



การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาสมุนไพรรักษาแผลเรื้อรัง

A Study of Antioxidant Activity in Thai Herbal Recipe for the Treatment of Chronic Wounds

พันสร รัตนมา* จุลาลักษณ์ โชคไพศาล และสุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ

Phansorn Rattanama* Julalak Chokpaisan and Surasak limsuwan

คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา ประเทศไทย

Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand

*Corresponding author, E-mail: phansorn@hotmail.co.th

บทคัดย่อ

ปัญหาแผลเรื้อรังที่พบในปัจจุบันเกิดจากการที่แผลอยู่ในระยะการอักเสบที่ยาวนานและไม่สามารถหายได้ตามกลไกของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ทั้งนี้มีสาเหตุมาจากหลากหลายปัจจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการอักเสบเรื้อรังที่เป็นปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างอนุมูลอิสระเพื่อสลายเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลและส่งผลให้แผลหายช้า ซึ่งหากยารักษาแผลสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ ก็จะมีผลทำให้ลดปัจจัยส่งเสริมในการทำให้เกิดแผลเรื้อรัง จากการศึกษาท่อน้ำพบว่า ยาสมุนไพรมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีโดยการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อสร้างความเสถียร ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำตำรับยาสมุนไพรรักษาแผลเรื้อรังที่ใช้ในการแพทย์พื้นบ้านภาคใต้ โดยประกอบไปด้วยสมุนไพร 6 ชนิด คือ ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ข้าวสาร (*Oryza sativa* L.) ใพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) หมากสง (*Areca catechu* L.) และเถาเลื้อยเทศ (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) มาศึกษาถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay และ ABTS scavenging assay ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลของตำรับยาสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.15 ± 0.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.11 ± 0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าตำรับยารักษาแผลเรื้อรังจากสมุนไพรสามารถช่วยลดอนุมูลอิสระในหลอดทดลองได้ดี จึงควรค่าแก่การนำไปศึกษาต่อในฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล เพื่อพัฒนาจากสมุนไพรให้เป็นที่ยอมรับและนำไปใช้ได้แพร่หลายมากขึ้น

คำสำคัญ: ยาสมุนไพร, อนุมูลอิสระ, แผลเรื้อรัง



Abstract

Currently, chronic wounds are caused by several factors, especially a chronic inflammatory response. The prolonged inflammation leads to a production of a large number of free radicals that can cause wounded tissue. Therefore, it is significant to seek a new therapeutic approach that can inhibit free radicals and eradicate the aggressive inflammatory reaction for chronic wound treatment.

If a wound healing drug inhibits free radicals, it can decrease factors causing chronic wounds. A previous study showed that herbal medicines had radical scavenging activities. Therefore, this study aimed to evaluate a southern Thai herbal recipe in the treatment of chronic wounds.³ The recipe consisted of six medicinal plants, including *Curcuma longa* L., *Oryza sativa* L., *Zingiber cassumunar* Roxb., *Garcinia mangostana* L., *Areca catechu* L., and *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. The recipe was studied for its *in-vitro* anti-oxidant activity by DPPH scavenging assay and ABTS scavenging assay. The result showed the DPPH and ABTS⁺ antioxidant activity of Thai herbal recipe ethanol extract with IC₅₀ values at 15.15±0.06µg/ml and 6.11±0.02µg/ml, respectively. According to the results, this Thai herbal recipe could reduce free radicals in *in-vitro*. Therefore, it is worthwhile to study other biological activities associated with wound healing process that can scientifically prove the activity of the recipe.

Keyword: Thai herbal, Anti-oxidant, Chronic wound

1. บทนำ

แผลคือรอยแยกที่เกิดขึ้นบริเวณผิวหนัง โดยอาจเกิดจากการประสบอุบัติเหตุหรือโดนของมีคมบาด เมื่อมีบาดแผลเกิดขึ้นร่างกายจะมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและเริ่มกระบวนการหายของแผลซึ่งแบ่งเป็น 4 ระยะ คือ ระยะห้ามเลือด ระยะอักเสบ ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์และระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ (Guo & Dipietro, 2010) แต่ในขณะเดียวกันหากมีปัจจัยอื่นๆเกิดแทรกซ้อนแผลจะส่งผลให้มีการหายที่ล่าช้านำไปสู่การเกิดแผลเรื้อรัง ซึ่งแผลลักษณะนี้จะมีระยะการอักเสบที่ยาวนาน ส่งผลให้การเสริมสร้างเนื้อเยื่อใหม่บริเวณแผลช้าลง ปัจจัยแทรกซ้อนที่มีผลต่อกระบวนการหายของแผลมีหลายปัจจัยเช่น โรคประจำตัว ภาวะโภชนาการ อายุ การติดเชื้อ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระในกระบวนการหายของแผลที่ส่งผลให้แผลหายช้า เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นอะตอมที่มีอิเล็กตรอนโคเดเดี่ยวซึ่งไม่มีความเสถียรแต่มีความว่องไวมาก จึงสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ง่ายกับโมเลกุลอื่นและก่อให้เกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันและการสลายเปอร์ออกไซด์ นำไปสู่การเกิดแอลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ ทั้งยังไปมีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีน นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอ (รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย, 2555) ซึ่งในกระบวนการหายของแผลมีการปล่อยอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ที่มาจากขั้นตอนการจับกินเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาวที่เรียกว่า ฟาโกไซโทซิส (Dunnill *et al*, 2017) โดยจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจนมาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็นอนุมูลอิสระดังกล่าวหากมีในปริมาณที่เหมาะสมจะมีผลต่อการอักเสบและ



การทำลายเนื้อเยื่อในระยะสั้น แต่หากมีการสร้างอนุมูลอิสระที่มากขึ้นจะกระตุ้นให้เกิดสารตัวกลางที่นำไปสู่โรคเรื้อรังขนาดใหญ่และมีผลกระตุ้นการเพิ่มอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ ได้ จากข้อมูลดังกล่าวมาข้างต้น การที่แผลจะสามารถหายเป็นปกติตามระยะเวลาที่เหมาะสม จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องลดกระบวนการสร้างอนุมูลอิสระ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าในพืชสมุนไพรมีคุณสมบัติดักจับอนุมูลอิสระได้ดี โดยมีกลไกการทำงานคือ จะมีการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อสร้างความเสถียร ซึ่งการศึกษานี้มีความสนใจในตำรับยาสมุนไพรของหมอพื้นบ้านที่มีสรรพคุณในการรักษาแผลเรื้อรัง มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยในตำรับยาดังกล่าวมีสมุนไพร 6 ชนิดดังนี้ ขมิ้นชัน ข้าวสาร ไพล เปลือกมังคุด หนามแดง และเสลดเทศ โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกสกัดสารเอทานอลเนื่องจากก่อนหน้านี้มีการศึกษาสารสกัดสมุนไพร 4 ชนิด คือ ขมิ้นชัน ข้าวสาร เปลือกมังคุด และหนามแดง พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (Chusri *et al*, 2013) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกนำสารสกัดเอทานอลของตำรับยา รักษาแผลเรื้อรังมาศึกษาข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เพื่อที่จะช่วยสนับสนุนการใช้ตำรับยาสมุนไพรของการแพทย์แผนไทยให้กว้างขวางยิ่งขึ้น

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของตำรับยาสมุนไพรรักษาแผลเรื้อรัง ที่ประกอบด้วย ขมิ้นชัน ข้าวสาร ไพล เปลือกมังคุด หนามแดง และเสลดเทศ
2. เพื่อสนับสนุนการใช้ตำรับยาสมุนไพรไทย

3. อุปกรณ์และวิธีการ / วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สมุนไพรและสารเคมี

ในการศึกษานี้ใช้สมุนไพรจากร้านไทรบุรี อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา สารเคมีที่ใช้ได้แก่ สารอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) จาก ALDRICH สารอนุมูลอิสระ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS⁺) จาก SIGMA สาร Dimethyl sulfoxide (DMSO) จาก Fisher chemical สาร Potassium persulphate (K₂SO₈) จาก Ajax Finechem สาร Phosphate bufferes saline (PBS) จาก Sigma สาร Trolox จาก Sigma เครื่องมือ Rotary evaporator จาก Heidolph เครื่องมือ Microplate reader จาก Scientific production

3.2 การเตรียมสารสกัดตำรับยาสมุนไพร

นำสมุนไพรมาชั่งน้ำหนักตามสัดส่วนของตำรับยา ซึ่งเป็นสัดส่วนของสูตรตำรับที่อ้างอิงจากหมอพื้นบ้าน ดังแสดงในตารางที่ 1



ตารางที่ 1 สัดส่วนและน้ำหนักของสมุนไพรในตำรับยาแก้โรคเรื้อรัง

สมุนไพร	สัดส่วนในตำรับยา	น้ำหนัก (กรัม)
ขมิ้นชัน	1	500
ข้าวสาร	5	2,500
ไพล	1	500
เปลือกมังคุด	1	500
หมากสง	1	500
สีเสียดเทศ	1	500

จากนั้นนำมาล้างทำความสะอาด แล้วอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปบดหยาบด้วยเครื่องบดสมุนไพร และนำไปหมักด้วยเอทานอล 95 % ปริมาณ 5 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดให้นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง กระดาษกรองเบอร์ 4 และกระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman® Grade 1 filter paper) ตามลำดับ จนสารสกัดมีลักษณะใส ไม่มีตะกอน แล้วจึงนำไประเหยเอทานอลออกโดยใช้เครื่อง Evaporator ซึ่งเป็นเครื่องสุญญากาศแบบหมุน นำสารสกัดที่ได้ไปตั้งบน Water bath เพื่อระเหยเอทานอลส่วนที่ยังเหลือออกให้จนหมด จนกว่าจะได้ลักษณะสารสกัดข้นเหนียวและมีน้ำหนักคงที่ จึงจะเก็บสารสกัดในภาชนะที่ปิดแสงและอยู่ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาคำนวณค่าน้ำหนักร้อยละ (%yield) จากสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\% \text{yield} = (\text{น้ำหนักจริง} / \text{น้ำหนักตามทฤษฎี}) \times 100$$

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radicals scavenging assay

เตรียมอนุมูลอิสระ DPPH โดยนำไปละลายด้วย Methanol และเตรียมสารสกัดตำรับยาสมุนไพรละลายด้วย DMSO เจือจางแบบ 2-fold dilution ให้ได้ 6 ความเข้มข้น ดังนี้ 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91 และ 1.95 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการหยดสารที่ต้องการทดสอบลงใน 96-well plate แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Sample กลุ่ม Blank และ กลุ่ม Control โดยในกลุ่ม Sample ทำการเติมสารสกัดตำรับยาสมุนไพร 20 ไมโครลิตร และ อนุมูลอิสระ DPPH 180 ไมโครลิตรสำหรับกลุ่ม Blank ทำการเติมสารสกัดตำรับยาสมุนไพร 20 ไมโครลิตร และ Methanol 180 ไมโครลิตร และสำหรับกลุ่ม Control เติม DMSO 20 ไมโครลิตรและอนุมูลอิสระ DPPH 180 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (Song *et al.*, 2017) โดยมีสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ คือ Trolox ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของวิตามินอี โดยเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดี นิยมใช้ เป็นสารมาตรฐานในการวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้



$$\% \text{ DPPH inhibition} = [(Abs_c - Abs_s) / Abs_c] \times 100$$

Abs_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่ม Control

Abs_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่ม Sample

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

เตรียมอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ โดยผสมสารละลาย ABTS กับสารละลาย K_2SO_8 เข้าด้วยกันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย ABTS มาเจือจางด้วยสารละลาย PBS แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย $ABTS^+$ อยู่ในช่วง 0.7 ± 0.02 จากนั้นเตรียมสารสกัดตำรับยาสมุนไพรละลายด้วย DMSO เจือจางแบบ 2-fold dilution ให้ได้ 6 ความเข้มข้น ดังนี้ 28.40, 14.20, 7.10, 3.55, 1.78 และ 0.89 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อจากนั้นทำการหยดสารที่ต้องการทดสอบลงใน 96-well plate แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Sample กลุ่ม Blank และกลุ่ม Control โดยในกลุ่ม Sample ทำการเติมสารสกัดตำรับยาสมุนไพร 20 ไมโครลิตรและ อนุมูลอิสระ $ABTS^+$ 200 ไมโครลิตรสำหรับกลุ่ม Blank ทำการเติมสารสกัดตำรับยาสมุนไพร 20 ไมโครลิตร และสารละลาย PBS 180 ไมโครลิตร และสำหรับกลุ่ม Control ทำการเติมอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณค่าที่วัดได้เป็นความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) (Song *et al*, 2017) โดยสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ คือ Trolox นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ ABTS inhibition} = [(Abs_c - Abs_s) / Abs_c] \times 100$$

Abs_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่ม Control

Abs_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่ม Sample

3.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำและคำนวณผลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ Standard deviation)

4. ผลการวิจัย

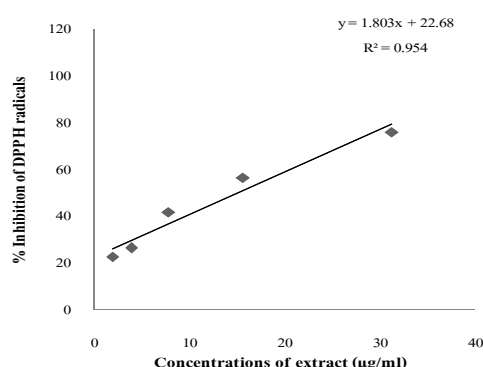
4.1 ผลการเตรียมสารสกัดเอทานอลของตำรับยารักษาแผลเรื้อรัง

จากการนำตำรับยารักษาแผลเรื้อรังที่ประกอบด้วยสมุนไพร 6 ชนิด คือ ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน มาสกัดด้วยเอทานอล พบว่าสารสกัดที่ได้หลังจากระเหยเอทานอลออกแล้ว มีลักษณะกึ่งแข็ง เหนียวและเหนียว สีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว โดยน้ำหนักสารสกัดที่ได้คือ 375.22 กรัม และนำมาคำนวณเป็นค่าน้ำหนักร้อยละ (%yield) ได้เท่ากับ 5.74 %



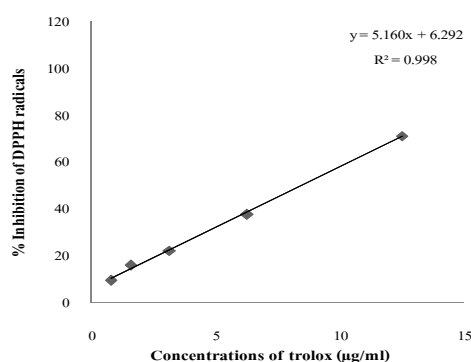
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radicals scavenging assay

จากการนำสารสกัดด้วยเอทานอลมาศึกษาความสามารถ ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ โดยที่ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น (Dose dependent) ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ได้จากการคำนวณสมการเส้นตรง $y = mx + c$ ของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล จะได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 15.15 ± 0.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล

และในสารมาตรฐาน Trolox พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระยังมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น (Dose dependent) ดังแสดงในรูปที่ 2 เมื่อนำมาคำนวณตามสมการเส้นตรง $y = mx + c$ ของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox จะได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 8.47 ± 0.13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

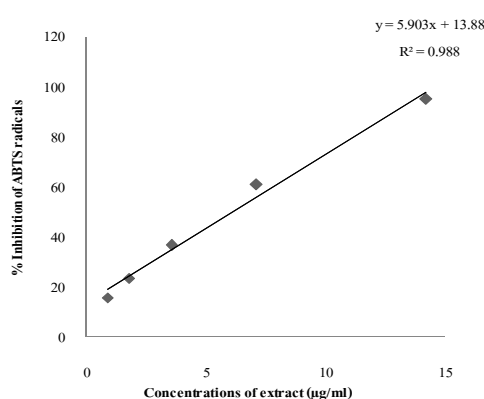


รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox



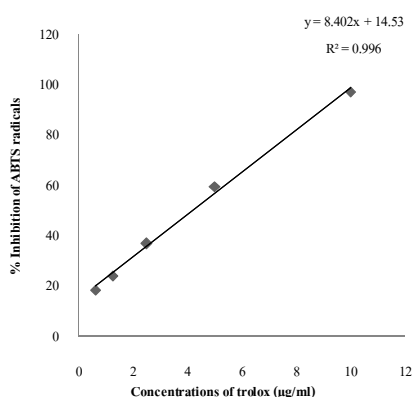
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

จากการนำสารสกัดด้วยเอทานอลมาศึกษาความสามารถ ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS⁺ พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ โดยที่ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระยังมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น (Dose dependent) ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ได้จากการคำนวณสมการเส้นตรง $y = mx + c$ ของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺ กับความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล จะได้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 6.11±0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺ กับความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล

และในสารมาตรฐาน Trolox พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ได้และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระยังมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น (Dose dependent) ดังแสดงในรูปที่ 2 เมื่อนำมาคำนวณตามสมการเส้นตรง $y = mx + c$ ของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺ กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox จะได้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.22±0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺ กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS⁺

สารทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	
	อนุมูลอิสระ DPPH	อนุมูลอิสระ ABTS ⁺
สารสกัด	15.15±0.06	6.11±0.02
สารมาตรฐาน Trolox	8.47±0.13	4.22±0.02

5. การอภิปรายผล

การรักษาแผลเป็นหนึ่งในการรักษาที่มีมาอย่างยาวนานตั้งแต่อดีต เนื่องจากส่งผลต่อคุณภาพชีวิต และการเจ็บป่วยหากแผลรักษาไม่หายหรือดูแลไม่ดีเพียงพอ อาจทำให้เกิดการติดเชื้อลุกลามหรือเกิดเนื้อเน่าตาย นำไปสู่การตัดอวัยวะ ก่อเกิดเป็นความพิการ ที่จะส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวันและการประกอบอาชีพ ฉะนั้นการลดปัจจัยการเกิดแผลเรื้อรังจึงเป็นเรื่องสำคัญอย่างยิ่ง โดยในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาผลของตำรับยาสมุนไพรที่ใช้ในการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาบาดแผล จากการศึกษาพบว่าตำรับยาดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในการทำให้เกิดแผลอักเสบเรื้อรัง โดยปกติอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นในกระบวนการรักษาแผลจะมาจากขั้นตอนของการอักเสบ ซึ่งมีส่วนช่วยในการทำงานของเม็ดเลือดขาว การหลั่ง Growth factors และ Cytokines เพื่อกระตุ้นการอักเสบ (Sen *et al*, 2002) แต่หากมีในระดับมากเกินไปก็จะสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่ออย่างรุนแรงหรืออาจทำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตผิดปกติได้ (Subrahmanyam, 1998) จากการสำรวจพบว่าในประเทศสหรัฐอเมริกา มีผู้ป่วยซึ่งมีบาดแผลที่ไม่หายตามระยะเวลาปกติ ส่งผลให้เป็นแผลเรื้อรังมากถึง 6.5 ล้านคน รัฐบาลต้องเสียค่าใช้จ่ายดูแลผู้ป่วยกลุ่มนี้มากกว่า 25 พันล้านเหรียญสหรัฐต่อปี ซึ่งคิดเป็นค่าใช้จ่าย 2 - 4% ของด้านสาธารณสุขทั้งหมด (Sen *et al*, 2009) จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าตำรับยาสมุนไพรรักษาแผลเรื้อรัง ที่ประกอบไปด้วย ขมิ้นชัน ข้าวสาร เปลือกมังคุด ไพล หนามแดง และสีเสียดเทศ มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ต่อก่อนอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺ เท่ากับ 15.15±0.06 และ 6.11±0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรในตำรับยามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Trolox ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.22±0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ การให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย K₂S₂O₈ ซึ่งอนุมูลอิสระชนิดนี้มีความใกล้เคียงกับอนุมูลอิสระในร่างกาย เนื่องจากมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา การทดลองนี้จึงเป็นตัวแทนในการจำลองการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายของตำรับยาสมุนไพรรักษาแผลเรื้อรังได้ดี จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสมุนไพรเดี่ยวในตำรับยามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี อันเนื่องมาจากสมุนไพรแต่ละชนิดมีสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิก โดยสารกลุ่มนี้จะพบมากในพืช และจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่บนโครงสร้างวงแหวน ซึ่งสามารถให้อิเล็กตรอนอะตอมแก่อนุมูลอิสระเพื่อสร้างความเสถียรได้ (สุพัตรา ปรศุพัฒนา และคณะ, 2555) โดยการศึกษาของ Zhang *et al*, (2017) พบว่าในขมิ้นชันมีสารสำคัญ คือ Curcumin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Leelarungrayub



et al, (2017) พบว่า ในโพลีมีสารสำคัญ คือ Curcumin เช่นเดียวกัน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หากมอง มีสารสำคัญ คือ Catechin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า IC_{50} 5.34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Khan *et al*, 2011) และสี่เสียดเทศ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ถึง 85.98% (Kassim *et al*, 2011) จากข้อมูลกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อนำสมุนไพรเดี่ยวมารวมเป็นตำรับส่งผลให้สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีเช่นเดียวกัน ดังนั้นตำรับยาสมุนไพรรักษาแผลเรื้อรังของหมอพื้นบ้านแผนไทยจึงสามารถเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการช่วยต้านอนุมูลอิสระเพื่อลดการเกิดแผลเรื้อรังในผู้ป่วย

6. บทสรุป

สารสกัดเอทานอลของตำรับยารักษาแผลเรื้อรังที่ประกอบด้วยสมุนไพร คือ โพล ขมิ้นชัน สี่เสียดเทศ หากมอง เปลือกมังคุด และข้าวสาร มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี เมื่อทำการทดสอบในหลอดทดลองด้วยวิธี DPPH radicals scavenging assay และ ABTS radical scavenging assay ซึ่งเป็นฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผลผ่านกลไกการดักจับอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาฤทธิ์ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการอักเสบ เพื่อเป็นการศึกษาถึงฤทธิ์การหายของแผลในตำรับยารักษาแผลเรื้อรังได้มากยิ่งขึ้น

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ หมอ สมพร ชาวงนิชย์สกุล ที่ให้องค์ความรู้เรื่องตำรับยาสมุนไพรรักษาแผลของหมอพื้นบ้าน และขอบคุณคณะกรรมการแพทย์แผนไทยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสถานที่วิจัยในครั้งนี้

8. เอกสารอ้างอิง

รัตน์า บรรณกิจพงศ์ชัย. (2555). อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค. ใน วรพล เองวานิช (บ.ก.). *อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ* (น.92-98). เชียงใหม่: สำนักพิมพ์นวัตกรรมสุขภาพ.

สุพัตรา ปรสุพัฒนา, ชลธิชา เทพหินลับ และไมตรี สุทธิจิตต์. (2555). อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค. ใน วรพล เองวานิช (บ.ก.). *สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่วิตามิน* (น.234-243). เชียงใหม่: สำนักพิมพ์นวัตกรรมสุขภาพ.

Chusri, S., Settharaksa, S., Chokpaisarn, J., Limsuwan, S., Voravuthikunchai, S.P, (2013). Thai herbal formulas used for wound treatment: A study of their anti-bacterial potency, anti-inflammatory, anti-oxidant and aytotoxicity effects. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 19, 671- 676.
doi: 10.1089/acm.2012.0625

Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., Leaper, D., Georgopoulos, N.T. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-



- modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal* 14, 89-96.
doi: 10.1111/iwj.12557
- Guo, S., Dipietro, L.A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research* 89, 219-229.
doi: 10.1177/0022034509359125
- Khan, S., Mehmood, M.H., Ali, A.N., Ahmed, F.S., Dar, A., Gilani, A.H.(2011). Studies on anti-inflammatory and analgesic activities of betel nut in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 135, 654-661.
doi: 10.1016/j.jep.2011.03.064
- Kassim, J., Hassin, H., Achmad, A., Dahon, H., Suan, K., Hamdan, S. (2011). Determination of total phenol, condensed tannin and flavonoid contents and antioxidant activity of *Uncaria gambir* extract. *Journal of Majalah Farmasi Indonesia* [Online]. Available from:
<https://indonesianjpharm.farmasi.ugm.ac.id/index.php/3/article/view/593>
- Leelarungrayub, J., Manorsoi, J., Manorsoi, A. (2017). Anti-inflammatory activity of niosomes entrapped with Plai oil (*Zingiber cassumunar* Roxb.) by therapeutic ultrasound in a rat model. *International Journal of Nanomedicine* 12, 2469-2476.
- Phan, T.T., See, P., Lee, S.T., Chan, S.Y. (2001). Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. *The Journal of Trauma* 51, 927-931.
doi: 10.1097/00005373-200111000-00017
- Sen, C.K., Khanna, S., Gordillo, G., Bagchi, D., Bagchi, M., Roy, S. (2002). Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957, 239-249.
doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb02920.x
- Sen, C.K., Gordillo, G.M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T.K., Gottrup, F., Gurtner, G.C., Longaker, M.T. (2009). Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society* 17, 763-771. doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x
- Song, Y., Zeng, R., Hu, L., Maffucci, K.G., Ren, X., Qu, Y. (2017). *In vivo* wound healing and *in vitro* antioxidant activities of *Bletilla striata* phenolic extracts. *Biomedicine and pharmacotherapy* 93, 451-461.
doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.079
- Subrahmanyam, M. (1998). A prospective randomised clinical and histological study of superficial burn wound healing with honey and silver sulfadiazine. *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries* 24, 157-161. doi: 10.1016/s0305-4179(97)00113-7



Zhang, L., Yang, Z., Chen, D., Huang, Z., Li, Y., Lan, X., Su, P., Pan, W., Zhou, W., Zheng, X., Du, Z. (2017).

Variation on Composition and Bioactivity of Essential Oils of Four Common Curcuma Herbs. *Chemistry & biodiversity* 14, 11. doi:10.1002/cbdv.201700280