

การศึกษาพิษของสารสกัดยาตำรับห้ารากด้วยน้ำ ในเซลล์เพาะเลี้ยง

พรชัย สินเจริญโกโคย¹ ตีญานี สาหัด¹ ณัฐภัทร หาญกิจ¹ ปฏิภาณ พรหมพราย¹ สมจิตร เนียมสกุล¹
ไกรสิทธิ์ ลิ้มประเสริฐ² ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์¹ และ พิเชฐ บัญญัติ¹

¹ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

² 238/4 ถนนอุดรดุสิต ตำบลหมากแข้ง อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี 41000

บทคัดย่อ ยาห้าราก เป็นยาตำรับสมุนไพรไทยที่ได้รับความนิยมจากประชาชนทั่วไปและนักวิจัยเป็นอย่างมากในช่วงที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 หรือโควิด-19 ในประเทศไทยได้มีการส่งเสริมการใช้สมุนไพรหรือยาตำรับในการช่วยบรรเทาอาการป่วยที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส เช่น อาการไข้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดยาตำรับห้ารากด้วยน้ำ ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SV-80, Chang-Liver และ HEK-293 ด้วย MTT assay และศึกษาความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c 3T3 ตาม OECD TG 129 ด้วย 3T3 NRU assay ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดยาตำรับห้ารากมีความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงต่ำ และเมื่อพิจารณาผลการศึกษาความเป็นพิษตาม OECD TG 129 พบว่า สารสกัดยาตำรับห้ารากมีความเป็นพิษต่ำเช่นเดียวกัน ดังนั้น จึงอาจใช้ยาห้ารากเป็นวิธีการรักษาทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากการใช้ยาแผนปัจจุบันได้

คำสำคัญ: ยาตำรับห้าราก, MTT assay, OECD TG 129

Corresponding author E-mail: pornchai.s@dmsc.mail.go.th

Received: 1 June 2024

Revised: 27 August 2024

Accepted: 1 October 2024

บทนำ

ยาห้าราก ยาเบญจโลกวิเชียร ยาแก้วห้าดวง หรือ ยาเพชรสว่าง ทั้งหมดนี้เป็นชื่อของตำรับยาเดียวกันเป็นตำรับยาแผนโบราณ⁽¹⁾ ประกอบด้วยรากสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ รากชิงชี (Capparis micracantha DC.) รากย่านาง (Tiliacora triandra (Colebr.) Diels) รากเห่ายายม่อม (Clerodendrum indicum (L.) Kuntze) รากคนทา (Harrisonia perforata (Blanco) Merr.) และรากมะเดื่อชุมพร (Ficus racemosa L.) มีสรรพคุณ ในการกระตุ้นให้หรือถอนพิษต่าง ๆ แก้ไข้ต้นมือ แก้ไข้พิษ ไข้กาฬ ไข้หัว แก้ไข้เพื่อดี และโลหิต⁽¹⁾ ในหนังสือ แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ ซึ่งเป็นตำรายาแผนไทยที่ได้รับการยอมรับเป็นมาตรฐาน ได้กล่าวถึงสรรพคุณของยา ห้ารากในการรักษาอาการไข้ไว้ในคัมภีร์ตักศิลา โดยให้ใช้ตำรับยานี้เพื่อกระตุ้นให้ (การทำให้พิษไข้ถูกขับ ออกมาภายนอก) ให้ออกมาก่อนเป็นลำดับแรก แล้วจึงใช้ยาตำรับอื่นๆ ต่อไป โดยใช้กับไข้พิษ ได้แก่ ไข้รากสาด ไข้ดำอืดแดง ไข้มาลาเรีย ไข้หมาแม่ม ไข้มาหานิล เป็นต้น อาการทั่วไปของพิษไข้ คือปวดศีรษะ ตัวร้อน จิตประจวบเลวไฟ ปากแห้ง พันแห้ง น้ำลายเหนียว ตาแดงคล้ายสายเลือด ร้อนใน กระหายน้ำ มือเท้าเย็น มีเม็ดขึ้นตามร่างกาย เม็ดนั้นเล็กบ้าง ใหญ่บ้าง สีต่างๆ กัน ดำก็มี แดงก็มี เขียวก็มี เป็นต้น^(2,3) นอกจากนี้ตำรับยาห้ารากจัดอยู่ในกลุ่มยาแก้ไข้ที่กระทรวงสาธารณสุขประกาศใช้ในบัญชียาจากสมุนไพรที่มีการใช้ตามองค์ความรู้ดั้งเดิมในบัญชียาหลักแห่งชาติการศึกษาฤทธิ์แก้ปวดและลดไข้ของตำรับยาห้ารากในสัตว์ทดลองโดย Jongchanapong และคณะพบว่า ตำรับยาห้ารากและสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นส่วนประกอบของตำรับ ขนาด 25 - 400 มก./กก. สามารถลดอุณหภูมิของหนูแรทที่เพิ่มขึ้นจากการเหนี่ยวนำให้เป็นไข้ด้วย lipopolysaccharide (LPS) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 หรือ 2 หลังการเหนี่ยวนำให้เกิดไข้ด้วย LPS โดยสารสกัดจากตำรับยาห้ารากขนาด 400 มก./กก. มีประสิทธิภาพในการลดไข้สูงสุด⁽⁴⁾ นอกจากนี้ มีการศึกษาความปลอดภัยของตำรับยาห้ารากและสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับ โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีทดสอบการตายของไรทะเล

(Artemia salina L.) ทดสอบการก่อกลายพันธุ์ด้วยการทดสอบแอมส์ (Ames mutagenicity assay) โดยใช้ Salmonella typhimurium และการก่อให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอด้วยวิธีโคเมต ตามลำดับ สารตัวอย่างโดยส่วนใหญ่ไม่มีความเป็นพิษต่อไรทะเล และไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรง แต่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ทางอ้อมหลังจากการเกิดปฏิกิริยาไนโตรเซชัน⁽⁵⁾ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาความเป็นพิษของยาห้ารากในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปกติ เพื่อเป็นข้อมูลความปลอดภัยเบื้องต้นและเป็นการทำนายความผิดปกติหรือรอยโรคที่อาจเกิดขึ้นกับอวัยวะสำคัญหลักๆ ที่มีโอกาสในการสะสมสารพิษ

การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อทดสอบความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงของสารสกัดตำรับยาห้ารากด้วยน้ำ ซึ่งเป็นวิธีการสกัดที่สอดคล้องต่อการใช้ตำรับยาตามภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย เพื่อให้ทราบถึงข้อมูลความเป็นพิษเบื้องต้นเป็นข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์สนับสนุนการคุ้มครองผู้บริโภคและการใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรยาตำรับห้าราก

สารเคมีและสารละลาย

อาหารเลี้ยงเซลล์สูตรสำเร็จชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA), อาหารเลี้ยงเซลล์สูตรสำเร็จชนิด Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Gibco, USA), Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, UK), Doxorubicin (Sigma-Aldrich, Israel), Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, France), 0.4% Trypan blue (Invitrogen, USA), 1X Phosphate buffer saline (PBS) (Sigma-Aldrich, USA), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (Invitrogen, USA), น้ำ Deionized Water (DI), Neutral red medium (Sigma-Aldrich, Switzerland) และ Neutral red destain solution (ประกอบด้วย Ethanol Absolute 99.9% (องค์การสุรา, ประเทศไทย), Acetic acid 100% (Merk, Germany), น้ำ Deionized Water (DI))

เครื่องมือและอุปกรณ์

เซลล์ปอดเพาะเลี้ยง (SV-80) (catalog number 300345), เซลล์ตับเพาะเลี้ยง (Chang-liver) (catalog number 300139) และเซลล์ไตเพาะเลี้ยง (HEK-293) (catalog number 300192) ซื้อจากบริษัท CLS Cell line service GmbH, Germany ส่วนเซลล์เอ็มบริโอหนูเพาะเลี้ยง (BALB/c 3T3) (catalog number 305155) ซื้อจากบริษัท European Collection of cell Culture, USA

กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) (Nikon, Japan), ตู้ชีวนิรภัยแบบ

Class II (Biosafety Cabinet Class II; BSC class II) (LABCONCO, USA), ตู้บ่มเลี้ยงเซลล์แบบใช้

คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) (SHEL LAB, USA), อ่างควบคุมอุณหภูมิชนิดเม็ดโลหะ (Bead bath)(LAB ARMOR, USA), เครื่องนับเซลล์แบบอัตโนมัติ(Cell counter) (Invitrogen, Singapore), เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Pipette controller) (RANNIN,USA), เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (DLAB,China), เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบไม่ควบคุม

อุณหภูมิ(Centrifuge) (LABOGENE, Denmark), เครื่องวัดปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (ELISA plate reader)(EnSpire, Singapore), ไมโครปิเปต (Micropipette)ขนาด 10 200 1000 และ 5000

ไมโครลิตร (RANNIN,USA), ไมโครปิเปตชนิด 8 ช่อง (Multi-channelmicropipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร (RANNIN,USA) และขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture flask)ขนาดพื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร แบบมี

สารเคลือบเพื่อการยึดเกาะ (SPL, Korea)วิธีการ

การเตรียมสารสกัดตำรับยาห้ารากตำรับยาห้าราก
ได้รับความอนุเคราะห์จาก

นายไกรสิทธิ์ ลิ้มประเสริฐ (พทว.13150 พท.ภ.13761 พท.ผ.2001 บป.20) ซึ่งจัดเตรียมตามยาสามัญประจำบ้านแผนโบราณ 2561 และจัดอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ (บัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ. 2555) จากนั้น

มาสกัดโดยนำผงยาตำรับห้ารากสกัดโดยวิธีการ Reflux ด้วยน้ำกลั่น (สัดส่วนสมุนไพร : ตัวทำละลาย เท่ากับ1:10) แล้วกรอง จากนั้นทำการกลั่นระเหยสูญญากาศและทำแห้งแบบเยือกแข็ง เก็บสารสกัดยาตำรับห้ารากในขวดสีชาที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส ตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีโดยศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-layer chromatography, TLC)ใช้สารละลายของ

n-hexane: acetone : Ethylacetate ในอัตราส่วน 70:20:5 เป็น

น้ำยาแยกศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงปอดชนิด

ปกติ (SV-80) เซลล์เพาะเลี้ยงตับชนิดปกติ (Chang-Liver)

และเซลล์เพาะเลี้ยงไตชนิดปกติ (HEK-293) ด้วย MTT assay ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดSV-80,

Chang-Liver และ HEK-293 ด้วย MTT assay เพื่อเป็น

ข้อมูลความปลอดภัยเบื้องต้นและเป็นการทำนายความผิดปกติหรือรอยโรคที่อาจเกิดขึ้นกับอวัยวะสำคัญหลักๆ ที่มี

โอกาสในการสะสมสารพิษ โดย เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงใน

เพลทเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SV-80

เลี้ยงด้วยอาหาร DMEM, เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Chang-Liver และ HEK-293 เลี้ยงด้วยอาหาร EMEM) บ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดยาตำรับห้า

ราก (Y5R) ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นต่ำ

ซึ่งไม่มีผลทำลายเซลล์จนถึงระดับความเข้มข้นสูงซึ่งมีผล

ทำลายเซลล์มากกว่าร้อยละ 90 จำนวน 8 ระดับความเข้มข้น(ระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ 5,000, 2,500, 1,250,

625, 312.5, 156.25, 78.125 และ 39.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเตรียมสารละลาย Doxorubicin

ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 8 ระดับความเข้มข้น (ระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 และ 0.03906 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เมื่อครบเวลาบ่มเลี้ยงเซลล์ดูดสารละลาย

อาหารออกจากเพลท จากนั้นเปิดสารละลายสารสกัดยาต้านมะเร็ง (Y5R) และสารละลาย Doxorubicin ทั้ง 8 ระดับความเข้มข้นที่เตรียมไว้แล้ว ลงในเพลทที่มีเซลล์ โดยเติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง เติม MTT ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทในตู้เลี้ยงเซลล์ เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ปิดสารละลาย MTT ออกให้เหลือเฉพาะผลึก Formazan เติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทุกในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึก Formazan เขย่าเพลทประมาณ 1 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร คำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมอาหารเลี้ยงเซลล์ เจือจางสารทดสอบ (Vehicle control)

ศึกษาความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c 3T3 ตาม OECD Test Guideline 129 ด้วย 3T3 NRU assay

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง BALB/c 3T3 cell ด้วย Neutral red uptake เพื่อหาค่า IC50 และเมื่อทราบค่า IC50 นำมาคำนวณหาค่า LD50 เพื่อใช้ในการกำหนดขนาดเบื้องต้นก่อนทดสอบพิษเฉียบพลัน โดยเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงในเพลทเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ใช้เซลล์เริ่มต้น 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม ละ 100 ไมโครลิตร เลี้ยงด้วยอาหาร DMEM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 นาน 24.2 ชั่วโมง เตรียมสารละลายสารสกัดยาต้านมะเร็ง (Y5R) ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นต่ำซึ่งไม่มีผลทำลายเซลล์จนถึงระดับความเข้มข้นสูงซึ่งมีผลทำลายเซลล์มากกว่า 90% จำนวน 8 ระดับความเข้มข้น (ระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5, 156.25, 78.125 และ 39.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเตรียมสารละลาย Doxorubicin ความ

เข้มข้นต่างๆ จำนวน 8 ระดับความเข้มข้น (ระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 และ 0.03906 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อครบเวลาบ่มเลี้ยงเซลล์ดูดสารละลายอาหารออกจากเพลท จากนั้นเปิดสารละลายสารสกัดยาต้านมะเร็ง (Y5R) และสารละลาย Doxorubicin ทั้ง 8 ระดับความเข้มข้นที่เตรียมไว้แล้ว ลงในเพลทที่มีเซลล์ โดยเติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มดูดสารละลายออกจากทุกหลุมแทนที่ด้วยสารละลาย Neutral red medium ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่ออีก 3 ชั่วโมง ดูดสารละลาย Neutral red medium ออกจากทุกหลุม และล้างสีด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติม Neutral red destain solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่าเพลทเบาๆ นานประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540.10 นาโนเมตร บันทึกข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องอ่าน คำนวณเทียบร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) กับกลุ่มควบคุมอาหารเลี้ยงเซลล์เจือจางสารทดสอบ (Vehicle control) คำนวณหา LD50 พิจารณาปริมาณที่ใช้ในสัตว์ทดลอง จากความสัมพันธ์ IC50-LD50 relationship ด้วยสมการ

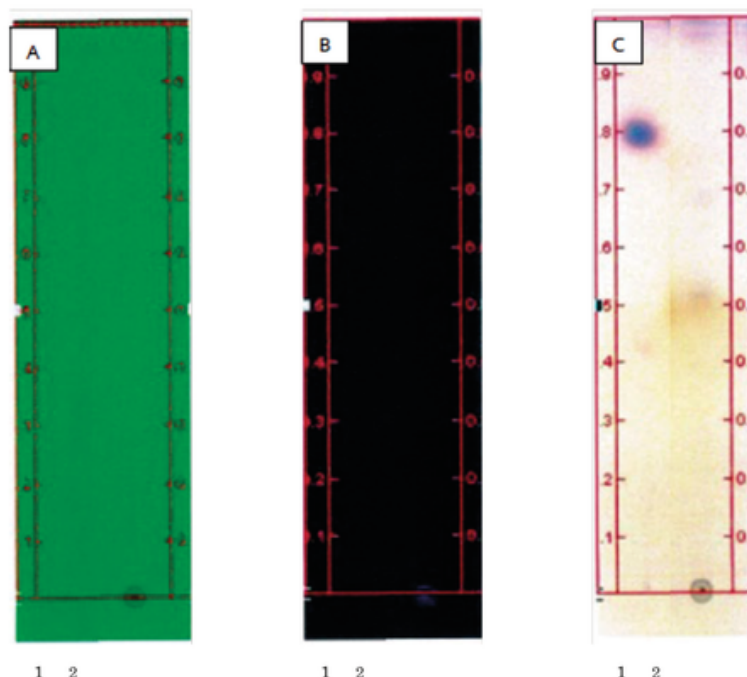
$$\log LD50 \text{ (mg/kg)} = 0.372 \log IC50 \text{ (.g/mL)} + 2.024$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลผลการศึกษาร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) คำนวณด้วยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) โดยการวัดการกระจาย ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)

ผลการวิจัย

1. เอกลักษณะทางเคมีของยาตำรับห้าราก



ภาพที่ 1 ผลพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางด้วยเมทานอล (1) สารมาตรฐาน β -eudesmol (2) สารสกัดด้วยเมทานอลจากผงตำรับยาห้าราก โดยใช้ n-hexane : acetone : Ethyl acetate ในอัตราส่วน 70:20:5 เป็นน้ำยาแยก โดยมีการตรวจสอบด้วย (A) รังสีเหนือม่วงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (B) รังสีเหนือม่วงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และ (C) น้ำยาทดสอบแอนซิลดีไฮด์-กรดกำมะถัน

2. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง SV-80, และ HEK-293 เท่ากับ $3,406.27 \pm 150.18$, Chang-Liver และ HEK-293 (ภาพที่ 2) ด้วย $2,527.40 \pm 68.41$ และ 757.06 ± 57.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

สารสกัด Y5R มีค่ายับยั้งการเจริญเติบโต ร้อยละ 50 (IC_{50}) ในเซลล์ SV-80, Chang-Liver

ตารางที่ 1 ค่า IC_{50} ($\mu g/ml$) ของสารสกัด Y5R และ Doxorubicin ในเซลล์ SV-80, Chang liver และ HEK-293

ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	Y5R	Doxorubicin
SV-80	$3,406.27 \pm 150.18$	0.51 ± 0.01
Chang-liver	$2,527.40 \pm 68.41$	0.46 ± 0.00
HEK-293	757.06 ± 57.46	0.08 ± 0.02

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ทำการทดสอบ 3 ครั้ง)

2. ศึกษาความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c 3T3 (ภาพที่ 3) ตาม OECD Test Guideline 129 ด้วย 3T3 NRU assay

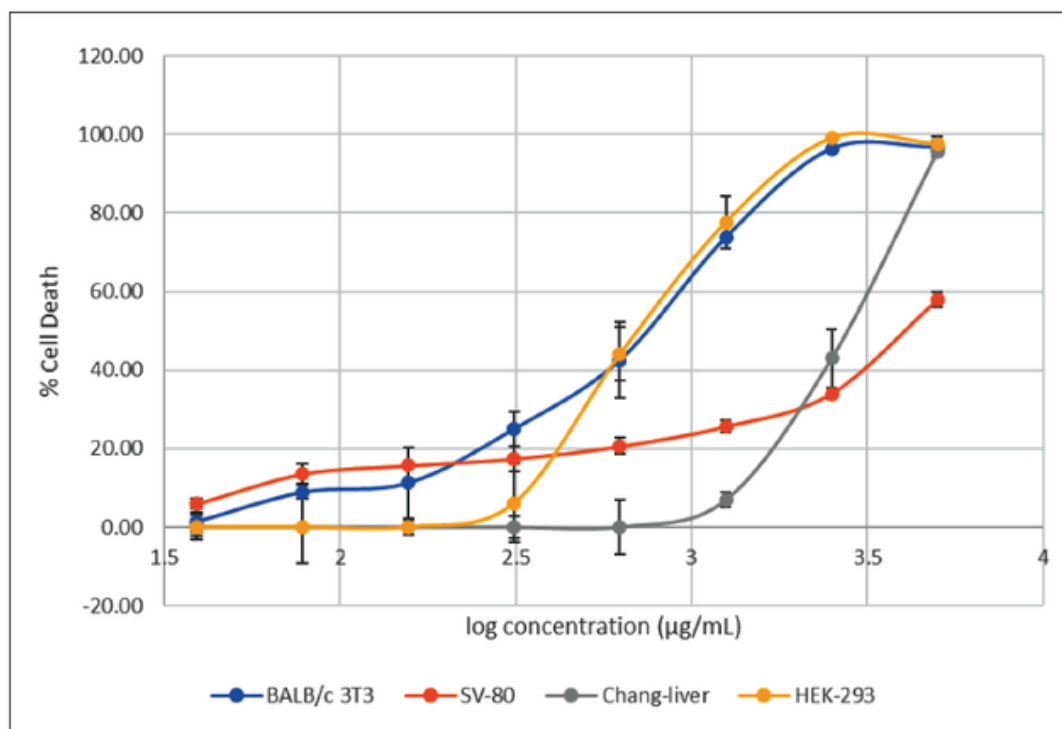
สารสกัด Y5R มีค่ายับยั้งการเจริญเติบโต ร้อยละ 50 (IC_{50}) ในเซลล์ BALB/c 3T3 เท่ากับ

$1,181.00 \pm 84.85$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าที่ได้คำนวณหาค่าประมาณของค่า LD_{50} ได้เท่ากับ $1,468.22 \pm 39.48$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), LD_{50} ที่ได้จากการคำนวณ IC_{50} - LD_{50} relationship (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และขนาดทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัด Y5R

สารทดสอบ	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	LD_{50} (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ขนาดแนะนำเริ่มต้นสำหรับ ทดสอบพิษเฉียบพลัน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
Y5R	$1,181.00 \pm 84.85$	$1,468.22 \pm 39.48$	300
Doxorubicin	0.21 ± 0.00		

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ทำการทดสอบ 3 ครั้ง)



ภาพที่ 1 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารสกัด Y5R เมื่อสัมผัสกับเซลล์ BALB/c 3T3, SV-80, Chang-liver และ HEK-293 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

วิจารณ์

ยาตำรับสมุนไพรในประเทศไทย เป็นยาที่ประกอบด้วยสมุนไพรหลายชนิด นำมาผสมผสานกันตามสัดส่วนที่กำหนดไว้ล่วงหน้า มีทั้งยาตำรับที่สืบทอดกันมาแต่

โบราณ และยาตำรับที่คิดค้นขึ้นใหม่โดยภูมิปัญญาท้องถิ่นเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีค่าควรแก่การอนุรักษ์และส่งเสริม ยาตำรับสมุนไพรหลายชนิดมีสรรพคุณทางยาที่ได้รับการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์ หาซื้อได้ง่าย

ราคาไม่แพง มีจำหน่ายทั้งในร้านขายยาแผนโบราณ ร้านสะดวกซื้อ และห้างสรรพสินค้า ซึ่งการส่งเสริมการพัฒนายาตำรับสมุนไพร เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดความเสี่ยงจากผลข้างเคียงการใช้ยาแผนปัจจุบัน ลดการนำเข้ายาแผนปัจจุบัน และช่วยเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์สมุนไพรในประเทศ รวมถึงยังส่งเสริมให้ประเทศมีศักยภาพแข่งขันทางการค้าเพิ่มขึ้นในตลาดโลก แต่กระบวนการในการส่งเสริมการใช้ยาตำรับจากสมุนไพรนั้นถึงแม้ว่าจะมีประวัติการใช้มาอย่างยาวนานแต่ก็ต้องผ่านกระบวนการศึกษาความปลอดภัยตามหลักการวิทยาศาสตร์เพื่อให้ได้ข้อมูลความปลอดภัยของยาตำรับสมุนไพรเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ซึ่งการศึกษาพิษของยาตำรับสมุนไพรในเซลล์เพาะเลี้ยงนับว่าเป็นการศึกษาขั้นต้น สอดคล้องหลัก 3Rs เพื่อให้ได้ข้อมูลความปลอดภัยของยาตำรับสมุนไพรเบื้องต้นที่สามารถนำไปใช้คุ้มครองผู้บริโภค และสามารถนำไปเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สมุนไพรในการดูแลสุขภาพของประชาชนได้อีกด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้จัดทำโครงการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากยาตำรับห้าราก โดยดำเนินการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงจากผลการทดลองพบว่า สารสกัดยาตำรับห้ารากที่ศึกษาความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปกติด้วย MTT assay เพื่อเฝ้าระวังอันตรายที่อาจเกิดขึ้นต่ออวัยวะสำคัญแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ไต (HEK-293) มากกว่าเซลล์ปอด (SV-80) และเซลล์ตับ (Chang-Liver) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับความเป็นพิษของสาร Doxorubicin ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดหรือยารักษามะเร็งที่ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง⁽⁷⁾ พบว่ายาตำรับห้ารากค่อนข้างมีความเป็นพิษน้อยมาก และเมื่อพิจารณาผลการศึกษาความเป็นพิษตาม OECD TG 129 เพื่อประเมินความปลอดภัยเบื้องต้น พบว่า สารสกัดยาห้ารากมีความเป็นพิษต่ำ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Singharachai และคณะ ที่พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบในตำรับส่วนใหญ่มีความเป็นพิษต่อไรทะเล (*Artemia salina* L.) ในระดับต่ำ⁽⁵⁾ แต่อย่างไรก็ตามควรระมัดระวังในการซื้อเพื่อรับประทาน

ด้วยตนเอง สำหรับผู้ป่วยที่ต้องสงสัยว่าเป็นไข้เลือดออกไม่ควรรับประทานยาตำรับห้ารากเนื่องจากฤทธิ์ยาอาจจะบดบังอาการของไข้เลือดออกได้ และหากมีการใช้ยาตำรับห้ารากติดต่อกันเป็นเวลาเกินกว่า 3 วันแล้วอาการไม่ดีขึ้น ควรปรึกษาแพทย์ นอกจากนี้ไม่นแนะนำให้ใช้ในหญิงที่มีไข้หวัดหรือไข้ระหว่างมีประจำเดือน⁽⁶⁾

สรุป

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดยาตำรับห้ารากด้วยน้ำต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปกติ 4 เซลล์ ได้แก่ เซลล์ปอด (SV-80), เซลล์ตับ (Chang-liver) และเซลล์ไต (HEK-293) พบว่า สารสกัดยาตำรับห้ารากมีค่ายับยั้งการเจริญเติบโตร้อยละ 50 (IC₅₀) ต่อเซลล์ไตต่ำที่สุด นับว่ามีความเป็นพิษสูงที่สุด รองลงมาเซลล์ตับ และเซลล์ปอด ส่วนในเซลล์ BALB/c 3T3 พบว่า สารสกัดยาตำรับห้ารากมีความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/c 3T3 ในระดับที่ต่ำ ขนาดแนะนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลการทดลอง การใช้ยาตำรับห้ารากมีความเป็นพิษเกิดขึ้นสูงในเซลล์ไต ฉะนั้นในการใช้ยาตำรับห้ารากเพื่อบรรเทาอาการไข้หรือกระทั่งพิษไข้ ถึงแม้จะเป็นยาที่มีประวัติการใช้มาอย่างยาวนานและค่อนข้างมีอันตรายต่ำ อย่างไรก็ตามไม่ควรใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน และควรใช้โดยปฏิบัติตามข้อควรระวังตามที่ระบุในบัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร พ.ศ. 2566

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการโรงงานต้นแบบผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการจัดเตรียมสารสกัด และศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพรในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สถาบันวิจัยสมุนไพรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- (1) กองการประกอบโรคศิลปะ. ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม.สำนักงานปลัดกระทรวง สาธารณสุข นนทบุรี; 2542a.
- (2) กองการประกอบโรคศิลปะ. ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไปสาขาเวชกรรม เล่ม 1. สำนักงานปลัดกระทรวง สาธารณสุข นนทบุรี; 2542b.
- (3) บุษบาประภาสพงศ์.แพทยศาสตร์ สงเคราะห์:ภูมิปัญญาทางการแพทย์ และมรดกทางวรรณกรรมของชาติ. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร; 2542.
- (4) Jongchanapong A, Singharachai C, Palanuvej C, Ruangrunsi N, Towiwat P. Antipyretic and antinociceptive effects of Ben-cha-lo-ka-wi-chian remedy. J Health Res. 2010; 24(1): 15-22.
- (5) Singharachai C, Palanuvej C, Kiyohara H. Yamada H, Ruangrunsi N. Safety evaluation of Thai traditional medicine remedy: Ben-cha-lo-ka-wi-chian. J Health Res. 2011; 25(2): 83-90.
- (6) กองผลิตภัณฑ์สมุนไพร. บัญชียาหลักแห่งชาติ ด้านสมุนไพร พ.ศ. 2566: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2566.
- (7) เลอศักดิ์ ประจวบอารีย์ และ สาวิตรี เกตุเฒ. การศึกษาอ่อนหลังความเป็นพิษต่อหัวใจจากยาด็อกโซลูบิซินในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในโรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรี. ว. เภสัชศาสตร์อีสาน. 2564; 17(2): 68-79.

Cytotoxicity study of aqueous extract of Ya-Ha-Rak remedy

Pornchai Sincharoenpokai¹, Tiyanee Sahad¹, Nathaphat Harnkit¹, Phatipan Primprai¹, Somchit Niumsukul¹, Kaisee Limprasert², Siriwan Chaisomboonpan¹ and Phichet Banyati¹

¹ Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang, Nonthaburi 11000, Thailand.

² 238/34 Udon Dutsadi Rd, Mak Khaeng Subdistrict, Mueang District, Udon Thani 41000, Thailand.

Abstract Ya-Ha-Rak is a Thai herbal medicine that has gained significant attention from both the general public and researchers during the COVID-19 pandemic. In Thailand, the use of herbs or herbal remedies to alleviate symptoms caused by viral infections, such as fever, has been promoted. This study aimed to investigate the cytotoxicity of the water extract of the Ya-Ha-Rak (Y5R) in SV-80, Chang-Liver, and HEK-293 cultured cells using the MTT assay. Additionally, the cytotoxicity in BALB/c 3T3 cultured cells was assessed using the 3T3 NRU assay (OECD TG 129). The study showed that the water extract of the Y5R exhibited low cytotoxicity in all three cultured cell lines. Consistent with the OECD TG 129 guidelines, the Y5R extract was classified as having low toxicity. Therefore, the Y5R could potentially be used as an alternative treatment option in addition to modern medicine.

Keywords: Ya-Ha-Rak remedy, MTT assay, OECD TG 129