

ฤทธิ์ด้านการแพ้ ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีและความคงตัวของสารสกัด

ตำรับยาสมุนไพรแก้ลมพิษ

Anti-Allergy Activity, Chemical Content and Stability Testing of Herbal
Formulation Extract for Treatment of Urticariaณัฏฐา เชิดชูธีรกุล (Natta Choedchutirakul)* สุมาลี ปานทอง (Sumalee Panthong)^{1**}

อินทัช ศักดิ์ภักดีเจริญ (Intouch Sakpakdeejaroen)** ผกากรอง ทองดียิ่ง (Pakakrong Thongdeeying)**

(Received: May 19, 2024; Revised: July 17, 2024; Accepted: July 19, 2024)

บทคัดย่อ

ตำรับยาแก้ลมพิษเป็นตำรับยาที่ระบุอยู่ในคู่มือตรวจรักษาโรคทางการแพทย์แผนไทยประยุกต์ ประกอบด้วย เหงือกปลาหมอ หอมแดง ใบไม้ และทองพันชั่ง งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการแพ้ในระดับหลอดทดลองของสารสกัดพืชเดี่ยวและตำรับยาแก้ลมพิษ และวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์รวมถึงศึกษาความคงตัว ในการเตรียมสารสกัดจะนำสมุนไพรที่อบแห้งแล้วทั้ง 4 ชนิดมาผสมรวมกันและสกัดด้วย เอทานอล 95% นำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการแพ้โดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ β -hexosaminidase และใช้เทคนิค ELISA ในการศึกษาฤทธิ์ ยับยั้ง IL-4 และ ฮีสตามีน จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู (RBL-2H3) พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษสามารถยับยั้งเอนไซม์ β -hexosaminidase, IL-4 และ ฮีสตามีนได้โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 87.04 ± 1.40 , 50.90 ± 0.24 และ 22.59 ± 0.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อนำไปหาปริมาณ สารสำคัญโดยใช้เทคนิค HPLC ในตำรับยาแก้ลมพิษประกอบด้วยสาร rhinacanthin-C และ rhinacanthin-N โดยมีปริมาณเท่ากับ $1.10 \pm 0.02\%$ $0.15 \pm 0.00\%$ w/w ตามลำดับ สารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษมีความคงตัวเมื่อถูกเก็บภายใต้สภาวะแรงที่อุณหภูมิ $40 \pm 2^\circ C$ ความชื้นสัมพัทธ์ (RH) $75 \pm 5\%$ เป็นเวลา 6 เดือน ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายาสมุนไพรดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะยับยั้งอาการแพ้ได้

ABSTRACT

The Kae-Lom-Pid formulation (KLP) is a combination of *A.licifolius*, *A.ascalonicum*, *B.blumeana*, and *R.nasutus*, as suggested in the therapy guidelines for Applied Thai Traditional Medicine. The study was to evaluate the in vitro anti-allergy activity of each plant and the KLP formulation extracts. It included chemical analysis and stability testing. The dried plant components were mixed and macerated in 95% ethanol for extraction. The antiallergy properties were evaluated by measuring the release of β -hexosaminidase and evaluating the levels of IL-4 and histamine release on RBL-2H3 cell lines by ELISA. The findings showed the KLP extract (HDE) effectively suppressed the activity of β -hexosaminidase, IL-4, and histamine release, with IC_{50} values of 87.04 ± 1.40 , 50.90 ± 0.24 , and 22.59 ± 0.41 $\mu g/mL$, respectively. The HDE contains rhinacanthin-C and -N at a concentration of $1.10 \pm 0.02\%$ and $0.15 \pm 0.00\% w/w$, respectively, determined by HPLC. Furthermore, HDE remained stable when stored at $40 \pm 2^\circ C$, $75 \pm 5\%$ RH for a period of 6 months. The findings suggest that HDE has a tendency to alleviate allergies.

คำสำคัญ: ฤทธิ์ด้านการแพ้ โรคลมพิษ สมุนไพร ตำรับยาแก้ลมพิษ

Keywords: Anti-allergy activity, Urticaria, Herbal medicine, Kae-Lom-Pid formulation

¹Corresponding author: psumalee@tu.ac.th

*นักศึกษา หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Student, Doctor of Philosophy in Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สถานการณ์แพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Assistance Professor, Department o Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

บทนำ

โรคลมพิษ เป็นอาการทางระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเกิดจากการตอบสนองของภูมิไวเกิน ทำให้ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้รวดเร็วและรุนแรง เมื่อร่างกายสัมผัสกับสิ่งกระตุ้นเช่น ละอองเกสรดอกไม้ ฝุ่น ครัน อาหาร หรือสารบางชนิด เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้แก่ พลาสมาเซลล์ จะผลิตสาร IgE เพื่อจับกับสิ่งแปลกปลอมดังกล่าว และกระตุ้นให้แมสต์เซลล์เกิดกระบวนการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นนั้น และเกิดการปลดปล่อยแกรนูโลภายในเซลล์ (Degranulation) ในกระบวนการนี้จะส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยสารกระตุ้นให้เกิดอาการแพ้และอาการคันหลายชนิด เช่น ฮิสตามีน IL-4 และยังมีสารอื่นๆ ที่ถูกปลดปล่อยออกมาพร้อมกัน ได้แก่ เอนไซม์เบต้าเฮกโซซามินิเดส (β -hexosaminidase) การตอบสนองของแมสต์เซลล์จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ชนิดอื่นๆในระบบภูมิคุ้มกันและส่งผลให้เกิดการผลิตสารไซโตไคน์ที่กระตุ้นกระบวนการอักเสบ และทำให้เกิดอาการบวมบริเวณผิวหนังและอาการแดงเนื่องมาจากหลอดเลือดบริเวณดังกล่าวขยายตัว ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการคันตามผิวหนังและเป็นตุ่มนูนแดงกระจายทั่วบริเวณที่สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอม [1] ในการรักษาอาการดังกล่าวแพทย์มักจะจ่ายยาต้านการหลั่งฮิสตามีนหรือให้ยาทาในกลุ่มสเตียรอยด์เพื่อช่วยลดอาการคันและลดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน แต่ยาดังกล่าวอาจเกิดผลข้างเคียงแก่ผู้ป่วย เช่น อาการเวียนศีรษะ อาการง่วงนอน ผิวหนังลอก [2] ปัจจุบันจึงมีการวิจัยและพัฒนายาทางเลือกที่มาจากสมุนไพรหรือสารจากธรรมชาติเพื่อนำมาใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบัน

ตำรับยาแก้ลมพิษเป็นตำรับยาที่ระบุไว้ในเอกสารคู่มือตรวจรักษาโรคการแพทย์แผนไทยประยุกต์ มีสรรพคุณบรรเทาอาการโรคลมพิษ ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ หอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) เหงือกปลาหมอ (*Acanthus ilicifolius* L.) ไม้ (*Bambusa blumeana* Schult.f.) และทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz) มาต้มน้ำอาบ [3] อย่างไรก็ตามตำรับยาดังกล่าวยังไม่พบรายงานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับการยืนยันสรรพคุณของตำรับ แต่พบรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรในตำรับ โดยพบว่า สารสกัดเหงือกปลาหมอสามารถลดอาการบวมในสัตว์ทดลองและลดการผลิต TNF- α , IL-6 และไนตริกออกไซด์ (NO) จากเซลล์แมโครฟาจได้ [4-6] หอมแดง มีฤทธิ์ต้านอักเสบโดยยับยั้ง NO, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ได้ [7] และมีฤทธิ์ต้านการแพ้โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์เบต้าเฮกโซซามินิเดสเมื่อทดสอบในเซลล์ RBL-2H3 อีกทั้งช่วยลดอาการภูมิแพ้ได้ในกลุ่มทดลองโรคจมูกอักเสบจากภูมิแพ้ [8] ทองพันชั่ง มีฤทธิ์ในการต้านการหลั่งพรอสตาแกลนดิน E2 (PGE-2), iNOS และ COX-2 จากเซลล์แมโครฟาจ RAW264.7 [9] และลดการอักเสบวามในสัตว์ทดลองได้ [10] อีกทั้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เบต้าเฮกโซซามินิเดส, TNF- α และ IL-4 ในเซลล์ RBL-2H3 [11] ในส่วนของไม้ พบว่ายังมีงานวิจัยที่ค่อนข้างน้อย แต่มีการรายงานว่าสามารถลดอาการบวมในสัตว์ทดลองได้ [12] แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านการแพ้ ในการออกฤทธิ์ของสมุนไพรนั้นมักจะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่พบในสมุนไพร เช่น สาร rhinacanthin ที่พบในทองพันชั่ง พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เบต้าเฮกโซซามินิเดส, TNF- α และ IL-4 จึงทำให้ทองพันชั่งสามารถยับยั้งสารในกระบวนการแพ้ได้ [11] ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีหรือสารสำคัญต่างๆจะช่วยบ่งบอกถึงระดับการออกฤทธิ์ของสมุนไพร อีกทั้งยังใช้ควบคุมคุณภาพทางด้านเคมีของสมุนไพรชนิดต่างๆ นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงของสารสกัดสมุนไพรภายใต้อุณหภูมิสูง ความชื้นสูงก็เป็นสาเหตุให้ฤทธิ์ทางชีวภาพและปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรมีค่าลดลงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคมียาลดลงตามไปด้วย

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการแพ้ของสารสกัดจากตำรับยาแก้ลมพิษ วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านการแพ้ และการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เพื่อดูความคงสภาพของสารสกัดเมื่อเก็บไว้ในที่อุณหภูมิสูงและความชื้นสูง ซึ่งจะช่วยบ่งบอกถึงอายุและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสารสกัดให้คงสภาพตาม

เกณฑ์มาตรฐาน [13] โดยข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนถึงสรรพคุณของตำรับยาดังกล่าวและนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษเพื่อใช้ในการรักษาโรคลมพิษต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการแพ้ในระดับหลอดทดลองของสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษและพืชที่เป็นส่วนประกอบในตำรับ
2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีที่เป็นสารออกฤทธิ์ในสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษ
3. เพื่อศึกษาความคงตัวของสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษทางด้านเคมี

วิธีการวิจัย

วัตถุดิบและวิธีการสกัด

ทำการจัดเตรียมวัตถุดิบโดยหัวหอมแดงได้รับจากจังหวัดศรีสะเกษ ใบทองพันชั่ง ใบเหงือกปลาหมอ จากจังหวัดลพบุรี และใบไผ่จากจังหวัดฉะเชิงเทรา จากนั้นจึงส่งตัวอย่างสมุนไพรไปทำเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงที่พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และพิพิธภัณฑ์พืช กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกเพื่อขอเลขอ้างอิงสายพันธุ์ จากนั้นนำพืชทั้ง 4 ชนิดมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้หมาด อบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำสมุนไพรที่แห้งแล้วไปทำการบดหยาบ เพื่อนำไปสกัดด้วยเอทานอล 95% (RCI LabScan, Thailand) โดยทำการผสมสมุนไพรแต่ละชนิดในอัตราส่วนที่เท่ากัน จากนั้นทำการเติมเอทานอลลงไปจนท่วมและแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน ในขณะที่สมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบทั้ง 4 ชนิดจะถูกสกัดแยกแต่ละชนิดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกัน นำมารองและระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (รุ่น R210 ยี่ห้อ Buchi ประเทศ Switzerland) นำกากเดิมมาทำการสกัดซ้ำจนครบ 3 รอบ นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกจนกระทั่งน้ำหนัคงที่ที่อุณหภูมิ 45 °C และเก็บภายใต้อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาทดสอบ

การเตรียมเซลล์ในการทดสอบฤทธิ์ด้านการแพ้

การทดสอบฤทธิ์ด้านการแพ้จะทำในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells ATCC CRL-2256 (ATCC, USA) เซลล์ดังกล่าวถูกเพาะเลี้ยงในอาหารชนิด minimum essential medium eagle หรือ MEM (Gibco, USA) ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) 15% (Gibco, USA), เพนนิซิลิน 100 µg/mL และ streptomycin 100 µg/mL (Gibco, USA) ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี CO₂ 5% ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 3-4 วัน เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงจะนำไปทดลองเมื่อมีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 80% เซลล์จะถูกนำออกจากฟลasks ด้วยการ trypsinize โดยบ่มกับ 0.05% trypsin (Gibco, USA) เป็นเวลา 8 นาทีเพื่อนำไปทำการทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ RBL-2H3 [14]

ก่อนเริ่มการทดสอบ สารสกัดทุกชนิดจะถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RBL-2H3 โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงใน 24 well plates ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2×10^5 เซลล์/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C สภาวะ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดเซลล์จะถูกนำออกมาล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 400 ไมโครลิตรต่อหลุม และเติม MEM ลงไป 180 ไมโครลิตร บ่มต่ออีก 10 นาที จึงเติมสารสกัดทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆลงไป 20 µL บ่มที่ 37°C นาน 6 ชั่วโมง แล้วจึงเปิดของเหลวเหนือเซลล์ออก และเติมสารละลาย MTT (TCI, Japan) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มต่อ 2 ชั่วโมง นำของเหลวเหนือเซลล์ออก เติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ลงไป 400 ไมโครลิตรต่อ

หลุม นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร คำนวณค่าการรอดชีวิตของเซลล์จากสมการด้านล่างโดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ไม่มีการทดสอบสารใดๆ โดยค่าการรอดชีวิตต้องมีมากกว่าร้อยละ 70 ขึ้นไปจึงถือว่าความเข้มข้นดังกล่าวไปก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ [15]

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิต} = [(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} / \text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม}) \times 100]$$

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ β -hexosaminidase [16]

การทดสอบดังกล่าวจะอาศัยหลักการเกี่ยวกับการที่แมสเซลล์ถูกกระตุ้นเมื่อสัมผัสสิ่งแปลกปลอมจะส่งผลให้เกิดกระบวนการ degranulation ซึ่งจะมีการปลดปล่อยสารฮิสตามีนและสารอื่นๆออกมา หนึ่งในนั้นคือ β -hexosaminidase ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในสัดส่วนที่แปรผันตรงกับปริมาณฮิสตามีน การทดสอบนี้จึงจะทำการศึกษากายยับยั้งการปลดปล่อยสารดังกล่าวเพื่อใช้ดูผลการยับยั้งสารฮิสตามีนทางอ้อม โดยในการทดสอบจะเริ่มจาก การเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 24 well plates ที่ความหนาแน่น 2×10^5 เซลล์/หลุม และบ่มที่ 37°C ใน 5% CO_2 นาน 2 ชั่วโมง เติมนิโตรเจนไดออกไซด์ (anti-dinitrophenyl immunoglobulin E หรือ anti-DNP IgE (Sigma, USA) (5 $\mu\text{g/mL}$) ปริมาตร 40 μL และบ่ม 24 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 37°C และ CO_2 5% เมื่อครบเวลาให้ทำการเปิดของเหลวในหลุมออกและล้างเซลล์ด้วย บัฟเฟอร์ A (400 ไมโครลิตร/หลุม) จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมนิโตรเจนไดออกไซด์ (บัฟเฟอร์ A ปริมาตร 160 ไมโครลิตรต่อหลุม และบ่มต่อ 10 นาที เติมนิโตรเจนไดออกไซด์แต่ละความเข้มข้นหลุมละ 20 ไมโครลิตรบ่มอีก 10 นาที เติมนิโตรเจนไดออกไซด์ DNP-BSA (Sigma, USA) 20 ไมโครลิตร (0.1 มก./มล.) ลงในหลุมทดสอบและควบคุม และบ่มอีก 20 นาที จากนั้นดูดของเหลวเหนือเซลล์ย้ายลง 96 well plates ที่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อหลุมโดยแบ่งออกเป็นสองส่วนอย่างละเท่ากันเพื่อเติมนิโตรเจนไดออกไซด์ (PNAG (Sigma, USA) 50 ไมโครลิตร และ 0.1 M citrate buffer (Sigma, USA) (pH 4.5) 50 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 โมลาร์ Na_2CO_3 (Merck, Germany) ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร และวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ 405 นาโนเมตร ในการทดสอบจะใช้สารไตรเฟนิลอะมิโนไทโรซีน (TCl, Japan) เป็น positive control จากนั้นนำค่า OD ที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ β -hexosaminidase ตามสมการด้านล่าง และคำนวณหาความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์ β -hexosaminidase ได้ 50% (IC_{50}) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [1 - (\text{OD sample} - \text{OD blank}) / (\text{OD control} - \text{OD blank})] \times 100$$

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-4 และ ฮิสตามีน [17]

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ตามขั้นตอนเดียวกับการทดสอบก่อนหน้า หลังจากที่ยับยั้งเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเรียบร้อยแล้ว ให้ทำการเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมนิโตรเจนไดออกไซด์ ปริมาตร 160 ไมโครลิตรต่อหลุมลงไปบ่มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมนิโตรเจนไดออกไซด์ตามความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบลงในหลุมทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อหลุมและเติมนิโตรเจนไดออกไซด์ (MEM (Gibco, USA) ลงในหลุม blank และ control นำไปบ่มต่ออีก 10 นาที หลังจากนั้น เติมนิโตรเจนไดออกไซด์ (BSA 20 ไมโครลิตรต่อหลุมเข้าไปในหลุมควบคุมและหลุมทดสอบ หลุม blank เติมนิโตรเจนไดออกไซด์ ในปริมาตรเท่ากัน นำไปบ่มต่อ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำของเหลวเหนือเซลล์ ไปตรวจสอบปริมาณ IL-4 และ ฮิสตามีนที่ถูกปลดปล่อย โดยชุดตรวจวัด ELISA kit (Sigma, USA) ภายหลังการหยุดปฏิกิริยาจะนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และนำ

ค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ IL-4 และฮิสตามีนจาก standard curve ของ IL-4 และฮิสตามีนและคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งจากสมการด้านล่าง ในการทดสอบจะใช้สารไตรเฟโนโอดรามีนเป็น positive control

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(\text{ปริมาณโปรตีนcontrol}-\text{ปริมาณโปรตีนsample})/\text{ปริมาณโปรตีนcontrol}] \times 100$$

การศึกษาปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษและไมโครอิมัลชันด้วยเทคนิค HPLC [18]

การศึกษานี้ได้นำวิธีของ Panichayupakaranant (2011) มาดัดแปลงโดยนำสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษ มาตรวจวัดปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC รุ่น LC-40D ยี่ห้อ Shimadzu ประเทศ Japan) โดยมีการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (HPLC validation) ตามข้อกำหนดของ ICH guideline [19] ซึ่งกำหนดให้ทำการหาค่าความเที่ยง (Accuracy) จากการวิเคราะห์ค่าร้อยละการคืนกลับของสารสำคัญ (%recovery) ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการ spike สารสำคัญที่ทราบความเข้มข้นลงในสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษ จากนั้นทำการวิเคราะห์หาค่า %recovery นอกจากนั้นจะต้องมีการหาค่าความแม่นยำ (Precision) จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ทราบความเข้มข้นภายในวันเดียวกันและต่างวัน แล้วจึงคำนวณหาความเข้มข้นของสารสำคัญ การหาค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยการวิเคราะห์สารสำคัญอย่างน้อย 5 ความเข้มข้นแล้วนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น การวิเคราะห์ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) หลังจากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ สารสกัดจะถูกเตรียมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายในเมทานอล (RCI LabScan, Thailand) และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ปริมาตรที่วิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร กำหนดอัตราส่วน 1.0 มล./นาฬิกา ด้วยอะซิโตนไนโตรส (RCI LabScan, Thailand) และกรดฟอสฟอริก 0.1% (Merck, Germany) เป็น mobile phase และใช้คอลัมน์ชนิด C18 reverse-phase 100A ขนาด 250 × 4.60 มิลลิเมตร โดยใช้รูปแบบอัตราส่วนไล่ระดับที่สัดส่วน 75:25 เป็นเวลา 35 นาที 75:25 ถึง 71.4:28.6 ใน 3 นาที 71.4:28.6 - 95:5 ในเวลา 2 นาที และ 95:5 ถึง 75:25 ใน 3 นาที จากนั้นนำไปตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสาร Rhinacanthin-C และ Rhinacanthin-N โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน และรายงานผลเป็น %w/w

การศึกษาความคงตัวของสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษ

สารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษจะถูกชั่งน้ำหนักใส่ในขวดแก้ว และนำไปทดสอบความคงตัวโดยเก็บไว้ภายใต้สภาวะเร่ง (accelerated condition) ที่อุณหภูมิ 40±2°C ความชื้นสัมพัทธ์ (RH) 75±5% เป็นระยะเวลา 6 เดือนโดยเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วันตามข้อกำหนดของ ASEAN guideline [13] จากนั้นจึงนำสารสกัดมาวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโดยใช้เทคนิค HPLC

ผลการวิจัย

จากการสกัดสารตำรับยาแก้ลมพิษด้วยเอทานอล 95% พบว่า ได้ร้อยละของสารสกัด (%yield) ของใบโฝม่มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 11.20 รองลงมาคือสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษมีค่าเท่ากับร้อยละ 5.50 ส่วนสารสกัดหอมแดง ทองพันชั่ง และเหียงอกปลาหมอ มีค่าเท่ากับ 4.21, 3.69 และ 3.34 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยลักษณะทางกายภาพของสารสกัดแต่ละชนิดพบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษมีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดสีเขียวเข้มอมดำ สารสกัดหอมแดงมีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลอ่อน สารสกัดเหียงอกปลาหมอมีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดสีเขียวเข้มอมน้ำตาล สารสกัดใบโฝม่มีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดสีเขียวเข้ม และสารสกัดทองพันชั่งมีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดมีความมัน สีเขียวเข้มอมดำ

ความเป็นพิษของสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษและสมุนไพรในตำรับต่อเซลล์ RBL-2H3

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดและไคเพนไฮโดรามีนต่อเซลล์ RBL-2H3 โดยทดสอบสารทุกชนิดที่ความเข้มข้น 12.5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเป็นเวลา 6 ชั่วโมงผลที่ได้พบว่าสารทุกชนิดที่ทำการทดสอบไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยพบว่าค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์มีค่ามากกว่าร้อยละ 70 ดังแสดงในภาพที่ 1 สารสกัดทั้งหมดนี้จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการแพ้ในเซลล์ RBL-2H3

ผลของสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษและสมุนไพรในตำรับต่อการยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ β -hexosaminidase และฮิสตามีน

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ β -hexosaminidase พบว่า สารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษสามารถยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ดังกล่าวได้ โดยการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และเมื่อทำการคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษพบว่ามีความเท่ากับ 87.04 ± 1.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในส่วนของสารสกัดสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับนั้นพบว่าทองพันชั่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ β -hexosaminidase ดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 59.36 ± 6.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร รองลงมาคือ หอมแดง และเหงือกปลาหมอ มีค่า IC_{50} คือ 76.14 ± 11.37 และ 80.14 ± 10.91 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบไผ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งน้อยที่สุดโดยพบว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ β -hexosaminidase ได้เพียงร้อยละ 41.01 ± 1.39 ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบ สารสกัดดังกล่าวจึงไม่ได้ถูกทำการทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

ในส่วนของการยับยั้งการหลั่งฮิสตามีนนั้น พบว่า สารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษสามารถยับยั้งการหลั่งฮิสตามีนได้โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.74 ± 0.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยผลการยับยั้งดังกล่าวจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดมีค่าสูงขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับไคเพนไฮโดรามีนซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.04 ± 0.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในขณะที่สมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับพบว่าหอมแดงมีฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาคือ เหงือกปลาหมอและทองพันชั่งโดยผลการยับยั้งจะคล้ายคลึงกับผลของสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษ นั่นคือค่าการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสมุนไพรมีค่าสูงขึ้น ในขณะที่ใบไผ่ยังคงแสดงฤทธิ์การยับยั้งได้น้อยที่สุดโดยพบว่าที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรสามารถยับยั้งได้เพียงร้อยละ 48.83 ± 0.20 จึงไม่ได้ถูกทำการทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3

ผลของสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษและสมุนไพรในตำรับต่อการยับยั้ง IL-4

ผลการทดสอบการยับยั้ง IL-4 พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษสามารถยับยั้งการหลั่ง IL-4 ได้โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 50.90 ± 0.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในขณะที่สารสกัดสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับทุกชนิดก็สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-4 ได้เช่นกัน โดยที่สารสกัดใบไผ่มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด รองลงมาคือ ทองพันชั่ง, เหงือกปลาหมอ และหอมแดง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.88 ± 1.13 , 26.85 ± 0.82 , 36.47 ± 0.93 และ 51.99 ± 0.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4

ปริมาณสารสำคัญที่พบในสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษ

จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าค่าความเป็นเส้นตรงของสาร Rhinacanthin-C และ Rhinacanthin-N ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบดังกล่าวมีค่า r^2 มากกว่า 0.999 และมีค่าความเที่ยงโดยแสดงผลในรูปของร้อยละการคืนกลับของสารสำคัญที่มีค่าการคืนกลับเปลี่ยนแปลงไปไม่เกิน 20% และมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ไม่เกิน 2% ความแม่นยำในการวิเคราะห์ทั้งในวันเดียวกันและต่างวันกันเป็นไปตามข้อกำหนดของ ICH

guideline [19] คือมีค่า %RSD ไม่เกิน 2% และมีค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้แตกต่างจากความเข้มข้นที่แท้จริงไม่เกิน 20% เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 5 ผลดังกล่าวทำให้เห็นว่าระบบ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งสองชนิดในสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษได้ เมื่อนำสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษมาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC จะเห็นได้ว่าลักษณะ peak มีความคล้ายคลึงกับที่พบในสารสกัดทองพันชั่ง ดังแสดงในภาพที่ 2 และเมื่อทำการเปรียบเทียบ spectrum ของ peak ที่พบในสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษและทองพันชั่งกับ spectrum จากฐานข้อมูลพบว่าสารดังกล่าวคือ rhinacanthin C และ rhinacanthin N ดังแสดงในภาพที่ 3 ในการวิเคราะห์ปริมาณของสารทั้ง 2 ชนิดที่พบในตำรับ ผู้วิจัยได้นำสาร rhinacanthin C และ rhinacanthin N ไปทำการเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆและนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อนำค่าที่ได้มาทำการสร้าง standard curve เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณสาร ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยพบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษมีปริมาณสาร rhinacanthin C และ rhinacanthin N เท่ากับ $1.10 \pm 0.02\%$ $0.15 \pm 0.00\%$ w/w ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดทองพันชั่งมีปริมาณสาร rhinacanthin C และ rhinacanthin N เท่ากับ $7.56 \pm 0.34\%$, $0.32 \pm 0.01\%$ w/w ตามลำดับ

ความคงตัวของสารสำคัญ rhinacanthin ที่พบในสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะเร่ง

เมื่อนำสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษมาทำการทดสอบภายใต้สภาวะเร่งเป็นระยะเวลา 6 เดือน ผลที่ได้พบว่าปริมาณสาร rhinacanthin C และ rhinacanthin N ที่พบในสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษนั้นมีค่าคงที่ โดยมีค่าปริมาณ rhinacanthin C อยู่ในช่วง 1.03-1.17 %w/w ในขณะที่ปริมาณ rhinacanthin N อยู่ในช่วง 0.15-0.17%w/w โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลานั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 5 แสดงให้เห็นได้ว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษมีความคงตัวและสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยที่ปริมาณสารสำคัญไม่มีการเปลี่ยนแปลงได้ถึง 2 ปี [13]

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

โรคลมพิษเป็นปฏิกิริยาภูมิแพ้ที่เกิดขึ้นหลังจากที่ร่างกายสัมผัสกับสารกระตุ้น (allergen) ส่งผลให้เกิดการสร้างสาร IgE ออกมาซึ่งสารดังกล่าวจะจับกับ high-affinity anti-human neonatal Fc receptor (FcRn) ที่อยู่บนผิว mast cell และ basophils เมื่อสารกระตุ้นจับกับ IgE ที่อยู่บนผิวเซลล์จะทำให้เกิดกระบวนการ degranulation และปลดปล่อยสารก่อให้เกิดการแพ้ และอักเสบ ซึ่งในระยะแรกจะเซลล์เม็ดเลือดขาวจะปลดปล่อยสารฮีสตามีน เอนไซม์ β -hexosaminidase และเมื่อเวลาผ่านไป 4-8 ชั่วโมง (late phase) จะเกิดการหลั่งไซโตไคน์ เช่น IL-4 ออกมาและทำให้เกิดปฏิกิริยาการคัน การอักเสบบริเวณผิวหนัง ดังนั้นการยับยั้งปฏิกิริยาการแพ้ หรือยับยั้งสารต่างๆที่ถูกผลิตออกมาจะช่วยลดอาการต่างๆ ของโรคลมพิษได้ [20-21]

ในการทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของตำรับสมุนไพรที่ชื่อว่าตำรับยาแก้ลมพิษต่อการยับยั้งอาการแพ้ในระดับหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษนั้นสามารถลดการหลั่งฮีสตามีนลงได้ ซึ่งสารดังกล่าวเป็นตัวกลางสำคัญที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ในระยะแรก อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการปลดปล่อยไซโตไคน์ IL-4 ในระยะ late phase ได้เช่นกัน นอกจากนี้สารตัวกลางที่ก่อให้เกิดการอักเสบเหล่านี้สามารถพบได้ทั้งในผู้ป่วยลมพิษระยะเฉียบพลันและเรื้อรังได้ [22] อีกทั้งยังช่วยยับยั้งเอนไซม์ β -hexosaminidase ซึ่งเป็นสารที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก mast cell เมื่อเกิดอาการแพ้ จึงเป็นการช่วยยับยั้งผลกระทบของตำรับยาแก้ลมพิษในการลดอาการแพ้จากการยับยั้งการเกิด degranulation ของ mast cell [23]

เมื่อเปรียบเทียบผลจากส่วนประกอบสมุนไพรเดี่ยวในตำรับเพื่อหาพืชที่ใช้เป็น biochemical marker พบว่า สารสกัดทองพันชั่ง มีฤทธิ์ต้านการแพ้ที่ดี เนื่องจากมีสารสำคัญในกลุ่มแนฟโทควิโนน (naphthoquinones) ที่มีการศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ต้าน

อาการแพ้ โดยสามารถยับยั้งการปลดปล่อยเอนไซม์ β -hexosaminidase และ IL-4 ได้ดี เนื่องจากมีสารไรนาแคนทินเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งสาร rhinacanthin-C และ -N แสดงฤทธิ์ยับยั้ง β -hexosaminidase ที่แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 6.9 และ 6.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และยังสามารถลดปริมาณสาร IL-4 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.0 และ 2.0 ไมโครโมลาร์ [11]

ในส่วนของสมุนไพรชนิดอื่นๆ ที่เป็นส่วนประกอบในสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษนั้นพบว่าสมุนไพรทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งสารที่กระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ โดยพบว่า สารสกัดหอมแดง และเหงือกปลาหมอ ยับยั้งสารสื่อการแพ้ได้ทั้ง 3 ชนิด คือ ฮิสตามีน, β -hexosaminidase และ IL-4 โดยผลดังกล่าวอาจจะเกิดจากการที่สมุนไพรทั้งสองชนิดประกอบด้วยสารสำคัญในกลุ่ม flavonoid เช่น quercetin ซึ่งช่วยยับยั้งการปลดปล่อยฮิสตามีน IL-4 และลดการผลิต antigen-specific IgE antibodies ได้ [24] นอกจากนี้ยังพบรายงานที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวผ่านการยับยั้งปริมาณการปลดปล่อย IL-4 ใน splenic mononuclear cells [7, 25] และที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถยับยั้งเอนไซม์ β -hexosaminidase ได้ถึง 97% เมื่อทดลองทางคลินิกหลังจากการรับประทานสารสกัดหอมแดง กลุ่มทดลองมีอาการจุกอึดเสจากภูมิแพ้ดีขึ้นได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม [8] ส่วนสารสกัดเหงือกปลาหมอที่ปริมาณ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถลดอาการแพ้จุกอึดเส และลดปริมาณเม็ดเลือดขาว ในหนูได้เช่นกัน [26] ในส่วนของสารสกัดใบไผ่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง IL-4 ดีที่สุด และพบว่าองค์ประกอบทางเคมีในใบไผ่ประกอบด้วย isoorientin, orientin, p-coumaric acid, vitexin, isovitexin, and apigenin ซึ่งสาร p-coumaric acid มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการหลั่ง IL-4 ได้จึงน่าจะเป็นเหตุผลที่สารสกัดใบไผ่สามารถยับยั้งการผลิต IL-4 จาก mast cell ได้ [27-28] จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า สารสกัดใบไผ่มีความจำเพาะในการยับยั้งสารในกระบวนการแพ้เพียงชนิดเดียวคือ IL-4 แต่ไม่สามารถยับยั้ง β -hexosaminidase และ histamine ได้ ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดอาการคันและส่งผลให้เกิดการ degranulation ของ mast cell แต่การที่สารสกัดใบไผ่สามารถยับยั้ง IL-4 ได้นั้นน่าจะมีส่วนช่วยในการยับยั้งการแพ้ในระยะท้ายของกระบวนการ โดยการยับยั้งการผลิต IL-4 อาจมีส่วนช่วยยับยั้งไม่ให้เกิดการอักเสบซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดจากการกระตุ้นผ่าน IL-4 ในกระบวนการแพ้ [21] การออกฤทธิ์ของใบไผ่อาจเกิดจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบซึ่งมีโครงสร้างจำเพาะทำให้สามารถเข้าจับกับตัวรับ (receptor) หรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตหรือการทำงานของ IL-4 ได้โดยเฉพาะเจาะจง จึงทำให้ยับยั้งได้เพียง IL-4 เท่านั้น ซึ่งคุณสมบัติการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือ receptor ต่างๆของสมุนไพรพบเห็นได้ในกลุ่มสารหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ [29] และต้องทำการศึกษาในระดับกลไกเพื่อให้ทราบถึงการออกฤทธิ์ของสารสกัดดังกล่าว

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า พืชสมุนไพรแต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบของตำรับยาแก้ลมพิษมีฤทธิ์ในการยับยั้งสารกระตุ้นการแพ้ได้แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในสมุนไพรที่ต่างชนิดกันจึงส่งผลให้ฤทธิ์ของสมุนไพรมีความแตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ยังพบว่า ตำรับยาแก้ลมพิษสามารถยับยั้งสารในกระบวนการแพ้ได้ในทุกการทดสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการยับยั้งฮิสตามีนที่พบว่ามีฤทธิ์ที่ดีกว่าสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบยกเว้นหอมแดง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการนำสมุนไพรหลายๆชนิดผสมกันเป็นตำรับยาแก้ลมพิษนั้นไม่ได้ทำให้เกิดการต้านฤทธิ์กันแต่อย่างใด ในทางกลับกันตำรับดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ได้หลากหลายกลไก ในส่วนของการเสริมฤทธิ์ของสมุนไพรในตำรับยาแก้ลมพิษเมื่อนำมาประกอบกันเป็นตำรับนั้นยังเห็นผลการเสริมฤทธิ์ที่ไม่ชัดเจน ซึ่งผลดีของการนำมาผสมกันเป็นตำรับนั้นอาจจะช่วยในการลดพิษของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับซึ่งต้องมีการศึกษาความเป็นพิษของตำรับยาเทียบกับสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบต่อไปในอนาคต ในส่วนของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตำรับยาแก้ลมพิษนั้นพบว่าประกอบด้วยสาร rhinacanthin-C และ -N ซึ่งน่าจะมีส่วนช่วยในการออก

ฤทธิ์ของตำรับยาแก้ลมพิษในการยับยั้งสารต่างๆ ในกระบวนการแพ้และสามารถนำไปใช้เป็น analytical marker สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ของตำรับยาดังกล่าวได้

สำหรับการทดสอบความคงตัวของสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษภายใต้สภาวะเร่งนั้น พบว่าปริมาณสาร rhinacanthin-C และ -N มีปริมาณคงตัวเมื่อทำการทดสอบภายใต้สภาวะเร่งเป็นระยะเวลา 6 เดือน จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารทั้งสองชนิดมีโครงสร้างเป็นกรด ได้แก่ octadienoic acid (rhinacanthin-C) และ naphthalene carboxylic acid ester (rhinacanthin-N) [11] ซึ่งมีความเสถียรในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน (pH 5.5) และไม่คงทนต่อสภาวะด่าง อีกทั้งยังสามารถคงสภาพได้ในอุณหภูมิสูงที่ 30°C และในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิและความชื้นที่สูงเป็นเวลา 3 เดือนได้ แต่อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้มีความไวต่อแสงเมื่อเก็บไว้ในภาชนะใสบรรจุภัณฑ์ไม่ทึบแสงทำให้สารสามารถเสื่อมสภาพลงได้ [30] ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้พบว่าการเก็บรักษาสารสกัดไว้ในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40±2°C ความชื้นสัมพัทธ์ (RH) 75±5% และทึบแสงเป็นระยะเวลา 6 เดือน มีปริมาณสารทั้งสองชนิดคงที่ โดยพบสาร rhinacanthin-C อยู่ในช่วง 1.12-1.17%w/w และสาร rhinacanthin-N อยู่ในช่วง 0.15-0.17%w/w ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการเก็บรักษาสารสกัดดังกล่าวได้ โดยควรไว้ในบรรจุภัณฑ์ทึบแสงและสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 2 ปี [13] ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบปริมาณสาร Rhinacanthin น้อยกว่าการทดลองก่อนหน้านี้มีรายงานปริมาณสาร Rhinacanthin-C และ -N เท่ากับ 2.60%w/w และ 0.16%w/w ตามลำดับ โดยปัจจัยที่อาจส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญคือแหล่งเพาะปลูกสมุนไพรและช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยว [31]

จากการทดลองสรุปได้ว่าตำรับยาแก้ลมพิษที่สกัดจากสมุนไพรแห้งจำนวน 4 ชนิดได้แก่ทองพันชั่ง เหงือกปลาหมอ ใบไม้และหอมแดงสามารถยับยั้งสารที่กระตุ้นให้เกิดการแพ้ในระดับหลอดทดลองได้ อีกทั้งปริมาณสารออกฤทธิ์ในตำรับยามีความคงตัวเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะเร่ง แต่อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบยืนยันประสิทธิภาพและความปลอดภัยทั้งในระดับสัตว์ทดลองและในมนุษย์เพื่อช่วยยืนยันผลของสารสกัดดังกล่าวและอาจจะมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดดังกล่าวเพื่อนำไปใช้รักษาโรคลมพิษและอาการแพ้บริเวณผิวหนังต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก กองทุนวิจัย (คณะแพทยศาสตร์) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีงบประมาณ 2567
สัญญาเลขที่ บค.1-01/2567

เอกสารอ้างอิง

1. Kolkhir P, Gimenez-Arnau AM, Kulthanan K, Peter J, Metz M, Maurer M. Urticaria. Nat Rev Dis Primers. 2022;8(1):1–22.
2. Barta K, Fonacier LS, Hart M, Lio P, Tullos K, Sheary B, et al. Corticosteroid exposure and cumulative effects in patients with eczema: Results from a patient survey. Ann Allergy Asthma Immunol. 2023;130(1):93–9.
3. Thai Traditional Medical Knowledge Fund. Applied Thai Traditional Medical Examination Manual. Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand, Ltd. (ACFT); 2016.
4. Matos P, Batista MT, Figueirinha A. A review of the ethnomedicinal uses, chemistry, and pharmacological properties of the genus Acanthus (Acanthaceae). J Ethnopharmacol. 2022;293:115271.

5. Pompermaier L, Marzocco S, Adesso S, Monizi M, Schwaiger S, Neinhuis C, et al. Medicinal plants of northern Angola and their anti-inflammatory properties. *J Ethnopharmacol.* 2018;216:26–36.
6. Kumar KMS, Gorain B, Roy DK, Samanta SK, Pal M, Biswas P, et al. Anti-inflammatory activity of *Acanthus ilicifolius*. *J Ethnopharmacol.* 2008;120(1):7–12.
7. Werawattanachai N, Kaewamatawong R, Junlatat J, Sripanidkulchai B. Anti-inflammatory potential of ethanolic bulb extract of *Allium ascalonicum*. *J Sci Technol.* 2015;17(2):63–8.
8. Arpornchayanon W, Klinprung S, Chansakaow S, Hanprasertpong N, Chaiyasate S, Tokuda M, et al. Antiallergic activities of shallot (*Allium ascalonicum* L.) and its therapeutic effects in allergic rhinitis. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2022;40(4):393–400.
9. Tewtrakul S, Tansakul P, Panichyupakaranant P. Anti-inflammatory compounds from *Rhinacanthus nasutus* leaves. Prince of Songkla University; 2007.
10. Bhusal N, Panichayupakaranant P, Reanmongkol W. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of a standardized *Rhinacanthus nasutus* leaf extract in comparison with its major active constituent rhinacanthin-C. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2014;36(3):325–31.
11. Tewtrakul S, Tansakul P, Panichayupakaranant P. Anti-allergic principles of *Rhinacanthus nasutus* leaves. *Phytomedicine.* 2009;16(10):929–34.
12. Lodhi S, Jain AP, Rai G, Yadav AK. Preliminary investigation for wound healing and anti-inflammatory effects of *Bambusa vulgaris* leaves in rats. *J Ayurveda Integr Med.* 2016;7(1):14–22.
13. Association of South East Asian Nations. ASEAN guidelines on stability study and shelf-life of traditional medicines and health supplements. Yogyakarta, Indonesia: Association of South East Asian Nations [Internet]. 2013 [updated 2013 Nov 16; cited 2024 Jan 15]. Available from: <https://asean.org/wp-content/uploads/2017/09/ASEAN-Guidelines-on-Stability-and-Shelf-Life-TM-V1.0-with-disclaimer.pdf>.
14. Attiyah SM. Immunomodulatory potential effects of pomegranate on RBL-2H3 cells. *Nat Vol Essent Oil J.* 2021;8(4):11662–74.
15. International Organization for Standardization. ISO 10993-5:2009(E): Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. In: International Organization for Standardization, editor. Switzerland: International Organization for Standardization; 2009.
16. Makchuchit S, Rattarom R, Itharat A. The anti-allergic and anti-inflammatory effects of Benjakul extract (a Thai traditional medicine), its constituent plants and its some pure constituents using in vitro experiments. *Biomed Pharmacother.* 2017;89:1018–26.
17. Abd Rani NZ, Kumolosasi E, Jasamai M, Jamal JA, Lam KW, Husain K. In vitro anti-allergic activity of *Moringa oleifera* Lam. extracts and their isolated compounds. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19:1–16.

18. Panichayupakaranant P. Isolation and identification of cytotoxic quinone from *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz leaves. Prince of Songkla University; 2011.
19. Borman P, Elder D. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures. In: Teasdale A, Elder D, Nims RW, editors. ICH Quality Guidelines. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2018.
20. Kulthanan K, Tuchinda P, Chularojanamontri L, Chanyachailert P, Korkij W, Chunharas A, et al. Clinical practice guideline for diagnosis and management of urticaria. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2016;34(3):190–200.
21. Dispenza MC. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc*. 2019;40(6):470–3.
22. Salman A, Porras NM, Gimenez-Arnau AM. Acute and chronic urticaria diagnosis and management taking into account their differences. *Curr Treat Options Allergy*. 2023;10(2):130–47.
23. Ogi K, Takabayashi T, Yamada T, Sakashita M, Kanno M, Narita N, et al. Trimellitic anhydride induces low-grade mast cell degranulation without specific IgE. *Toxicol Rep*. 2016;3:701–7.
24. Najaf Najafi N, Armide N, Akbari A, Baradaran Rahimi V, Askari VR. Quercetin: A promising functional food additive against allergic diseases: A comprehensive and mechanistic review. *J Funct Foods*. 2024;116:106152.
25. Farhadi L, Mohammadi-Motlagh HR, Seyfi P, Mostafaie A. Low concentrations of flavonoid-rich fraction of shallot extract induce delayed-type hypersensitivity and TH1 cytokine IFN γ expression in BALB/c mice. *Int J Mol Cell Med*. 2014;3(1):16–25.
26. Sardar PK, Dev S, Al Bari MA, Paul S, Yeasmin MS, Das AK, et al. Antiallergic, anthelmintic and cytotoxic potentials of dried aerial parts of *Acanthus ilicifolius* L. *Clin Phytosci*. 2018;4(1):34.
27. Tundis R, Augimeri G, Vivacqua A, Romeo R, Vincenzo S, Bonofiglio D, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of leaves and sheath from bamboo (*Phyllostachys edulis* J. Houz). *Antioxidants*. 2023;12:1239.
28. Moon PD, Han NR, Lee JS, Kim HM, Jeong HJ. p-Coumaric acid, an active ingredient of *Panax ginseng*, ameliorates atopic dermatitis-like skin lesions through inhibition of thymic stromal lymphopoietin in mice. *J Ginseng Res*. 2021;45(1):176–82.
29. Rauf A, Jehan N. Natural products as potential enzyme inhibitors from medicinal plants [Internet]. 2017 [updated 2017 Mar 09; cited 2024 Jul 13]. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/67376>.
30. Puttarak P, Charoonratana T, Panichayupakaranant P. Antimicrobial activity and stability of rhinacanthin-rich *Rhinacanthus nasutus* extract. *Phytomedicine*. 2010;17(5):323–7.
31. Suksawat T, Panichayupakaranant P. Variation of rhinacanthin content in *Rhinacanthus nasutus* and its health products. *Pharm Biomed Anal*. 2023;224:115177.

ตารางที่ 1 รายละเอียดของสมุนไพรและร้อยละของสารสกัดแต่ละชนิด

สมุนไพร	เลขอ้างอิง	ส่วนที่ใช้	ตัวย่อ	ร้อยละของสารสกัด
ตำรับยาแก้ลมพิษ	-	-	HDE	5.50
หอมแดง	BK No. 084791	หัว	AADE	4.21
เหงือกปลาหมอ	BK No. 084900	ใบ	AEDE	3.34
ใบไผ่	TTM No. 0005495	ใบ	BBDE	11.20
ทองพันชั่ง	BK No. 084901	ใบ	RNDE	3.69

ตารางที่ 2 แสดงผลยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ β -hexosaminidase ของสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาแก้ลมพิษ

สมุนไพรและสารมาตรฐาน	ร้อยละการยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ β -hexosaminidase แต่ละความเข้มข้น (%)				IC ₅₀ (μ g/mL)
	12.5 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	
HDE	-1.93 $\pm$ 3.04 ^b	12.46 $\pm$ 0.54 ^a	30.95 $\pm$ 1.55 ^a	56.51 $\pm$ 0.18 ^a	87.04 $\pm$ 1.40 ^b
AADE	8.15 $\pm$ 1.77	22.71 $\pm$ 2.52 ^a	37.70 $\pm$ 5.25 ^a	62.74 $\pm$ 4.35 ^a	76.14 $\pm$ 11.37
AEDE	3.44 $\pm$ 1.65 ^b	17.64 $\pm$ 1.91 ^a	34.85 $\pm$ 5.10 ^a	57.83 $\pm$ 3.30 ^a	80.14 $\pm$ 10.91
BBDE	NT	NT	NT	41.01 $\pm$ 1.39 ^{a,b}	>100
RNDE	8.41 $\pm$ 4.67	25.21 $\pm$ 2.64 ^a	46.88 $\pm$ 3.40 ^a	72.98 $\pm$ 2.87 ^a	59.36 $\pm$ 6.51
ไคเฟนไฮโดรามีน	11.73 $\pm$ 1.82	24.23 $\pm$ 3.41	43.12 $\pm$ 4.98	71.32 $\pm$ 4.94	62.67 $\pm$ 8.25

หมายเหตุ: (NT) หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ, ^aแสดงค่า p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ, ^bแสดงค่า p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับไคเฟนไฮโดรามีน

ตารางที่ 3 แสดงผลยับยั้งการหลั่งฮิสตามีนของสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาแก้ลมพิษ

สมุนไพรและสารมาตรฐาน	ร้อยละการยับยั้งการหลั่งฮิสตามีนของสารสกัดแต่ละความเข้มข้น (%)				IC ₅₀ (μ g/mL)
	12.5 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	
HDE	26.36 $\pm$ 3.98	58.68 $\pm$ 0.06 ^{a,b}	57.29 $\pm$ 0.64 ^{a,b}	70.50 $\pm$ 1.53	20.74 $\pm$ 0.42 ^b
AADE	49.22 $\pm$ 0.59 ^{a,b}	58.94 $\pm$ 0.90 ^{a,b}	60.11 $\pm$ 0.51 ^{a,b}	60.70 $\pm$ 0.70 ^{a,b}	13.39 $\pm$ 0.69 ^b
AEDE	16.75 $\pm$ 2.47 ^b	38.71 $\pm$ 0.28 ^{a,b}	51.36 $\pm$ 0.38 ^{a,b}	56.03 $\pm$ 0.34 ^{a,b}	40.95 $\pm$ 3.11 ^b
BBDE	NT	NT	NT	48.83 $\pm$ 0.20 ^{a,b}	>100
RNDE	32.11 $\pm$ 1.61 ^a	38.13 $\pm$ 0.30 ^{ab}	47.48 $\pm$ 1.54 ^{ab}	52.14 $\pm$ 0.37 ^{a,b}	64.44 $\pm$ 11.17 ^b
ไคเฟนไฮโดรามีน	34.36 $\pm$ 1.50	71.87 $\pm$ 0.54	74.65 $\pm$ 0.52	76.73 $\pm$ 0.51	17.04 $\pm$ 0.33

หมายเหตุ: (NT) หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ, ^aแสดงค่า p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ, ^bแสดงค่า p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับไคเฟนไฮโดรามีน

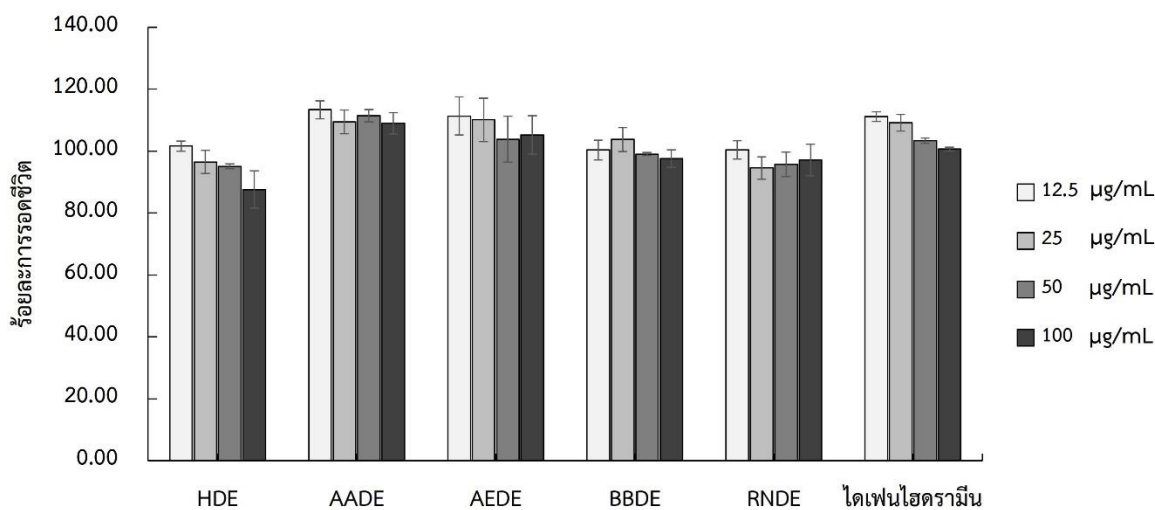
ตารางที่ 4 แสดงผลยับยั้งการหลั่ง IL-4 ของสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาแก้ลมพิษ

สมุนไพรและสาร มาตรฐาน	ร้อยละการยับยั้งการหลั่ง IL-4 ของสารสกัดแต่ละความเข้มข้น (%)				IC ₅₀ (μg/mL)
	12.5 μg/mL	25 μg/mL	50 μg/mL	100 μg/mL	
HDE	2.68±0.13 ^{a,b}	24.69±0.23 ^{a,b}	49.32±0.17 ^{a,b}	91.82±0.00 ^{a,b}	50.90±0.24 ^b
AADE	14.66±2.84 ^a	10.21±0.23 ^{a,b}	46.85±1.30 ^{a,b}	84.01±0.13 ^{a,b}	51.99±0.92 ^b
AEDE	14.88±2.13 ^a	56.13±1.40 ^a	60.73±0.52 ^a	84.43±0.02 ^{a,b}	36.47±0.93
BBDE	38.88±2.46 ^{a,b}	51.68±1.06 ^{a,b}	79.68±0.18 ^{a,b}	94.38±0.01 ^{a,b}	23.88±1.13
RNDE	26.53±1.57 ^{a,b}	47.47±1.13 ^{a,b}	69.56±0.49 ^{a,b}	95.48±0.10 ^{a,b}	26.85±0.82
ไคเฟนไฮโดรามีน	10.69±0.71	37.49±0.63	66.48±0.00	92.37±0.06	33.00±0.35

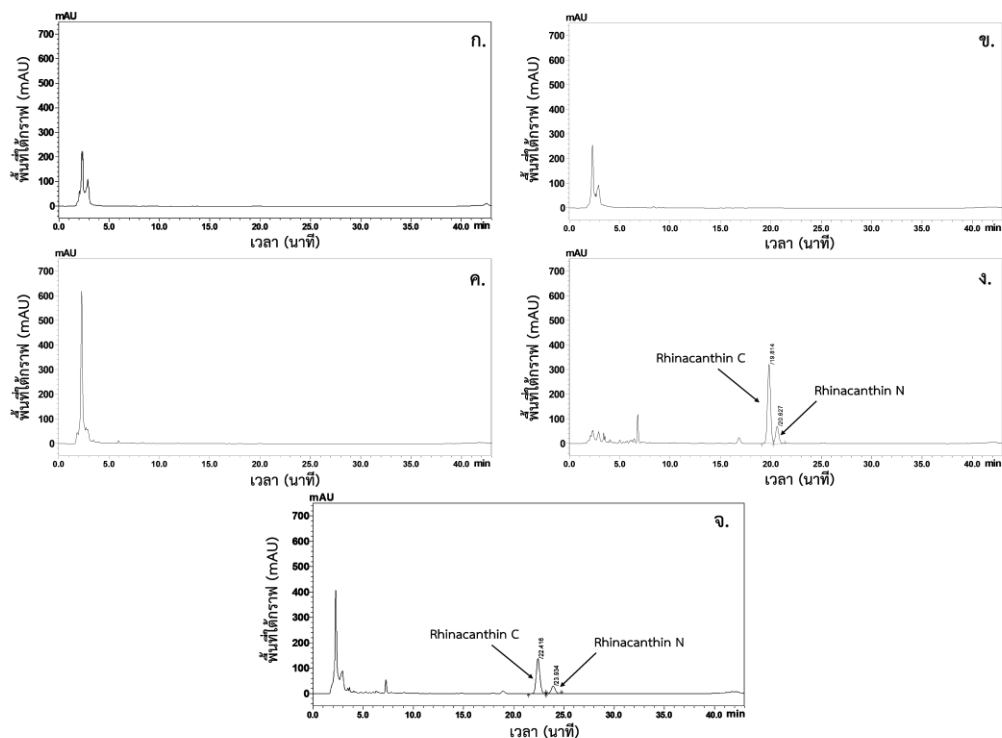
หมายเหตุ: ^a แสดงค่า p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ, ^b แสดงค่า p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับไคเฟนไฮโดรามีน

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สาร Rhinacanthin-C และ Rhinacanthin-N ในสารสกัดตำรับยาแก้ลมพิษด้วยเทคนิค HPLC

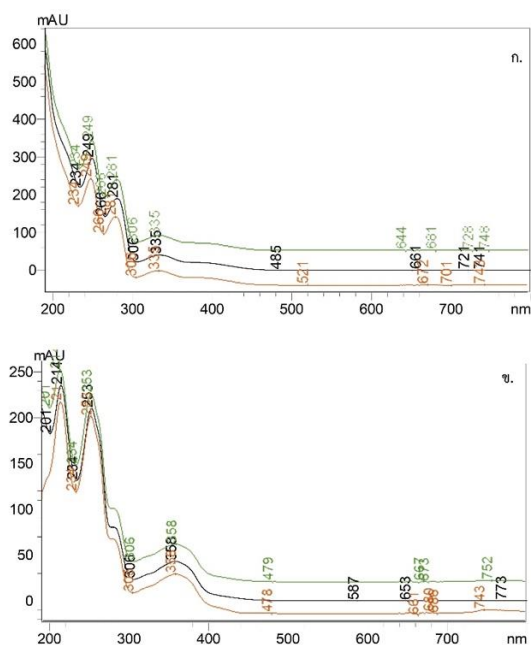
พารามิเตอร์		Rhinacanthin-C	Rhinacanthin-N
ความเป็นเส้นตรง (Linearity, μg/mL)		10-300	10-300
สมการเชิงเส้น (regression equation)		Y = 22192X - 55338	Y = 52963X - 83717
สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (R ²)		0.9997	0.9998
ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD, μg/mL)		2.89	2.17
ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (LOQ, μg/mL)		8.77	6.57
ความแม่นยำ (ความเข้มข้นเฉลี่ย±%RSD)			
Intra-day	100 μg/mL	106.90±0.99	101.33±1.06
	200 μg/mL	207.45±1.71	205.33±1.15
	300 μg/mL	297.14±0.83	312.40±1.03
Inter-day	100 μg/mL	103.66±1.96	98.78±1.41
	200 μg/mL	204.64±1.77	197.89±1.88
	300 μg/mL	301.25±1.80	300.97±1.76
การคืนกลับของสารสำคัญ			
(%การคืนกลับ±%RSD)			
50 μg/mL		106.56±1.17	103.14±1.06
100 μg/mL		110.49±1.63	108.21±1.04
200 μg/mL		110.29±1.06	109.67±1.59



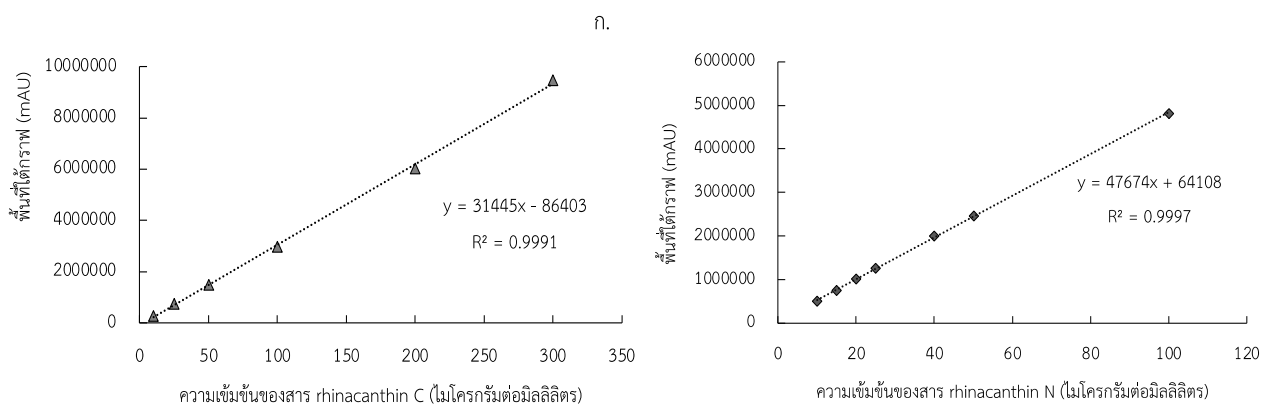
ภาพที่ 1 ผลการรอดชีวิตของเซลล์ RBL-2H3 ของสารสกัดแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นแต่ละระดับ



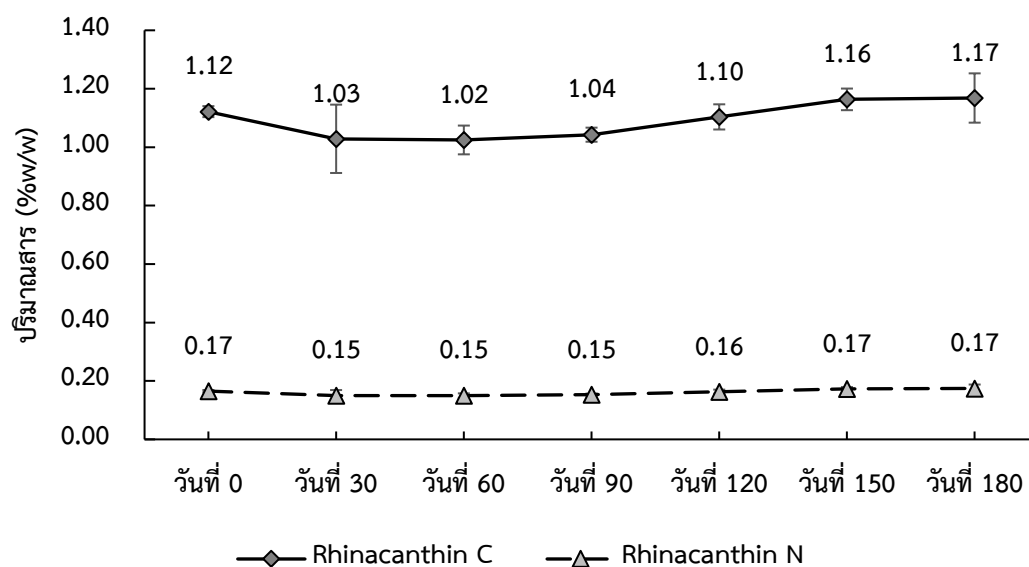
ภาพที่ 2 HPLC profile ของ (ก.) สารสกัดหัวหอมแดง, (ข.) เหงือกปลาหมอ, (ค.) ใบไผ่, (ง.) ทองพันชั่ง และ (จ.) ตำรับยา แก้มพิษ ตรวจวัดภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร



ภาพที่ 3 Spectrum ของ (ก.) สารบริสุทธิ์ rhinacanthin C (เส้นสีดำ) และสาร rhinacanthin C ที่พบในตำรับยาแก้ลมพิษ (เส้นสีส้ม) และทองพันชั่ง (เส้นสีเขียว) และ (ข.) สารบริสุทธิ์ rhinacanthin N (เส้นสีดำ) และสาร rhinacanthin N ที่พบในตำรับยาแก้ลมพิษ (เส้นสีส้ม) และทองพันชั่ง (เส้นสีเขียว)



ภาพที่ 4 กราฟ standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของ (ก.) rhinacanthin C และ (ข.) rhinacanthin N



ภาพที่ 5 ปริมาณสารไรนาแคนทินที่เก็บไว้ในสภาวะแรงเป็นเวลา 6 เดือน, * หมายถึง p-value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าของวันที่ 0