การวิเคราะห์เปรียบเทียบสารสกัดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการสกัดตำรับยาโคคลานด้วยวิธีทางการแพทย์แผนไทย

Comparative Analysis of Extract and Antioxidant Activity of Kokran Extracted By Thai Traditional Medicins Procedures.

วศิน บำรุงชัยชนะ*
Wasin Bumrungchaichana
ธวัชชัย กมลธรรม**
Thawatchai Kamontham

Received : June 19, 2019
Revised : August 22, 2019
Accepted : September 25, 2019

บทคัดย่อ

ตำรับยาผสมโคคลานเป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติ สรรพคุณ บรรเทาอาการปวดเมื่อย มีสารออกฤทธิ์คือ เบอจีนิน(Bergenin) และมัลโลรีฟิน(Mallorepine) เตรียมโดยวิธีการต้ม ซึ่งทางการแพทย์แผนไทย มีหลายวิธี วิธีที่นิยมคือการต้มเดือด 7 วัน และการต้มแบบ 3 เอา 1 การวิจัยนี้ต้องการศึกษาองค์ประกอบทองเคมีด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) ศึกษาปริมาณสาร Bergenin สาร Mallorepine ด้วยวิธีสร้างกราฟมาตรฐาน และศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay และ ABTS assay ในการเตรียมตำรับด้วยวิธีต้มเดือด 7 วัน ต้มแบบ 3 เอา 1 และการสกัดด้วยเอทานอล ผลพบว่าสาร Bergenin พบมากในการต้มเดือดวันที่ 5 สาร Mallorepine พบมากในการต้มเดือดวันที่ 3 และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระDPPH assay พบมากในการต้มเดือดวันที่ 3 (IC_{50}=90.18 µg/ml) ABTS assay พบมากในการต้มเดือดวันที่ 4 (IC_{50}=415.1 µg/ml) ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการทางการแพทย์แผนไทยที่ดีที่สุดในการเตรียมตำรับยาผสมโคคลานคือการต้มเดือด 7 วันเนื่องการให้ปริมาณสารสำคัญ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

คำสำคัญ : ตำรับยาผสมโคคลาน / Bergenin / Mallorepine / การเตรียมตำรับยา

*นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
Master of Science students Applied Thai Traditional Medicine Branch College Suan Sunandha Rajabhat University
**อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
Master of Science Program Applied Thai Traditional Medicine Branch Suan Sunandha Rajabhat University

ABSTRACT

Kokran is the recipe recommended as essential item in Thai National List of Essential Medicines. It is used for treating muscle pain and fatigue. The bioactive compounds are bergenin and mallorepine. The drug preparations recommended by Thai traditional medicine are composed of several methods, however it is usually performed by boiling in hot water for 7 days and decoction from 3 parts collected 1 part. This research was to study the chemical constituents by using thin layer chromatography (TLC), determine the content of bergenin and mallorepine by plotting standard calibration curve and examine antioxidant activity by DPPH and ABTS assays. According to drug preparation performed by boiling in hot water for 7 days, decoction from 3 parts collected 1 part and macerating in ethanol, the result indicated that the most content of bargenin is found on the 5th day of boiling while the most content of mallorepine is found on the 3rd day of boiling. The highest antioxidant activity determined by DPPH is shown on the 4th day of boiling while the highest activity determined by ABTS assay is presented on the 4th day of boiling. The result reveals that the best method for preparing Kokran recommended by Thai traditional medicine is boiling in hot water for 7 days because the highest content of bioactive compounds and antioxidant activity are evident.

Keywords : Kokranrecipe / Bergenin / Mallorepine / Drug Preparation

บทนำ

ในสถานการณ์ปัจจุบันพบว่าอาการปวดเมื่อกล้ามเนื้อ และกล้ามเนื้ออักเสบตามการรายงานของกระทรวงสาธารณสุข ในปี 2559 พบว่า ผู้ป่วยโรคระบบกระดูกและกล้ามเนื้อที่เกิดจากการทำงาน จำนวน 82,147 ราย อัตราป่วย 124.94 ต่อแสนประชากร เพิ่มขึ้นจากปี 2558 ซึ่งมี จำนวน 73,012 ราย อัตราป่วย 112.08 ต่อแสนประชากร และเมื่อพิจารณาถึงอาชีพ พบว่าผู้ป่วยโรคระบบกระดูกและกล้ามเนื้อจากการทำงานส่วนใหญ่เป็นอาชีพเกษตรกรมากกว่า ร้อยละ 50 โดยในปี 2558 ร้อยละ 54.37 และในปี 2559 ร้อยละ 60.85 (กลุ่มอาชีวอนามัย สำนักงานโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม, 2560)

อนุมูลอิสระ คือสารที่มีอิเล็กตรอนไม่มีคู่อยู่ในวงรอบของอะตอม หรือโมเลกุล ทำให้มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นในร่างกาย โดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการหายใจ กระบวนการเผาผลาญพลังงาน และร่างกายก็จะมีระบบการกำจัดอนุมูลอิสระ เช่น กลูต้าไธโอน ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส และคะตะเลส เป็นต้น (Di Giacomo CD, et al., 2003) แต่ถ้าร่างกายมีการสร้างอนูมูลอิสระมากเกินไปจากภาวะเครียด ภาวะอักเสบ มีการติดเชื้อ ก็จะทำให้ร่างกายเกิดภาวะที่ไม่สมดุล ที่เรียกว่าภาวะเครียดออกซิเดชั่น (Floyd RA & Hensley K., 2002) ซึ่งมีผลในการเกิดพยาธิสภาพต่างๆ เช่น ภาวะสมองขาดเลือด, โรคมะเร็งบางชนิด, โรคไขข้ออักเสบ, ภาวะการอักเสบ เป็นต้น ดังนั้นการกำจัดอนุมูลอิสระจึงช่วยลดการเกิดพยาธิสภาพลงได้แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีมากตามธรรมชาติพบได้ทั้งในอาหาร พืช ผัก และผลไม้

การแพทย์แผนไทยมีกรรมวิธีการรักษากลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อหลากหลาย เช่นการนวด การประคบความร้อน การอบสมุนไพร และการใช้ยาสมุนไพร ปัจจุบันการใช้ยารักษากลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อและกระดูกตามบัญชียาจากสมุนไพร กล่าวถึงยาตำหรับโคคลานในการช่วยบรรเทาอาการปวดได้ (คณะกรรมการพัฒนา

ระบบยาแห่งชาติ, 2561) ซึ่งตรงกับแพทย์พื้นบ้านในไตหวันที่ใช้โคคลานในการรักษาอาการอักเสบ อาการไข้ อาการตับแข็ง และอาการตับอักเสบ (JM Linv, et al., 1995) นอกจากนี้แพทย์พื้นบ้านบังกลาเทศยังใช้โคคลานแก้อาการปวด อาการข้อเข่าเสื่อม อาการตับอักเสบเรื้อรังและอาการไข้ (Hasan, et al., 2014, p. 1)การใช้ยาตำรับโคคลานในประเทศไทยนั้นกล่าวถึงวิธีการต้มเพื่อสกัดสารสำคัญในน้ำเพื่อนำมาดื่มรับประทานบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อแต่ไม่ได้ระบุถึงวิธีการต้มในลักษณะใด โดยกรรมวิธีทางการแพทย์แผนไทยการมีการต้มหลายลักษณะ เช่น การต้มเดือด 15 นาที, การต้มเคี่ยวโดยต้ม 3 เอา 1 (วุฒิ, 2558) ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเพื่อเปรียบวิธีการต้มแต่ละชนิดของตำรับยาผสมโคคลานโดยการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้วิธีการเตรียมยาให้เหมาะกับผู้ป่วยให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดของการใช้ยา และเพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของยาผสมโคคลาน ให้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำยาสมุนไพรใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบัน

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดตำรับยาผสมโคคลาน

เตรียมตำหรับยาผสมโคคลานตามอัตราส่วนที่กำหนดคือ เถาโคคลาน 50 g ทองพันชั่ง 25 g โด่ไม่รู้ล้ม 15 g ผลมะตูมอ่อน 15 g จำนวน 3 ชุด

นำยาตำรับจำนวน 1 ชุด สกัดแบบต้มเดือด 7 วัน โดยการเอาสมุนไพรใส่ในหม้อเติมน้ำเป็น 20 เท่าของน้ำหนักยา ให้ความร้อนจนเดือดต้มต่อไปอีกประมาณ 15 นาที เทน้ำออกเพื่อทดสอบ 200 ml แล้วพักไว้ จากนั้นนำยาและสมุนไพรที่เหลือนำไปใช้ในครั้งต่อไปโดยเติมน้ำเท่ากับปริมาตรที่ลดลงไปจากการต้มครั้งแรก ต้มให้เดือดเหมือนกับการต้มครั้งแรกและทำเช่นเดียวกันนี้ในการต้มครั้งต่อๆไป จนครบ 7 ครั้ง จะได้สารตัวอย่าง จำนวน 7 ความเข้มข้น นำสารทั้ง 7 ความเข้มข้นทำการระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator

นำยาตำรับจำนวน 1 ชุด สกัดแบบต้ม 3 เอา 1 โดยการเอาสมุนไพรใส่ในหม้อเติมน้ำเป็น 20 เท่าของน้ำหนักยาก่อนเติมจะแบ่งน้ำเป็น 3 แล้วใส่ไป 1 ส่วนก่อนจากนั้นทำเครื่องหมายวัดระดับน้ำไว้แล้วจึงเติมน้ำอีก 2 ส่วน ให้ความร้อนจนเดือด ต้มให้น้ำเหลือ 1 ส่วนโดยสังเกตจากระดับที่ทำเครื่องหมายไว้ เทน้ำออกมาเพื่อทำการระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator

นำยาตำรับจำนวน 1 ชุด สกัดด้วยแอลกอฮอล์ โดยการใส่เอทานอล 95% ท่วมสมุนไพรจากนั้นหมักทิ้งไว้ 7 วัน รินออกมาเพื่อทำการระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator

การทำ Thin layer chromatography (TLC)

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจาก (นพมาศ และนงลักษณ์, 2551) ซึ่งเป็นวิธีศึกษาเอกลักษณ์โครมาโตกราฟฟีแบบเยื่อบาง คือ silica gel GF_{254} วัฏภาคเคลื่อนที่ Dichloromethane : Methanol = 8.5 : 1.5 นำแผ่น Silica gel GF_{254} อ่านผลภายใต้เครื่องให้กำเนิดแสง UV ความยาวคลื่น 254 nmแล้วบันทึกผล ความยาวคลื่น 365 nm แล้วบันทึกผลด้วยการถ่ายภาพ แล้ววิเคราะห์โปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อหาความเข้มของจุดสารโดยคำนวนจากพื้นที่ใต้กราฟ

การทำกราฟมาตรฐาน สาร Bergenin

โดยนำสารมาตรฐาน Bergenin ปริมาณ 0.1 g ละลายในเมทานอล 500 µl เจือจางด้วยการเติมเมทานอลให้ได้ 5 ความเข้มข้นคือ 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/mlและ 1.25 mg/ml จากนั้นหยดสารปริมาตร 2 µl ลงบนแผ่น Silica gel GF_{254} เป็นเส้นตรงยาว 5 มิลลิเมตร ในวัฏภาคเคลื่อนที่ Dichloromethane : Methanol = 8.5 : 1.5 อ่านผลภายใต้เครื่องให้กำเนิดแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm

แล้วบันทึกผล ที่ความยาวคลื่น 365 nm ภาพถ่ายแผ่น Silica gel GF_{254}ที่ได้จากการอ่านผล เข้าโปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อหาพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มสีและแทนค่าในสมการเส้นตรงแล้วบันทึกผล

การทำกราฟมาตรฐาน สาร Mallorepine

โดยนำสารมาตรฐานสารมาตรฐานMallorepine ปริมาณ 0.05 g ละลายในเมทานอล 500 µl เจือจางด้วยการเติมเมทานอลให้ได้ 5 ความเข้มข้นคือ 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/mlและ 0.625 mg/ml จากนั้นหยดสารปริมาตร 2 µl ลงบนแผ่น Silica gel GF_{254} เป็นเส้นตรงยาว 5 มิลลิเมตร ในวัฏภาคเคลื่อนที่ Dichloromethane : Methanol = 8.5 : 1.5 อ่านผลภายใต้เครื่องให้กำเนิดแสง (UV lamp with dark box) ความยาวคลื่น 254 nmแล้วบันทึกผล ความยาวคลื่น 365 nm ภาพถ่ายแผ่น Silica gel GF_{254}ที่ได้จากการอ่านผล เข้าโปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อหาพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มสีและแทนค่าในสมการเส้นตรงแล้วบันทึกผล

การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

DPPH Radical Scavenging Assay

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจาก (Thaipong, et al., 2006) โดยการทดลองนี้ใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระคืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช $DPPH^{\bullet}$ (1,1-diphenyl–2–picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดโดยเติมสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 1000-7.825 µg/ml ร่วมกับสารละลาย 125 µl $DPPH^{\bullet}$ปริมาตร 375 µl บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ในการทดลองนี้จะทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน แล้วจึงประเมินหาความสามารถของสารทดสอบในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{DPPH} - A_{Sample}) / (A_{DPPH} - A_{Control})] \times 100$$

เมื่อ A_{DPPH} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ $DPPH^{\bullet}$

A_{Sample} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

$A_{Control}$ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (Blank)

ABTS Radical Scavenging Assay

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจาก (Thaipong, et al., 2006) โดยการทดลองนี้ใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระคืออนุมูลอิสระเอบีทีเอส ABTS (2,2-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดโดยเติมสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 1000-7.825 µg/ml ร่วมกับสารละลาย 40 µl $ABTS^{\bullet}$ปริมาตร 360 µl บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ในการทดลองนี้จะทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ troloxเป็นสารมาตรฐาน แล้วจึงประเมินหาความสามารถของสารทดสอบในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{DPPH} - A_{Sample}) / (A_{DPPH} - A_{Control})] \times 100$$

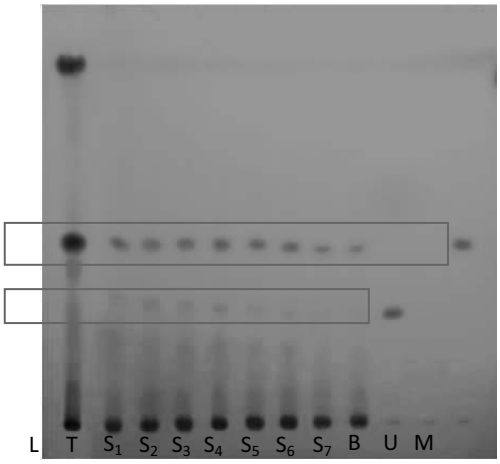
เมื่อ A_{DPPH} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet}$

A_{Sample} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

$A_{Control}$ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (Blank)

ผลการวิจัย

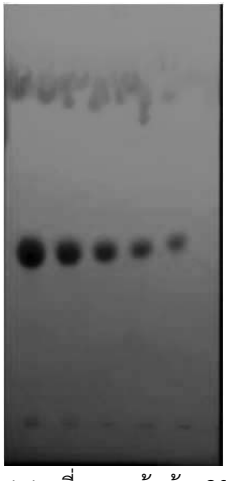
การหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC



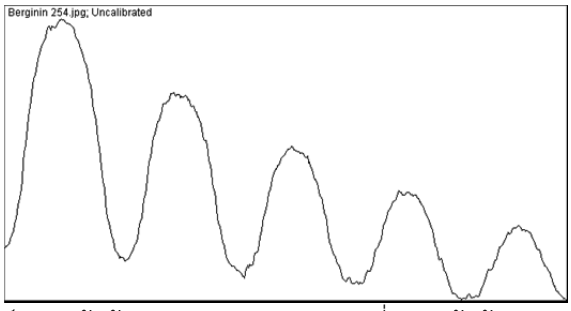
ภาพที่ 1 ผลการหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC ของตำรับยาผสมโคคลาน
L= การสกัดด้วยเอทานอล T=การต้มแบบ 3 เอา 1 S_{1-7}=การต้มเดือดวันที่ 1-7
B=สารมาตรฐาน Bergenin U=สารมาตรฐาน Ursolic acid M=สารมาตรฐาน Mallorepine

จากภาพที่ 1 แสดงถึงผลการหาองค์ประกอบทางเคมีของตำรับยาผสมโคคลาน จากการสกัดทั้ง 3 วิธี เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Bergenin, Ursolic acid และMallorepine พบว่าจากการสกัดทั้ง 3 วิธีเมื่อส่องด้วยเครื่อง UV ที่ 256 nm ปรากฏแถบสารในระดับเดียวกับสารมาตรฐาน Bergenin และMallorepine แต่ไม่ปรากฏแถบสารที่ตรงกับสารมาตรฐาน Ursolic acid

การหากราฟมาตรฐาน สาร Bergenin



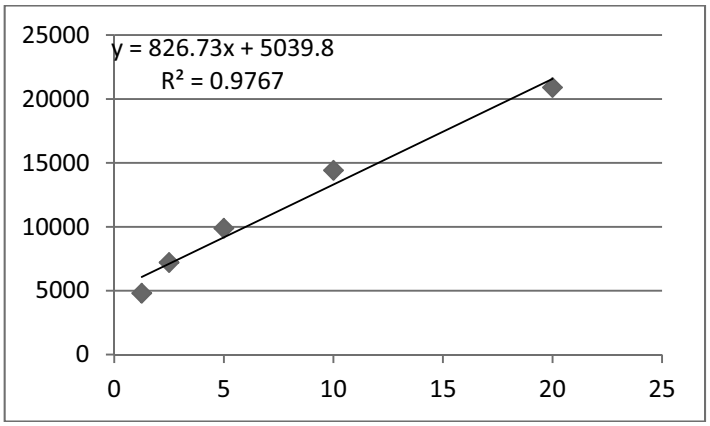
ภาพที่ 2 สารมาตรฐาน Berginin ที่ความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mg/ml



ภาพที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นสารมาตรฐาน Berginin ที่ความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mg/ml ด้วยโปรแกรม ImageJ

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Berginin และพื้นที่ใต้กราฟจากโปแกรม ImageJ

ความเข้มข้น (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ (area unit)
20	20907.70
10	14414.17
5	9886.73
2.5	7215.15
1.25	4810.71

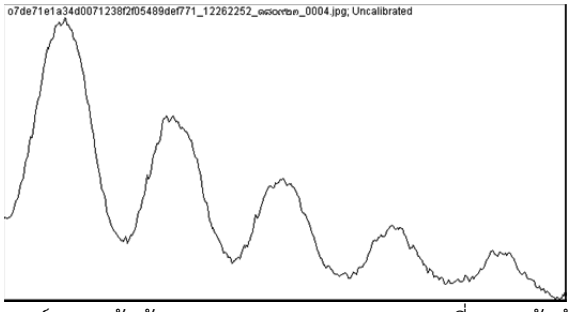


กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของความเข้มข้นสารมาตรฐาน Berginin และพื้นที่ใต้กราฟจากโปแกรม ImageJ

จากกราฟ จะได้สมการเส้นตรง y = 826.7x + 5039 โดยมีค่า R^2 = 0.976

การหากราฟมาตรฐาน สาร Mallorepine

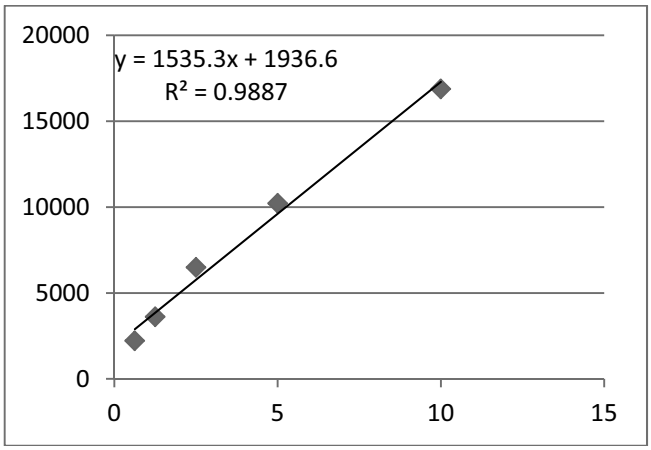
ภาพที่ 4 สารมาตรฐาน Mallorepine ที่ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/ml



ภาพที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นสารมาตรฐาน Mallorepine ที่ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/ml ด้วยโปรแกรม ImageJ

ตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Mallorepine และพื้นที่ใต้กราฟจากโปแกรม ImageJ

ความเข้มข้น (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ (area unit)
10	16877.95
5	10221.05
2.5	6490.56
1.25	3617.78
0.625	2221.00



กราฟที่ 2 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของความเข้มข้นสารมาตรฐาน Mallorepine และพื้นที่ใต้กราฟจากโปแกรม ImageJ

จากกราฟ จะได้สมการเส้นตรง y = 1535.x + 1936 โดยมีค่า R^2= 0.988

ตารางที่ 3 แสดงความเข้มข้นของสาร Berginin และสาร Mallorepine จากการแทนค่าในสมการ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ตำรับยาผสมโคคลาน	ปริมาณสารสำคัญ		ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ	
	Berginin (mg/ml)	Mallorepine (mg/ml)	DPPH assay IC_{50} (µg/ml)	ABTS assay IC_{50} (µg/ml)
การสกัดด้วยการต้มเดือดวันที่ 1	3.95±0.74	7.33±0.24	177.8	528.7
การสกัดด้วยการต้มเดือดวันที่ 2	3.40±1.03	7.31±0.47	165.7	656.5
การสกัดด้วยการต้มเดือดวันที่ 3	4.45±1.56	9.61±0.27	90.18	664.6
การสกัดด้วยการต้มเดือดวันที่ 4	3.99±0.45	8.74±0.18	209	224.2
การสกัดด้วยการต้มเดือดวันที่ 5	5.87±0.47	8.36±0.10	121.1	415.1
การสกัดด้วยการต้มเดือดวันที่ 6	3.26±0.51	5.84±0.13	637.1	973.6
การสกัดด้วยการต้มเดือดวันที่ 7	2.19±0.52	6.20±0.23	>1000	>1000
การสกัดด้วยการต้มแบบ 3 เอา 1	0.73±0.28	6.00±0.37	245.8	>1000
การสกัดด้วยแอลกอฮอล์	21.05±0.36	23.55±0.64	>1000	429.6

อภิปรายผล

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง เพื่อเปรียบเทียบสารสกัดตำรับยาโคคลานด้วยวิธีทางการแพทย์แผนไทยโดยการต้มเดือด 7 วัน การต้มแบบ 3 เอา 1และการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ การทดลองนี้ใช้การตรวจ TLC fingerprintหาปริมาณสารสำคัญ Barginin และ Mallorepine โดยการสกัดตำรับยาผสมโคคลาน 3 วิธีและสกัดสมุนไพรเดียวภายในตำรับเพื่อตรวจค่า Rf ของสมุนไพรเดียวภายในตำรับพบว่าจากการตรวจสอบมีเพียงตำรับยาผสมโคคลานและสมุนไพรโคคลานที่มีค่า Rf ตรงกับแถบสารสำคัญ Barginin และ Mallorepine ซึ่งตำรับยาผสมโคคลานที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์มีปริมาณสาร Barginin และ Mallorepine มากที่สุดเนื่องจาก แอลกอฮอล์

เป็นสารมีขั้วปานกลาง ซึ่งสามารถละลายสารที่มีขั้ว และไม่มีขั้วได้มากกว่า น้ำที่มีขั้วสูงกว่า ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี (นพมาศ และคนอื่นๆ, 2551) นอกจากนี้ความร้อนยังมีผลต่อปริมาณสาร Barginin ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรม (ยลดา, 2561) พบว่าการทำMaceration สมุนไพรโคคลานด้วยน้ำให้ปริมาณสาร Barginin มากกว่าการทำ Soxhlet extraction ซึ่งเห็นได้ว่าการที่สมุนไพรถูกความร้อนนั้นจะได้ปริมาณสารออกมาน้อยกว่า

อย่างไรก็ตามจากการทดลองฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยการตรวจ DPPH assayพบว่าการต้มเดือดวันที่ 3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด IC_{50} 90.18µg/mlส่วนการสกัดด้วยแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด IC_{50}>1,000µg/mlและการตรวจ ABTS assay พบว่าการต้มเดือดวันที่ 4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด IC_{50} 224.2µg/mlส่วนการต้มแบบ 3 เอา 1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด IC_{50}>1,000µg/ml สารต้านอนุมูลอิสระช่วยลดสารสื่ออักเสบซึ่งสามารถช่วยลดอาการปวดได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นการนำไปใช้ในทางการแพทย์แผนไทยจึงควรเลือกใช้วิธีต้มเดือด 7 วันและเมื่อเทียบปริมาณการรับประทานเพื่อรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อทางทฤษฎีโดยคำนวนเปรียบเทียบสารสกัดตำรับยาผสมโคคลานจากการทดลองในสัตว์ (Hasan, et al., 2018) พบว่า การสกัดด้วยวิธีการทางการแพทย์แผนไทยที่ดีที่สุดคือการต้มเดือด 7 วันโดยมีขนาดรับประทานที่ไม่ทำให้เกิดพิษต่อร่างกายคือ 10.29 g/Kg/วัน แต่อย่างไรก็ตามตำรับยาผสมโคคลานยังมีสมุนไพรอื่นภายในตำรับนอกจากโคคลานที่มีฤทธิ์แก้ปวดเช่น โด่ไม่รู้ล้ม (Chim Kei Chan, et al., 2017) ซึ่งควรศึกษาต่อไปทั้งในเรื่องสารสำคัญ และฤทธิ์อื่นๆที่เกี่ยวข้อง เช่นฤทธิ์แก้ปวด แก้อักเสบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณวิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดพิษณุโลก ที่สนับสนุนด้านสถานที่ในการทำวิจัย และมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทาที่มีส่วนสนับสนุนให้งานวิจัยลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มอาชีวอนามัย สำนักงานโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม. (2560). **แนวทางการจัดบริการอาชีวอนามัยให้กับแรงงานในชุมชนด้านการยศาสตร์ สำหรับเจ้าหน้าที่หน่วยบริการสุขภาพปฐมภูมิ**. นนทบุรี : กรมควบคุมโรค.

คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ (2561). **ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติเรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.2561 ประกาศใช้เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2561**. [Online]. Available : www.fda.moph.go.th/sites/drug/Shared%20Documents/New/nlem2561.PDF [2561, พฤศจิกายน 19].

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และนงลักษณ์ เรื่องวิเศษ. (2551). **วิเคราะห์ วิจัย คุณภาพเครื่องยาไทย**. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ : คอมเซ็พท์ เมดิคัส.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, อุทัย โสธนะพันธ์ และประไพ วงศ์สินคงมั่น. (2551). **ทีแอลซี : วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย**. (พิมพ์ครั้งที่ 1). นนทบุรี: สถาบันพัฒนาการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก.

ยลดา ศรีเศรษฐ์, วรัญญา จตุพรประเสริฐ และกนกวรรณ จารุกำจง. (2561). การวิเคราะห์ปริมาณเบอจีนินในสารสกัดลำต้นโคคลานโดยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงวัฏภาคย้อนกลับ. **เภสัชศาสตร์อีสาน, 14**(1). 67-74.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2558). **ย่อเภสัชกรรมไทย และสรรพคุณสมุนไพร**. (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ : ศิลป์สยามบรรจุภัณฑ์และการพิมพ์.

Chim Kei Chan, et al. (2017). **Anti-neuroinflammatory Activity of *Elephantopus scaber* L. via Activation of Nrf2/HO-1 Signaling and Inhibition of p38 MAPK Pathway in LPS-Induced Microglia BV-2 Cells**. Frontiers in Pharmacology, pp.1-14.

Di Giacomo CD, et al. (2003). Novel inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. **Experimental Biology and Medicine, 288,** 486-490.

Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. (2002). Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Aging, 23,** 795-807.

Hasan, et al. (2014). **Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Leaf Extract of *Mallotusrepandus* (Willd.) Muell. Arg**. BioMed Research International. pp.1-7.

_____. (2018). **Analgesic and anti inflammatory activities of methanolic extract of *Mallotusrepandusstem* in animal models**. SpringerLink.

JM Lin, et al. (1995). Scavenging effects of *Mallotusrepandus*on active oxygen species. **Ethnopharmacology, 46**, 175-181.

Kriengsak Thaipong, et al. (2006). **Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts**. Food Composition and Analysis. pp.669-675.