วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine
ปีที่ 20 ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม 2565 Vol. 20 No. 3 September-December 2022

นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของตำรับยาบำรุงไขข้อ

รัตติยา ตั้งบูชาเกียรติ

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

ผู้รับผิดชอบบทความ: *rattiya.t@rsu.ac.th*

บทคัดย่อ

โรคข้อเข่าเสื่อมและโรคปวดข้อรูมาตอยด์ เป็นสาเหตุของอาการปวดข้อในคนอายุมากกว่า 40 ปี และเป็นโรคเรื้อรังที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต การศึกษานี้สนใจนำตำรับยาบำรุงไขข้อในคัมภีร์โรคนิทานและคัมภีร์ธาตุวิภังค์จากตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ มาศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกอ่อนหนู ATDC-5 โดยนำตำรับยามาสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ น้ำ เอทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมพบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตท มีปริมาณสูงสุด และสารสกัดน้ำมีปริมาณต่ำสุด (GAE = 4.1218 และ 2.3001 mg GAE/g ตามลำดับ) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย ABTS radical scavenging assay พบว่าสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์สูงสุด และสารสกัดน้ำมีฤทธิ์ต่ำสุด (EEAC = 1.8241 และ 0.0378 mg EEAC/g ตามลำดับ) ซึ่งผลสอดคล้องกับ DPPH radical scavenging assay โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินอี คือสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์สูงสุดและสารสกัดน้ำมีฤทธิ์ต่ำสุด (IC_{50} = 0.0749 และ 1.4145 μg/ml ตามลำดับ) ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด (IC_{50} = 44.4961 μg/ml) สารสกัดเฮกเซนทุกความเข้มข้นไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 พบว่าสารสกัดน้ำ เอทานอล เอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้นสูงสุด 50 μg/ml ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า เอทิลอะซิเตท และเอทานอล เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนสรรพคุณของตำรับยาบำรุงไขข้อในการช่วยบรรเทาอาการข้อเข่าเสื่อมและโรคปวดข้อรูมาตอยด์

คำสำคัญ: ต้านอนุมูลอิสระ, ต้านการอักเสบ, ยาบำรุงไขข้อ, ยับยั้งไนตริกออกไซด์, ATDC-5cells

Received date 18/04/22; Revised date 10/09/22; Accepted date 30/11/22

Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of "*BAMRUNG-KHAIKHOR*" Herbal Formula

Rattiya Tangbuchakiat

College of Oriental Medicine, Rangsit University, Lak Hok Subdistrict, Muang District, Pathum Thani 12000, Thailand

Corresponding author: *rattiya.t@rsu.ac.th*

Abstract

Osteoarthritis and rheumatoid arthritis cause joint pain in people over 40 years of age that have a chronic disease affecting quality of life. This study reviewed BAMRUNG-KHAIKHOR (herbal joint pain) formula in *Thatwipang* and *Rokanithan* scriptures of the first Thai medical textbook *Tumra Paetsart Songkroh*. The formula was extracted with various solvents (water, ethanol, ethyl acetate and hexane) and then analyzed for total phenolic content, antioxidant activities with ABTS radical scavenging assay and DPPH radical scavenging assay, and inhibitory effects of nitric oxide using cytotoxicity test in the ATDC5 cells. The findings showed that ethyl acetate extract contained the highest total phenolic content whereas the water extract had the lowest content (4.1218 and 2.3001 mg GAE/g, respectively). Concerning antioxidant activities with ABTS radical scavenging assay, the ethanol extract exhibited the highest and the water extract exhibited the lowest (1.8241 and 0.0378 mg EEAC/g, respectively). The results were consistent with those from the DPPH radical scavenging assay compared to standard vitamin E, i.e. the ethanol extract exhibited the highest, while the water extract exhibited the lowest IC_{50} values (0.0749 and 1.4145 g/mL, respectively). Tested for the inhibitory effects of nitric oxide in the ATDC5 cells, the ethyl acetate extract exhibited the highest IC_{50} value at 44.4961 g/mL, while the hexane extract had no inhibitory effects. For the cytotoxicity test in the ATDC5 cells, the water extract, and ethanol and ethyl acetate extracts at a maximum concentration of 50 g/mL were not toxic to the cells. Altogether, the results indicated that ethyl acetate and ethanol were the optimum solvents for extracting the active antioxidants and nitric oxide inhibitors. These results confirmed that active herbal ingredients in this formula are good sources of antioxidants and nitric oxide inhibitors, which scientifically verify the properties of BAMRUNG-KHAIKHOR for osteoarthritis and rheumatoid arthritis pain relief.

Key words: antioxidant, anti-inflammatory, BAMRUNG-KHAIKHOR herbal formula, nitric oxide inhibition, ATDC5 cells

บทนำและวัตถุประสงค์

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ เช่น เชื้อโรค การตายของเซลล์จากการขาดเลือดหรือขาดออกซิเจน กระบวนการอักเสบสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) การอักเสบแบบเฉียบพลันจะเกิดขึ้นรวดเร็ว ภายในระยะเวลาเป็นวินาที หรือเป็นนาที หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและคงอยู่ประมาณ 2 ถึง 3 วัน แต่มักไม่เกิน 1 สัปดาห์ ลักษณะสำคัญของการอักเสบเฉียบพลัน คือ การบวมของเนื้อเยื่อ (edema) มีสารน้ำซึ่งมีโปรตีน (exudate) ภายในเนื้อเยื่อ และพบเซลล์อักเสบชนิด neutrophils ส่วนการอักเสบแบบเรื้อรังนั้นจะเกิดนานกว่า อาจเกิดตามหลังการอักเสบแบบเฉียบพลัน หรือเกิดจากร่างกายตอบ

สนองต่อสิ่งแปลกปลอมบางชนิดก็ได้ ขึ้นกับปัจจัยหลาย ๆ ด้าน ลักษณะสำคัญของการอักเสบเรื้อรัง คือ มีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดขึ้น (fibrosis) มีการสร้างหลอดเลือดขึ้นจำนวนมาก และพบเซลล์อักเสบชนิด macrophages และ lymphocytes ลักษณะทางคลินิกของการอักเสบ โดยเฉพาะการอักเสบเฉียบพลันจะประกอบอาการหลัก 4 อาการ คือ ปวด บวม แดง และร้อน[1] ปฏิกิริยาการอักเสบที่เกิดขึ้นในเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งจะหลั่งสารสื่อ (chemical mediators) ในการอักเสบชนิดต่าง ๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ พรอสตาแกลนดิน E2 และไซโตไคน์ เป็นต้น[2-3] การหลั่งสารสื่อการอักเสบต่าง ๆ ในปริมาณมากเกินไปจะทำให้มีการทำลายเนื้อเยื่อ หรือหลั่งเป็นระยะเวลาต่อเนื่องเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิวิทยาของโรคต่าง ๆ เช่น โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน ภาวะช็อกจากการติดเชื้อ โรคเบาหวาน และโรคอักเสบต่าง ๆ[2,4-5] การยับยั้งการหลั่งสารสื่อการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E2 ที่มากเกินไปนี้ เป็นทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ ปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติที่สามารถลดการผลิตสารสื่อการอักเสบเหล่านี้เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบที่มีประสิทธิผลสูง และมีผลข้างเคียงต่ำ ซึ่งพืชเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบ[6]

อนุมูลไนตริกออกไซด์ เป็นโมเลกุลขนาดเล็กซึ่งมีอิเล็กตรอนไม่อยู่เป็นคู่ สร้างขึ้นในเนื้อเยื่อ โดยอาศัยเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเตส เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอไลซ์ของอาร์จินีน ไปเป็นซิทูลลิน และมีการสร้างอนุมูลไนตริกออกไซด์ขึ้น อนุมูลไนตริกออกไซด์มีความสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นสูงมาก มีบทบาทสำคัญในการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนทางสรีรวิทยา เช่น กลไกการป้องกันของร่างกาย การคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ หรือการควบคุมภูมิคุ้มกัน ไนตริกออกไซด์ละลายได้ในของเหลวและไขมันและสามารถแพร่ผ่านน้ำ จะได้เป็นอนุมูลไนเตรทและไนไตรท์ เซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันก็สามารถสร้างอนุมูลไนตริกออกไซด์ระหว่างขั้นตอนการอักเสบ และอนุมูลไนตริก-ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ได้อนุมูลเปอร์ออกซิลไนไตรท์ ที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาสูงมาก สามารถทำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) และเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน[7] โดยพบว่าระดับของไนตริกออกไซด์ที่สูงขึ้นในเซลล์กระดูกอ่อนมีผลต่อการเกิดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนที่ผิวข้อในโรคข้อเข่าเสื่อม[8-9]

โรคข้อเข่าเสื่อม (osteoarthritis) เป็นสาเหตุอันดับแรกของอาการปวดข้อในคนอายุมากกว่า 40 ปีขึ้นไป หรือหลังวัยหมดประจำเดือน พบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชายประมาณ 3 เท่า เป็นโรคเรื้อรังที่ไม่ค่อยมีโรคแทรกซ้อนที่อันตรายร้ายแรง สาเหตุเกิดจากข้อเสื่อมตามวัย หรือข้อรับน้ำหนักมากเกินไป หรือมีการบาดเจ็บทำให้กระดูกอ่อนตรงผิวข้อต่อสึกกร่อนและมีกระดูกงอก (หินปูนเกาะ) ขรุขระ เวลาเคลื่อนไหวข้อจึงทำให้เกิดอาการปวดขัดในข้อ อาจมีสาเหตุมาจากกรรมพันธุ์ อายุมาก ความอ้วน อาชีพที่ต้องใช้ข้อมาก เป็นต้น การรักษาให้แอสไพรินหรืออินโดเมทาซิน[10] โรคปวดข้อรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) เป็นโรคเรื้อรังประเภทหนึ่งพบได้ประมาณร้อยละ 1-3 ของคนทั่วไป พบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชายประมาณ 4-5 เท่า และพบมากในช่วงอายุ 20-50 ปี แต่พบได้ในคนทุกเพศทุกวัย สาเหตุของโรคนี้พบว่ามีการอักเสบเรื้อรัง

ของเยื่อบุข้อเกือบทุกแห่งทั่วร่างกายพร้อม ๆ กัน ร่วมกับมีการอักเสบของพังผืดหุ้มข้อ เส้นเอ็นและกล้ามเนื้อรอบ ๆ ข้อ เชื่อว่าเป็นผลมาจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีการตอบสนองอย่างผิดปกติต่อเชื้อโรคหรือสารเคมีบางอย่าง ทำให้มีภูมิต้านทานที่เกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อในบริเวณข้อของตัวเอง เรียกว่าภูมิแพ้ต่อตัวเอง (autoimmune) การรักษาให้ยาแก้ปวดข้อและระงับข้ออักเสบ เช่น แอสไพริน อินโดเมทาซิน หรืออื่น ๆ[11]

ตำรับยาบำรุงไขข้อเป็นตำรับยาสมุนไพรในคัมภีร์โรคนิทาน และคัมภีร์ธาตุวิภังค์ ในตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ประกอบด้วยพืชวัตถุ 18 ชนิด และสัตว์วัตถุ 1 ชนิด (ตารางที่ 1) การศึกษาข้อมูลที่สหคลินิกการแพทย์แผนตะวันออก (ไทย-จีน) มหาวิทยาลัยรังสิต พบว่าตำรับยาบำรุงไขข้อเป็นตำรับยาสมุนไพรไทยที่ให้ผลการบรรเทาอาการปวดข้อเข่าปวดตึงในข้อได้ดี ซึ่งเป็นอาการที่พบในโรคข้อเข่าเสื่อมและโรคปวดข้อรูมาตอยด์ การศึกษานี้จึงมีความสนใจที่จะนำตำรับยานี้มาศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และทดสอบความเป็นพิษของตำรับยาบำรุงไขข้อต่อเซลล์กระดูกอ่อนหนู (ATDC-5 cell) เพื่อเป็น หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ประกอบสรรพคุณของยาตำรับตามภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย ได้ข้อมูลเพื่อพัฒนา

ตารางที่ 1 สมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยาบำรุงไขข้อ

สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ปริมาณ (ส่วน)
โกฐกระดูก	*Aucklandia lappa* DC.	2
โกฐกะกลิ้ง	*Strychnos nux-vomica* L.	2
โกฐกักกรา	*Pistacia integerrima* J.L.Stewart ex Brandis	2
รากแฝก	*Chrysopogon zizanioides* (L.) Boberty	2
แก่นมะหาด	*Artocarpus lacucha* Buch.-Ham.	2
แก่นปรู	*Alangium salviifolium* (L.f.) Wangerin	2
แก่นสนเทศ	*Platycladus orientalis* (L.) Franco	2
แก่นสักขี	*Dalbergia candenatensis* (Dennst.) Prain	2
ผลมะเมื่อย	*Gnetum montanum* Markgr.	2
รากมะตัน	*Garcinia schomburgkiana* Pierre.	2
รากประดงข้อ	*Piper retrofractum* Vahl.	2
กระดูกงูเหลือม	*Malayopython recticulatus*	2
แก่นเหมือดคน	*Simplocos racemosa* Roxb.	1
ใบส้มเสี้ยว	*Bauhinia malabarica* Roxb.	1
เหง้าส้มสันดาร	*Cissus hastata* Miq.	1
พริกไทย	*Piper nigrum* L.	1
เหง้าขิง	*Zingiber officinale* Roscoe.	1
รากคนทา	*Harrisonia perforata* (Blanco) Merr.	5
หัวข้าวเย็นเหนือ	*Smilax cerbularia* Kunth *subsp.corbularia*	10

ตำรับยาให้อยู่ในรูปแบบที่ทันสมัยมากขึ้นเพื่อลดขนาดการใช้ยาและเพิ่มประสิทธิผล เป็นทางเลือกในการลดหรือทดแทนการใช้ยาแก้ปวดและต้านอักเสบกลุ่มที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ (NSAID) ซึ่งมีผลข้างเคียงระคายเคืองกระเพาะอาหาร นอกจากนี้การศึกษาความเป็นพิษของตำรับยา เพื่อยืนยันความปลอดภัยของตำรับยานี้ และสนับสนุนให้เกิดการนำตำรับยาสมุนไพรไทยมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างปลอดภัย

สรรพคุณของตำรับยาบำรุงไขข้อคือ แก้ปวดในข้อกระดูก บรรเทาอาการข้อขัด ข้อตึง รูปแบบดั้งเดิมเป็นผงบดหยาบบรรจุแคปซูล รับประทานครั้งละ 3-4 แคปซูล วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น ก่อนอาหาร

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของตำรับยาบำรุงไขข้อ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 ของตำรับยาบำรุงไขข้อ

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ analytical balance (Satorius, Germany), autoclave (Tomy SX-700, Japan), centrifuge (Labortechnik Germany), CO2 incubator (Gibthai, Thai), hemocytometer (Japan), hot air oven (Memmert, Germany), inverted microscope (Nikon, Japan), micro pipette (Gilson,French), laminar air flow (Faster, Italy), microplate reader (Biotek Instruments, USA), pH meter (PB-10, Sartorius, Germany), rotary evaporator (IKA, Germany) และ water bath (BEC THAI, WNB45, Thai)

สารเคมี ได้แก่ absolute ethanol (Merck, Germany), ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)] (Sigma, USA), aluminium chloride (Sigma, USA), ascorbic acid (Sigma, USA), ATDC-5 mouse chondrogenic cell (Invitrogen, USA), d-alpha-tocopherol (Sigma, USA), dimethyl sulfoxide (Sigma, USA), DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich, Germany), DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) (Sigma, USA), ethyl acetate (commercial grade) (Sigma, USA), fetal bovine serum (Sigma, USA), Folin-Ciocalteu reagent (Carlo erba, Germany), gallic acid (Sigma, USA), griess reagent (Sigma, USA), hexane (commercial grade) (Sigma, USA), lipopolysaccharide (Sigma, USA), (L-nitro arginine (Sigma, USA), penicillin streptomycin (Invitrogen, USA), phosphate-buffered saline (Invitrogen, USA), potassium peroxodisulfate (Sigma, USA), และ vitamin E (Sigma, USA)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

จัดซื้อสมุนไพรจากแหล่งจำหน่าย ได้แก่ บริษัทเจริญสุขโอสถ เวชพงศ์โอสถ และเจ้ากรมเป๋อ ได้รับการตรวจทานชนิดของสมุนไพรจากอาจารย์แพทย์แผนไทยนพพันธุ์ ประกิจบุญญฤทธิ์ ผู้เชี่ยวชาญด้านเภสัชกรรมไทย และได้ทำการตรวจพิสูจน์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสมุนไพรตามหลักอนุกรมวิธาน นำไปเทียบเคียงกับตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงจากพิพิธภัณฑ์พืชกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ แล้วนำสมุนไพรแห้งที่

เป็นส่วนประกอบในตำรับมาล้างทำความสะอาด แล้วอบให้แห้ง บดแยกแต่ละชนิดให้เป็นผงบดหยาบแล้วนำมาผ่านแร่งเบอร์ 60 นำผงบดหยาบผสมกันตามอัตราส่วนเป็นตำรับยาบำรุงไขข้อ แล้วชั่งตัวอย่าง 100 กรัม แยกสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ชนิดละ 1,000 มิลลิลิตร ได้แก่ น้ำ โดยการเติมน้ำแล้วต้มจนปริมาตรลดลงเหลือ 1 ใน 3 ส่วนตัวทำละลายอีก 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 95% เอทิลอะซิเตท และ เฮกเซน แช่เป็นเวลา 7 วัน คนวันละ 1 ครั้ง แล้วกรองผ่านผ้าขาวบางและกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator)[12-13]

2.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิคความเข้มข้น 50-100 μg/ml โดยใช้เอทานอล 70% เป็นตัวทำละลาย

2.2.2 เตรียมสารละลายของสารสกัดความเข้มข้น 10 μg/ml โดยใช้ propylene glycol เป็นตัวทำละลาย แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 2 mg/ml ด้วยเอทานอล 70%

2.2.3 เตรียม positive control โดยใช้ 20% propylene glycol ในเอทานอล 70% เป็นตัวทำละลายสำหรับสารสกัด และเอทานอล 70% เป็นตัวทำละลาย

2.2.4 ปิเปตสารละลายในข้อ 2.2.2 จำนวน 100 μl และสารละลาย 10%v/v Folin-Ciocalteu จำนวน 200 μl ลงใน microtube ขนาด 2,000 μl บ่มเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 0.7 M sodium carbonate 800 μl ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปิเปตสารที่บ่มแล้วมา 200 μl ใส่ 96 well plate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ด้วย microplate reader โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิค แสดงค่าเป็น Gallic acid equivalent (GAE)[12-13] ทำ 5 ตัวอย่าง

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging Assay

2.3.1 เตรียมสารละลายวิตามินอีความเข้มข้น 0-50 μg/ml โดยใช้เอทานอล 70% เป็นตัวทำละลาย

2.3.2 เตรียมสารละลายของสารสกัดความเข้มข้น 1 μg/ml โดยใช้ propylene glycol เป็นตัวทำละลาย แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 200, 400 และ 800 mg/ml ด้วยเอทานอล 70%

2.3.3 เตรียม positive control โดยใช้เอทานอล 70% เป็นตัวทำละลาย

2.3.4 เตรียมสารละลาย 7 mM ABTS โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

2.3.5 เตรียมสารละลาย 2.45 mM potassium persulfate โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

2.3.6 เตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS โดยปิเปตสารละลาย 7mM ABTS และ 2.45 mM potassium persulfate มาอย่างละ 2.5 ml บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเจือจางด้วยเอทานอล 95%

2.3.7 ปิเปตสารละลายในข้อ 2.3.2 จำนวน 50 μl และสารละลายในข้อ 2.3.6 จำนวน 950 μl ลงใน microtube ขนาด 2,000 μl ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วปิเปตสารที่บ่มแล้วมา 200 μl ใส่ 96 well plate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วย microplate reader โดยเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินอี แสดงค่าเป็น vitamin E equivalent antioxidant capacity (EEAC)[13] ทำ 5 ตัวอย่าง

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี

DPPH radical scavenging assay

2.4.1 เตรียมสารละลายวิตามินอีความเข้มข้น 0-50 μg/ml โดยใช้เอทานอล 70% เป็นตัวทำละลาย

2.4.2 เตรียมสารละลายของสารสกัดความเข้มข้น 10 μg/ml โดยใช้ propylene glycol เป็นตัวทำละลาย แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 40, 80, 160, 320 และ 640 mg/ml ด้วยเอทานอล 70%

2.4.3 เตรียม positive control โดยใช้เอทานอล 70% เป็นตัวทำละลาย

2.4.4 เตรียมสารละลาย 0.2 mM DPPH โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย

2.4.5 ปิเปตสารละลายในข้อ 2.4.2 จำนวน 100 μl และสารละลายในข้อ 2.4.4 จำนวน 100 μl ลงใน 96 well plate ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วย microplate reader โดยเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินอี แสดงค่าเป็นการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50} value)[14] ทำ 5 ตัวอย่าง

2.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

ตำรับยาบำรุงไขข้อมือวัยวะเป้าหมายไปออกฤทธิ์ที่เซลล์กระดูกอ่อนที่ข้อเข่า จึงเลือกใช้ ATDC-5 mouse chondrogenic cell ซึ่งเป็นเซลล์กระดูกอ่อนข้อเข่าหนู จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ. เมื่อนำเซลล์มาทดสอบจะละลายที่อุณหภูมิ 37 °ซ. จากนั้นนำเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที และดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แยกออกทิ้ง แล้วนำไปเลี้ยงใน culture flask โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงชนิด DMEM/Ham's F-12 ซึ่งในอาหารจะมีส่วนประกอบของร้อยละ 5 fetal bovine serum, human transferrin 3×10^8 โมลาร์, penicillin 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร human transferrin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ sodium selenite 3×10^{-8} โมลาร์ จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้ CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ที่ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 °ซ. และ subcultured ทุก 2 วัน รอจนได้ปริมาณเซลล์หนาแน่นเต็มที่ เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย lipopolysaccharide (LPS) ที่ได้มาจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (055: B5) ให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์ โดยมีขั้นตอนการศึกษาโดยย่อดังนี้ เลี้ยงเซลล์ความเข้มข้น 80,000 cells/well ในอาหาร DMEM/Ham's F-12 ที่ไม่มี FBS 500 มิลลิลิตร ใน 24 well plate แล้วบ่มเซลล์ในตู้ CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว pretreat เซลล์ด้วยสารสกัดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วย 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร LPS ในอาหารปกติปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จากนั้นเติมตัวอย่าง ทดสอบลงไป 500 ไมโครลิตร และบ่มเซลล์ในตู้ CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายแต่ละหลุมมา 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate แล้วเติม griess reagent ลงในแต่ละหลุมอีก 100 ไมโครลิตร จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา griess reaction ตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เซลล์สร้างขึ้นที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่ายับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ และสร้างกราฟระหว่างค่ายับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์กับความเข้มข้นของตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น

3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยการทดลองนี้จะทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง โดยสารมาตรฐานที่ใช้ คือ L-nitroarginine (L-NA) คำนวณร้อยละการยับยั้งการสร้างไนตริก-ออกไซด์ การวัดปริมาณของไนตริกออกไซด์ที่หลั่งออกมา วัดในรูปของไนไตรท์ เนื่องจากไนตริกออกไซด์ที่หลั่งออกมาจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ได้เป็น dinitrogen tetraoxide และเมื่อทำปฏิกิริยาต่อกับน้ำจะได้ผลิตภัณฑ์คือไนเตรท และไนไตรท์ ซึ่งไนไตรท์จะทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide ในสารละลายที่เป็นกรดได้เป็นสารตัวกลางที่เป็นเกลือ diazonium ซึ่งสารตัวกลางนี้จะทำปฏิกิริยา N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrocholide (NED) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น azo compound ที่มีสีทำให้สามารถวัดปริมาณไนไตรท์ที่มีอยู่โดยวัดการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร[15]

2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 mouse chondrogenic cell โดยใช้วิธี 3-(4,5-dimethyl thiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Assay ซึ่งหลักการศึกษาจะอาศัยเอนไซม์ภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตรีดิวส์ MTT ที่เป็นสารสีเหลืองให้เป็นผลึก formazan สีม่วง หลังจากทดสอบสารตัวอย่างกับเซลล์ในตู้ CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (10 ไมโครลิตร 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงไปในแต่ละหลุมแล้วบ่มต่อใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายทิ้งไปแล้วเติมตัวทำละลายผลึก 100 ไมโครลิตร (เตรียมจาก 10 กรัม SDS + 83.7 ไมโครลิตร กรดไฮโดรคลอลิค ปรับปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น) เพื่อละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วย microplate reader (โดยสารที่ทดสอบจะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อค่าร้อยละการรอดชีวิตน้อยกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)[15]

ผลการศึกษา

การสกัดตำรับยาบำรุงไขข้อด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ น้ำ เอทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ได้น้ำหนักสารสกัดแห้งเท่ากับ 54.9734, 38.2612, 21.5723 และ 4.2564 กรัม ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักสารสกัดแห้งเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นของตำรับก่อนการสกัด (% yield) เท่ากับ 5.50, 2.16, 3.83 และ 0.98 ตามลำดับ

1. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ผลการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของตำรับยาบำรุงไขข้อ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ น้ำ เอทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน พบว่า สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด และสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมต่ำสุด โดยมีค่า gallic acid equivalent (GAE) เท่ากับ 4.82 และ 2.30 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยการทดสอบความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) พบว่าสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด มีค่าเฉลี่ย GAE แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาบำรุงไขข้อ

การทดสอบ	สารสกัด				
	น้ำ	เอทานอล	เอทิลอะซิเตท	เฮกเซน	วิตามินอี
Total phenolic (GEA)	2.30 ± 0.07[e]	4.12 ± 0.03[c]	4.82 ± 0.08[b]	3.71 ± 0.09[d]	
ABTS (EEAC)	0.0378 ± 0.02[e]	1.8241 ± 0.04[b]	0.9642 ± 0.02[c]	0.1950 ± 0.03[d]	
DPPH (IC_{50})	1.4145 ± 0.03[e]	0.0749 ± 0.06[b]	0.1103 ± 0.10[c]	0.6512 ± 0.09[d]	0.0544 ± 0.02

หมายเหตุ [b,c,d,e]ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2´-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline6--sulphonic acid) (ABTS) radical scavenging assay

พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด โดยมีค่า vitamin E equivalent antioxidant capacity (EEAC) เท่ากับ 1.8241 และ 0.0378 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินอีต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยการทดสอบความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) พบว่าสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด มีค่าเฉลี่ย EEAC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 2)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)

พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด median inhibitory concentration (IC_{50}) เท่ากับ 0.0749 และ 1.4145 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารมาตรฐานวิตามินอีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0544 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยการทดสอบความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) พบว่าสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด มีค่าเฉลี่ย IC_{50} แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 2)

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 โดย MTT Assay

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ถูกสร้างขึ้นโดยกระตุ้นด้วย LPS ของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 โดย MTT Assay ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ L-NA เป็นสารมาตรฐาน แสดงผลเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 [median inhibitory concentration (IC_{50})] ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเอทานอลและน้ำ (IC_{50} เท่ากับ 44.4961 และ 46.7576 และ > 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และสารสกัด

เฮกเซนไม่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ในการคำนวณค่า IC_{50} ไม่ได้นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาคำนวณ เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวของสารสกัดทุกตัวทำละลายมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่าร้อยละ 80 แสดงว่าที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ ATDC-5 ของสารสกัดจากตำรับยาบำรุงไขข้อ

	สารสกัดร้อยละการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (μg/ml)					IC_{50}
	3.125	6.25	12.50	25.00	50.00	μg/ml
เฮกเซน	ไม่ได้ทดสอบ	ไม่ได้ทดสอบ	ไม่ได้ทดสอบ	ไม่ได้ทดสอบ	ไม่ได้ทดสอบ	ไม่ได้ทดสอบ
เอทิลอะซิเตท	6.7669 ± 0.04	13.1579 ± 0.07	17.2181 ± 0.09	29.0978 ± 0.10	56.0150 ± 0.26	44.4916
เอทานอล	11.0526 ± 0.11	12.7068 ± 0.05	16.4661 ± 0.03	23.1578 ± 0.04	56.0150 ± 0.13	46.7576
น้ำ	7.6692 ± 0.08	10.2255 ± 0.10	11.0526 ± 0.03	13.4587 ± 0.07	18.3458 ± 0.02	> 50
L-NA	25.0550 ± 0.37	36.6550 ± 0.13	51.7200 ± 0.59	60.8400 ± 0.38	81.8350 ± 0.43	18.2744

*ค่า IC_{50} ของตัวอย่างทดสอบน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ L-NA ที่ $p < 0.05$

อภิปรายผล

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้ เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ด้วยวิธี 2,2´-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical scavenging assay และ 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging assay ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจาก ABTS และ DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร[16] โดยอนุมูล DPPH° เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่มีความคงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอิสระอยู่แล้ว ไม่ต้องทำปฏิกิริยาให้เกิดอนุมูล เป็นการวัดความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม ซึ่งเป็นวิธีเบื้องต้นที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยทั่วไป ส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\circ+}$ เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกซี เนื่องจาก $ABTS^{\circ+}$ เป็นอนุมูลอิสระที่สลายตัวในอนุมูลเปอร์ออกซี ซึ่งการทดสอบทั้ง 2 วิธีนี้ ทำปฏิกิริยาในตัวกลางที่เป็นสารอินทรีย์ (organic solvent) แต่เซลล์ในร่างกายมนุษย์อยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำ หรือมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยน้ำ เพราะฉะนั้นควรมีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในตัวกลางที่เป็นน้ำด้วย สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่มีวงเบนซีนเป็นองค์ประกอบและมีหมู่แทนที่เป็น hydroxyl group อย่างน้อย 1 หมู่ ทำให้มีความเป็นขั้วสูง จึงสามารถสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น เอทานอล และเอทิลอะซิเตท และพบว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพดี[17-19] จากการศึกษาพบว่าการสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน จะทำให้สารสกัดที่ได้มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่แตกต่าง

กัน ซึ่งสารสกัดเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดเอทานอล และสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด จากการทดสอบฤทธิ์ทั้ง 2 วิธี ซึ่งเอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) มีขั้ว ส่วนเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ โดยมีความจำเพาะ (selectivity) ในการละลายมากกว่า[20] มีการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารบริสุทธิ์หรือสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและชีวภาพ รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ สารสกัดจากธรรมชาติบางชนิดนอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วยังมีคุณสมบัติต้านการอักเสบร่วมด้วย[21-22] สารประกอบฟีนอลิกโดยเฉพาะกลุ่ม flavonoid ในพืชสมุนไพรหลายชนิดทั้งในรูปสารบริสุทธิ์หรือสารสกัดสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์ RAW264.7 เช่น rutin, quercetin, apigenin, wogonin, luteolin, tectorignin, galangin, morin, naringenin, epi-gallocatechin galllate, *Ginko biloba* extract (Egb 761), silymarin, hesperidin, pycnogenol, grape seed extract เป็นต้น[23-30] ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่แสดงว่าสารสกัดจากพืชหลากหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ ในเซลล์ RAW264.7 และฤทธิ์ทางด้านชีวภาพอื่น ๆ รวมทั้งฤทธิ์ต้านการอักเสบ เช่น curcumin จากขมิ้นชัน resveratrol จากเปลือกองุ่น ไวน์แดง และสารสกัดจากพืชอื่น ๆ อีกมากมายเป็นต้น[21,31] นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกโดยเฉพาะกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น apigenin, genistein และ kaempferol เมื่อบ่มล่วงหน้ากับเซลล์ RAW264.7 สามารถยับยั้งการแสดงออกของไนตริกออกไซด์ที่กระตุ้นด้วย LPS ได้[26-27] ดังนั้นสารสกัดตำรับยาบำรุงไขข้อซึ่งประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิก จึงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วย นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ข้อสรุป

ผลการหาปริมาณฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของตำรับยาบำรุงไขข้อ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ น้ำ เอทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด แต่สารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตัวทำละลายอื่น และมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์สูงที่สุดด้วย อาจเป็นเพราะเอทานอลสามารถสกัดสารอื่นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า เอทิลอะซิเตทและเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ที่อาจอยู่ในรูปฟีนอลอิสระ (free phenols) หรือในรูปกลัยโคไซด์ และมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ ซึ่งให้ผลดีต่อสุขภาพในการต้านการอักเสบของข้อเข่าจากอนุมูลอิสระและไนตริกออกไซด์ แต่ต้องใช้ในขนาดที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการเกิดพิษ การศึกษานี้เป็นการเริ่มต้นของการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ต่อเซลล์ ATDC-5 mouse chondrogenic cell ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ดังนั้นควรนำสารสกัดดังกล่าวไปศึกษาใน chondrogenic cell ที่แยกได้จากกระดูกข้อเข่าของมนุษย์แบบ *in vitro* และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบ *in vivo* ซึ่งอาจให้ผลที่เหมือนหรือแตกต่างออกไป จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาต่อ

ไปในอนาคต เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนสรรพคุณของตำรับยาบำรุงไขข้อในการช่วยบรรเทาอาการข้อเข่าเสื่อมและโรคปวดข้อรูมาตอยด์ เป็นแนวทางในการพัฒนาตำรับยาให้อยู่ในรูปแบบเภสัชภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ทันสมัยทั้งรูปแบบรับประทานและใช้ภายนอกเพื่อลดปริมาณการใช้ยาต่อครั้งและเพิ่มประสิทธิผลด้านการรักษา หรือเป็นทางเลือกในการลดหรือทดแทนการใช้ยาแก้ปวดข้อและระงับข้ออักเสบ (NSAID)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยรังสิต ปีงบประมาณ 2564

References

1. Sitthichaiyakuk P. Acute and chronic inflammation. Phitanulok: Faculty of Medicine Naresuan University; 2011. 19 p. (in Thai)
2. Van der Vliet A, Eiserich JP, Cross CE. Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease?. Respir Res. 2000;1(2):67-72.
3. Jung H-W, Seo U-K, Kim J-H, Leem K-H, Park Y-K. Flower extract of *Panax notoginseng* attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response via blocking of NF-KappaB signaling pathway in murine macrophages. J Ethnopharmacol. 2009;122(2):313-9.
4. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. Int Immunopharmacol. 2001;1(8):1397-406.
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. Huang W-H, Lee A-R, Yang C-H. Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Biosci Biotechnol Biochem. 2006;70(10):2371-80.
7. Aengpanit W. Oxidative stress. Free radicals and antioxidants. Chiang Mai: Innovation publishing, Faculty of Medicine, Chiang Mai University; 2012. p.50-1. (in Thai)
8. Håuselmann HJ, Stefanovic-Racic M, Michel BA, Evans CH. Differences in nitric oxide production by superficial and deep human articular chondrocytes: implications for proteoglycan turnover in inflammatory joint diseases. J Immunol. 1998;160(3):1444-8.
9. Boileau C, Martel-Pelletier J, Moldovan F, Jouzeau J-Y, Netter P, Manning PT, Pelletier J-P. The in situ up-regulation of chondrocyte interleukin-1-converting enzyme and interleukin-18 levels in experimental osteoarthritis is mediated by nitric oxide. Arthritis Rheum. 2002;46(10):2637-47.
10. Archanupap S. Osteoarthritis: textbook of medicine. Bangkok: Reankhaw Karnpim; 1989. p. 461-2.
11. Archanupap S. Rheumatoid arthritis: textbook of medicine. Bangkok: Reankhaw Karnpim; 1989. p. 463-5.
12. Zieliński H, Kozłowska H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. J Agric Food Chem. 2000;48(6):2008-16.
13. Suthajit M, Khalsuwan U, Suthajit S, Kheawsuriya P, Sinchaikit P. Potential of herbal active ingredient. Chiang Mai: Faculty of Medicine Chiang Mai University; 2000. (in Thai)
14. Sânchez-Moreno C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Science and Technology International. 2002;8(3):121-37.
15. Iacono A, Gômez R, Sperry J, Conde J, Bianco G, Meli R, Gômez-Reino JJ, Smith AB, Gualillo O. Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line. Arthritis Rheum. 2010;62(6):1675-82.
16. Ahmad R, Ali AM, Israf DA, Ismail NH, Shaari K, Lajis NH. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some Hedyotis species. Life Sci. 2005;76(17):1953-64.
17. Wacharakup O, Sripa K, Chathasas D. Anti-free radical. Bangkok: P.S. Print; 2006. (in Thai)
18. Jimênez-Ecrig A, Jimênez I, Pulido R, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2001;81(5):530-4.
19. Nagai T, Yukimoto T. Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. J. Food Chem. 2003;81(3):327-32.
20. Inthranupakorm R. Herbal extraction, preparation and isolation of active ingredient by chromatography. Bang-

kok: Chamchuri Production; 2013. (in Thai)

21. Calixto JB, Otuki MF, Santos ARS. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). Planta Med. 2003;69(11):973-83.
22. Kris-Etherton PM, Lefevre M, Beecher GR, Gross MD, Keen, CL. Etherton TD. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. Annu Rev Nutr. 2004;24:511-38.
23. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. Immunol Today. 1992;13(5):157-60.
24. Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. Biochem Pharmacol. 1999;58(5):759-65.
25. Raso GM, Meli R, Carlo GD, Pacilio M, Carlo RD. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. Life Sci. 2001;68(8):921-31.
26. Kobuchi H, Droy-Lefaix MT, Christen Y, Packer L. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW264.7. Biochem Pharmacol. 1997;53(6):897-903.
27. Sakata K, Hirose Y, Qiao Z, Tanaka T, Mori H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. Cancer Lett. 2003;199(2):139-45.
28. Chan MM, Fong D, Ho CT, Huang HI. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. Biochem Pharmacol. 1997;54(12):1281-6.
29. Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang K-H. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. J Pharmacol Exp Ther. 2002;302(1):138-44.
30. Komutarin T, Azadi S, Butterworth L, Keil D, Chitsomboon B, Suttajit M, Meade BJ. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages *in vitro* and *in vivo*. Food Chem Toxicol. 2004;42(4):649-58.
31. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-Kappa B activation. Mutat Res. 2001;480-481:243-68.