



การพัฒนาเจลต้านการอักเสบจากสารสกัดไพลและติปลี

Development of an Anti-inflammatory Gel of *Zingiber cassumunar* Roxb and *Piper retrofractum* Extractsนิภาพร ไทยพัฒน์กิจ¹ สายสุดา แสงกล้า¹ ปิยวดี คำสวัสดิ์² พรรณนิภา แจกแต่งพะเนา³จตุพร ประทุมเทศ¹ รัชฎาวรรณ อรรถนิมาตย์¹ และ ปราณี ศรีราช^{1*}¹สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร

สกลนคร 47160

²กลุ่มงานการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลห้วยเกิ้ง อุดรธานี 41110³สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ สุรินทร์ 33000

Nipaporn Thaipattanakit¹, Saisuda Saengkla¹, Piyawadee Khamsawat²,
Phannipha Chekdaengphanao³, Jatuporn Prathumtet¹, Ratchadawan Aukkanimart¹
and Pranee Sriraj^{1*}

¹Department of Traditional Medicine Faculty of Natural Resources Rajamangala University of
Technology ISAN Sakonnakhon Campus, Sakonnakhon 47160

²Thai Traditional and Alternative Medicine, Huaikoeng Hospital, Udon Thani Province, 41110

³Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Public Health, Surindra Rajabhat University,
Surin Province, 33000

*Corresponding author: pranee.si@rmuti.ac.th

Received: 4 October 2025/ Revised: 12 January 2026/ Accepted: 16 January 2026

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารสำคัญ ฤทธิ์ทางชีวภาพ และพัฒนาเจลสมุนไพรรักษาแผลจากสารสกัดเหง้าไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) และสารสกัดผลติปลี (*Piper retrofractum* Vahl.) มีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) พบว่าสารสกัดเหง้าไพลมีสาร (E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol อยู่ในกลุ่มฟีนอลบิวทิโนยด์ ส่วนสารสกัดผลติปลีมีสาร Piperine อยู่ในกลุ่มอัลคาลอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ การทดสอบปริมาณสารสำคัญพบว่า สารสกัดเหง้าไพลมีค่าปริมาณสารฟีนอลรวมและสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด 185.95 ± 23.29 mg GAE/g และ 217.80 ± 30.53 mg QCE/g ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดผลติปลีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 109.04 ± 2.33 และ 102.61 ± 0.50 μ g/mL ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดเหง้าไพลมีค่าการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กด้วยวิธี FRAP สูงสุด 519.24 ± 10.47 mM Fe^{2+} /mg การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบพบว่าสารสกัดผลติปลีมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด 12.89 ± 0.61 μ g/mL สำหรับเจลสมุนไพรรักษาแผล 3 สูตร พบว่าเจลสารสกัดผลติปลีมีประสิทธิภาพกำจัด NO สูงสุด ทั้งก่อนและหลังการทดสอบความคงตัว ($IC_{50} = 16.18 \pm 1.02$ และ 15.05 ± 1.41 μ g/mL, $P > 0.05$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผลติปลีมีศักยภาพในการต้านการ

อักเสบที่ดี และสารสกัดผสมไพลและติปลีทำให้มีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ดีขึ้นจากสารสกัดเหง้าไพลเดี่ยว จึงสามารถพัฒนาเป็นเจลสมุนไพรใช้ภายนอกเพื่อบรรเทาการอักเสบ รวมถึงเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวิจัยทางคลินิกในอนาคต

คำสำคัญ: ไพล ติปลี ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ เจลสมุนไพร

Abstract

This study aimed to identify bioactive compounds, evaluate biological activities, and develop herbal gels from crude extracts of *Zingiber cassumunar* Roxb. and *Piper retrofractum* Vahl. GC-MS analysis revealed that *Z. cassumunar* contained (E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl) but-3-en-1-ol(phenylbutenoid), while *P. retrofractum* contained piperine (alkaloid), both associated with anti-inflammatory activity. Phytochemical analysis showed that *Z. cassumunar* exhibited the highest total phenolic content (185.95 ± 23.29 mg GAE/g) and total flavonoid content (217.80 ± 30.53 mg QCE/g). Antioxidant assays indicated strong radical scavenging activity of *P. retrofractum* with IC_{50} values of 109.04 ± 2.33 μ g/mL (DPPH) and 102.61 ± 0.50 μ g/mL (ABTS), whereas *Z. cassumunar* had the highest reducing power (FRAP: 519.24 ± 10.47 mM Fe^{2+} /mg). Anti-inflammatory evaluation revealed that *P. retrofractum* had the lowest IC_{50} (12.89 ± 0.61 μ g/mL). Among three herbal gel formulations, the *P. retrofractum*-based gel demonstrated the strongest nitric oxide inhibition, maintaining stability after six heating-cooling cycles ($IC_{50} = 16.18 \pm 1.02$ and 15.05 ± 1.41 μ g/mL, $P > 0.05$). This study demonstrates that *P. retrofractum* fruit extract possesses strong anti-inflammatory potential. Moreover, a combined extract of *Z. cassumunar* and *P. retrofractum* produced enhanced anti-inflammatory activity compared with the *Z. cassumunar* extract alone. These findings suggest that the mixed herbal extract can be further developed into a topical herbal gel for external use to help alleviate inflammation. This study provides a foundation for future clinical research on herbal-based anti-inflammatory therapies.

Keywords: *Zingiber cassumunar* Roxb., *Piper retrofractum* Vahl., Antioxidant, Anti-inflammatory, Herbal gel

บทนำ

การอักเสบ (inflammation) มีสาเหตุจากกระบวนการทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาที่หลากหลาย เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำเป็นซึ่งช่วยให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในระหว่างการติดเชื้อหรือการบาดเจ็บ [1] ทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่าง ๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) และโพรสตาแกลนดิน E2 (Prostaglandins E2) กระบวนการอักเสบแบ่งได้ 2 ชนิด คือ การอักเสบเฉียบพลัน (Acute Inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (Chronic Inflammation) ลักษณะเฉพาะของการอักเสบเฉียบพลัน จะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมคโครฟาจ ลักษณะทางคลินิกของการอักเสบโดยเฉพาะการอักเสบแบบเฉียบพลันในระดับเนื้อเยื่อการอักเสบจะมีลักษณะ ดังนี้ ปวด บวม แดง และร้อน [2] ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณภายในเซลล์และระหว่างเซลล์ที่สำคัญ มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการอักเสบ [3] นอกจากนี้ไนตริกออกไซด์ปริมาณมากในสภาวะอักเสบยังเหนี่ยวนำปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย [4] กระบวนการสร้างไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) สร้างจาก L-arginine โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Nitric Oxide Synthetase (NOS) ทำปฏิกิริยา deamination โดย NO ที่สร้างขึ้นจากกระบวนการดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของการอักเสบ NO ที่เพิ่มมากกว่าปกติจะทำปฏิกิริยากับ Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) เกิดเป็น Peroxynitrite (ONOO-) ที่มีฤทธิ์รุนแรงฆ่าจุลชีพได้และยังสามารถทำลายเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้น [5] ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของ NO นับเป็นแนวทางสำคัญในการควบคุมและบรรเทาการอักเสบ [6]



ในปัจจุบันโรคระบบกล้ามเนื้อเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสุขภาพอีกประการหนึ่งของมนุษย์ คุณภาพชีวิตในผู้ใหญ่ของผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อลดลง มีความรุนแรงและการทำงานของโรคมีความสัมพันธ์อย่างมากกับการทำงานทางกายภาพและทางสังคม [7] มีรายงานอัตราผู้ป่วยนอกตามกลุ่มสาเหตุการป่วยกลุ่มโรคระบบกล้ามเนื้อเป็นอันดับ 3 ของประเทศไทย อาการปวดและอักเสบของกล้ามเนื้อและข้อ พบได้ประมาณร้อยละ 47 ของประชากร [8] ยาในการรักษาอาการเรื้อรังนี้ โดยทั่วไปมีการใช้ยาแก้ปวดเฉพาะที่ในรูปแบบยาแผนปัจจุบัน ยาสเตียรอยด์และยาที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ เช่น ยาปฏิชีวนะ มักใช้ในการรักษาโรคอักเสบ ยาสังเคราะห์เหล่านี้มีผลข้างเคียงต่อสุขภาพมากมาย เช่น ปัญหาทางเดินอาหาร เกิดแผลในกระเพาะอาหาร [9] มีปัญหาดับหรือโต หรืออาจเกิดการแพ้ยาได้ เป็นต้น [10] และในทางการรักษาด้วยศาสตร์ทางการแพทย์แผนไทย นอกจากการนวดรักษา ประคบสมุนไพร หรือรับประทานยาสมุนไพรเพื่อลดอาการอักเสบ มีการใช้ครีมไหล [11] ลูกประคบที่มีส่วนผสมของกระท่อม [12] ตำรับยาสมุนไพรใช้ภายนอกลดอาการปวดถือได้ว่าได้รับความนิยมเป็นอย่างสูง

จากสรรพคุณของพืชสมุนไพรไทยที่ได้กล่าวมาข้างต้นในงานวิจัยนี้ได้สนใจทำการศึกษาสมุนไพรสองชนิดได้แก่ ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) และติปลี (*Piper retrofractum* Vahl.) ไพล เป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญ ใช้รักษาอาการอักเสบ ปวด และปัญหาเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ เนื่องจากเหง้าไพลที่นำมาใช้ทางการแพทย์ มีองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติในการรักษา โดยไพลมีสารสำคัญหลัก ได้แก่ (E)-(3,4-dimethoxyphenyl)butadiene (DMPBD), (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (compound D), และ (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-yl acetate (compound D acetate) อยู่ในกลุ่มฟีนอลบิวทีนอยด์ (Phenylbutenoids) และเคอร์คูมินอยด์ (Curcumin) [13] ในตำราสรรพคุณยาไทยรายงานว่าไพลมีรสเผ็ดร้อน ใช้ภายนอกโดยการทาถูลดอาการปวดกล้ามเนื้อและแก้เคล็ดขัดยอก การศึกษาพบว่าไพลมีสารกลุ่มมอโนเทอร์พีน (Monoterpene) เป็นหลัก ได้แก่ sabinene และ terpinen-4-ol [14] นอกจากนี้ไพลยังมีสารสีเหลืองเคอร์คูมิน (Curcumin) ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร [15] ในขณะที่สรรพคุณทางการแพทย์แผนไทยของติปลี ตามตำรายาไทยพบว่า ผล มีรสเผ็ดร้อน นิยมใช้เป็นเครื่องเทศ เนื่องจากมีกลิ่นหอมฉุน บำรุงธาตุ ขับลมในลำไส้ ระบบย่อยอาหารทำงานได้ดีขึ้น ทำให้เจริญอาหาร [15] มีรายงานการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากผลพบสารอัลคาลอยด์ (alkaloids) คือ ไพเพอรีน (piperine) เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักซึ่งมีผลระงับปวด มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านอาการซึมเศร้า กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ด้านท้องเสีย และด้านพิษต่อตับ เป็นต้น [16]

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด แม้ในปัจจุบันจะมีผลิตภัณฑ์ไพลในรูปแบบครีมและมีรายงานการพัฒนาเจลไพลมาก่อน แต่ยังไม่มียาตำรับที่มุ่งพัฒนาสูตรผสมไพลร่วมกับติปลีในรูปแบบเจล เพื่อยกระดับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาให้เหมาะสมกับการใช้ภายนอก งานวิจัยนี้จึงนำสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดมารวมกันเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบในหลอดทดลอง และพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบ “เจลด้านการอักเสบ” ซึ่งมีข้อดีด้านความสะดวกต่อการใช้งาน ช่วยให้สารออกฤทธิ์ตรงตำแหน่ง ลดการฟุ้งกระจายและอาการข้างเคียงของยาแผนปัจจุบัน รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญสำหรับการต่อยอดสู่การนำไปศึกษาทางคลินิกและการพัฒนาเชิงผลิตภัณฑ์ในอนาคตต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสาร

นำสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ เหง้าไพลและผลติปลี ได้จากร้านสมุนไพรท่าพระจันทร์ แขวงบางจาก เขตภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร เมื่อเดือน มกราคม พ.ศ. 2568 นำสมุนไพรแห้งไปบดให้ละเอียด แล้วชั่งสมุนไพรหัวแต่ละชนิด 3,000 g มาสกัดโดยใช้ 95% เอทานอล (Chemipan Corporation Co., Ltd., Thailand) เป็นตัวทำละลาย ในอัตราส่วน 1:2 คือสมุนไพร 1 ส่วน และเอทานอลอีก 2 ส่วน หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน แล้วกรองด้วยกระดาษ Whatman No.1 (CAT NO.1001-110, GE Healthcare Life Sciences, Thailand) นำส่วนของสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหย Rotary Evaporator (SIAM INTERCORP CO., Ltd., Thailand) จนตัวทำละลายแห้งสนิทและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบ

2. การวิเคราะห์สารประกอบทางเคมีของสารสกัดเหง้าไพลและผลติปลี

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเหง้าไพลและสารสกัดผลติปลีด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GCMS-QP2020 Ultra, Shimadzu, Japan) เตรียมตัวอย่างสำหรับนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยเตรียมสารสกัดความเข้มข้น 1 µg/mL ในเอทานอลผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Sodium sulfate ปริมาตร 0.1 g นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex นาน 30 นาที แล้วนำไปกรองด้วย ไซริงค์ฟิลเตอร์ (Syringe Filter) ขนาด 0.45 µm จะได้ส่วนใสที่กรองได้ของสารสกัดนำไปวิเคราะห์ ส่วนของ GC ใช้การฉีดที่ปริมาตร 1 µL (split ratio เท่ากับ 5:1) โดยตั้งอุณหภูมิส่วนที่ฉีดสาร 250 องศาเซลเซียส ใช้คอลัมน์ คือ SH-Rtx-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) ตั้งอัตราการไหลของก๊าซฮีเลียมเข้าคอลัมน์เป็น 1.36 mL/min ส่วนอุณหภูมิคอลัมน์จะตั้งโปรแกรมโดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร็ว 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร็ว 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปรับอัตราเร็วเป็น 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส ส่วนของ MS เป็น MS Quadrupole (mass selective detector) ที่ต่อกับ GC โดยตรง ใช้ ionization voltage เป็น 70 อิเล็กตรอนโวลต์ และอุณหภูมิของ ion source เป็น 280 องศาเซลเซียส ในระบบ Electron Impact Ionization (EI) โดยให้ผลแยกองค์ประกอบของสารสกัดเหง้าไพลและสารสกัดผลติปลีเป็น Total Ion Chromatogram (TIC) ในระบบ Scan Mode ใช้ช่วงของ Mass 35-400 AMU (Atomic Mass Unit) วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดโดยการเปรียบเทียบค่า Retention time และ Mass spectrum กับค่ามาตรฐานที่มีใน NIST1 library database ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 80% Quality match [17]

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic content; TPC) โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ใช้สารละลาย gallic acid (Cas No.50-81-7, RANKEM™, India) เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยเตรียมสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL และเตรียมสารสกัด 1 mg/mL ปริมาตร 20 µL เติมนลงใน 96-Well plates เตรียมสาร Folin-Ciocalteu reagent (Loba Chemie, India) ปริมาตร 100 µL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 75% (w/v) Sodium carbonate (Na₂CO₃) (Loba Chemie, India) ปริมาตร 80 µL ลงใน 96-Well plates โดยแต่ละหลุมจะมีปริมาตรของสารรวมทั้งหมด 200 µL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Infinite® 200 pro, Tecan, Switzerland) บันทึกและวิเคราะห์ผล ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกับกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดแห้ง (mg GAE/g dry extract) [18]

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) โดยใช้สาร Quercetin (Sigma-Aldrich, USA) เป็นสารมาตรฐาน มีขั้นตอนโดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 µg/mL ปริมาตร 5 µL เติมนลงใน 96-Well plate จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 130 µL และ 5% Sodium nitrite (NaNO₂) (Loba Chemie, India) ปริมาตร 7.5 µL บ่มไว้ในที่มืด 5 นาที ครบเวลาเติม 10% Aluminum chloride (AlCl₃) (Loba Chemie, India) ปริมาตร 7.5 µL และบ่มไว้ในที่มืด 5 นาที ครบเวลา เติมน้ำกลั่น Sodium hydroxide (NaOH) (QReC, Newzealand) ที่ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 50 µL เติมนลงใน 96-Well plate โดยแต่ละหลุมจะมีปริมาณของสารรวมทั้งหมด 200 µL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader บันทึกและวิเคราะห์ผล ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยรายงานค่าในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอซีตินต่อกรัมสารสกัด (mg QCE/g crude extract) [18]

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เป็นการทดสอบเพื่อวัดค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดย DPPH จะไปทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระภายใน 10 – 30 นาที ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็น positive control คือ กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) (Cas No. 30931-67-O, SIGMA-ALDRICH, USA) นิยมรายงานผลเป็นค่า IC₅₀ ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระลดลง 50% โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 25 µg/mL โดยใช้



เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย จากนั้นเจือจางสารให้ได้ความเข้มข้น 1-20 $\mu\text{g/mL}$ เตรียมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย จากนั้นเจือจางสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นที่ 2-20 $\mu\text{g/mL}$ เตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.2 mM ใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย เติมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$ สารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 100 μL และเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 μL ลงใน 96-well plate บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm วัดด้วยเครื่อง Microplate reader บันทึกและวิเคราะห์ผล ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยรายงานค่า IC_{50} [19]

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) โดยใช้ reagent คือ 2,2 - Azino-bis (3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid) เป็น stable radical ใน aqueous solution โดยสารละลายนี้จะมีสีเขียว ก่อนนำไปใช้ทดสอบปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมสารละลาย ABTS (Cas No. 30931-67-O, SIGMA-ALDRICH, USA) โดยการชั่งสาร ABTS จำนวน 3.6 mg ละลายในน้ำกลั่น 1 mL เติมสารละลาย Potassium persulfate (QReC, Newzealand) 0.6 mg จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 มาผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ เมื่อครบกำหนดเวลา เติมสารละลายที่เตรียมไว้ นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 40 mL และนำสารละลาย ABTS มาเจือจางด้วยเอทานอล ให้ได้สารละลายที่มีค่าดูดกลืนแสงในช่วง 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 nm เตรียมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรและปิเปตต์สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 1-20 $\mu\text{g/mL}$ จากนั้นลงใน 96-Well plates เติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 50 μL เติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 100 μL บ่มทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที ครบกำหนดนำไปอ่านด้วยเครื่อง Microplates reader วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระด้วยค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน (0.0125-0.1 mg/mL) บันทึกและวิเคราะห์ผล ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยรายงานค่า IC_{50} [20]

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน (Fe^{3+} -TPTZ) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Fe^{2+} -TPTZ) จากสารละลายสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีน้ำเงินม่วง ปริมาณของ (Fe^{2+} -TPTZ) ที่เกิดขึ้นนี้คือ ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่แสดงออก ในรูป FRAP value เทียบกับสารมาตรฐานของ Ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) โดยมีวิธีการดังนี้ เตรียม Acetate buffer ที่ความเข้มข้น 300 mM (pH = 3.6) ปริมาตร 500 mL โดยชั่ง Sodium acetate (QReC, Newzealand) 1.55 g เติม Glacial acid (RCI Labscan, Ireland) 8 mL แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 mL เตรียมสาร 2,4,6-tripyridyl-striazine (TPTZ) (Acros Organics, Belgium) ที่ความเข้มข้น 10 mM โดยชั่ง TPTZ 31 mL ละลายใน HCl 10 mL (เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง) เตรียมสาร Iron (III) chloride (FeCl_3) (Loba Chemie, India) โดยการชั่ง FeCl_3 จำนวน 54 mg ละลายในน้ำกลั่น 10 mL (เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง) นำสารละลาย Acetate buffer, สารละลาย TPTZ และสารละลาย Iron (III) chloride (FeCl_3) มาผสมกัน (ในอัตราส่วน 10:1:1) เตรียมสาร $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 10 mM โดยการชั่งสาร $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 1.7613 mg เติม 95% ethanol 10 mg โดยเตรียมเป็นความเข้มข้น 25-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำเป็นกราฟมาตรฐาน นำสารสกัดแห้งโพลีและผลดีปัสที่ละลายใน 95% ethanol ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ เติมลงใน 96-Well plates ปริมาตร 20 μg เติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 80 μL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm นำไปอ่านผลด้วยเครื่อง Microplates reader บันทึกผลทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไปเปรียบเทียบเป็นกราฟมาตรฐาน FeSO_4 [21]

4. การศึกษาผลของสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลติป्ली และสารสกัดผสมไพลและติป्ली ต่อศักยภาพในการต้านการอักเสบในระดับหลอดทดลอง

เพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 (ATCC No. TIB-71) ซื้อมาจาก American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ประกอบด้วย L-glutamine, sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum (FBS) (Thermo fisher, USA), and 1% antibiotic/antimycotic mixture (Sigma-Aldrich, USA) เลี้ยงที่ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส [22]

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ใช้สาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Thermo fisher, USA) ด้วยวิธี colorimetric assay เพาะเลี้ยง RAW 264.7 cell (1×10^5 cells/well) เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาณ 100 μ L/ หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดละลายอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0.1-10,000 μ g/mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุม (vehicle) ได้เติมเฉพาะสาร DMSO (Thermo fisher, USA) (0.5% v/v) ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัด เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ปริมาณ 200 μ L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและละลายผลึก formazan ด้วย DMSO จำนวน 200 μ L วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดย Microplate reader บันทึกและวิเคราะห์ผลทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยรายงานค่า IC₅₀

การศึกษามลของสารสกัดต่อการอักเสบ โดยวัดการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide (NO) นำเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7 cell line) จำนวน 1×10^5 cells/well เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin) (Thermo fisher, USA) ใน 96 well plates 5% CO₂ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 100 μ L จากนั้นเติมสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1-10,000 μ g/mL) ลงไปหลุมละ 100 μ L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เก้าออก จากนั้นเติม DMEM ใหม่ที่มี lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, USA) 100 μ g/mL ลงไปหลุมละ 100 μ L ยกเว้นหลุม control หลุม control เติม DMEM เท่านั้น บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูด supernatant แต่ละหลุมมา 100 μ L ใส่ใน 96-well plates เติม Griess reagent (Promega, USA) หลุมละ 100 μ L วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm รายงานค่าปริมาณ NO โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน Sodium nitrite (NaNO₂) ทดสอบ 3 ซ้ำ [22]

5. การพัฒนาเจลสมุนไพรรักษาแผลจากสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลติป्लीและสารสกัดผสมไพลและติป्ली

ส่วนประกอบของเจลสมุนไพรรักษาแผล ได้แก่ สารสกัดเหง้าไพลและสารสกัดผลติป्ली, Carbopol 940 (Chemipan Corporation Co., Ltd., Thailand), Methyl Paraben (Chemipan Corporation Co., Ltd., Thailand), Propylene Glycol (Chemipan Corporation Co., Ltd., Thailand), Triethanolamine (Phitsanuchemicals, Thailand) และ Distilled Water (From Pharmaceutical Chemistry Laboratory Room) การเตรียมเจลสมุนไพรรักษาแผล แบ่งออกเป็น 3 สูตร โดยมีการกำหนดความเข้มข้นของสารสกัดในตำรับเจล จากค่าความเข้มข้นในการยับยั้ง nitric oxide (IC₅₀) ซึ่งได้จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับหลอดทดลอง ซึ่งสารสกัดเหง้าไพล 248.9 mg สารสกัดผลติป्ली 0.015 mg และสารสกัดผสมไพลและติป्ली 102.9 mg ทุกสูตรเตรียม Carbopol 1.5 g ผสมในน้ำกลั่น 94 mL แล้วตีให้เข้ากันประมาณ 30 นาที แล้วปล่อยให้เจลพองตัว เติม Methyl Paraben 0.2 g, Propylene Glycol 5 mL คนให้เข้ากัน ค่อย ๆ เติม Triethanolamine (TEA) เพื่อปรับค่า pH ให้อยู่ระหว่าง 5.0-5.5 จากนั้นเติมสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดติป्ली และสารสกัดผสมไพลและติป्लीในตำรับเจลแต่ละสูตร ผสมให้เข้ากันและบรรจุลงในหลอด [23]

การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบของเจลสมุนไพรรักษาแผล โดยการวิเคราะห์ศักยภาพในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ด้วยวิธี Griess method นำเจลสมุนไพรรักษาแผลมาละลายใน DMSO ปริมาตร 1-2 μ L เพื่อให้เจลไม่ข้นหนืดเกินไป จากนั้นเปิดเจลปริมาตร 20 μ L ใส่ใน 96 well plate จากนั้นเติมโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (Sodium nitroprusside) ความเข้มข้น 10 mM



ปริมาตร 40 μL นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 150 นาที แล้วเติม Griess reagent ที่ประกอบด้วย 1% ซัลฟานิลลาไมด์ และ 0.1% เอ็น-(1-แนฟทิล) เอทีลินไดอะมีนไดไฮโดรคลอไรด์ ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 μL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader ทดสอบ 3 ซ้ำ โดยใช้เจลมาตรฐานที่มีส่วนผสมของ 1% ไคโคลฟิแนค เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก และ เจลพื้นไม่มีส่วนผสมของสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุม ฤทธิ์ด้านการอักเสบจะถูกรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง NO [22]

การประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบของเจลสมุนไพรเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ และหลังจากการประเมินความคงตัวในสภาวะเร่งครบ 6 รอบ (ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง /1 รอบ) [24]

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเจลสมุนไพรก่อนและหลังจากการประเมินความคงตัวในสภาวะเร่ง (Heating cooling cycle) โดยใช้สถิติ Paired-sample T-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} < 0.05$ ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Science (SPSS) เวอร์ชัน 16.0 และสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism V. 10

ผลการวิจัย

1. ผลของการสกัดสาร

การสกัดสมุนไพรเหง้าไพลและผลดีป्ली ด้วยวิธีการหมักในเอทานอลร้อยละ 95 ได้สารสกัดหยาบแต่ละชนิดมีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวหนืด สารสกัดเหง้าไพลมีสีน้ำตาลเหลือง สารสกัดผลดีป्लीมีสีน้ำตาลเหลืองส้ม พบปริมาณสารสกัดหยาบแตกต่างกันคิดเป็นร้อยละผลผลิต (%yield) มีค่าเท่ากับ 3.07 และ 5.04 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ร้อยละของผลผลิตของสารสกัดเหง้าไพลและผลดีป्ली

สมุนไพร	น้ำหนักสมุนไพรแห้ง (กรัม)	ปริมาณสารสกัดที่ได้ (กรัม)	%Yield
<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.	3000	92.33	3.07
<i>Piper retrofractum</i> Vahl.	3000	151.32	5.04

2. ผลการวิเคราะห์สารประกอบทางเคมีของสารสกัดเหง้าไพลและสารสกัดผลดีป्ली

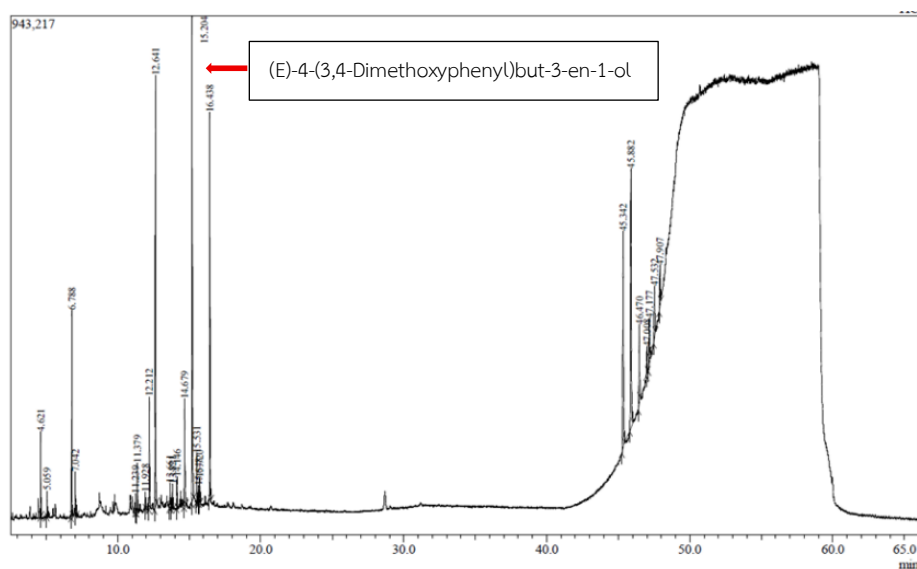
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเหง้าไพลและผลดีป्लीด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าสารสกัดเหง้าไพลพบสารสำคัญ ได้แก่ (E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol มี Retention Time: 15.20 ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 1 และสารสกัดผลดีป्ली พบสารสำคัญ ได้แก่ Piperine มี Retention Time: 42.07 ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเหง้าไพลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

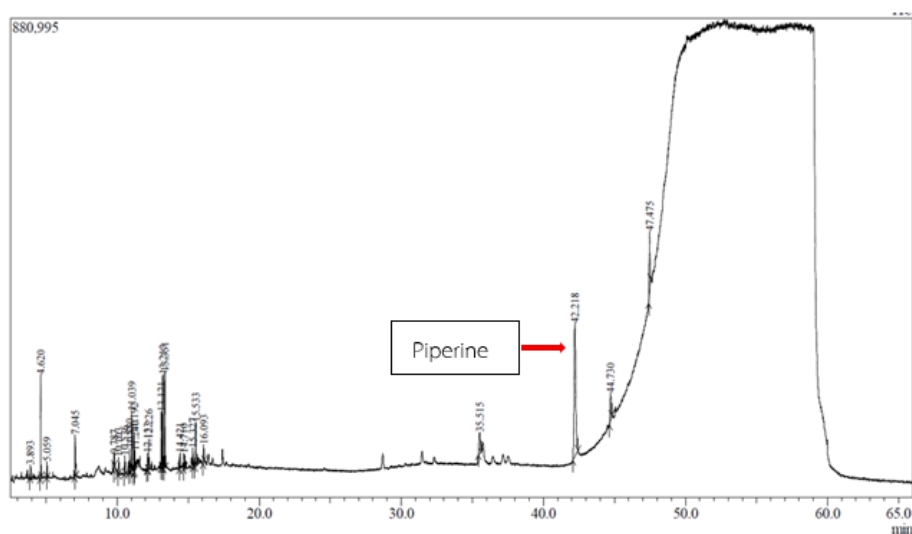
ลำดับ	Retention Time	ชนิดของสารสกัด	%Area	%Height
1	4.621	D-Limonene	1.87	2.96
2	5.059	gamma-Terpinene	0.58	0.91
3	6.745	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methyl)	4.92	7.22
4	7.042	Methyl salicylate	1.34	1.49
5	11.239	2,4-Di-tert-butylphenol	0.48	0.66
6	11.379	Cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)	1.43	1.71
7	11.928	Benzene, 4-(1E)-1,3-butadien-1-yl-1,2-dimethoxy	0.47	0.59



ลำดับ	Retention Time	ชนิดของสารสกัด	%Area	%Height
8	12.212	(E)-4-(But-1-en-1-yl)-1,2-dimethoxybenzene	3.53	3.90
9	12.641	Benzene, 4-(1E)-1,3-butadien-1-yl-1,2-dimethoxy	12.25	15.08
10	14.146	(E)-1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)but-1-ene	0.82	1.09
11	14.679	(E)-1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)buta-1,3-diene	3.56	3.73
12	15.204	(E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol	15.22	16.98
13	15.720	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.90	0.88
14	16.438	(E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-yl acetate	11.64	13.52
15	45.342	trans-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4-[(E)3',4'-dimethoxystyryl] cyclohex-1-ene	12.01	7.56
16	45.882	trans-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4-[(E)3',4'-dimethoxystyryl] cyclohex-1-ene	14.44	9.07



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเหง้าไพล



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดผลดีปลี



ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดผลดีปัสที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

ลำดับ	Retention Time	ชนิดของสารสกัด	%Area	%Height
1	3.893	beta.-Pinene	0.66	1.31
2	4.620	D-Limonene	5.31	10.24
3	5.059	gamma.-Terpinene	0.76	1.53
4	7.045	Methyl salicylate	3.14	4.14
5	9.787	Tetradecane	0.73	1.35
6	10.103	Caryophyllene	1.03	1.65
7	10.536	Humulene	1.08	1.81
8	11.039	Pentadecane	4.28	5.93
9	11.240	2,4Di-tert-butylphenol	1.38	1.99
10	13.121	8-Heptadecene	3.49	5.56
11	13.170	8-Heptadecene	5.64	9.26
12	13.270	Nonadecane	6.10	9.50
13	14.385	Heneicosane	0.98	1.58
14	15.305	Z-5-Nonadecane	1.14	1.85
15	15.475	Lidocaine	3.72	1.85
16	35.425	Piperine	4.53	2.12
17	42.075	Piperine	35.12	13.23
18	44.650	(2E,4E,14E)-N-Isobutylicos-2,4,14-trienamide	4.10	2.65
19	47.475	Pipernonaline	6.64	5.92

ผลของสารสกัดเหง้าไพลและสารสกัดผลดีปัสต่อปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total Phenolic content; TPC) พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวเหง้าไพลและผลดีปัส และสารสกัดผสมสองชนิดนี้ อยู่ในช่วง 147.1–185.9 mg GAE/g dry extract ซึ่งสารสกัดเหง้าไพล มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดผสมไพลและดีปัสและสารสกัดผลดีปัส

ผลของสารสกัดเหง้าไพลและสารสกัดผลดีปัสต่อสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content; TFC) พบว่า ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวเหง้าไพลและผลดีปัส และสารสกัดผสมไพลและดีปัสนี้ อยู่ในช่วง 142.40 – 217.80 mg QCE/g crude extract ซึ่งสารสกัดเหง้าไพล มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดผลดีปัส และสารสกัดผสมไพลและดีปัส ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์รวมของ สารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลดีปัส และสารสกัดผสมไพลและดีปัส

ชนิดของสารสกัด	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QCE/g)
สารสกัดเหง้าไพล	185.95 ± 23.29 ^b	217.80 ± 30.53 ^c
สารสกัดผลดีปัส	147.17 ± 18.75 ^a	142.40 ± 7.95 ^a
สารสกัดผสมไพลและดีปัส	181.82 ± 6.49 ^b	177.40 ± 6.54 ^b

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก (^{a, b}) ที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH assay รายงานค่าเป็น IC_{50} เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลติปัสและสารสกัดผสมไพลและติปัส พบว่าสารสกัดผลติปัสมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $109.04 \pm 2.33 \mu\text{g/mL}$ เมื่อเทียบกับสารสกัดผสมไพลและติปัส และสารสกัดเหง้าไพล

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี ABTS assay รายงานค่าเป็น IC_{50} เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลติปัสและสารสกัดผสมไพลและติปัส พบว่าสารสกัดผลติปัสมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $102.61 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$ เมื่อเทียบกับสารสกัดผสมไพลและติปัส สารสกัดเหง้าไพล และสารสกัดผลติปัส สารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS น้อยกว่าสารมาตรฐาน Trolox อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 5

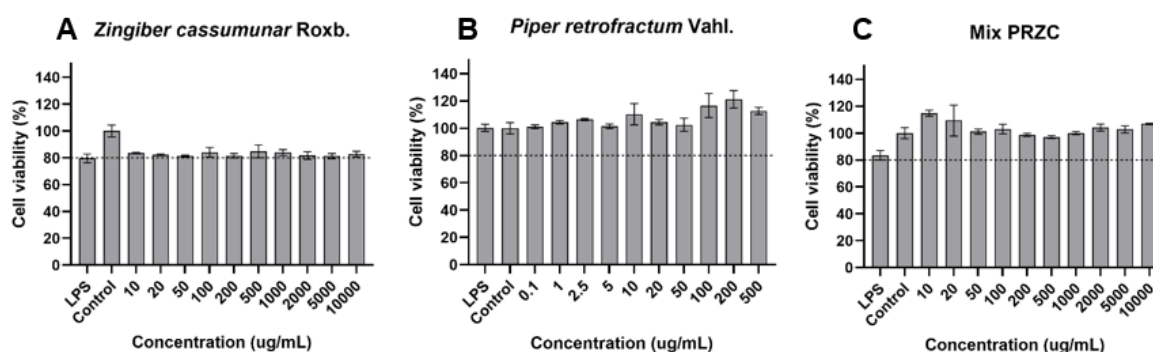
ตารางที่ 5 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay ของสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลติปัส และสารสกัดผสมไพลและติปัส

ชนิดของตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ		
	DPPH	ABTS	FRAP
	(IC_{50} ; $\mu\text{g/mL}$)	(IC_{50} ; $\mu\text{g/mL}$)	(mM Fe^{2+} / mg)
Trolox	25.23 ± 2.86^a	26.19 ± 1.26^a	228.59 ± 8.38^a
สารสกัดเหง้าไพล	257.47 ± 2.81^d	220.16 ± 2.03^d	519.24 ± 10.47^d
สารสกัดผลติปัส	109.04 ± 2.33^b	102.61 ± 0.50^b	382.36 ± 4.95^b
สารสกัดผสมเหง้าไพลและผลติปัส	193.51 ± 3.00^c	195.74 ± 4.84^c	486.80 ± 8.22^c

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a, b, c, d) ที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4. การศึกษาผลของสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลติปัส และสารสกัดผสมไพลและติปัสต่อศักยภาพในการต้านการอักเสบในระดับหลอดทดลอง

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี Cytotoxicity test (MTT assay) พบว่า %Cell viability มีค่ามากกว่า 80% ทุกค่า แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 (%Cell viability) ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (LPS) หลังได้รับสารสกัดเหง้าไพลที่ความเข้มข้น 10 – 10,000 $\mu\text{g/mL}$ (A), สารสกัดผลติปัสที่ความเข้มข้น 0.1 – 500 $\mu\text{g/mL}$ (B) และสารสกัดผสมไพลและติปัสที่ความเข้มข้น 10 – 10,000 $\mu\text{g/mL}$ (C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษาผลของสารสกัดต่อการอักเสบ โดยวัดการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide (NO) สารสกัดผลติปัสแสดงฤทธิ์ยับยั้ง NO ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $12.89 \pm 0.61 \mu\text{g/mL}$ เมื่อเทียบกับสารสกัดผสมไพลและติปัส และสารสกัดเหง้าไพล ดังตารางที่ 6



ตารางที่ 6 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง nitric oxide (NO) ของสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลติป्ली และสารสกัดผสมไพลและติป्ली

ชนิดของสารสกัดสมุนไพร	ฤทธิ์ยับยั้ง NO (IC ₅₀ ; ug/ml)
สารสกัดผลติป्ली	12.89 ± 0.61 ^a
สารสกัดเหง้าไพล	2,489 ± 76.90 ^c
สารสกัดผสมไพลและติป्ली	1,029 ± 82.70 ^b

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (^{a, b, c}) ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5. การพัฒนาเจลสมุนไพรจากสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลติป्ली และสารสกัดผสมไพลและติป्ली

ผลการประเมินประสิทธิภาพด้านการต้านการอักเสบของสูตรตำรับเจลมีส่วนผสมของสมุนไพรจากสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลติป्ली และสารสกัดผสมไพลและติป्ली พบว่าเจลจากสารสกัดติป्लीมีฤทธิ์ยับยั้ง NO ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับเจลมาตรฐานไดโคลฟีแนลความเข้มข้น 1% มีการประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบของเจลสมุนไพรเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ และหลังจากการประเมินความคงตัวในสภาวะเร่งครบ 6 รอบ มีค่า IC₅₀ ก่อนทดสอบ เท่ากับ 16.18 ± 1.02 ug/mL และ มีค่า IC₅₀ หลังทดสอบ เท่ากับ 15.05 ± 1.41 ug/mL ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการประเมินประสิทธิภาพด้านการต้านการอักเสบของสูตรตำรับเจลมีส่วนผสมของสมุนไพรจากสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลติป्ली และสารสกัดผสมไพลและติป्ली

สูตรเจล	ฤทธิ์ยับยั้ง NO (IC ₅₀ ; ug/ml) Before	ฤทธิ์ยับยั้ง NO (IC ₅₀ ; ug/ml) After
สารสกัดผลติป्ली	16.18 ± 1.02 ^a	15.05 ± 1.41 ^a
สารสกัดเหง้าไพล	2,559.93 ± 338.74 ^d	3145.42 ± 181.35 ^d
สารสกัดผสมไพลและติป्ली	1,203.82 ± 160.16 ^c	1477.46 ± 54.38 ^c
1% Diclofenac gel	72.68 ± 3.51 ^b	74.21 ± 1.88 ^b

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (^{a, b, c, d}) ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เพื่อให้เข้าใจถึงศักยภาพของสารสกัดจากเหง้าไพลและผลติป्लीในการนำไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร จึงได้มีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ปริมาณสารสำคัญ และประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งด้านการต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ รวมถึงการประเมินความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ จากนั้นจึงนำผลการทดสอบไปใช้ในการพัฒนาเจลสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพด้านการอักเสบ

จากการรายงานของ Han และคณะ [25] และ Ozaki และคณะ [26] พบว่าสารกลุ่มฟีนิลบิวทีนอยด์ (Phenylbutenoids) และเคอร์คูมินอยด์ (Curcumin) จากไพลเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ใช้ในการบรรเทาอาการปวดและลดการอักเสบ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้ของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วย GC-MS ในงานวิจัยนี้ ซึ่งพบว่าสารสกัดเหง้าไพลมีสารสำคัญ (E)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (compound D) ซึ่งอยู่ในสารกลุ่มฟีนิลบิวทีนอยด์ (phenylbutenoids) เป็นกลุ่มสารที่มีรายงานว่าสามารถลดการอักเสบผ่าน MAPK pathways ได้แก่ p38, ERK และ Akt [27] ขณะเดียวกันผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วย GC-MS ของสารสกัดติป्ली พบสารอัลคาลอยด์ (alkaloids) ชนิดไพเพอรีน (piperine) ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานของ Takooree และคณะ [28] ว่าไพเพอรีน เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญของติป्ली และงานของ Phan และคณะ [29] ที่อธิบายว่าไพเพอรีนสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ ผ่านการยับยั้ง NF-KB pathway ทำให้การแสดงออกของ iNOS ลดลง จึงเชื่อมโยงได้ว่าการพบไพเพอรีนในสารสกัดติป्लीเป็นปัจจัยที่อธิบายฤทธิ์ต้านการอักเสบที่เด่นชัดของสารสกัดชนิดนี้ จากวรรณกรรมพบว่าผลติป्लीมีสารไพเพอรีน มีไอโซเมอร์หลายชนิด เช่น chavicine,

isopiperine และ isochavicine ส่วนการพบสารไพเพอรีน ที่แยกออก 2 Retention time นั้น อาจเกิดจากสารที่แตกตัวเป็น fragment ซึ่งไอโซเมอร์มักแตกตัวคล้ายกันมาก Library จึงระบุชื่อเหมือนกัน [30] และการแยกไอโซเมอร์กลุ่มสารไพเพอรีน สารบางชนิดในส่วน GC มีโอกาสเกิด isomerization จากความร้อนได้ [31]

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์รวม พบว่าสารสกัดเหง้าไพลมีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวม (TPC) และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (TFC) สูงที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดผลดีปัสและสารสกัดผสมสองชนิดนี้ ซึ่งสัมพันธ์กับศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และช่วยลดการเกิด Oxidative stress ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นสำคัญของกระบวนการอักเสบผ่าน NF- κ B pathway

จากผลฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดผลดีปัสมีค่า IC_{50} ของ DPPH และ ABTS เท่ากับ 109.04 ± 2.33 และ 102.61 ± 0.50 μ g/mL ตามลำดับ แสดงถึงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระได้ดี ขณะที่สารสกัดเหง้าไพลมีค่า FRAP สูงสุด 519.24 ± 10.47 mM Fe^{2+} /mg สะท้อนถึงศักยภาพในการรีดิวซ์เหล็กและเป็นตัวให้โปรตอนที่มีประสิทธิภาพ

เมื่อนำสารสกัดเหง้าไพล สารสกัดผลดีปัส และสารสกัดผสมไพลและดีปัส มาทดสอบการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี Cytotoxicity test (MTT assay) พบว่า มากกว่า 80% แสดงว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่าสารสกัดมีความปลอดภัยในระดับเซลล์ สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไปได้ การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ ผลการทดสอบการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ในเซลล์ RAW 264.7 พบว่าสารสกัดผลดีปัสมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดผสมไพลและดีปัส และสารสกัดเหง้าไพล นำค่า IC_{50} ที่ได้ไปพัฒนาเจลสมุนไพรต่อไป

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้นำสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดไปพัฒนาเป็นเจลสมุนไพร 3 สูตร พบว่าเจลสารสกัดผลดีปัสมีประสิทธิภาพการกำจัด NO สูงสุด ทั้งก่อนและหลังการทดสอบความคงตัว มีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน (16.18 ± 1.02 และ 15.05 ± 1.41 μ g/mL, $P > 0.05$) แสดงถึงความคงตัวของฤทธิ์ทางชีวภาพของเจลสมุนไพรหลังการทดสอบความคงตัว

จากผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเหง้าไพลพบสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด ซึ่งสะท้อนความสามารถรีดิวซ์ใน FRAP assay ที่สูงที่สุดเช่นกัน แสดงว่าเหง้าไพลอาจมีสารต้านอนุมูลอิสระที่เด่นในกลไกการให้ e^- หรือ reducing power มากกว่าการจับอนุมูลอิสระโดยตรง ขณะที่สารสกัดผลดีปัสไม่มี TPC/TFC ต่ำกว่า แต่กลับมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH/ABTS) และยับยั้งการสร้าง NO ซึ่งอาจเกิดจากสารออกฤทธิ์เฉพาะกลุ่มในดีปัสที่มีความสามารถในการจับ radical และเกี่ยวข้องกับ pathway การอักเสบได้ดี สารสกัดเหง้าไพลและสารสกัดผลดีปัส มีศักยภาพในการลดการอักเสบระดับเซลล์ ยับยั้ง MAPK pathways ลดการกระตุ้น NF- κ B pathway และลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS จึงลดการสร้าง nitric oxide (NO) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งสมุนไพรทั้งสองยังมีระดับความปลอดภัยที่ดีในระดับเซลล์ และสามารถนำสารสกัดไปพัฒนาเป็นเจลสมุนไพรที่มีความคงตัวทางกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพภายใต้สภาวะแรง นอกจากนี้สารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด เป็นวัตถุดิบจากสมุนไพรไทยที่มีความพร้อมเชิงวัตถุดิบสูง สามารถจัดหาได้ต่อเนื่อง สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับสมุนไพรไทย แสดงถึงความเป็นไปได้ในเชิงอุตสาหกรรมในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลสมุนไพรใช้ภายนอกสำหรับบรรเทาการอักเสบและอาการปวดในระดับผู้บริโภครจริง การที่เจลสมุนไพรมีความปลอดภัยในระดับเซลล์และคงประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบได้ดี ช่วยสนับสนุนให้สามารถต่อยอดไปทดลองด้านการทดสอบเฉพาะที่ในผิวหนัง (Skin sensitization) อีกทั้งยังเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาทางคลินิกในอนาคต เพื่อยืนยันประสิทธิผลในระดับผู้ใช้จริง

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการดำเนินงาน จากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร



เอกสารอ้างอิง

1. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol* 2007;147(2):227-35.
2. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(5):986-1000.
3. Clossa D, Folch-Puy E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* 2004;56(4):185-91.
4. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269(19):13725-8.
5. Van der vliet A, Eiserich JP, Cross CE. Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease *Respir Res* 2000;1(2):67-72.
6. Malinski T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007;11(2):207-18.
7. Graham CD, Rose MR, Grunfeld EA, Kyle SD, Weinman J. A systematic review of quality of life in adults with muscle disease. *J Neurol* 2011;258(9):1581-92.
8. กระทรวงสาธารณสุข. สรุปรายงานการป่วย 2566. กลุ่มบริหารจัดการข้อมูลขนาดใหญ่กองยุทธศาสตร์และแผนงาน 2566. [อินเทอร์เน็ต]. 2566 [เข้าถึงเมื่อ 28 เม.ย. 2566]. เข้าถึงได้จาก: https://spd.moph.go.th/wp-content/uploads/2024/11/ill_2023_full_07112567.pdf
9. Laine L. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1996;6(3):489-504.
10. Muzamil A, Tahir M, Ali S, Liaqat I, Ali A, Summer M. Inflammatory Process and Role of Cytokines in Inflammation: An Overview. *Punjab Univ J Zool* 2022;36(2):237-252.
11. Manimmanakorn N, Manimmanakorn A, Boobphachart D, Thuwakum W, Laupattarakasem W, Hamlin MJ. Effects of Zingiber cassumunar (Plai cream) in the treatment of delayed onset muscle soreness. *J Integr Med* 2016;14(2):114-20.
12. Mahaprom K, Chokpaisarn J, Kunworarath N, Paduka W, Phoopha S, Limsuwan S, et al. In vivo analgesic, anti-inflammatory activities, and phytochemical profile of Thai herbal Kratom recipe, a traditional Thai herbal medicine for muscle pain relief. *J Ethnopharmacol* 2025;343:119442.
13. Jeenapongsa R, Yoovathaworn K, Sriwatanakul KM, Pongprayoon U, Sriwatanakul K. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from Zingiber cassumunar Roxb. *J Ethnopharmacol* 2003;87(2):143-8.
14. Asasutjarit R, Sookdee P, Veeranondha S, Fuongfuchat A, Itharat A. Application of film-forming solution as a transdermal delivery system of piperine-rich herbal mixture extract for anti-inflammation. *Heliyon* 2020;6(6):e04139.
15. Chongmelaxme B, Srumsiri R, Dilokthornsakul P, Dhippayom T, Kongkaew C, Saokaew S, et al. Clinical effects of Zingiber cassumunar (Plai): A systematic review. *Complement Ther Med* 2017;35:70-7.
16. Alseekh S, Aharoni A, Brotman Y, Contrepolis K, D'Auria J, Ewald J, et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nature Methods* 2021;18(7):747-56.



17. Teles AM, Silva-Silva JV, Fernandes JMP, Abreu-Silva AL, Calabrese KDS, Mendes Filho NE, et al. GC-MS Characterization of Antibacterial, Antioxidant, and Antitrypanosomal Activity of *Syzygium aromaticum* Essential Oil and Eugenol. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021;2021:6663255.
18. Nobossé P, Fombang E, Mbofung C. The Effect of Steam Blanching and Drying Method on Nutrients, Phytochemicals and Antioxidant Activity of Moringa (*Moringa oleifera* L.) Leaves. *Am J Food Sci Technol* 2017;5:53-60.
19. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 2009;113(4):1202-5.
20. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26(9):1231-7.
21. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research* 2003;23(12):1719-26.
22. Poteser M, Wakabayashi I. Serum albumin induces iNOS expression and NO production in RAW 267.4 macrophages. *Br J Pharmacol* 2004;143(1):143-51.
23. Sarukh VS, Nagoba SN, Hindole SS, Kaudewar KD, More DR. FORMULATION AND EVALUATION OF HERBAL GEL CONTAINING *Allium cepa* EXTRACT: FORMULATION AND EVALUATION OF HERBAL GEL CONTAINING *Allium cepa* EXTRACT. *J Drug Deliv Ther* 2019;9(4-s):492-6.
24. Sangkaew W, Sianglum W, Wunnoo S, Voravuthikunchai SP, Joycharat N. Bioactive substance contents and therapeutic potential for skin inflammation of an herbal gel containing *Derris reticulata* and *Glycyrrhiza glabra*. *Pharm Biol* 2024;62(1):648-58.
25. Han AR, Kim H, Piao D, Jung CH, Seo EK. Phytochemicals and Bioactivities of *Zingiber cassumunar* Roxb. *Molecules* 2021;26(8):2377
26. Ozaki Y, Kawahara N, Harada M. Anti-inflammatory effect of *Zingiber cassumunar* Roxb. and its active principles. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1991;39(9):2353-6.
27. Gundom T, Sukketsiri W, Panichayupakaranant P. Phytochemical analysis and biological effects of *Zingiber cassumunar* extract and three phenylbutenoids: targeting NF- κ B, Akt/MAPK, and caspase-3 pathways. *BMC Complement Med Ther* 2025;25(1):180.
28. Takooree H, Aumeeruddy MZ, Rengasamy KRR, Venugopala KN, Jeewon R, Zengin G, et al. A systematic review on black pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2019;59(sup1):S210-s43.
29. Phan UTT, Nguyen HD, Nguyen TKO, Tran TH, Le TH, Tran TTP. Anti-inflammatory effect of *Piper longum* L. fruit methanolic extract on lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 murine macrophages. *Heliyon* 2024;10(4):e26174.
30. Marutoiu C, Gogoasa I, Oprean I, Marutoiu O-F, Moise M-I, Tigae C, et al. Separation and Identification of Piperine and Chavicine in Black Pepper by TLC and GC-MS. *JPC* 2006;19(3):250-2.
31. Tiwari A, Mahadik KR, Gabhe SY. Piperine: A comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties. *Med Drug Discov* 2020;7:100027.