



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการวิจัยเรื่อง

นวัตกรรมการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของตำรับยาสมุนไพรอายุวัฒนะ  
เพื่อการดูแลสุขภาพผู้สูงอายุในประเทศไทย

The Innovation of Bioactivities Study of  
Longevity Medicinal Plants Recipes for The Elder Health  
Care in Thailand

สนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัย

กองทุนภูมิปัญญาแพทย์แผนไทย

กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

กระทรวงสาธารณสุข

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.นพ. ธวัชชัย กมลธรรม (หัวหน้าโครงการวิจัย)

และคณะ

## บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ได้คัดเลือกตำรับยาสมุนไพรเกี่ยวกับอายุวัฒนะจำนวน 2 ตำรับ ซึ่งมีที่มาจากตำรายาเกร็ดจำนวน 1 ตำรับ และจากหนังสือเวชศึกษาของพระยาพิศณุประสาทรเวทจำนวน 1 ตำรับ มาเตรียมเป็นสารสกัดสมุนไพรแบบผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะตำรับที่ 1 และ 2 โดยวิธีการสกัดเย็นด้วย 75% เอทานอลและวิธีการสกัดร้อนด้วยน้ำ จากผลการเตรียมสารสกัดพบว่า สารสกัดส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นของแข็ง จับตัวกันเป็นก้อน สีน้ำตาลและมีกลิ่นเฉพาะตัว มีเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (%yield) อยู่ในช่วง 6.10-9.16% w/w เมื่อนำสารสกัดสมุนไพรที่เตรียมได้ไปทดสอบหาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่มีสารพฤกษเคมีประเภท Triterpenes เป็นองค์ประกอบ จากนั้นนำสารสกัดสมุนไพรแบบผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะตำรับที่ 1 และ 2 โดยวิธีการสกัดเย็นด้วย 75% เอทานอลและวิธีการสกัดร้อนด้วยน้ำไปทดสอบฤทธิ์ชะลอวัยโดยศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้าง DNA ที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ telomerase พบว่าสารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 2 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น และสารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 2 ซึ่งสกัดด้วยน้ำแบบร้อน มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้าง DNA ที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ telomerase โดยมีเปอร์เซ็นต์การกระตุ้นการสร้าง DNA เท่ากับ  $104.14 \pm 4.60$ ,  $101.67 \pm 2.06$  และ  $100.19 \pm 2.67$  % ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ จากนั้นได้นำสารสกัดสมุนไพรแบบผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะตำรับที่ 1 และ 2 โดยวิธีการสกัดเย็นด้วย 75% เอทานอลและวิธีการสกัดร้อนด้วยน้ำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง พบว่าสารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วยน้ำแบบร้อน และสารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 2 ซึ่งสกัดด้วยน้ำแบบร้อน มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วยน้ำแบบร้อน มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวิธี NBT สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วยน้ำแบบร้อน สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น และสารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 2 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น และสารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 2 ซึ่งสกัดด้วยน้ำแบบร้อน มีฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH คิดเป็น 0.08, 0.02, 0.17 และ 0.07 เท่าของวิตามินซี ตามลำดับ สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วยน้ำแบบร้อน สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 2 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น และสารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 2 ซึ่งสกัดด้วยน้ำแบบร้อน มีฤทธิ์จับโลหะหนักเล็กน้อย สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น

สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 2 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น และ สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 2 ซึ่งสกัดด้วยน้ำแบบร้อน มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยา ออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว คิดเป็น 0.07, 0.05 และ 0.003 เท่าของวิตามินอี ตามลำดับ สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วยน้ำแบบร้อน สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 2 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น และสารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 2 ซึ่งสกัดด้วยน้ำแบบร้อน มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีความแรงคิดเป็น 0.02, 0.00002, 0.13 และ 0.01 เท่า ของกรดโคจิก ตามลำดับ คณะผู้วิจัยได้คัดเลือกสารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น ซึ่งมีคะแนนรวมสูงสุด (900 คะแนน) สำหรับนำไปควบคุมคุณภาพสารสกัด โดยได้จัดทำ HPLC finger print สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็นโดยใช้สารมาตรฐาน piperine และ quercetin เป็น marker เนื่องจาก piperine เป็นสารสำคัญที่พบในพริกไทย และ quercetin เป็นสารสำคัญที่พบในแห้วหมู กระชาย และบอระเพ็ด ซึ่งเป็นสมุนไพรองค์ประกอบที่ในตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 โดยมีปริมาณ piperine และ quercetin คิดเป็น  $0.8578 \pm 0.1588$  และ  $0.0412 \pm 0.0082$  mg ต่อน้ำหนักตัวอย่าง 100 mg ตามลำดับ นอกจากนี้ได้นำสารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็นไปทดสอบการละลายและความคงตัวทางเคมี พบว่า สารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็น สามารถละลายได้เล็กน้อย (slightly soluble) ในน้ำเย็น ละลายได้เล็กน้อยมาก (very slightly soluble) ในน้ำร้อน และเมทานอล แต่ไม่ละลาย (practically insoluble) ในเอทานอล, กลีเซอริน, โพรพิลีนไกลคอลและ มิเนอรัลออยล์ และสารสกัดดังกล่าวมีความคงตัวต่อกรดแก่ (10% HCl), กรดอ่อน (10% CH<sub>3</sub>COOH), เบสอ่อน (10% NH<sub>4</sub>OH), สารออกซิไดซ์ (10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) และเกลือของกรดอ่อน (10% CH<sub>3</sub>COONa) แต่ไม่มีความคงตัวต่อเบสแก่ (10% NaOH) และ สารรีดิวซ์ (10% FeCl<sub>3</sub>) จากผลงานวิจัยที่ได้ สามารถจัดทำ specification ของสารสกัดสมุนไพรผสมจากตำรับยาอายุวัฒนะ ตำรับที่ 1 ซึ่งสกัดด้วย 75% เอทานอลแบบเย็นเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพสำหรับผู้สูงอายุต่อไป

## Abstract

The 2 Thai medicinal plant longevity recipes were selected from Thai medicinal plant recipe textbooks named “Ya Kret” and “Vet Suk Sa Phra Ya Phit Sa Nu Pra Sat Vet”. The 2 Thai medicinal plant longevity recipes were extracted by maceration with 75 % ethanol and boiling with water. Most extracts were brown solid with specific odor. The percentages yields of the 4 recipe extracts were in the range of 6.10-9.16 % w/w. Phytochemicals of these 4 recipe extracts were performed in order to establish their specifications. Triterpenes were the most abundant found in the 4 recipe extracts. Longevity effect by enhancement telomerase activity of the 4 recipe extracts was investigated. The extract of recipe No. 1 prepared by maceration with 75 % ethanol and the extract of recipe No. 2 prepared by maceration with 75 % ethanol and boiling with water showed longevity effect by enhancement telomerase activity with the percentage of  $104.14 \pm 4.60$ ,  $101.67 \pm 2.06$  and  $100.19 \pm 2.67$  of the control, respectively. However, the 4 recipe extracts were investigated for other biological activities. The extract of recipe No. 1 prepared by maceration with 75 % ethanol and boiling with water and the extract of recipe No. 2 prepared by maceration with 75 % ethanol exhibited immunomodulatory activity in macrophage (RAW 264.7). Moreover, the extract of recipe No. 1 prepared by boiling with water demonstrated immunomodulatory activity in NBT test. For anti-oxidative activities, the extract of recipe No. 1 prepared by maceration with 75 % ethanol and boiling with water and the extract of recipe No. 2 prepared by maceration with 75 % ethanol and boiling with water showed free radical scavenging activity with the potency of 0.08, 0.02, 0.17 and 0.07 fold of ascorbic acid, respectively. The 4 recipe extracts exhibited little metal chelating activity. The extract of recipe No. 1 prepared by maceration with 75 % ethanol and the extract of recipe No. 2 prepared by maceration with 75 % ethanol and boiling with water demonstrated lipid peroxidation inhibitory activity with the potency of 0.07, 0.05 and 0.003 fold of vitamin E, respectively. Besides, the extract of recipe No. 1 prepared by maceration with 75 % ethanol and boiling with water and the extract of recipe No. 2 prepared by maceration with 75 % ethanol and boiling with water showed tyrosinase inhibitory activity with the potency of 0.02, 0.00002, 0.13 and 0.01 fold of kojic acid, respectively. The extract of recipe No. 1 prepared by maceration with 75 % ethanol which gave the highest biological activity

scores of 900 points was selected for quality control. HPLC fingerprint of the extract of recipe No. 1 prepared by maceration with 75 % ethanol was performed in order to standardize and establish its specification. Since, piperine was active constituent of *Piper nigrum* and quercetin were active constituents of *Cyperus rotundus*, *Boesenbergia rotunda* and *Tinospora crispa* which were medicinal plants in the recipe. The HPLC fingerprint of the extract of recipe No. 1 prepared by maceration with 75 % ethanol was constructed by using piperine and quercetin as the markers. The piperine and quercetin contents were  $0.8578 \pm 0.1588$  and  $0.0412 \pm 0.0082$  mg/ 100 mg sample, respectively. In addition, the extract of recipe No. 1 prepared by maceration with 75 % ethanol was investigated for solubility and chemical stability. The extract of recipe No. 1 prepared by maceration with 75 % ethanol was slightly soluble in cold water, very slightly soluble in hot water and methanol and practically insoluble in ethanol, glycerin, propylene glycol and mineral oil. The extract was stable in strong acid (10% HCl), weak acid (10% CH<sub>3</sub>COOH), weak base (10% NH<sub>4</sub>OH), oxidizing agent (10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and salt (10% CH<sub>3</sub>COONa). Whereas, the extract was unstable in strong base (10% NaOH) and reducing agent (10% FeCl<sub>3</sub>). The specification of the extract of recipe No. 1 prepared by maceration with 75 % ethanol was performed for the further longevity dietary supplement, scientifically established herbal medicine or scientific-based herbal health product for the elder health care.

