ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบกลุ่มสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์รวม ของสมุนไพรตำรับยาพอกเข่าสูตรโรงพยาบาลพระพุทธบาท

Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities, and Total Phenolic and Flavonoid Contents of the Herbal Knee Poultice Formulation from Phraphutthabat Hospital

ประภัสรา สุหิรัญ[1] สายสุดา แสงกล้า[1] ชนัญญา สุขผสม[1] พัตต์วราภรณ์ อุดรสรรพ์[2] รัชฎาวรรณ อรรคนิมาตย์[1] และ ปราณี ศรีราช[1*]

[1]สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร สกลนคร 47160

[2]สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี อุดรธานี 41000

Praphatsara Suhiran[1], Saisuda Saengkla[1], Chananya Sukpasom[1], Patwarapohn Udonsan[2], Ratchadawan Aukkanimart[1] and Pranee Sriraj[1*]

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

[2]Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University, Udon Thani, 41000

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

Received: 14 June 2026/ Revised: 13 October 2026/ Accepted: 16 October 2026

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมุนไพรตำรับยาพอกเข่าสูตรโรงพยาบาลพระพุทธบาทประกอบด้วย ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) ดองดึง (*Gloriosa superba* L.) ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees) และบอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson) สกัดด้วยเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:10 (w/v) เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) ฟลาโวนอยด์รวม (TFC) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH, ABTS และ FRAP ฤทธิ์ต้านการอักเสบจากการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ในเซลล์ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย MTT พบว่าสารสกัดตำรับมีค่า TPC และ TFC เท่ากับ 396.31 ± 30.16 mg GAE/g และ 301.32 ± 9.16 mg QCE/g ตามลำดับ มีค่า DPPH IC_{50} 178.60 ± 6.78 µg/mL, ABTS IC_{50} 76.13 ± 0.64 µg/mL และ FRAP 390.68 ± 9.06 mM Fe^{2+}/mg นอกจากนี้สามารถยับยั้งการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ที่เป็นสารเกิดการอักเสบได้ดี โดยมีค่า IC_{50}

31.04 ± 1.87 µg/mL และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 0–78 µg/mL ผลการศึกษาสนับสนุนศักยภาพด้านการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสารสกัดตำรับ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรใช้ภายนอกบรรเทาอาการข้อเข่าเสื่อม และศึกษาทางคลินิกต่อไป

คำสำคัญ: สารสกัดตำรับยาพอกเข่า ปริมาณกลุ่มสารฟีนอลิก ปริมาณกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ สารต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

Abstract

This study aimed to determine the total phenolic and flavonoid contents and evaluate the antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of the herbal knee poultice extract from Phraphutthabat Hospital. The formulation consisted of plai (*Zingiber cassumunar* Roxb.), climbing lily (*Gloriosa superba* L.), green chiretta (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees), and heart-leaved moonseed (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson). The herbs were extracted with 95% ethanol at a ratio of 1:10 (w/v) for 7 days. Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) were determined. Antioxidant activity was evaluated using DPPH, ABTS, and FRAP assays, while anti-inflammatory activity was assessed by inhibition of nitric oxide (NO) production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cytotoxicity was evaluated using the MTT assay. The herbal formula extract showed TPC and TFC values of 396.31 ± 30.16 mg GAE/g and 301.32 ± 9.16 mg QCE/g, respectively. The DPPH and ABTS IC_{50} values were 178.60 ± 6.78 and 76.13 ± 0.64 µg/mL, respectively, while the FRAP value was 390.68 ± 9.06 mM Fe^{2+}/mg. The extract also inhibited NO production with an IC_{50} of 31.04 ± 1.87 µg/mL and showed no cytotoxicity at concentrations of 0–78 µg/mL. These findings support the antioxidant and anti-inflammatory potential of the herbal formulation and its further development as a topical herbal product for relieving knee osteoarthritis symptoms and for future clinical investigation.

Keywords: Herbal knee poultice extract, Total phenolic content, Total flavonoid content, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity

บทนำ

โรคข้อเข่าเสื่อม (Knee Osteoarthritis : KOA) เป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญทั่วโลกและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามอายุ จากหลักฐานระบาดวิทยา พบว่าอุบัติการณ์เฉลี่ยของโรคนี้อยู่ที่ประมาณ 203 ต่อประชากร 10,000 คนต่อปี ในประชากรอายุ 20 ปีขึ้นไป หรือคิดเป็นผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 86.7 ล้านคนต่อปีในปี ค.ศ. 2020 ขณะที่ความชุกของโรคในประชากรอายุ 40 ปีขึ้นไป อยู่ที่ร้อยละ 22.9 หรือประมาณ 654.1 ล้านคนทั่วโลก นอกจากนี้ยังพบว่าอุบัติการณ์และความชุกของโรคเพิ่มสูงขึ้นตามอายุ และพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นถึงภาระด้านสุขภาพและคุณภาพชีวิตของประชากร รวมถึงความจำเป็นในการพัฒนามาตรการคัดกรอง ป้องกัน และจัดการอาการของโรคตั้งแต่ระยะเริ่มต้น เพื่อลดความพิการค่าใช้จ่ายด้านสาธารณสุข และผลกระทบต่อสังคมในระยะยาว [1]

โรคข้อเข่าเสื่อมมีความเกี่ยวข้องกับภาวะการอักเสบระดับต่ำที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะการอักเสบของเยื่อบุข้อ (synovitis) ซึ่งสัมพันธ์กับอาการปวดและการดำเนินของโรค [2] กระบวนการอักเสบเกี่ยวข้องกับตัวกลางทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen oxide species (RNOS), cytokines, prostaglandins และ

transcription factors เช่น NF-KB ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการตอบสนองต่อการอักเสบ [3] นอกจากนี้กลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อมยังรวมถึงการหลั่งไซโตไคน์ก่อการอักเสบ เช่น interleukin-1 beta (IL-1β) และ tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) ซึ่งส่งผลต่อการสลายของกระดูกอ่อน อาการปวดเรื้อรัง และการดำเนินของโรคที่รุนแรงขึ้น [4] แม้ว่ายากลุ่ม nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) จะสามารถบรรเทาอาการปวดและการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่การใช้ต่อเนื่องในระยะยาวอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อผลไม่พึงประสงค์ต่อระบบทางเดินอาหาร ไต และระบบหัวใจและหลอดเลือด [5] ดังนั้นการพัฒนาทางเลือกการรักษาในรูปแบบยาทาเฉพาะที่ที่มีความปลอดภัยสูงและให้ประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยารับประทาน จึงเป็นแนวทางที่ได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน

ศาสตร์การแพทย์แผนไทยมีหัตถการในการบรรเทาอาการปวดเข่า ได้แก่ การนวด การประคบร้อนสมุนไพร และการพอกยาสมุนไพร ทางกลุ่มงานแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลพระพุทธบาท ได้พัฒนาตำรับยาพอกเข่าสมุนไพรสำหรับผู้มีอาการปวดเข่า ในตำรับประกอบไปด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ ไพล (เหง้า) ดองดึง (เหง้า) ฟ้าทะลายโจร (ต้นและใบ) และบอระเพ็ด (ลำต้น) ซึ่งไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) เป็นสมุนไพรที่มีสารสำคัญหลายกลุ่ม โดยเฉพาะ phenylbutenoids และ terpenoids ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบและลดปวด โดยเกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการอักเสบและเส้นทางการส่งสัญญาณ NF-**K**B และ MAPK [6] นอกจากนี้มีรายงานการใช้ไพลในตำรับยาไทยสำหรับโรคระบบกระดูกและกล้ามเนื้อในรูปแบบใช้ภายนอก ได้แก่ การประคบ พอก และทา [7] และการศึกษาของลีลารุ่งระยับได้ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของนีโอไพล รวมถึงศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองโดยประยุกต์ใช้ภายนอกด้วยการทา อัลตราซาวนด์และการผลักสารด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งสนับสนุนศักยภาพของไพลสำหรับการใช้ภายนอก [8] ดองดึง (*Gloriosa superba* L.) เป็นสมุนไพรที่มีสารสำคัญกลุ่ม alkaloids โดยเฉพาะ colchicine และ colchinoids ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [9, 10] ฤทธิ์ต้านการอักเสบ [11] มีรายงานว่า colchicine สามารถทำให้ mouse peritoneal macrophages ที่ถูกกระตุ้นมีการสร้าง ROS, NO และ IL-1β ลดลง [12, 13] สารสำคัญดังกล่าวมีความเป็นพิษเมื่อได้รับในปริมาณสูง จึงควรคำนึงถึงความเข้มข้นและความปลอดภัยในการนำมาใช้ [14, 15] จึงมีการนำมาใช้ในตำรับยาพื้นบ้านไปทอดในน้ำมันแล้วนำมาทาบรรเทาอาการปวด บวม ลดการอักเสบ [16] นำมาทาบรรเทาอาการปวดข้อ ปวดจากเกาต์ [17] ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall ex Nees.) มีสารสำคัญหลัก คือ แอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) และสารกลุ่ม diterpenoid lactones ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการสร้างสารก่อการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และพรอสตาแกลนดิน (prostaglandins) จึงช่วยลดอาการปวดที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ นิยมใช้ทั้งในตำรับยาไทยและงานวิจัยสมัยใหม่เพื่อบรรเทาอาการปวดข้อ ปวดกล้ามเนื้อ และอาการอักเสบเรื้อรัง [18, 19] บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L). Miers ex Hook.f.& Thomson.) เป็นสมุนไพรมีสารสำคัญกลุ่ม alkaloids, diterpenes, และ glycosides ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ ช่วยยับยั้งกระบวนการสร้างสารก่อการอักเสบ ลดอาการปวดจากการอักเสบ และมีข้อมูลการใช้ตามภูมิปัญญาในรูปแบบภายนอก เช่น การพอกร่วมกับน้ำมันมะพร้าวเพื่อบรรเทาอาการข้ออักเสบ [20, 21] แม้ว่าจะมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสมุนไพรแต่ละชนิด และมีหลักฐานการใช้สมุนไพรบางชนิดในรูปแบบภายนอก แต่หลักฐานส่วนใหญ่เป็นการศึกษาสมุนไพรเดี่ยวหรือการใช้ตามภูมิปัญญา ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบในระดับหลอดทดลองของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดในรูปแบบตำรับยาพอกเข่าสูตรโรงพยาบาลพระพุทธบาท การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งประเมินฤทธิ์ดังกล่าว เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำหรับใช้ภายนอกและการศึกษาทางคลินิกต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสาร

การเตรียมตัวอย่างสมุนไพรดำเนินการโดยจัดหาสมุนไพรจากร้านสมุนไพรท่าพระจันทร์ แขวงบางจาก เขตภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2568 โดยใช้สมุนไพรบดละเอียด 4 ชนิด ได้แก่ ไพล (เหง้า) ดองดึง (เหง้า) ฟ้าทะลายโจร (ต้นและใบ) และบอระเพ็ด (ลำต้น) สำหรับตำรับยาพอกเข่าสูตรโรงพยาบาลพระพุทธบาท ใช้สมุนไพรในอัตราส่วนโดยน้ำหนัก ไพล : ดองดึง : ฟ้าทะลายโจร : บอระเพ็ด เท่ากับ 2:1:2:2 ตามลำดับ โดยใช้ไพล 1,000 กรัม ดองดึง 500 กรัม ฟ้าทะลายโจร 1,000 กรัม และบอระเพ็ด 1,000 กรัม รวมสมุนไพรในตำรับ 3,500 กรัม จากนั้นนำสมุนไพรมาสกัดทั้งในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยวและตำรับ โดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 95% เป็นตัวทำละลายในอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v) ด้วยวิธีการหมักเป็นเวลา 7 วัน และเขย่าทุกวัน เมื่อครบกำหนดนำสารสกัดมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator (Rotavapor® R-300, BÜCHI, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดหยาบ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป [22] สารสกัดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล 95% (95% ethanolic extract) ทั้งในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยวและสารสกัดตำรับ

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดสมุนไพรตำรับยาพอกเข่าสูตรโรงพยาบาลพระพุทธบาท

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content; TPC) ดำเนินการโดยใช้วิธี Folin–Ciocalteu colorimetric โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125 และ 250 µg/mL สำหรับตัวอย่างสารสกัด เตรียมที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 20 µL เติมลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสาร Folin–Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 µL และผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 7.5% (w/v) ปริมาตร 80 µL โดยปริมาตรรวมในแต่ละหลุมเท่ากับ 200 µL ผสมสารให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Infinite 200 PRO, Tecan, Switzerland) บันทึกผลการทดลอง และทำการทดลองซ้ำ จำนวน 5 ครั้ง ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปของมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดแห้ง (mg GAE/g dry extract) [14, 19-21, 23-25]

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content; TFC) ดำเนินการโดยใช้เควอซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 µg/mL ปริมาตร 5 µL เติมลงในหลุมของ 96-well plate จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 130 µL และเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ 5% ($NaNO_2$) ปริมาตร 7.5 µL แล้วบ่มในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ 10% ($AlCl_3$) ปริมาตร 7.5 µL บ่มในที่มืดต่ออีก 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 50 µL โดยทำให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลุมเท่ากับ 200 µL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Infinite 200 PRO, Tecan, Switzerland) บันทึกผลการทดลอง และทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง รายงานผลในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของเควอซิตินต่อกรัมของสารสกัดหยาบ (mg QE/g crude extract) [21-23, 25-26]

3. การวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระดวยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assays

3.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay เป็นการประเมินความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาภายในระยะเวลา 10–30 นาที โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นสาร

มาตรฐาน (positive control) และรายงานผลในรูปค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ดำเนินการโดยเตรียมสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 25 µg/mL โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 1–20 µg/mL สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 µg/mL โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย และทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 2–20 µg/mL เตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.2 mM โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกและสารสกัดสมุนไพรในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 µL เติมลงใน 96-well plate แล้วเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL รวมปริมาตรทั้งหมด 200 µL ต่อหลุม บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Infinite 200 PRO, Tecan, Switzerland) บันทึกผล และวิเคราะห์ข้อมูล โดยทำการทดลองซ้ำจำนวน 5 ครั้ง รายงานผลเป็นค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดสมุนไพรเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน [8, 23-25, 27-28]

3.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay เป็นการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) โดยใช้สารละลาย ABTS (2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระเสถียรในสารละลายน้ำ โดยมีสีเขียวก่อนเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ การเตรียมสารละลาย ABTS ดำเนินการโดยชั่งสาร ABTS ปริมาณ 3.6 mg ด้วยเครื่องชั่งเชิงวิเคราะห์ (ME204T series, METTLER TOLEDO, Switzerland) ละลายในน้ำกลั่น 1 mL จากนั้นเติมโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต (potassium persulfate) ปริมาณ 0.6 mg แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลาย ABTS ผสมกับ potassium persulfate และบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12–16 ชั่วโมง เพื่อสร้างอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ก่อนการทดสอบ เมื่อครบกำหนดนำสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ที่ได้มาปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสง 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 nm จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง โดยกำหนดระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาเท่ากันทุกตัวอย่างเป็นเวลา 6 นาที ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm สำหรับการทดสอบ เตรียมสารสกัดสมุนไพรและสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ที่ความเข้มข้นช่วง 1–20 µg/mL โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.0125–0.1 mg/mL จากนั้นปิเปตสารตัวอย่างและสารมาตรฐานลงใน 96-well plate แล้วเติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 100 µL ต่อหลุม บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Infinite 200 PRO, Tecan, Switzerland) บันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล โดยทำการทดลองซ้ำจำนวน 5 ครั้ง ผลการทดสอบรายงานในรูปค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ [8, 23]

3.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสาร โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+}-TPTZ ให้เป็น Fe^{2+}-TPTZ ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสารละลายสีเหลืองเป็นสีน้ำเงินอมม่วง โดยปริมาณของ Fe^{2+}-TPTZ ที่เกิดขึ้นสะท้อนถึงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และรายงานผลในรูปค่า FRAP value เทียบกับสารมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (Ferrous sulfate heptahydrate; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ในการเตรียมสารรีเอเจนต์ FRAP เตรียมสารละลาย acetate buffer ความเข้มข้น 300 mM (pH 3.6) ปริมาตร 500 mL โดยชั่ง sodium acetate 1.55 g เติมกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) 8 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึง 500 mL เตรียมสารละลาย 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 mM โดยละลายใน HCl (เตรียมก่อนใช้งานทุกครั้ง) และเตรียมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) โดยชั่ง $FeCl_3$

ปริมาณ 54 mg ละลายในน้ำกลั่น 10 mL (เตรียมก่อนใช้งานทุกครั้ง) จากนั้นนำสารละลาย acetate buffer, TPTZ และ $FeCl_3$ มาผสมกันในอัตราส่วน 10:1:1 เพื่อเตรียมเป็นสารละลาย FRAP reagent สำหรับสารมาตรฐาน เตรียม $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 25–1,000 µg/mL เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน FRAP ในการทดสอบ เตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ละลายในเอทานอล 95% ความเข้มข้น 100 µg/mL ปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 20 µL ลงในหลุมของ 96-well plate จากนั้นเติมสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 80 µL รวมเป็นปริมาตรทั้งหมด 100 µL ต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Infinite 200 PRO, Tecan, Switzerland) บันทึกผลการทดลองและทำซ้ำจำนวน 5 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ เพื่อคำนวณค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในรูป FRAP value [23, 26]

4. การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรตำรับยาพอกเข่าโรงพยาบาลพระพุทธบาท ต่อศักยภาพในการต้านการอักเสบในระดับหลอดทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจหนูสายพันธุ์ RAW264.7 ได้รับการจัดซื้อจากบริษัท PromoCell (Germany) และนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium ซึ่งเสริมด้วย heat-inactivated calf serum 10% และยาปฏิชีวนะ penicillin (100 U/mL)–streptomycin (100 µg/mL) 1% จากนั้นบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ภายในตู้บ่ม เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (ECLIPSE Ts2, Nikon, Japan) [23, 29]

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ RAW264.7 ดำเนินการด้วยวิธี MTT assay ซึ่งเป็นการทดสอบแบบ colorimetric โดยใช้สาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW264.7 ในความหนาแน่น 1×10^5 cells/well ลงใน 96-well plate ปริมาตร 100 µL ต่อหลุม และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และเติมสารสกัดในความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.1–10,000 µg/mL บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุม (vehicle control) ใช้สาร DMSO ความเข้มข้น 0.5% (v/v) เป็นตัวทำละลายของสารสกัด หลังครบระยะเวลาการบ่มเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ปริมาตร 200 µL ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และละลายผลึก formazan ด้วย DMSO ปริมาตร 200 µL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Infinite 200 PRO, Tecan, Switzerland) บันทึกและวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยทำซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง และรายงานผลในรูปค่า IC_{50} [23, 26, 30]

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) ดำเนินการโดยใช้เซลล์ RAW264.7 ที่ความหนาแน่น 1.5×10^5 cells/mL โดยกำหนดช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบจากผลการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งเลือกเฉพาะช่วงความเข้มข้นที่มีค่า cell viability มากกว่าร้อยละ 80 ได้แก่ สารสกัดไพล สารสกัดฟ้าทะลายโจร และสารสกัดบอระเพ็ด 0–625 µg/mL สารสกัดดองดึง 0–39 µg/mL และสารสกัดตำรับ 0–78 µg/mL จากนั้นกระตุ้นการสร้าง NO ด้วย lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 50 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณ nitrite ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การสร้าง NO ตรวจวัดด้วย Griess assay โดยผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 µL กับ Griess reagent 100 µL บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วย Microplate reader (Infinite 200 PRO, Tecan, Switzerland) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์สดเป็น blank และ L-NAME เป็น positive control ผลรายงานเป็นร้อยละการยับยั้งการสร้าง NO (% inhibition) จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ [28-35]

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Science (SPSS) เวอร์ชั่น 16.0 และสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism V. 10

ผลการวิจัย

1. ผลของการสกัดสาร

การสกัดสมุนไพรตำรับยาพอกเข่าโรงพยาบาลพระพุทธบาท ทั้งในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยวและตำรับรวม โดยวิธีการหมักด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1:10 เป็นเวลา 7 วัน ได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวหนืด โดยสารสกัดไพลมีสีน้ำตาลเข้ม ดองดึงมีสีน้ำตาลเข้ม ฟ้าทะลายโจรมีสีเขียวเข้ม บอระเพ็ดมีสีน้ำตาลเข้ม และตำรับยาพอกเข่ามีสีน้ำตาลเข้ม ทั้งนี้พบว่าปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้แตกต่างกัน โดยมีร้อยละผลผลิต (%yield) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ร้อยละของผลผลิตของสารสกัดสมุนไพร

สมุนไพร	น้ำหนักสมุนไพรแห้ง (กรัม)	ปริมาณสารสกัดที่ได้ (กรัม)	ร้อยละผลผลิต
ZCE	1,000	89.28	8.92
GSE	500	13.81	2.76
APE	1,000	56.03	5.60
TCE	1,000	34.42	3.44
HFE	3,500	164.00	4.68

หมายเหตุ : ZCE = *Zingiber cassumunar* Roxb., GSE = *Gloriosa superba* L., APE = *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall ex Nees., TCE = *Tinospora crispa* (L). Miers ex Hook.f.& Thomson., HFE = Herbal formula extract

ผลการศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content; TPC) ของสารสกัดสมุนไพรตำรับยาพอกเข่าโรงพยาบาลพระพุทธบาท ทั้งในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยวและตำรับ พบว่าสารสกัดทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ไพล ดองดึง ฟ้าทะลายโจร บอระเพ็ด และสารสกัดตำรับ มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วง 225.80 – 475.12 mg GAE/g dry extract โดยสารสกัดดองดึงมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด เท่ากับ 475.12 ± 16.27 mg GAE/g ซึ่งสูงกว่าสารสกัดตำรับ สารสกัดไพล สารสกัดฟ้าทะลายโจร และสารสกัดบอระเพ็ด ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content; TFC) ของสารสกัดสมุนไพรตำรับยาพอกเข่าโรงพยาบาลพระพุทธบาท ทั้งในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยวและตำรับ พบว่าสารสกัดทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ไพล ดองดึง ฟ้าทะลายโจร บอระเพ็ด และสารสกัดตำรับ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมอยู่ในช่วง 200.19–395.98 mg QE/g dry extract โดยสารสกัดดองดึงมีปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด เท่ากับ 395.98 ± 6.27 mg QE/g เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดไพล สารสกัดตำรับ สารสกัดฟ้าทะลายโจร และสารสกัดบอระเพ็ด ดังแสดงในตารางที่ 2

2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAB assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยรายงานผลในรูปค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว ได้แก่ ไพล ดองดึง ฟ้าทะลายโจร และบอระเพ็ด รวมถึงสารสกัดตำรับ พบว่าสารสกัดไพลมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 101.69 ± 6.30 µg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดบอระเพ็ด สารสกัดตำรับ สารสกัดดองดึง และสารสกัดฟ้าทะลายโจร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐาน ascorbic acid ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP assay ของสารสกัดตำรับยาพอกเข่าโรงพยาบาลพระพุทธบาท

ชนิดของตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ				
	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)	DPPH (IC_{50} µg/mL)	ABTS (IC_{50} µg/mL)	FRAP (mM Fe^{2+}/ mg)
ascorbic acid	-	-	25.23 ± 2.86[a]	26.19 ± 1.26[a]	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	-	-	228.59 ± 8.38[a]
ZCE	381.55 ± 19.39[c]	321.32 ± 9.39[d]	101.69± 6.30[b]	33.768 ± 1.05[b]	430.32 ± 22.39[f]
GSE	475.12 ± 16.27[e]	395.98 ± 6.27[e]	219.54± 1.24[e]	124.52 ± 1.55[e]	389.32 ± 7.71[c]
APE	345.07 ± 0.57[b]	298.79 ± 2.24[b]	804.13 ± 79.45[f]	284.90 ± 3.41[f]	377.60 ± 9.55[b]
TCE	225.80 ± 0.36[a]	200.19 ± 5.71[a]	147.80 ± 3.03[c]	111.56 ± 0.41[d]	414.32 ± 15.96[e]
HFE	396.31 ± 30.16[d]	301.32 ± 9.16[c]	178.60 ± 6.78[d]	76.13 ± 0.64[c]	390.68 ± 9.06[d]

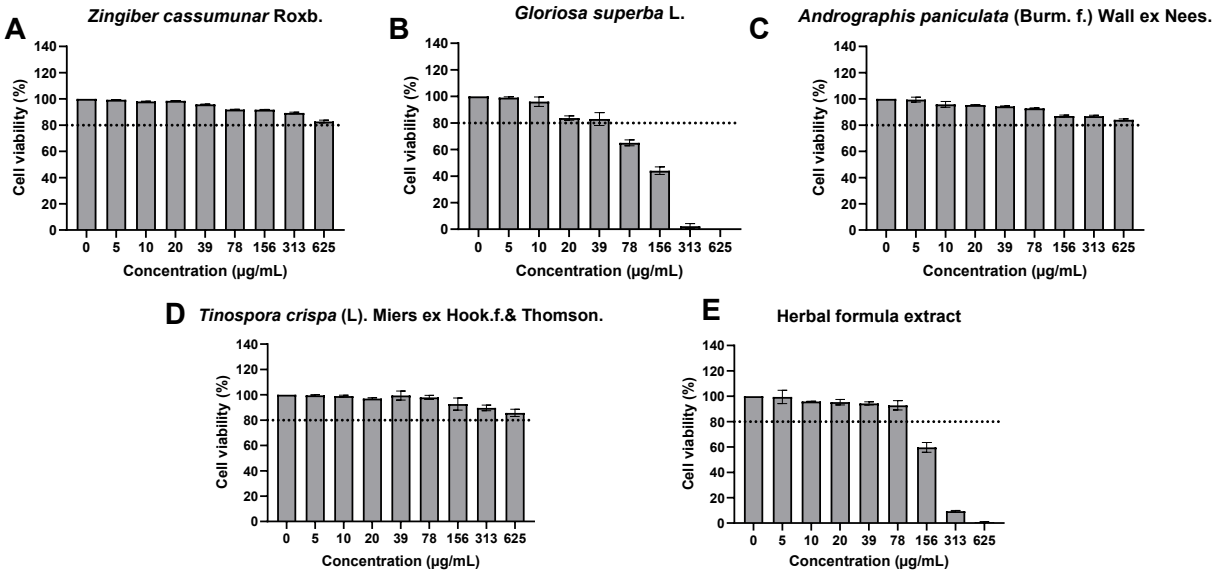
หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก ([a-f]) ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ZCE = *Zingiber cassumunar* Roxb., GSE = *Gloriosa superba* L., APE = *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall ex Nees., TCE = *Tinospora crispa* (L). Miers ex Hook.f.& Thomson., HFE = Herbal formula extract

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay โดยรายงานผลในรูปค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว ได้แก่ ไพล ดองดึง ฟ้าทะลายโจร และบอระเพ็ด รวมถึงสารสกัดตำรับ พบว่าสารสกัดไพลมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 33.768 ± 1.05 µg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดตำรับ สารสกัดบอระเพ็ด สารสกัดดองดึง และสารสกัดฟ้าทะลายโจร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐาน ascorbic acid ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ซึ่งรายงานผลในรูปของค่า FRAP value หรือความสามารถในการรีดิวซ์สารต้านออกซิเดชัน เทียบกับกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4$ (mg $FeSO_4$ equivalent/g extract) ในสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว ได้แก่ ไพล ดองดึง ฟ้าทะลายโจร และบอระเพ็ด รวมถึงสารสกัดตำรับ พบว่าสารสกัดไพลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP สูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 430.32 ± 22.39 mM Fe^{2+}/mg เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดบอระเพ็ด สารสกัดตำรับ สารสกัดดองดึง และสารสกัดฟ้าทะลายโจร ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากราฟมาตรฐานของ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ดังแสดงในตารางที่ 2

3. การศึกษาผลของสารสกัดตำรับยาพอกเข่าโรงพยาบาลพระพุทธบาทในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยวและตำรับต่อศักยภาพในการต้านการอักเสบในระดับหลอดทดลอง

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มาโครฟาจเพาะเลี้ยง (RAW 264.7) ด้วยวิธี Cytotoxicity test (MTT assay) พบว่าสารสกัดไพล สารสกัดฟ้าทะลายโจร และสารสกัดบอระเพ็ด ที่ความเข้มข้นในช่วง 0 – 625 µg/mL มีค่า %Cell viability มากกว่า 80% ขณะที่สารสกัดดองดึงที่ความเข้มข้นในช่วง 0 – 39 µg/mL และสารสกัดตำรับยาพอกเข่าที่ความเข้มข้นในช่วง 0 – 78 µg/mL มีค่า %Cell viability มากกว่า 80% แสดงให้เห็นว่าสารสกัดในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งนี้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 1



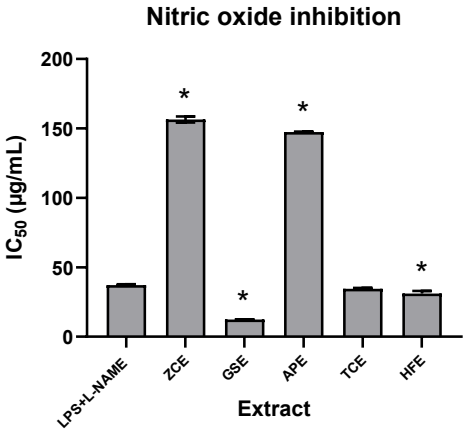
ภาพที่ 1 ผลแสดงความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (LPS) หลังได้รับสารสกัดไพล (A), สารสกัดดองดึง (B), สารสกัดฟ้าทะลายโจร (C), สารสกัดบอระเพ็ด (D), และสารสกัดตำรับ (E) ที่ความเข้มข้น 0-625 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD, n = 3) โดยเส้นประแสดงเกณฑ์ความมีชีวิตของเซลล์ที่ร้อยละ 80

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัด โดยประเมินจากความสามารถในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) พบว่าสารสกัดดองดึงมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.34 ± 0.08 µg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดตำรับ สารสกัดบอระเพ็ด สารสกัดฟ้าทะลายโจร และสารสกัดไพล ตามลำดับ ขณะที่กลุ่ม positive control (LPS + L-NAME) มีค่า IC50 เท่ากับ 37.22 ± 0.56 µg/mL ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 2

ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง nitric oxide ของสารสกัดสมุนไพรตำรับยาพอกเข่าโรงพยาบาลพระพุทธบาท

ชนิดสารสกัด	ฤทธิ์ยับยั้ง NO (IC_{50} µg/mL)
LPS+L-NAME	37.22 ± 0.56 ^{c}
ZCE	156.41 ± 2.23^{a}
GSE	12.34 ± 0.08^{e}
APE	147.32 ± 0.32^{b}
TCE	34.57 ± 0.56^{c}
HFE	31.04 ± 1.87^{d}

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก ($^{a-e}$) ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ZCE = *Zingiber cassumunar* Roxb., GSE = *Gloriosa superba* L., APE = *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall ex Nees., TCE = *Tinospora crispa* (L). Miers ex Hook.f.& Thomson., HFE = Herbal formula extract



ภาพที่ 2 ค่า IC_{50} ของฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและสารสกัดตำรับ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD, n = 3) อักษร

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม positive control (LPS+L-NAME), $p < 0.05$

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้ประเมินศักยภาพทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรตำรับยาพอกเข่าโรงพยาบาลพระพุทธบาท ทั้งในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยวและตำรับ โดยครอบคลุมการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนทั้งด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสารสกัด

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดตำรับมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์รวมค่อนข้างสูง โดยมีค่า TPC เท่ากับ 396.31 ± 30.16 mg GAE/g และ TFC เท่ากับ 301.32 ± 9.16 mg QCE/g แสดงให้เห็นว่าสารสกัดตำรับมีองค์ประกอบของสารกลุ่ม phenolics และ flavonoids ซึ่งเป็นกลุ่มสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสารกลุ่มดังกล่าวสามารถทำหน้าที่เป็นสารให้อิเล็กตรอนและช่วยลดความเครียดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคข้อเข่าเสื่อม ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yongkhamcha B et al. [23] ที่รายงานว่าสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรในกลุ่ม Zingiber มีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Ahmad W et al. [20] ที่ระบุว่า *Tinospora crispa* ประกอบด้วยสารสำคัญหลายกลุ่ม เช่น alkaloids, diterpenes และ glycosides ซึ่งเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดตำรับยาพอกเข่าโรงพยาบาลพระพุทธบาทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 178.60 ± 6.78 และ 76.13 ± 0.64 µg/mL ตามลำดับ แม้ฤทธิ์จะต่ำกว่าสารมาตรฐาน แต่ยังสะท้อนว่าสารสกัดตำรับสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะผลจากวิธี ABTS ที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่าวิธี DPPH แสดงว่าสารสกัดอาจตอบสนองต่ออนุมูล ABTS ได้ดีกว่าอนุมูล DPPH ทั้งนี้ความแตกต่างของผลการทดสอบอาจเกิดจากกลไกของแต่ละวิธีที่แตกต่างกัน โดย DPPH และ ABTS ใช้ประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ขณะที่ FRAP ประเมินความสามารถในการรีดิวซ์หรือการให้อิเล็กตรอน ดังนั้นการใช้หลายวิธีร่วมกันจึงช่วยสะท้อนศักยภาพของสารสกัดสมุนไพรได้ครอบคลุมมากขึ้น ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Ahmad W et al. [20] ที่พบว่า *Tinospora crispa* มีสารสำคัญหลายกลุ่ม เช่น alkaloids, diterpenes และ glycosides ซึ่งเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ จึงสนับสนุนว่าสารสกัดตำรับยาพอกเข่ามีศักยภาพในการลดภาวะ oxidative stress เป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและพยาธิสภาพของโรคข้อเข่าเสื่อม นอกจากนี้ Nobosse P et al. [25] รวมถึง Panyatip P et al. [28] รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของ

สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ประเมินด้วย DPPH, ABTS และ FRAP ผลดังกล่าวจึงแสดงถึงศักยภาพด้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดกระบวนการที่สัมพันธ์กับ oxidative stress เมื่อพิจารณารูปแบบของผลการทดสอบทั้งสามวิธี พบว่าผล DPPH, ABTS และ FRAP มีแนวโน้มโดยรวมสอดคล้องกัน โดยสารสกัดไพลแสดงศักยภาพต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ขณะที่สารสกัดฟ้าทะลายโจรแสดงศักยภาพต่ำที่สุดในทั้งสามวิธี ทั้งนี้การแปลผลควรคำนึงถึงรูปแบบการรายงานผลที่แตกต่างกัน เนื่องจาก DPPH และ ABTS รายงานเป็นค่า IC_{50} ซึ่งค่าที่ต่ำแสดงถึงฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระที่สูงกว่า ขณะที่ FRAP รายงานความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} ซึ่งค่าที่สูงแสดงถึง reducing power ที่สูงกว่า อย่างไรก็ตามลำดับของสารสกัดบางชนิดอาจแตกต่างกันระหว่างแต่ละวิธี เช่น สารสกัดตำรับและบอระเพ็ดในวิธี ABTS เมื่อเทียบกับ DPPH และ FRAP ซึ่งอาจสะท้อนถึงความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีและการตอบสนองของสารออกฤทธิ์ต่อระบบทดสอบแต่ละชนิด ความแตกต่างของลำดับศักยภาพต้านอนุมูลอิสระระหว่างวิธีทดสอบดังกล่าวมีรายงานในงานวิจัยก่อนหน้า โดย Chaves et al. ศึกษาสารสกัดพืช 12 ชนิด ด้วยวิธี DPPH, ABTS, FRAP และ reducing power พบว่าการจัดลำดับศักยภาพต้านอนุมูลอิสระของพืชสามารถแตกต่างกันตามวิธีที่ใช้วิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าวิธีแต่ละชนิดมีความไวและความสามารถในการจำแนกสารสกัดแตกต่างกัน [36] นอกจากนี้ He F et al. [31] ซึ่งประเมินสมุนไพรจีน 94 ชนิดด้วย DPPH, ABTS และ FRAP พบว่าสมุนไพรที่มีฤทธิ์สูงมากมีแนวโน้มให้ลำดับใกล้เคียงกันในทุกวิธี ขณะที่สมุนไพรที่มีฤทธิ์ระดับต่ำถึงปานกลางสามารถให้ลำดับแตกต่างกันระหว่าง ABTS กับ FRAP และ DPPH ได้ สอดคล้องกับ Ayuni D et al. [32] ที่ศึกษาสารสกัดใบข้าวหอมมะลิไทยและพบว่าภายใต้เงื่อนไขการสกัดบางรูปแบบ ค่า FRAP แสดงแนวโน้มแตกต่างจาก DPPH และ ABTS เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนตัวทำละลายต่อวัตถุดิบ ดังนั้นความแตกต่างบางส่วนระหว่างผลการทดสอบแต่ละวิธีจึงไม่จำเป็นต้องแสดงถึงความไม่สอดคล้องของข้อมูล แต่สะท้อนให้เห็นว่าการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรควรพิจารณาผลจากหลายวิธีร่วมกัน

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดตำรับไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 ในช่วงความเข้มข้น 0–78 µg/mL โดยมีค่า cell viability มากกว่า 80% แสดงให้เห็นว่าสารสกัดตำรับมีความปลอดภัยในระดับเซลล์ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามสารสกัดดองดึงมีช่วงความเข้มข้นที่ปลอดภัยแคบกว่าสมุนไพรชนิดอื่น ซึ่งอาจสัมพันธ์กับสารกลุ่ม alkaloids โดยเฉพาะ colchicine หรือ colchinoids ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงและอาจส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อใช้ในความเข้มข้นสูง ผลนี้สอดคล้องกับรายงานของ Goel B et al. [14] ที่พบสารกลุ่ม colchinoid จากรากดองดึงซึ่งมีฤทธิ์ต่อเซลล์ และสอดคล้องกับรายงานของ Gunasekaran K et al. [15] ที่กล่าวถึงความเป็นพิษของดองดึงเมื่อได้รับในปริมาณสูง ดังนั้นการนำดองดึงมาใช้ในตำรับสมุนไพรภายนอกจึงควรควบคุมความเข้มข้นให้เหมาะสมและควรมีการประเมินความปลอดภัยเพิ่มเติม

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยประเมินจากความสามารถในการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่าสารสกัดดองดึงมีฤทธิ์ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.34 ± 0.08 µg/mL รองลงมาคือสารสกัดตำรับที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.04 ± 1.87 µg/mL แสดงให้เห็นว่าสารสกัดตำรับมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ชัดเจน เนื่องจาก NO และ reactive nitrogen species เป็นตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ [3] โดยการกระตุ้นเซลล์ macrophage ด้วย LPS สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ iNOS และเพิ่มการสร้าง NO ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับ Forstermann U และ Sessa WC [33] ที่อธิบายบทบาทของ nitric oxide synthase ต่อการสร้าง NO ในกระบวนการอักเสบ และสอดคล้องกับรายงานของ Giustarini D et al. [34] รวมถึง Goshi E et al. [35] ที่ระบุว่าการตรวจวัด nitrite ด้วย Griess reagent สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการสร้าง NO ในระบบชีวภาพได้

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของสมุนไพรในตำรับ พบว่าไพลมีสารสำคัญในกลุ่ม sesquiterpenes และ phenylbutenoids ซึ่งมีรายงานว่าสามารถออกฤทธิ์ต้านการอักเสบและลดปวด โดยเกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการสร้างสารก่อการอักเสบและเส้นทางการส่งสัญญาณ เช่น NF-**K**B, Akt/MAPK และ caspase-3 pathways สอดคล้องกับการศึกษาของ Gundom T et al. [6] และรายงานที่กล่าวถึงการใช้ไพลในรูปแบบพอก ทา หรือน้ำมันไพล เพื่อบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ เคล็ด ขัดยอก และอาการปวดจากข้อเข่าเสื่อม [7, 37] และการศึกษาของลีลารุ่งระยับ [8] ซึ่งมีการประยุกต์ใช้ภายนอกในสัตว์ทดลองด้วยวิธีการทา ร่วมกับอัลตราซาวนด์และการผลักสารด้วยกระแสไฟฟ้า จึงเป็นหลักฐานที่สนับสนุนศักยภาพของไพลสำหรับการใช้ภายนอก ขณะที่ดองดึง (Gloriosa superba L.) มีสารสำคัญกลุ่ม alkaloids โดยเฉพาะ colchicine และ colchicinoids ซึ่งมีรายงานเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดย Marques-da-Silva C et al. [12] พบว่า colchicine สามารถลดการสร้าง ROS, NO และ IL-1β ในเซลล์ macrophage ซึ่งอาจมีส่วนอธิบายผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัดดองดึงยับยั้งการสร้าง NO ได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามหลักฐานดังกล่าวเป็นการศึกษาในระดับเซลล์ ไม่ใช่การใช้ภายนอกโดยตรง สำหรับหลักฐานการใช้ภายนอก Khajornvanitchot V และ Bunnag V [16] ศึกษาสารสกัดดองดึงด้วยเอทานอล 80% โดยทาสารสกัดเฉพาะที่บริเวณใบหูหนูในแบบจำลอง EPP-induced ear edema พบว่าสามารถลดอาการบวมได้อย่างสัมพันธ์กับขนาดที่ใช้ (dose-dependent manner) จึงเป็นหลักฐานโดยตรงที่สนับสนุนฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดดองดึงเมื่อใช้ภายนอก ทั้งนี้ดองดึงมีสาร colchicine ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษเมื่อได้รับในปริมาณสูง ดังนั้นการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ภายนอกควรควบคุมปริมาณสารสำคัญและประเมินความปลอดภัยทางผิวหนังเพิ่มเติม [14, 15] ส่วนฟ้าทะลายโจรมีสารสำคัญคือ andrographolide ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide, prostaglandins และ cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ iNOS และการส่งสัญญาณ NF-**K**B สอดคล้องกับรายงานของ Hossain S et al. [18] รวมถึง Raman S et al. [19] อย่างไรก็ตามงานดังกล่าวเป็นหลักฐานด้านฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการพัฒนารูปแบบนำส่งยาเป็นหลัก มิใช่หลักฐานการทดลองฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการใช้ภายนอกโดยตรง จึงควรพิจารณาผลของฟ้าทะลายโจรในตำรับในฐานะองค์ประกอบที่อาจมีส่วนเสริมฤทธิ์ต้านการอักเสบ มากกว่าการสรุปประสิทธิผลจากการใช้ภายนอก และบอระเพ็ดประกอบด้วยสารกลุ่ม alkaloids และ diterpenes ซึ่งมีรายงานเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ โดยอาจช่วยลด oxidative stress และการสร้าง inflammatory mediators สอดคล้องกับรายงานของ Ahmad W et al. [20] สำหรับการใช้ภายนอก มีข้อมูลการใช้ตามภูมิปัญญาในรูปแบบพอกร่วมกับน้ำมันมะพร้าว เพื่อบรรเทาอาการข้ออักเสบ แต่หลักฐานดังกล่าวเป็นข้อมูล ethnomedicinal มิใช่การทดลองฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากการใช้ภายนอกโดยตรง ดังนั้นจึงควรแยกการอ้างอิงด้านฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาออกจากหลักฐานการใช้ภายนอกให้ชัดเจน [38] เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดเอทานอล 95% ของตำรับกับสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว พบว่าสารสกัดตำรับไม่ได้ให้ฤทธิ์สูงที่สุด ในทุกการทดสอบ แต่แสดงศักยภาพที่ครอบคลุมทั้งด้านต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ โดยในการทดสอบ ABTS สารสกัดตำรับมีค่า IC_{50} เท่ากับ 76.13 ± 0.64 µg/mL ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดบอระเพ็ด ดองดึง และฟ้าทะลายโจร ขณะที่การทดสอบ DPPH และ FRAP สารสกัดตำรับมีฤทธิ์สูงกว่าสมุนไพรเดี่ยวบางชนิด สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบ สารสกัดตำรับสามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.04 ± 1.87 µg/mL ซึ่งเป็นอันดับสองรองจากสารสกัดดองดึง และสูงกว่าสารสกัดบอระเพ็ด ฟ้าทะลายโจร และไพล ผลดังกล่าวอาจสะท้อนถึงผลร่วมของสารออกฤทธิ์หลายกลุ่มจากสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกันและอาจมีส่วนสนับสนุนศักยภาพของตำรับทั้งด้านการลด oxidative stress และการควบคุมตัวกลางของกระบวนการอักเสบ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้ประเมินปฏิสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของตำรับโดยตรง จึงควรอธิบายผลในลักษณะของผลร่วมที่เป็นไปได้ (possible combined effects) มากกว่าการสรุปว่าเป็น synergistic effect ดังนั้นเมื่อพิจารณาร่วมกัน สมุนไพรทั้ง 4 ชนิด อาจมีส่วนสนับสนุนฤทธิ์ของตำรับผ่านกลไกที่แตกต่างกัน ทั้งการกำจัดอนุมูลอิสระ การลด oxidative stress และการควบคุมตัวกลางของกระบวนการอักเสบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัดตำรับมีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโว

นอยด์รวมค่อนข้างสูง และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP นอกจากนี้ ยังพบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการสร้าง NO ในเซลล์ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.04 ± 1.87 µg/mL อีกทั้งไม่ก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 ในช่วงความเข้มข้น 0–78 µg/mL ผลดังกล่าวสนับสนุนศักยภาพของสารสกัดตำรับสำหรับการพัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรใช้ภายนอก สำหรับบรรเทาอาการปวดและการอักเสบในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบระดับหลอดทดลอง จึงควรศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและความปลอดภัยของสารสกัดตำรับในสัตว์ทดลองยืนยันผลในระดับ in vivo รวมถึงประเมินความปลอดภัยทางผิวหนัง ความคงตัวของผลิตภัณฑ์ เพื่อยืนยันประสิทธิผลและความปลอดภัยในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. American Academy of Orthopaedic Surgeons. Knee osteoarthritis (OrthoInfo Basics) [Internet]. 2019 [cited 2026 Sep 8]. Available from: https://orthoinfo.aaos.org/globalassets/pdfs/knee-osteoarthritis.pdf
2. Primorac D, Molnar V, Rod E, Jelec Z, Cukelj F, Matisic V, et al. Knee osteoarthritis: a review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations. Genes (Basel) 2020;11(8):854.
3. Zubair M, Burns B. Pathology, inflammation. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; [Internet]. 2024 [cited 2026 Sep 8]. Available from:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534820/
4. สุวรรณี สร้อยสงค์, อังคณา เรือนก้อน, ภัณฑิรชา เฟื่องทอง, ผุสดี สระทอง. การพยาบาลผู้สูงอายุโรคข้อเข่าเสื่อม. วารสารวิชาการแพทย์เขต 11 2562;33(2):197-210.
5. พิพัฒน์ เพิ่มพูล. คู่มือการพยาบาลผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม [อินเ ตอร์เน็ต]. 2557 [เข้าถึงเมื่อ 12 มิ.ย. 2569]. เข้าถึงได้จาก: https://repository.li.mahidol.ac.th/handle/123456789/58610
6. Gundom T, Sukketsiri W, Panichayupakaranant P. Phytochemical analysis and biological effects of *Zingiber cassumunar* extract and three phenylbutenoids: targeting NF-kappaB, Akt/MAPK, and caspase-3 pathways. BMC Complement Med Ther 2025;25:180.
7. พรนิภา สิทธิสระดู่, กนกวรรณ วงศ์แก้ว, มัณฑนา คำอ้าย. การศึกษาการใช้ไพลในตำรับยาไทยสำหรับรักษาโรคระบบกระดูกและกล้ามเนื้อ. วารสารมหาจุฬานาครทรรศน์ 2565;9(5):463-75.
8. ดลรวี (นัฏฐกาล) ลีลารุ่งระยับ. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการอักเสบของนีโอไพลและแนวทางการประยุกต์มาใช้ทางด้านกายภาพบำบัด [รายงานวิจัย]. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2552.
9. Mondal M, Chandra I. Organ specific phytochemical changes and antioxidant activities of in vivo and in vitro grown *Gloriosa superba* L. S Afr J Bot 2023;152:1-10.
10. Singh A, Kumar A, Gautam DNS. Pharmacognostical assessment, antioxidant ability and determination of phytomolecules using GC-MS in *Gloriosa superba* Linn. J Plant Sci Res. 2023;39(2):219-28.
11. Nikhila GS, Sangeetha G, Swapna TS. Anti-inflammatory properties of the root tubers of *Gloriosa superba* and its conservation through micropropagation. J Med Plants Res 2015;9(1):1-7.
12. Marques-da-Silva C, Chaves MM, Castro NG, Coutinho-Silva R, Guimaraes MZP. Colchicine inhibits cationic dye uptake induced by ATP in P2X2 and P2X7 receptor-expressing cells: implications for its therapeutic action. Br J Pharmacol 2011;163(5):912-26.

13. Manikanta K, Ramya Sri M, Bhavana B, Jhansi C, Divya Sai Sri B, Sitty MB, et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Gloriosa superba* using various in-vitro methods. Sch Acad J Pharm 2025;14(5):91-6.
14. Goel B, Reddy H, Cholkar A, Kumar S, Guru SK, Jain SK. Isolation of a new cytotoxic colchinoid from *Gloriosa superba* roots. Nat Prod Res 2023;37(23):3909-14.
15. Gunasekaran K, Mathew DE, Sudarsan TI, Iyyadurai R. Fatal colchicine intoxication by ingestion of *Gloriosa superba* tubers. BMJ Case Rep 2019;12(5):e228718.
16. Khajornvanitchot V, Bunnag V. Anti-inflammatory activity of *Gloriosa superba* L. extracts [special project]. Bangkok: Faculty of Pharmacy, Mahidol University; 2014.
17. Sasithorn T. Comparison of colchicine content in *Gloriosa superba* L. root after pretreatment by Thai traditional medicine methods. Pharmacogn J 2021;13(4):942-8.
18. Hossain S, Urbi Z, Karuniawati H, Mohiuddin RB, Qrimida AM, Allzrag AMM, et al. *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees: an updated review of phytochemistry, antimicrobial pharmacology, and clinical safety and efficacy. Life (Basel) 2021;11(4):348.
19. Raman S, Murugaiyah V, Parumasivam T. *Andrographis paniculata* dosage forms and advances in nanoparticulate delivery systems: an overview. Molecules 2022;27(19):6164.
20. Ahmad W, Jantan I, Bukhari SNA. *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson: a review of its ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological aspects. Front Pharmacol 2016;7:59.
21. กรุณา เจริญนวรัตน์. ผลกระทบของโรคข้อเข่าเสื่อม และการรักษาด้วยยาพอกสมุนไพร. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 2564;19(3):724-36.
22. Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. J Ethnopharmacol 2007;109(3):535-8.
23. Yongkhamcha B, Khankhum S, Buddhakala N. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activities and toxicities of ethanol extracts from *Curcuma mangga*, *Zingiber officinale* and *Zingiber montanum*. Trends Sci 2024;21(9):8086.
24. Jayakumar T, Hsieh CY, Lee JJ, Sheu JR. Experimental and clinical pharmacology of *Andrographis paniculata* and its major bioactive phytoconstituent andrographolide. Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013:846740.
25. Nobosse P, Fombang EN, Mbofung CMF. 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(2):53-60.
26. John JC, Fernandes J, Nandgude TD, Niphade SR, Savla A, Deshmukh PT. Analgesic and anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extract from *Gloriosa superba* Linn. Int J Green Pharm 2009;3(3):215-9.
27. Sharma GJ, Thokchom DS. Antioxidant and radioprotective properties of *Zingiber montanum* (J. Konig) A. Dietr. Planta Med 2011;77(5):127.

28. Panyatip P, Padumanonda T, Yongram C, Kasikorn T, Sungthong B, Puthongking P. Impact of tea processing on tryptophan, melatonin, phenolic and flavonoid contents in mulberry (*Morus alba* L.) leaves: quantitative analysis by LC-MS/MS. Molecules 2022;27(15):4979.
29. Truong VL, Manochai B, Pham TT, Jeong WS. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Zingiber montanum* oil in HepG2 cells and lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. J Med Food 2021;24(6):595-605.
30. นาถฤดี สิทธิสมวงศ์, เจษฎา เพ็งชะตา, ทรงพล ชีวะพัฒน์, เอมมนัส หวังหมัด, พัชรินทร์ รักษามั่น, จรินทร์ จันทรฉายะ และคณะ. พิษเฉียบพลันและกึ่งเรื้อรังของฟ้าทะลายโจร (Toxicity of Andrographis paniculata Wall. ex Nees). Thai J Pharm Sci 1989;14(2):109-18.
31. He F, Chen J, Dong K, Leng Y, Xu J, Hu P, et al. Multi-technical analysis on the antioxidative capacity and total phenol contents of 94 traditional Chinese dietary medicinal herbs. Food Sci Nutr 2018;6(6):1358-69.
32. Ayuni D, Neri L, Pittia P, Sirikantaramas S, Devahastin S, Borompichaichartkul C. Impact of extraction methods on bioactive compounds and antioxidant activities of Thai jasmine rice leaf extracts. Int J Food Sci Technol 2024;59(10):7865-72.
33. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J 2012;33(7):829-37
34. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. Methods Enzymol 2008;440:361-80.
35. Goshi E, Zhou G, He Q. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. Med Gas Res 2019;9(4):192-207.
36. Chaves N, Santiago A, Alías JC. Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. Antioxidants (Basel) 2020;9(1):76.
37. ฐิติรัตน์ ชัยชนะ, วนิษา ปันฟ้า, ยิ่งยง เทาประเสริฐ, ศิวพงษ์ ตันสุวรรณวงค์. การศึกษาและติดตามผลการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมระยะเริ่มต้นด้วยการแพทย์แผนไทย. วารสารหมอยาไทยวิจัย 2563;6(1):45-54.
38. กุลธิดา อิ่นแก้ว. นวัตกรรมเจลพอกเข่าสมุนไพร. สุโขทัย: โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลไทยชนะศึก; 2563.