกัดยาหำรากที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH โดยพบ ร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของยาหำรากเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยเมื่อนำร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นกับความเข้มข้นของยาหำราก แล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดยาหำรากที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (SC50) ได้เท่ากับ 120.17 $\pm$ 0.07 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อคำนวณ TEAC มีค่าเท่ากับ 9.80 $\pm$ 0.04 มิลลิโมลาร์โทรลอคซ์/กรัมของตัวอย่าง

ตารางที่ 2ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH ของสารสกัดยาห้ารากที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ

YHR ($\mu\text{g/ml}$)	% DPPH radical scavenging activity (mean $\pm$ SD)
100	41.29 $\pm$ 0.10
50	17.88 $\pm$ 3.15
25	6.47 $\pm$ 3.07
12.5	2.56 $\pm$ 2.00

4. ผลการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS

สารสกัดยาห้ารากที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS โดยพบ % scavenging activity สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของยาห้ารากเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3 พบความเข้มข้นของสารสกัดยาห้ารากที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ร้อยละ 50 (SC50) ได้เท่ากับ 73.27 $\pm$ 0.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า TEAC เท่ากับ 14.92 $\pm$ 0.05 มิลลิโมลาร์โทร็อกซ์/กรัมของตัวอย่าง

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS ของสารสกัดยาห้ารากที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ

YHR ($\mu\text{g/ml}$)	% ABTS radical scavenging activity (mean $\pm$ SD)
100	65.65 $\pm$ 1.04
50	38.19 $\pm$ 0.49
25	19.32 $\pm$ 1.65
12.5	10.65 $\pm$ 0.01

อภิปรายผลการวิจัย

ตำรับยาห้ารากที่ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ รากมะเดื่อชุมพร รากชิงช้า รากห้ายายม่อม รากคนทา และรากย่านาง ในสัดส่วนเท่ากัน นำมาสกัดด้วยน้ำได้ ร้อยละของสารที่สกัดได้ (% yield) ของการสกัดเท่ากับ 2.05 ซึ่งเมื่อเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Juckmeta and ltharat (2012) ที่สกัดยาห้ารากด้วยร้อยละ 95 เอทานอล ได้ร้อยละของสารที่สกัดได้ (% yield) ของการสกัดเท่ากับ 4.26 การศึกษาในครั้งนี้พบว่าได้สารที่สกัดออกมาน้อยกว่า อาจแสดงถึงความสามารถในการละลายสารสกัดของเอทานอลสูงกว่าเมื่อเทียบกับน้ำ ในรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดจากสมุนไพรที่ผ่านมาพบว่า สารประกอบที่ออกฤทธิ์ด้านการอักเสบและสามารถละลายได้ดีในน้ำ เป็นสารประกอบประเภท glycoside ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มนี้จะมีส่วนที่เรียกว่า aglycone ซึ่งจะจับกับน้ำตาล หรือ glycone โดยในส่วน aglycone ของไกลโคไซด์ในพืชแต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกัน จึงส่งผลทำให้สมุนไพรไทยแต่ละชนิดมีสรรพคุณที่แตกต่างกัน สำหรับในตำรับยาห้ารากนี้คาดว่าจะจะเป็นสารประกอบประเภท Flavonoid glycosides ซึ่งสารประกอบชนิดนี้มีโครงสร้างโมเลกุลที่หลากหลาย และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Jiang et al., 2018;

Torres *et al.*, 2016) สารในกลุ่ม Flavonoid glycosides ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ คือ rutin (Pikulski and Brodbelt, 2003; Wang *et al.*, 2015) จึงคาดว่าน่าจะเป็นสารประกอบที่ออกฤทธิ์ในตำรับยาห้าราก ทำให้ยาห้ารากที่สกัดด้วยน้ำสามารถต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ดี โดยมีการศึกษาแสดงว่าพบสาร Rutin ในเท้ายายม่อม (Obloh *et al.*, 2017) และชิงชี่ (Hamed *et al.*, 2007) ผลด้านการอักเสบนี้คาดว่ามาจากสารสำคัญหลายๆ ชนิดที่มาจากสมุนไพรถึง 5 ชนิดในยาตำรับนี้ ที่ส่งผลแบบ Synergistic anti-inflammatory effect คือมีการเสริมฤทธิ์กัน ซึ่งได้พิสูจน์แล้วในการศึกษาของ Juckmeta and Itharat (2012) ที่เป็นการศึกษาที่สกัดยาห้ารากด้วยเอทานอล อย่างไรก็ตาม ค่า IC50 ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้สำหรับไนตริกออกไซด์เป็น Inflammatory mediator ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ สร้างจากเซลล์แมคโครฟาจ ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์ และทำให้เซลล์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ (Kuo and Schroeder, 1995; Nathan and Xie, 1994) ดังนั้นการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการควบคุมกระบวนการอักเสบ นำไปสู่การศึกษาเพื่อพัฒนายาในการรักษาโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของยาห้ารากที่สกัดด้วยน้ำในการศึกษานี้พบว่า SC50 ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS เท่ากับ 120.17 ± 0.07 และ 73.27 ± 0.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ทดสอบสารสกัดยาห้ารากด้วยเอทานอลพบการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 เท่ากับ 40.93 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Juckmeta and Itharat, 2012) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชจะเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลสามารถละลายใน organic solvent ที่มีขั้วต่ำกว่าในน้ำ แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืช ขึ้นกับการเลือกใช้ตัวทำละลาย นอกจากนี้ยังขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดและแรงกลที่ใช้ในการสกัด (Lee *et al.*, 2018; Sepahpour *et al.*, 2108; Yang *et al.*, 2017; Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011) การศึกษานี้สรุปได้ว่าตำรับยาห้ารากที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ รวมทั้งสารออกฤทธิ์ที่มีในตำรับยานี้และควรมีการศึกษาเปรียบเทียบกับตำรับสมุนไพรอื่นที่มีฤทธิ์คล้ายคลึงกัน เพื่อเป็นทางเลือกในการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัย

ยาห้ารากที่สกัดด้วยน้ำสามารถมีระดับความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ระดับ CC50 เท่ากับ 44.32 ± 3.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีการฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ระดับค่า IC50 เท่ากับ 16.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH และ ABTS ที่ระดับ SC50 เท่ากับ 120.17 ± 0.07 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 73.27 ± 0.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า TEAC เท่ากับ 9.80 ± 0.04 และ 14.92 ± 0.05 มิลลิโมลาร์โทรลอคซ์ /กรัมของตัวอย่าง ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ในการสนับสนุนทุนการวิจัย และการใช้พื้นที่ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กองการประกอบโรคศิลปะ. (2542). ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม. นนทบุรี: สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข.
- บัญญัติจากสมุนไพร เนบท้ายประกาศบัญญัติหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2559. (2559 วันที่ 12 เมษายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่มที่ 133 ตอนพิเศษ 86 ง., หน้า 11.
- บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21(3), 275-286.
- Hamed, A.R., Abdel-Shafeek, K.A., Abdel-Azim, N.S., Ismail, S.I. and Hammouda, F.M. (2007). Chemical investigation of some capparid species growing in Egypt and their antioxidant activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4(Suppl 1), 25-28.
- Jiang, X.L., Wang, L., Wang, E.J., Zhang, G.L., Chen, B., Wang, M.K. and Li, F. (2018). Flavonoid glycosides and alkaloids from the embryos of *Nelumbo nucifera* seeds and their antioxidant activity. *Fitoterapia*, 125, 184-190.
- Juckmeta, T. and Itharat, A. (2012). Anti-inflammatory and antioxidant activities of Thai traditional remedy called “Ya-Ha-Rak”. *Journal of Health Research*, 26(4), 205-210.
- Kim, S.J., Park, H. and Kim, H.P. (2004). Inhibition of nitric oxide production from lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells by synthetic flavones: structure-activity relationship and action mechanism. *Archives of Pharmacal Research*, 27(9), 937-943.
- Kuo, P.C. and Schroeder, R.A. (1995). Annals of surgery the emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Annals of Surgery*, 221(3), 220-235.
- Lee, Y.H., Kim, B., Hwang, S.R., Kim, K. and Lee, J.H. (2018). Rapid characterization of metabolites in soybean using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) and screening for alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant properties through different solvent systems. *Journal of Biological Chemistry*, 26(1), 277-291.
- Nathan, C. and Xie, Q.W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 269(19), 13725-13728.

- Ndam, L.M., Mih, A.M., Tening, A.S., Fongod, A.G., Temenu, N.A. and Fujii, Y. (2016). Phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Euphorbia golondrina* L.C. Wheeler (Euphorbiaceae Juss.): an unexplored medicinal herb reported from Cameroon. *Springerplus*, 5(1), 264.
- Nemudzivhadi, V. and Masoko, P. (2014). *In vitro* assessment of cytotoxicity, antioxidant, and anti-inflammatory activities of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) leaf extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 8.
- Nuaeissara, S., Kondo, S. and Itharat, A. (2011). Antimicrobial activity of the extracts from Benchalokawichian remedy and its components. *Journal of Medical Association Thailand*, 94(Suppl 7), S172-177.
- Oboh, G., Ogunraku, O.O., Oyeleye, S.I., Olasehinde, T.A., Ademosun, A.O. and Boligon, A.A. (2017). Phenolic extracts from *Clerodendrum volubile* leaves inhibit cholinergic and monoaminergic enzymes relevant to the management of some neurodegenerative diseases. *Journal of Dietary Supplements*, 14(3), 358-371.
- Pikulski, M. and Brodbelt, J.S. (2003). Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(12), 1437-1453.
- Rodríguez-Carpena, J.G., Morcuende, D., Andrade, M.J., Kylli, P. and Estévez M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5625-5635.
- Sepahpour, S., Selamat, J., Abdul Manap, M.Y., Khatib, A. and Abdull Razis, A.F. (2018). Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems. *Molecules*, 23(2), 402.
- Torres Castaneda, H.G., Colmenares Dulcey, A.J. and Isaza Martinez, J.H. (2016). Flavonoid glycosides from *Siparuna gigantotepala* leaves and their antioxidant activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 64(5), 502-506.
- Wang, L., Xu, M.L., Liu, J., Wang, Y., Hu, J.H. and Wang, M.H. (2015). *Sonchus asper* extract inhibits LPS-induced oxidative stress and pro-inflammatory cytokine

- production in RAW 264.7 macrophages. *Nutrition Research and Practice*, 9(6), 579-585.
- Yang, J., Ou, X., Zhang, X., Zhou, Z. and Ma, L. (2017). Effect of different solvents on the measurement of phenolics and the antioxidant activity of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) with accelerated solvent extraction. *Journal of Food Science*, 82(3), 605-612.
- Yang, M., Al Zaharna, M., Chen, Y.S., Li, L. and Cheung, H.Y. (2014). *In vitro* antioxidant activities and anti-proliferative properties of the functional herb *Abrus cantoniensis* and its main alkaloid abrine. *Food & Function*, 5(9), 2268-2277.